

**DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

**DONGÓ ANITA**

**VESZPRÉMI EGYETEM  
GEORGIKON MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR  
KESZTHELY**

2005

VESZPRÉMI EGYETEM  
GEORGIKON MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR  
KESZTHELY

NÖVÉNYTERMESZTÉSI ÉS KERTÉSZETI TUDOMÁNYOK  
DOKTORI ISKOLA

***ALTERNARIA* FAJOK ÖSSZEHASONLÍTÓ  
ELEMZÉSE**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

KÉSZÍTETTE:

**DONGÓ ANITA**  
okleveles gazdasági-agrármérnök

TÉMAVEZETŐ:

**Dr. habil. FISCHL GÉZA**  
egyetemi tanár,  
a mezőgazdasági tudományok kandidátusa

Keszthely  
2005.

# ALTERNARIA FAJOK ÖSSZEHASONLÍTÓ ELEMZÉSE

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:  
Dongó Anita

Készült a Veszprémi Egyetem Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok Doktori Iskolája keretében.

Témavezető: Dr. habil. Fischl Géza

Elfogadásra javaslom ( igen / nem )

.....  
(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton ..... %-ot ért el.  
Keszthely, 2005. szeptember 21.

.....  
a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javasolom:

Bíráló neve: ..... igen / nem

.....  
(aláírás)

Bíráló neve: ..... igen / nem

.....  
(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján ..... %-ot ért el.

Keszthely,

.....  
a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése .....

.....  
az EDT elnöke

# Tartalomjegyzék

<b>1. Kivonatok</b>	<b>6</b>
1.1. Magyar nyelvű kivonat	6
1.2. Angol nyelvű kivonat – Abstract: Comparative analysis of <i>Alternaria</i> species	7
1.3. Francia nyelvű kivonat – Extrait: Analyse comparative des espèces d' <i>Alternaria</i>	8
<b>2. Bevezetés</b>	<b>9</b>
2.1. Célkitűzés	11
<b>3. Irodalmi áttekintés</b>	<b>12</b>
3.1. Az <i>Alternaria</i> -k előfordulása	12
3.2. Fontosabb alternáriás betegségek tünettana	14
3.3. Az <i>Alternaria brassicicola</i> faj kiemelt jelentősége	16
3.4. A hazai <i>Alternaria</i> kutatás helyzete	17
3.5. Az <i>Alternaria</i> nemzetség rendszerezése	20
3.5.1. Rendszertani besorolás	20
3.5.2. Az <i>Alternaria</i> -k rokon nemzetségei	22
3.6. <i>Alternaria</i> izolátumok morfológiai jellemzése	23
3.6.1. A gombák morfológiai változékonysága	23
3.6.2. Csoportosítást megalapozó kutatások	23
3.6.3. Abiotikus tényezők vizsgálata <i>in vitro</i>	26
3.7. Az <i>Alternaria</i> izolátumok molekuláris jellemzése	28
3.7.1. Vizsgálati módszerek áttekintése	28
3.7.2. Rendszerezésre irányuló külföldi eredmények	29
3.7.3. Egyes populációk szerkezetének vizsgálatára irányuló kutatások	33
3.7.4. Molekuláris elemzés mikroszatellit alapú indítószekvenciákkal	35
3.7.4.1. Mikroszatellitek fogalma és vizsgálata	35
3.7.4.2. Különbféle markerezési technikák	36
3.7.4.3. Polimorfizmusok kimutatásának egyik módszere – STMS	37
3.7.4.4. Mikroszatellit <i>primerek</i> alkalmazásának lehetőségei	38
3.7.4.5. Több genomrészlet egyidejű vizsgálata – multiplex PCR	39
3.7.4.6. Mikroszatellit profilok illetve mintázatok kiértékelésének nehézségei	39
<b>4. Anyag és módszer</b>	<b>41</b>
4.1. Vizsgálatok helyszíne	41
4.2. <i>Alternaria</i> izolátumok morfológiai jellemzése	42
4.2.1. Hazai <i>Alternaria</i> izolátumok	42
4.2.2. Referencia izolátumok	43
4.2.3. Tenyésztéshez felhasznált táptalajok	46
4.2.4. Izolálás, monokonídiumos tenyészetek létrehozása és az izolátumok tartósítása	48
4.2.5. Az <i>Alternaria</i> -k meghatározása	49
4.2.6. Mikromorfológiai tulajdonságok vizsgálata fénymikroszkóp segítségével	49
4.2.7. Konídiumlánc képzés vizsgálata	51
4.2.8. Telepmorfológiai jellemzők vizsgálata	51
4.2.9. Hőmérséklet és pH hatásának vizsgálata <i>in vitro</i> a gomba növekedésére és sporulációjára	51

4.3. <i>Alternaria</i> izolátumok molekuláris jellemzése	54
4.3.3. DNS kivonás CTAB használatával	54
4.3.4. RAPD vizsgálat	54
4.3.5. Mitokondriális DNS RFLP vizsgálat	55
4.3.6. A RAPD és mtRFLP vizsgálat adatainak feldolgozása	56
4.3.7. Molekuláris elemzés mikroszatellit alapú indítószekvenciákkal	57
4.3.7.1. Vizsgálatba vont <i>Alternaria brassicicola</i> izolátumok	57
4.3.7.2. Gyors DNS kivonás SDS használatával	59
4.3.7.3. Alkalmazott mikroszatellit indítószekvenciák	59
4.3.7.4. Mikroszatellit allélek felszaporítása multiplex PCR-rel	59
4.3.7.5. Allélek elválasztása poliakrilamid gélelektroforézissel	62
4.3.7.6. Allélek detektálása ezüst-nitrát festéssel	63
4.3.7.7. Mikroszatellit vizsgálat adatainak feldolgozása	63
<b>5. Eredmények</b>	<b>65</b>
5.2. <i>Alternaria</i> izolátumok morfológiai vizsgálatának eredményei	65
5.2.3. Mikromorfológiai tulajdonságok	65
5.2.4. Sporuláció típusok vizes-agaron	66
5.2.5. Telepmorfológiai jellemzők	69
5.2.6. Hőmérséklet és pH hatása <i>in vitro</i> a növekedésre és sporulációra	70
5.3. <i>Alternaria</i> izolátumok molekuláris vizsgálatának eredményei	78
5.3.3. RAPD vizsgálat eredményei	78
5.3.4. Mitokondriális DNS RFLP elemzése	81
5.3.5. Az <i>Alternaria brassicicola</i> faj mikroszatellit profiljának jellemzése	85
5.3.5.1. Alpopulációk genetikai diverzitása	87
5.3.5.2. Genotípusok klaszteranalízise	89
5.3.5.3. A kórokozó diagnosztizálása mikroszatellit típusú specifikus markerekkel	91
<b>6. Következtetés</b>	<b>92</b>
6.2. Morfológiai vizsgálatok eredményeinek megvitatása	92
6.2.3. Mikromorfológiai tulajdonságok	93
6.2.4. Sporuláció típusok	93
6.2.5. Telepmorfológiai jellemzők	94
6.2.6. <i>In vitro</i> vizsgálatok eredményeiből levont következtetések	95
6.3. Molekuláris vizsgálatok eredményeinek megvitatása	95
6.3.3. RAPD mintázatok	96
6.3.4. Mitokondriális DNS RFLP mintázatok	97
6.3.5. Mikroszatellit genotípusok	100
<b>7. Összefoglalás</b>	<b>102</b>
<b>8. Új tudományos eredmények</b>	<b>104</b>
8.2. Új tudományos eredmények magyar nyelven	104
8.3. Új tudományos eredmények angol nyelven - New scientific results	105
<b>9. Köszönetnyilvánítás</b>	<b>106</b>
<b>10. Irodalomjegyzék</b>	<b>107</b>

## 1. Kivonatok

### 1.1. Magyar nyelvű kivonat

A kutatómunka során foglalkoztunk az *Alternaria* nemzetségbe tartozó izolátumaink morfológiai tulajdonságával, genetikai azonosításával és az *A. brassicicola* faj populáció-szerkezetének vizsgálatával.

A morfológiai tulajdonságok közül megvizsgáltuk a mikromorfológiai tulajdonságokat, konídiumlánc képzést valamint a tenyészetek morfológiai tulajdonságait. A mikromorfológiai tulajdonságok rendkívül heterogén képet mutattak. Sporuláció vizsgálat céljából vizes-agart használtunk, melyen kimutattuk a különféle kisspórás *Alternaria*-kra jellemző konídiumképzés típusokat. Konídiumlánc struktúra alapján kisspórás fajcsoportokba soroltuk a hazai, ismeretlen azonosságú izolátumainkat. Megállapítottuk, hogy a telepmorfológiai bélyegek az egyes izolátumok elkülönítése szempontjából jelentős segítséget nyújtanak, azonban az izolátumok rendszerezése céljából önmagában nem használhatók. *In vitro* kísérletek során vizsgáltuk az egyes fajcsoportok micéliumnövekedés és sporuláció intenzitásának válaszreakcióit 5-35°C hőmérséklet és 4-11 pH tartományban. Az *in vitro* kísérletek közül a hőmérséklet és a pH hatásának vizsgálata hozott új eredményeket a sporuláció intenzitásának szempontjából. Kísérleti úton megállapítottuk, hogy az egyes *Alternaria* fajcsoportokat képviselő izolátumok milyen intenzitással sporulálnak a hőmérséklet és pH függvényében.

RAPD vizsgálattal molekuláris szinten azonosítottuk a hazai izolátumok fajcsoportjait és egyben megerősítettük az izolátumok morfológiai alapon tett fajcsoportba sorolásának státuszát. A mitokondriális DNS RFLP elemzést alkalmaztunk különféle kisspórás *Alternaria* izolátumok azonosítása céljából. A vizsgált négy restriktív enzim közül, a *Hin* 6I enzimmel lehetett a legtöbb és legpolimorfabb markereket előállítani. Az mtDNS RFLP vizsgálat során öt mitokondriális haplotípust határoztunk meg. A feltárt különbségek alapján a módszert alkalmasnak találtuk a kisspórás *Alternaria* fajcsoportok elkülönítése szempontjából. Az *A. brassicicola* izolátumok populáció-szerkezetének vizsgálata céljából specifikusan kifejlesztett mikroszatellit indítószekvenciákat az *Alternaria* fajokra elsőként alkalmaztunk. Populáció-genetikai módszerekkel az izolátumok szegregált alpopulációkra való tagolódását nem lehetett igazolni. Az elemzéssel nagyfokú genetikai sokszínűséget tártunk fel.

## 1.2. Angol nyelvű kivonat – Abstract: Comparative analysis of *Alternaria* species

In this dissertation, the author investigated morphological features and molecular identification of isolates of the *Alternaria* genus and the population structure of *A. brassicicola*.

Among the morphological features, micromorphological attributes, conidia-chain formation and culture morphological characters have been examined. The micromorphological attributes presented extremely heterogen aspect. The sporulation was examined on water-agar surface, in which the different small-spored *Alternaria* conidial chain formation was proved to be typical. Based on this experiment, the Hungarian unidentified isolates was grouped into species-groups respectively. The examined culture morphological features constituted a special mean to discriminate each isolate, but they were not able to use alone for classification purposes. *In vitro* experiments was involved to assess mycelial radial growth and sporulation responses of different species groups for the effect of temperature (5-35°C) and pH (4-11 pH). Among these experiments, the temperature and pH effects were proved to bring new results concerning the evaluation of sporulation intensity respectively. The intensity of representative isolates of *Alternaria* species-groups was determined in function of temperature and pH effects.

Molecular identification of species-group respectively the Hungarian isolates was determined by RAPD analysis, in the same time, it was confirmed that the species-groups segregated on morphological characters was similar to the ones segregated by RAPD analysis on molecular level. The different small spored isolates were subjected to mitochondrial DNA RFLP analysis to further identify the isolates. Among the examined four restriction enzymes, the *Hin* 6I enzyme supplied the most and best discriminative markers. In the mtDNA RFLP analysis, five haplotypes were resolved. The analysis confirmed to be suitable to discriminate the small spored *Alternaria* species-groups.

To analyse the population structure of *A. brassicicola* isolates, previously developed specific microsatellite primers were used for the first time in the genus *Alternaria*. Using population genetic methods the segregation of sub-populations could not be verified. Based on cluster analysis of SSR data, a great genotypic diversity was evident.

### 1.3. Francia nyelvű kivonat – Extrait: Analyse comparative des espèces d'*Alternaria*

Dans cette thèse, l'auteur a étudié les différents caractères de morphologie et les identifications génétiques des isolats du genre d'*Alternaria* et la structure de population des espèces de *A. brassicicola*.

Parmi les caractères morphologiques: les variations micromorphologiques, la formation de chaîne de conidie et les caractères de colonie ont été examinés. Les attributs micromorphologiques avaient présenté extrême hétérogénéité. La sporulation a été examinée sur milieu d'eau-agar, dans laquelle la formation de chaînes de conidie a été prouvée à discriminer les chaînes caractéristiques pour chaque groupe d'espèce. Basé sur cette expérience, les isolats de Hongrie non identifiés ont été groupés dans différents groupes d'espèce respectivement. Les caractères de culture examinés ont constitué un moyen spécial pour distinguer chaque isolat, mais ils ne pouvaient pas être utilisés tout seuls pour un but de classification. Des essais *in vitro* ont été évalués pour analyser les réponses de croissance mycéliennes et de sporulation de différents groupes d'espèce contre l'effet de la température (5-35°C) et de pH (4-11 pH). Parmi ces expériences, on s'est avéré que l'effet de température et de pH apportent de nouveaux résultats concernant l'évaluation de l'intensité de sporulation respectivement. Cette intensité a été déterminée dans la fonction de la température et pH.

L'identification moléculaire des groupes sous-génériques concernant les isolats de Hongrie a été déterminée par analyse de RAPD, en même temps, la ségrégation des groupes sous-génériques basée sur les caractères morphologiques a été confirmée au niveau moléculaire. Les différents petits spores isolats ont été soumis à l'analyse mitochondriale d'ADN RFLP pour identifier plus loin les isolats. Parmi les quatre enzymes de restriction examinées, l'enzyme de *Hin 6I* a fourni les plus nombreux et les plus discriminatifs marqueurs. Dans l'analyse du mtDNA RFLP, sept haplotypes ont été résolus. L'analyse a confirmé d'être convenable pour distinguer les différents petits spores groupes d'espèce d'*Alternaria*. Pour analyser la structure de population des isolats *A. brassicicola*, spécifiques marqueurs microsatellites développés précédemment ont été employés pour la première fois chez les *Alternaria*. En utilisant des méthodes de population génétiques, on n'a pas pu vérifier la ségrégation des sous-populations. Basé sur l'analyse de cluster des données de SSR, une diversité génotypique était évidente.



## 2. Bevezetés

Az *Alternaria* nemzetség fajai széles körben elterjedtek. A fajok jelentős része kozmopolita. Szaprotróf tevékenységük kapcsán gyakran, minden elhalt növényi részen előfordulnak. Egy részük nekrotróf parazita életmódot folytat és néhány faj valódi, gazdanövény specifikus parazitaként okoz növényi betegségeket.

Magyarországon az *Alternaria* fajok rendszerezésével kapcsolatban viszonylag kevés, elavult ismeretekkel rendelkezünk, ami indokolja a téma több irányú feldolgozását, részben klasszikus mikológiai, részben újszerű vizsgálati módszerek alkalmazásával.

Jelen kutatómunka illeszkedik az *Alternaria* nemzetség gombáinak változékonyságát tanulmányozó munkák sorába. A nemzetség jelenleg több mint 100 fajt foglal magába. Ezek között megtalálhatók gazdanövényt specifikus kisspórás és nagyspórás fajok egyaránt. A kisspórás *Alternaria* fajok részben gazdanövényt specifikusak és morfológiai jellemzőik alapján nagy hasonlóságot mutatnak, így az elkülönítésük a morfológiai jellemzőik alapján nehézségekbe ütközik. Ezzel ellentétben a nagyspórás *Alternaria* fajok mindegyike gazdanövény specifikus és ennek köszönhetően az elkülönítésük nem okoz különösebb nehézséget. A morfológiai diverzitásuk miatt a múltbeli és jelenlegi külföldi szakirodalom túlnyomórészt a kisspórás *Alternaria* fajok elkülönítésének problémáival foglalkozik és csak elvétve lelhetők fel szakirodalmi forrásmunkák, amelyek a nagyspórás *Alternaria* fajok kutatására vonatkoznak.

A kórokozók tipikusan foltosodás típusú betegségeket idéznek elő kultúrnövényeinken. A patogén fajok a csíranövények különböző károsodását okozzák, és ebben a fenológiai stádiumban kifejezetten jelentős lehet az *Alternaria* kórokozók megjelenése. Ilyen pl. az *A. brassicicola* és az *A. brassicae* káposztán, az *A. dauci* répán, az *A. helianthi* napraforgón vagy az *A. raphani* retken. Az *A. brassicicola* a keresztesvirágú növények foltosodás típusú betegségét idézi elő, mely a termesztett *Brassica* fajok legsúlyosabb betegségét jelenti. Kutatómunkánk során e faj populáció-szerkezetének vizsgálatát kiemelten kezeltük.

Az *Alternaria* nemzetség kutatása nemzetközi viszonylatban az utóbbi két évtizedben újonnan előtérbe került, ugyanis kiderült róluk, hogy kapcsolatba hozhatók az élelmiszerek mikotoxin szennyezésével, allergiával, asztmával.

A gomba sötét színű porokonídiuma és konídiumtartója az UV sugárzás felső tartományának, azaz az UV-A sugárzásnak ellenáll. A világviszonylatban növekvő UV sugárzás, vagyis a Föld UV sugárzás terhelése, nem pusztítja el az *Alternaria* nemzetség kórokozóit, sőt egyes vizsgálatok szerint reprodukciós készségét fokozza.

Így ezen növénypatogén szervezetek tulajdonságainak megismerése, ökológiai igénye különösen jelentőssé vált. Magyarországon előforduló és károsító *Alternaria* fajokról csupán részleges információkat lehet szerezni. Ezért ahol lehetett, elsősorban hazai izolátumokkal végeztük kísérleteinket.

## 2.1. Célkitűzés

Az *Alternaria* nemzetség taxonómiai összetettségére vonatkozóan ma már korszerű ismeretek állnak rendelkezésre. A morfológiai alapokon végzett rendszerezés újabb eredményekkel gazdagodott, amely a kispórás *Alternaria* fajokat fajcsoportokra osztja. Elsődleges célunk az volt, hogy további adatokkal szolgáljunk a fajok morfológiai és genetikai diverzitásán alapuló elkülönítéséhez. Ennek megfelelően további célkitűzéseink a következők:

- hazai növényekről származó *Alternaria* izolátumok morfológiai különbségeinek vizsgálata és kispórás fajcsoportok morfológiai alapokon történő elkülönítése;
- mikromorfológiai és tenyészetmorfológiai vizsgálatok elvégzése;
- az egyes fajcsoportok növekedésének és sporulációjának tanulmányozása a hőmérséklet és a pH függvényében;
- ismert molekuláris módszerek alkalmazásán keresztül megerősíteni a morfológia vizsgálatok szerint besorolt hazai izolátumok taxonómiai helyzetét;
- a mitokondriális DNS RFLP vizsgálat alkalmazhatóságának kipróbálása az *Alternaria* fajok besorolása céljából;
- az *Alternaria brassicicola* faj populáció-szerkezetének tanulmányozása mikroszatellit analízissel.

### 3. Irodalmi áttekintés

Ez a fejezet a kutatási problémánk szempontjából érdekes három területet öleli fel. Egyrészt, az *Alternaria* nemzetségbe tartozó gombákra vonatkozó ismereteket összegzi. Másrészt, e gombák tanulmányozása céljából alkalmazott főbb markerek előnyeit és korlátait tárgyalja, kifejezett hangsúlyt fektetve a molekuláris markerek alkalmazására. Harmadrészt, hazánkban új, eddig növénykórtani vonatkozásban nem használt, mikroszatellit marker technikát ismerteti.

#### 3.1. Az *Alternaria*-k előfordulása

Az *Alternaria* fajokkal a mikológusok talán a leggyakrabban találkoznak mindennapos munkavégzésük során. Az *Alternaria* nemzetség jelenleg több mint 100 kozmopolita fajt foglal magába, melyek a környezetben széleskörben elterjedtek (JOLY 1964, ELLIS 1971, 1976, SIMMONS 1992). Megtalálható közöttük szaprotróf és patogén szervezetek, amelyek a növényeket és az embereket egyaránt fertőzhetik, részt vesznek különböző szervezetek lebontásában, egyes fajok iparilag is hasznosíthatók, valamint vannak fajok, melyek a biológiai növényvédelemben is ígéretes eszközt jelentenek.

Bizonyos számú faj szaprotróf módon elhalt növényi maradványon is megél (pl. *A. alternata*). Mások opportunisták vagy olyan másodlagos paraziták, melyek szaprotróf módon is képesek megélni (pl. *A. tenuissima*).

Számos faj növénypatogén és jelentős növénybetegségek kórokozója (KOLTE 1985, TEWARI 1991, STRANDBERG 1992, ROTEM 1994, VERMA és SAHARAN 1994). Az *Alternaria* fajok gyakran valamilyen gazdanövény családra vagy gazdanövényre specializálódtak. Jelentős gazdasági károkat idéznek elő a búzán (*A. triticina*), a zöldségnövényeken (*A. cucumerina*, *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. porri*, *A. dauci*), a dohányon (*A. longipes*), a gyümölcsfákon (*A. gaisen*, *A. citri*, *A. mali*).

Az *Alternaria*-k a „magflóra” állandó alkotói, több mint 60 fajt, parazita illetve szaprotróf szervezetet mutattak eddig ki a vetőmagvak felületéről (CHAMPION 1997). A patogén szervezetek a csíranövényeken különböző károsodásokat idéznek elő, felbukkanásuk ebben a fázisban kifejezetten nem kívánatos. Ilyen fajok pl. az *A. brassicicola*, az *A. brassicae* és az *A. raphani* a keresztesvirágú növények, az *A. dauci* a sárgarépa, az *A. linicola* a len, az *A. helianthi* a napraforgó magján, illetve termésén.

A szaprotróf fajok a legkülönbélebb magvakon fordulhatnak elő. Csíranövénykorban kárt általában nem idéznek elő, jelenlétükkel hátráltatják más parazita szervezetek kifejlődését. Kevésbé életképes csíranövényeken, bőséges sporulációjuk révén, zavarhatják a gyököcske kifejlődését, melynek jelentősége fokozódik víz-stresszes állapot esetén (CHAMPION 1997).

A tipikus tünetek klorotizálódott foltosodásként jelennek meg, mely foltok gyakran a leveleken, a száron vagy magán a gyümölcsön idővel nekrotizálódnak és koncentrikus zónázottságot mutatnak. A gazdanövény fotoszintetikus képességének csökkentésével lassú pusztulást okoznak. A kiváltott kórtünetek kevésbé figyelhetők meg a fejlődésben lévő gazdasági növényeken, a tünetek inkább a tenyészidő késői fázisában jelentkeznek (ROTEM 1994). A hozam 20-40%-os csökkentésével járulhatnak hozzá az adott növényfajon előidézett veszteséghez.

Egyes *Alternaria* fajokat a biológiai védekezésben hasznosítanak a gyomnövényekkel vagy növénybetegségekkel szemben. Ide sorolható az *A. eichhorniae* és az *A. cassiae* fajok, melyek mikoherbicid hatásuk révén a szója és a földimogyoró gyomnövényeinek elpusztításában szerepet kaphatnak (SHABANA és mtsai 1995). BÉRES és mtsai (2000) szerint a biológiai növényvédelemben az *A. crassa* faj a *Datura stramonium* ellen, az *A. alternata* az *Amaranthus retroflexus* gyomnövény ellen használható. Ugyanúgy, az *A. alternata* nem patogén izolátumainak spóraszuszpenziója úgy tűnik, hogy dohány növényeken a „tobacco brown spot” néven elterjedt betegség csökkentésében kaphat szerepet (SPURR 1977). Nemrégiben, CHRISTIAS és mtsai (2001) rávilágítottak arra, hogy az *Alternaria* nemzetségbe tartozó egyik kórokozó parazitálja a levéltetveket is, ezt a fajt *A. alternata*-ként azonosították. Úgy tűnik, hogy e faj a dísz- és kultúrnövények levéltetű inváziójával szemben gazdaságosan hasznosítható lesz.

Sok *Alternaria* faj toxintermelő. Az *Alternaria* izolátumok toxintermelése a 60-as évek óta ismert. Néhány faj gazdanövény-specifikus toxinokat, mások nem specifikus toxinokat termelnek. Ma mintegy 30-féle eltérő bioszintézisű és kémiai szerkezetű *Alternaria*-toxint ismerünk. Ezek közül legismertebbek: alternariol, alternariol-monometiléter, tentoxin, alternuen, altenuiszol, tenuazonsav. Legjelentősebb toxintermelő faj az *Alternaria alternata*. A toxintermelést a környezeti tényezők nagymértékben befolyásolják (SZÉCSI 1997).

Régebben a *Dematiaceae* családba sorolt nemzetségek közül (*Cladosporium*, *Alternaria*, stb.) a környezetből rendszeresen izolált gombaelemek legtöbbször potenciálisan veszélyes humán egészségügyi szempontból is. Nevezetesen, humán patológiai vonatkozásban nyolc *Alternaria* fajt tartanak nyilván, ezek közül négy gyakran előfordul a környezetben (*A. tenuissima*, *A. alternata*, *A. chartarum* és *A. chlamydospora*). A levegőben való nagyszámú

előfordulásuk révén bőrbetegségeket, homloküreg-gyulladást és légúti allergiát (asztmát) vagy tüdőgyulladást idézhetnek elő (KOENIG 1995, DOWNS és mtsai 2001).

### 3.2. Fontosabb alternáriás betegségek tünettana

Az *Alternaria*-k által okozott betegségek számos növény esetén a leggyakoribb megbetegedéseket jelentik világviszonylatban. A tünetek elsősorban a leveleken, a száron és a virágon, szántóföldi növények termésén (pl búza magvakon, 1. ábra), zöldség-(4. ábra, 5. ábra) és dísznövények vagy akár fás szárú növények termésén jelennek meg. Az alternáriás megbetegedések gyakran foltosodás vagy nekrózis formájában jelennek meg, de palántadőlést (2. ábra), szár-(3. ábra), gumó és gyümölcs rothadást is okozhatnak. A teljesség igénye nélkül néhány jelentősebb megbetegedést emelnénk ki: burgonya levél- és szárfoltosság (6. ábra), paradicsom bogyófoltosság (4. ábra), sárgarépa levélfoltosság, káposztafélék levélfoltossága (7. ábra), alma és tök levél- és gyümölcsfoltossága, alma magház rothadás, paprika magházpenész.

A foltok általában sötétbarnák vagy feketék, melyek gyakran kiterjedt léziókat képeznek. A foltok rendszerint koncentrikusan zónázottak, amely „cél tábla-szerű” megjelenést kölcsönöz a foltoknak. Az alsó, idősebb leveleket támadják elsőként, de a betegség felfelé is terjeszkedik és a leveleken sárguló tüneteket, levélszáradást vagy levélhullást idéz elő. Sötét, besüppedt foltok kialakulhatnak ágrészeken vagy száron, mint ahogy pl. a paradicsom növényénél ezt megfigyelhetjük. Csíranövényeknél a szárfoltosodás rákosodássá alakulhat, mely növekedve, körbeölelve a szárat a növény pusztulásához vezethet. Az *Alternaria*-k éréfélben lévő gyümölcsöt is fertőzhetnek, egyes gazdanövények esetén a virágzás végén fertőznek, míg másoknál a hajtáscsúcsot támadják meg, vagy sebzéseken keresztül fertőznek. A foltok lehetnek kis méretűek és kissé besüppedtek, vagy akár az egész termést beboríthatják bőrszerű, bársonyos bevonatot képezve, mely a gomba micéliumából és szaporítóképletéből tevődik össze. A paradicsomnál és a paprikánál előfordulhat olyan eset is, hogy a felületen csak egy kisebb méretű folt jelentkezik, míg a magházban a fertőzés kiterjedt formája figyelhető meg. A gomba széles hőmérséklettartományban is jól fejlődik, így akár a hűtőszekrényben is növekszik, igaz kisebb intenzitással (AGRIOS 1997).



1. ábra *Alternaria* spp. fertőzés búza magvakon



2. ábra *Alternaria* fajok által okozott palántadőlés tünetei (Fotó: CHAMPION 1999)



3. ábra Szárfoltosodás tünetei *Schoenoplectus lacustris* száron



4. ábra Paradicsom bogyófoltosság tünetei



5. ábra *Alternaria* spp. fertőzés tünetei paprika bogyón



6. ábra Burgonya lévélfoltossága



7. ábra Levélfoltosság tünetei repcelevélen

### 3.3. Az *Alternaria brassicicola* faj kiemelt jelentősége

Az *Alternaria brassicicola* faj az egyik gazdaságilag legjelentősebb *Alternaria* patogén, mely a keresztesvirágú növények foltosodás típusú betegségeit idézi elő. A becőn megjelenő tünetek gyakran magpergést idéznek elő. A vetőmaggal terjedő kórokozó számos országban megtalálható. Amellett, hogy a nagy gazdasági jelentőségű *Alternaria* nemzetség tagja, jelentőségét tovább fokozza, hogy egyrészt az ismert genomú *Arabidopsis* spp. gazda-parazita kapcsolat modell értékű nekrotróf kórokozója, másrészt, hogy genomjának teljes szekvenálása folyamatban van (MAURICIO és mtsai 2005).

Egyes *Alternaria* fajok ivaros formáit a *Lewia* nemzetségbe sorolták (SIMMONS 1986), ugyanakkor a legtöbb fajt mitospórás gombának tartják, ide sorolva a keresztesvirágúak családját fertőző *A. brassicae*, *A. brassicicola* és *A. japonica* fajokat. Ezen gombák DNS polimorfizmus vizsgálatainak célpontja a riboszomális DNS (rDNS) szekvencia analízise (JASALAVICH és mtsai 1995), a véletlenszerűen amplifikált polimorf DNS (RAPD, **R**andom **A**mplified **P**olimorfic **D**NA; COOKE és mtsai 1998, SHARMA és TEWARI 1998) vagy a fragmenthossz sokszorosított polimorf DNS (AFLP, **A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphisms; BOCK és mtsai 2002, 2005) volt. Az egyes szerzők mindenütt mérsékelt, ugyanakkor szignifikáns polimorfizmust tártak fel az *A. brassicicola* fajt illetően. Ez a megfigyelés vezetett ahhoz, hogy a genetikai variabilitás alapjául BOCK és mtsai (2005) egy rejtett ivaros folyamatot feltételezzen.

Ismereteink szerint mikroszatellit markereket széleskörűen alkalmaznak gomba populációk genetikai strukturáltságának tanulmányozására, ugyanakkor e fajra vagy az *Alternaria* nemzetség más fajaira eddig még nem fejlesztettek ki, illetve nem alkalmaznak ilyen markereket.

A kiemelt fontosságú növénypatogén *Alternaria brassicicola* faj biodiverzitásának tanulmányozására a tudomány jelen állása szerint a molekuláris mikroszatellit marker analízis a legalkalmasabb a nagyfokú megbízhatóságuk és az erőteljes polimorfizmust mutató eredményeik révén.



### 3.4. A hazai *Alternaria* kutatás helyzete

Magyarországon az *Alternaria* fajok kutatásával és vizsgálatával eddig keveset foglalkoztak.

MOESZ 1928-as munkájában olvashatunk *Alternaria* kórokozó burgonya növényről történő izolálásáról. Feltételezhetően ez az első hazai forrásmunka, mely foglalkozik a kórokozó nemzetséggel.

VÖRÖS és HUSZ (1965) forrásmunkája alapján az *Alternaria* fajok nagy morfológiai változékonyságot mutatnak, közöttük sok az átmenet. A konídium kialakulását, a haránt és hosszanti falak számát, a csőr hosszát stb. a környezeti tényezők nagymértékben befolyásolják. A konídiumtartó sötét, a konídiumok általában egyszerű vagy elágazó, hosszú, ritkábban rövid láncokban vagy magányosan keletkeznek, sötét színűek, kereszt és hosszanti falakkal tagoltak, különböző alakúak (ellipszis, tojás, bunkó). A csúcsuk hosszan megnyúlt, csőrszerű. Az *Alternaria*-k kártételei a következők:

- csíranövény rothadást, palántadőlést okozhatnak,
- a zöld részeken (levél, szár, termés) száraz foltokat vagy bársonyos penészbevonatot idéznek elő,
- megtámadhatják a virág részeit és a termést,
- a kórokozó hifái mélyen behatolhatnak a magházba és a magba, így fertőzhetik a magvakat, amiktől azok minőségi és mennyiségi kárt szenvednek.

Sok faj szaprotróf vagy gyengültségi parazita, általában a külső körülmények következtében legyengült növényeken károsítanak. A magvakban évekig életben maradhatnak. Kedvező viszonyok között a konídiumképzés rendkívül nagy mértékű, így rövid idő alatt járványos megbetegedés törhet ki. A levegőben messzire eljutó konídiumok még 3000 m magasságban is megtalálhatók (VÖRÖS és HUSZ 1965).

A rendszertani munka fajleírásai a következő adatokat tartalmazzák: a kórokozó neve, a kórokozó korábbi nevezéktanban előforduló megnevezései, az okozott betegség, a gazdanövénykör, a kórtünetek, a károsítás formái, a konídiumtartó szerkezete, hosszúsága, a konídiumképzés formája, a konídium alakja, színe, konídiumtest mérete, haránt és hosszanti válaszfalak száma, a csőr színe, hossza, szélessége, harántfalainak száma.

Az *Alternaria* fajok konídiumképzésére jellemző, hogy első lépésben a konídiogén sejt külső falán egy apró, kerek lyuk, pórus keletkezik, majd ezen keresztül kitüremkedik a konídiogén sejt belső fala, ami a konídium külső falát fogja alkotni. A konídium belső fala *de*

*novo* szintetizálódik. A képződött konídiumot (*Poroconidiaceae* család) porokonídiumnak nevezzük (VAJNA 1987).

VÖRÖS (1985) Magyarország mikroszkopikus gombáinak határozókönyvében a *Phaeodictyae* spóracsoport fontosabb nemzetségei között, az *Alternaria* nemzetség tagjainak fajszerű határozókulcsát közli. A leírásokban 30 faj szerepel, amely a Magyarországon izolált fajok és a NEERGARD (1945) által elfogadott, jól definiált, gazdaságilag jelentős fajok tartoznak. A határozás során alapvető jelentőséget tulajdonítanak a gazdanövénynek és a konídium morfológiai tulajdonságainak.

Magyarországon formálisan 13 *Alternaria* fajt írtak le (VÖRÖS 1985).

Az *A. solani* gazdasági jelentőségét, életciklusát, ökológiáját és a védekezés lehetőségeit HÓDOSY (1967) dolgozta fel részletesen.

BEZNER és mtsai (1970) zöldségfélék gombás betegségei között 7 *Alternaria* faj (*A. brassicae*, *A. dauci*, *A. dauci* f. sp. *porri*, *A. oleracea*, *A. raphani*, *A. solani*, *A. tenuis*) kórképét, kórfolyamatát és konídiumképzését írta le.

RÁDULESCU és NEGRU (1971) magyar nyelven kiadott munkájában szántóföldi növények, ipari növények, takarmánynövények, zöldségfélék, gyümölcsfák, gyógy és illóolaj-tartalmú növények valamint virágmagvak betegségeinek és kártevőinek leírását találhatjuk meg. A vetőmagvakon található *Alternaria* kórokozók határozásához analitikai kulcs nyújt segítséget. Az egyes betegségeket kiváltó okokat a szerzők 24 *Alternaria* fajra vezetik vissza.

A klasszikus mikológia területén napjainkig is folynak kutatások e nemzetséget illetően, amely hazánkban elsősorban WALCZ Ilona nevével fémjelezhető. WALCZ korábbi munkájának eredményeként egy új *Alternaria* faj, az *Alternaria helianthinficiens* (WALCZ 1989) leírásával is gazdagodott a nemzetközi szakirodalom. Napraforgóról eddig három *Alternaria* fajt (*A. helianthi* HANSFORD, TUBAKI és NISHIHARA; *A. helianthinficiens* SIMMONS, WALCZ és ROBERTS; *A. alternata* FRIES ex FRIES, KEISSLER) azonosított.

Az utóbbi tíz évben, hazánkban is az *Alternaria* kórokozók a növénykórtani kutatás előterébe kerültek. Számos szakirodalmi vonatkozás különböző gazdanövényről izolált kórokozók körében említi az *Alternaria* fajokat (FISCHL és KOVÁCS 1990, SIMAY 1994, KIMMEL 1995, BALÁZS és mtsai 2001, MOLNÁR 2002).

A tápanyagellátás és a betegségek közötti összefüggéseket vizsgálta KISS és POTYONDI (2000) cukorrépán, KÁDÁR és mtsai (2000) burgonyán.

BENE és EÖRI (1992) hatékony csávázószereket próbált ki cukorrépa magvakon – többek között *A. alternata* fertőzéssel szemben.

KOVÁCS (2001) paprika magház penészesedésért felelős *A. alternata* kórokozó patogenitását bizonyította paprika csíranövényeken, illetve többlépcsős szelekciós eljárást dolgozott ki *Alternaria* izolátumok és tentoxin gazdaspecifikus anyagcsere termék felhasználásával. *A. alternata* esetén a KOCH-féle posztulátumok igazolása mellett, foglalkozott a gomba különböző autökölógiai igényének megállapításával, valamint a megbetegedés és a gazdanövény présnedvének összetétele közötti kapcsolattal.

BÉRES és mtsai (2000) patogén gombákkal történő biológiai gyomnövény szabályozás témában részletes gazda-kórokozó vizsgálatot végzett számos gyomnövény (pl. *Datura stramonium*) és többek között *A. crassa* kórokozó viszonylatában.

HASIJIA és mtsai (1979) bizonyították, hogy a vizsgált növénykórokozó *Alternaria* fajok képesek parazita életmódjuk mellett elhalt szerves anyaggal is táplálkozni, tehát a körülményektől függően szaprotróf életmódot folytatni.

NAGY és FISCHL (2003) UV-C sugárzás hatását vizsgálta az *A. alternata* konídiumainak csírázása szempontjából. Később NAGY (2004) a mágneses tér hatását is tanulmányozta néhány növénypatogén konídiumos gomba konídiumcsírázásának, micéliumnövekedésének és sporulációjának tükrében.

FISCHL és mtsai (1993), majd SZUNICS és mtsai (1996) a búzaszemek feketecsírájúságát az *A. alternata* kórokozó jelenlétére vezette vissza.

Hazánkban új alternáriás levélfoltosság tünetekről számoltak be URBÁNSZKI és mtsai (2003), mely tüneteket görögdinnyéről és uborkáról írták le.

Az *Alternaria* nemzetség kórokozóit nemcsak növénypatogenitás vonatkozásban vizsgálták egyes szerzők, hanem a kiváltott környezeti ártalmakat illetően is.

MAGYAR és mtsai (2000) a légkörben megtalálható allergén és növénypatogén szervezetek koncentráció változásaival, ökológiai válaszreakciók vizsgálatával foglalkozott, valamint szőlő ültetvény monitorozott légterében figyelte az *Alternaria* konídiumok koncentrációját.

PINTÉR és mtsai (1995) pollencsapda preparátum anyagait mikrogombák vonatkozásában vizsgálta. A vizsgálatok eredményei alapján feltételezte, hogy az eddigi pollen-allergia néven számontartott betegség egyes változatainak kialakulásához hozzájárulnak a fitopatogén és szaprotróf mikrogombák légkörben jól terjedő szaporítóképletei. Ezek között több *Deuteromycota* törzsbe tartozó: *Cladosporium* és *Alternaria* konídiumokat figyeltek meg.

Állategészségügy területén is folynak kutatások *Alternaria* fertőzöttség viszonylatában. Takarmány adagok gabona szemterméseinek mikológiai vizsgálata során leggyakrabban *Alternaria* fertőzést mutattak ki (SZIGETI és mtsai 1994).

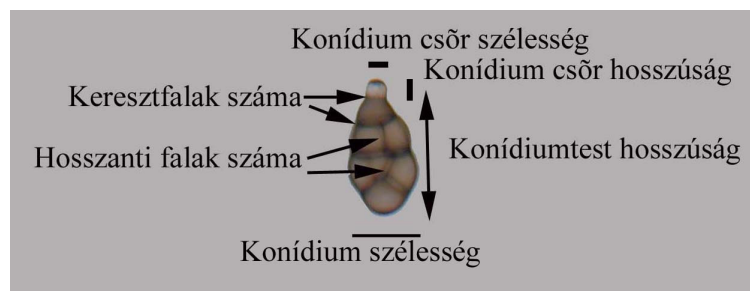
### 3.5. Az *Alternaria* nemzetség rendszerezése

1816-ban NEES elsőként írt le egy olyan mikroszkopikus gombát, mely spóráit láncokban képezi és fonalas jellegű csőrrel rendelkeznek. E fajt NEES *Alternaria tenuis*-nak nevezte el. Az *Alternaria* nemzetség fajainak leírásával egymást követően az alábbi szerzők foglalkoztak: GROVES és SKOLKO (1944), NEERGAARD (1945), JOLY (1964) és SIMMONS (1967, 1986, 1992).

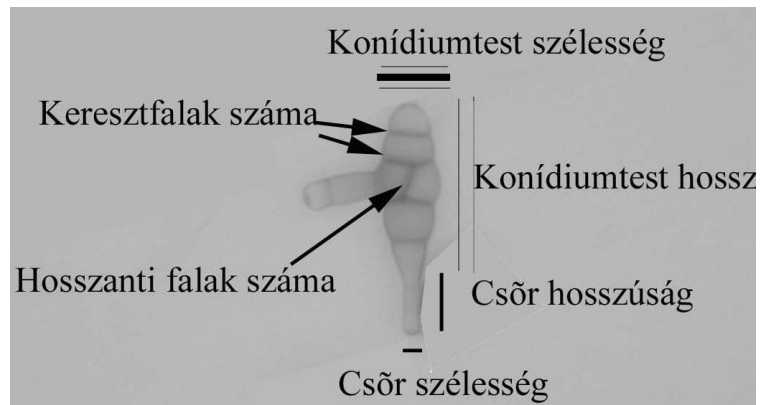
#### 3.5.1. Rendszertani besorolás

Az *Alternaria* nemzetségbe tartozó gombák a *Deuteromycota* (syn. *Adelomycetes*, *Fungi imperfecti*) törzsbe sorolhatók. Korábbi forrásmunkák (pl. AGRIOS 1997) az *Alternaria* nemzetséget a *Dematiaceae* családba sorolják több más fontos gombával együtt (*Bipolaris*, *Exerohilum*, *Dreschlera*, *Cladosporium*, *Stemphylium*, stb.). Leggyakrabban a fajok konídiumos alakjával találkozunk. Az *Alternaria* fajok a *Hyphales* (syn. *Moniliales*) rendbe tartoznak, mivel konídiumtartójuk kevésbé differenciált, szabadon álló, elszórtan elhelyezkedő és szimpodialis növekedésű. Bizonyos *Alternaria* fajnak létezik ivaros szaporodási formája (teleomorf alak) is, mely a *Loculoascomycetes* (*Pleospora* vagy *Lewia* nemzetség) osztályba tartozik (ELLIS 1971, SIMMONS 1986, ERICKSON és HAWKSWORTH 1991).

Az *Alternaria* nemzetségbe tartozó gombákat együttesen sötét színű (olívdzöld, barnás fekete, fekete), többsejtű, általában körte vagy ovális alakú, kereszt- és hosszirányban tagolt konídium jellemzi, mely vagy magányosan, vagy egy konídiumlánc tagjaként fordul elő. Az általános rendszertan ezen konídium morfológián alapul (SZÉCSI és mtsai 2003). A 8. és 9. ábrán egy kisspórás és egy nagypórás konídiumot mutatunk be. Ezek az ábrák bejelölték azokat a paramétereket, melyeket az egyes konídiumok méretezésénél figyelembe vesznek.



8. ábra Kisspórás *Alternaria* konídiumra jellemző tulajdonságok



9. ábra Nagyspórás *Alternaria* konídiumra jellemző tulajdonságok

HAWKSWORTH és mtsai (1995) az *Alternaria*-kat nem sorolja be nemzetségnél magasabb szintű csoportokba, mivel rendszerezése alapján ezen kategóriák nem tükröznék a gombák természetes rokonsági viszonyait.

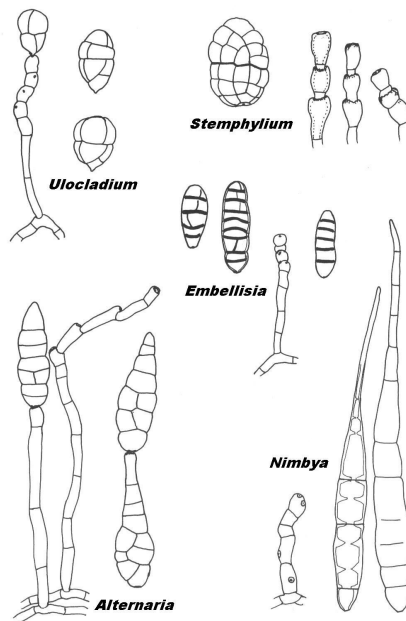
KIFFER és MORELET (1997) a konídiumok képződésének módja alapján az aszexuális *Alternaria* gombákat a *Blastosporae* csoport, *Porosporae* alosztályába sorolja. Az egységes konídiogenezis rendszerében minden ivartalanul szaporodó gomba besorolható a szaporító képlet keletkezési módjának megfelelően. Ez a rendszertani elképzelés visszanyúl a SACCARDO-féle 1899-1906 között közölt rendszertanhoz azáltal, hogy a konídiumtartók szerint végez csoportosítást, igaz ezeknek másodlagos jelentőséget kölcsönözve (a konídiumok morfológiája szerinti rendszerezés a leggyakrabban alkalmazott rendszerezési elv). Mindenesetre, a konídium képzést fő rendszerező elvként tekintő modern elképzelés gyakorlati alkalmazása még akadályokba ütközik.

A Botanikai Nevezéktan Nemzetközi Kódexe (International Code of Botanical Nomenclature ICBN) az *Alternaria* fajokat egységesen az *Ascomycota* törzs, *Pleosporaceae* családjába sorolja (GUARRO és mtsai 1999).

A konídiumos gombák nagy változékonysága és heterogenitása újabb rendszertani elképzelések megszületéséhez vezetett. Az újabb, gyakran molekuláris vizsgálati eszközök használata révén lehetővé vált a kórokozók eredetének és diverzitásának pontosabb meghatározása, az azonosítás és a jellemzés egzaktabb megfogalmazása.

### 3.5.2. Az *Alternaria*-k rokon nemzetségei

Az *Alternaria* nemzetséghez közel álló nemzetségek, mint pl. *Stemphylium*, *Ulocladium* és *Macrosporium* definiálásában és taxonómiáját illetően hosszú ideig egyfajta bizonytalanság uralkodott. A bizonytalanság alapját képező *Alternaria*, *Stemphylium* és *Ulocladium* nemzetségekhez tartozó fajok morfológiáját mutatjuk be a 10. ábrán. Az *Alternaria* nemzetséghez tartozó néhány faj azonosítását és rendszerezését nehezítette ez a körülmény. Így néhány atipikus fajt már a kezdeti azonosításuktól fogva több nemzetségbe soroltak az egyes szerzők (pl. KWASNA közlése szerint (1992) *Ulocladium consortiale* (Thum) SIMMONS szinonimái a következők: *Macrosporium consortiale* THUMEN, *Stemphylium consortiale* (Thum) GROVES és SKOLKO és *A. consortiale* (Thum) GROVES és HUGHES). Az *Alternaria* nemzetség más közeli nemzetségektől (*Ulocladium*, *Stemphylium*, *Embellisia* és *Nimbya*) való pontos elkülönítését SIMMONS fogalmazta meg (1992).



10. ábra Az *Alternaria*, *Stemphylium*, *Ulocladium*, *Embellisia* és *Nimbya* nemzetségekre jellemző konídiumok és konídiumtartók (SIMMONS nyomán, 1992)

### 3.6. *Alternaria* izolátumok morfológiai jellemzése

#### 3.6.1. A gombák morfológiai változékonysága

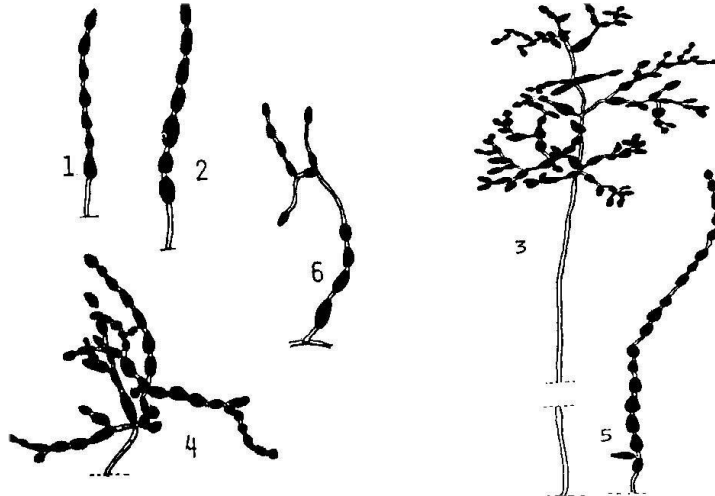
A legtöbb *Alternaria* faj, beleértve az *A. alternata*-t is, jelentős morfológiai változékonysággal rendelkezik, mely függ a tenyésztés feltételeitől, a táptalajtól, a hőmérséklettől, a fénytől és a nedvességtől (MISAGHI és mtsai 1978, SIMMONS 1992). Monospórák tenyészetben is jelentős eltérések mutatkoznak a konídium méret, alak, szeptáltság, szín és a konídium korától függő felületi struktúrák vonatkozásában (SIMMONS 1992). Egyes kisspórák, konídiumláncot képző *Alternaria* fajok morfológiai jellemzői átfedik az *A. alternata*-ra jellemző tulajdonságokat. A leggyakoribb ilyen faj az *A. tenuissima* és az *A. infectoria* (PRYOR és MICHALIADES 2002). A fajszintű azonosítást nehezíti, hogy számos izolátum olyan köztes jellemzőkkel rendelkezik, amelyek alapján az adott izolátum nem sorolható be egyértelműen az ismert fajok egyikébe sem (SIMMONS 1992).

#### 3.6.2. Csoportosítást megalapozó kutatások

Az *Alternaria* nemzetség nagyfokú változékonyságának eredményeként, több munka ajánlása szerint a morfológiailag azonos bélyegekkel rendelkező fajokat alcsoportokba sorolják (NEERGAARD 1945, JOLY 1964, ELLIS 1971, 1976). A NEERGARD-féle csoportosítás a konídium méreteken és a konídiumlánc hosszán alapul. Három kategóriát különböztet meg: *Longi-catenae* – a konídiumlánc soktagú (legalább 10) konídiumból épül fel, az itt található fajok általában szaprotrófok (pl. *A. tenuis* – syn. *A. alternata*, *A. brassicicola*); *Brevi-catenae* – a konídiumlánc rövidebb és elágazó típusú, a konídiumok szélesebbek (pl. *A. tenuissima*); *Non-catenae* – magányosan képződő konídiumok, melyek csőre hosszúkasan nyújtott, az itt található fajok leggyakrabban a parazita gombák közé sorolhatók (pl. *A. brassicae*). A lánchosszúság és a konídiumok morfológiája sajnos néhány faj esetén kevésbé diszkriminatív valamint a környezeti körülmények által könnyen befolyásolható paraméter. Így ezek a határozó bélyegek a fajok elkülönítésére, valamint filogenetikai kapcsolatok feltérképezésére nem alkalmasak.

SIMMONS (1992) egy új rendszerbe foglalta az *Alternaria* nemzetséget és 14 csoportot különített el, melyek élére egy-egy típusfajt állított. E rendszerezés elveként továbbra is a konídium tulajdonságok, a konídium képződés és a csőr alakja szerepeltek.

Később SIMMONS és ROBERTS (1993) bevezette a fajcsoport fogalmát és a kisspórás, láncképző fajokat 6 fajcsoportra osztotta fel. Az egyes csoportok sporuláció típusa a 11. ábrán figyelhető meg.



11. ábra Különböző kisspórás *Alternaria* fajcsoportok sematikus láncszerkezetének ábrázolása (SIMMONS és ROBERTS nyomán 1993)

Ebben a rendszerben a csoportképző ismérvek a következők: a láncok alakzata, a konídiogén sejtek apikális vagy laterális megnyúlása. Csoporton belül a fajok megkülönböztetése továbbra is stabil jellemzők alapján lehetséges, úgymint: fiatal konídiumok kialakulása és morfológiája, válaszfal kialakulásának menete, válaszfalak száma, alak, méret, szín, a konídium ornamentáltsága és egyedi tenyészbélyegek. A fajcsoport határozás alapját az adott táptalajra oltott, meghatározott körülmények között előállított tiszta tenyészetek képezik.

Ennek a rendszerezésnek előnye, hogy ellenőrzött, mesterséges körülmények között előállított izolátumokra épít. Így az eredmények összehasonlíthatók egymással, és a vizsgálati körülmények reprodukálhatók. Szemben a korábbi azonosítási eljárásokkal, melyek alkalmazása során gazdanövényről származó kórokozókat jellemeztek és rendszereztek, figyelmen kívül hagyva az *Alternaria* kórokozó gombák nagyfokú környezettől függő fenotípusos változékonyságát. Ez az új megközelítés hangsúlyos szerepet kapott az új *Alternaria* fajok leírásánál (SIMMONS 1999), illetve a formálisan leírt taxonok átcsoportosításánál, mint pl. az *A. alternata* f. sp. *lycopersici* áthelyezése az *A. arborescens* fajba (SIMMONS 1999).

NEERGARD (1945), SIMMONS és ROBERTS (1993) valamint SIMMONS (2000) ajánlása szerinti összehasonlító csoportosítás olvasható az 1. táblázatban. NEERGARD a jelen



munkában kutatott fajokat három csoportra osztotta fel a konídium morfológia alapján. Érdekes, hogy NEERGARD az *A. tenuissima* izolátumokat az *A. cheiranthi*-hoz közel sorolja, a rövid láncú *Alternaria*-k közé. SIMMONS szerint a kisspórás fajoknak különböző a konídiumlánc képzése, ezért azok tovább csoportosíthatók a következőknek megfelelően: *alternata*, *arborescens*, *gaisen*, *infectoria* és *tenuissima* fajcsoportokra (SIMMONS és ROBERTS 1993). Később SIMMONS (1995) megnevezi a *cheiranthi* és *brassicicola* fajcsoportokat is, melyek sporulációs típus alapján nem különíthetők el az *infectoria* és az *alternata* csoporttól. A fajcsoportok elnevezései az őket leginkább azonosító típusfajok alapján történik. SIMMONS (2000) egy későbbi munkájában részletesen jellemzi a *Solanaceae* család gazdanövényeiről származó nagyspórás *Alternaria* fajokat. A különböző gazdanövényekről származó fajokat külön-külön nevezi meg, elhatárolódva a NEERGARD által is alkalmazott, *forma specialis*-ok használatától.

Standardizált izolálási és tenyésztési körülményeket használva, a morfológiai bélyegek változékonysága minimalizálható. A legújabb kísérleti eredmények szerint a kisspórás *Alternaria* fajcsoportok egymástól elkülöníthetők a morfológiai- és a tenyészbélyegek, valamint a kémiai tulajdonságaik alapján is (ANDERSEN és THRANE 1996, ANDERSEN és mtsai 2001, 2002).

**1. táblázat Az *Alternaria* fajok rendszerezése kapcsán ajánlott különböző morfológiai alapon elkülönített csoportok**

Morfo-csoportok NEERGARD (1945)	Morfo-csoportok SIMMONS és ROBERTS (1993)
<i>A. tenuis</i>	<i>A. alternata</i>
	<i>A. arborescens</i>
	<i>A. gaisen</i>
<i>A. tenuissima</i> <i>A. cheiranthi</i> <i>A. dianthicola</i>	<i>A. tenuissima</i>
	<i>A. infectoria</i>
SIMMONS (2000)	
<i>A. brassicae</i>	<i>A. brassicae</i>
<i>A. porri</i>	<i>A. porri</i>
<i>A. porri</i> f. sp. <i>solani</i>	<i>A. solani</i>
<i>A. porri</i> f. sp. <i>dauci</i>	<i>A. dauci</i>

A rendszerező taxonómia kialakításában az említetteken kívül többen is közreműködtek. Hazánkban többnyire a NEERGARD-féle rendszerezési elvek terjedtek el az egyes izolátumok morfológiai jellemzésekor. Ehhez képes előrehaladást jelent a SIMMONS-féle fajcsoportok szerinti csoportosítás. A legújabb tendenciák az *Alternaria* taxonómiai kutatások területén is a genetikai összehasonlító elemzésekre irányulnak.

### 3.6.3. Abiotikus tényezők vizsgálata *in vitro*

A mikroorganizmusok élettevékenysége a bonyolult összefüggések és kölcsönhatások végtelen során keresztül szoros kapcsolatban van természetes környezetükkel, annak szerves részét képezi. Ezért a mikroorganizmusok igen érzékenyen reagálnak a környezet tényezőinek legcsekélyebb változására is. Ugyanakkor nagyfokú alkalmazkodóképességgel rendelkeznek, morfológiai jellemzőik, élettani sajátásaik viszonylag könnyen megváltoznak, és nem ritka a maradandó változás sem. Az *in vitro* tenyésztéskor egy igen jelentős környezeti tényezőt, az élő környezetet tudjuk kiküszöbölni, mivel tiszta tenyészetekkel dolgozunk. Fontos szerepet játszanak az egyes környezeti tényezők hatásának megismerése a mikroorganizmusokra rendszerezése, meghatározása és izolálása céljából (HORVÁTH 1980).

Tekintettel arra, hogy számos gomba viszonylag gyorsan növekszik tiszta tenyészetben, fiziológiai és biokémiai technikák alkalmazásával lehetséges azonosításuk és rendszerezésük (BRIDGE 1985, PATERSON és BRIDGE 1994). E technikákat sikerrel alkalmazták az élesztőgombáknál (HOOG és Yurlova 1994). Különböző hőmérsékleti tartományban mért növekedési mutatók kiegészítésül használhatók néhány ivartalanul (MCGINNIS és SALKIN 1986) és ivaros szaporodó gomba azonosításában. Meghatározott körülmények között mért növekedési ráta értékes információval szolgál komplex nemzetségek tanulmányozása során, mint pl. a *Penicillium* nemzetség esetén (PITT 1973).

A gombák növekedésére és differenciálására ható legfontosabbnak tekintett tényezők közé a hőmérséklet, a vízáktivitás és a pH tartozik (MCMEEKIN és ROSS 1996). Ezen tényezők egyikét sem alkalmazzák fonalas gombák rendszerezése szempontjából. A rendszerezés alapvetően a mikromorfológiai tényezők vizsgálatán alapul. Egy újabb taxonómiai bélyeg lehet a növekedés vizsgálat az *Alternaria* fajok esetében (ANDERSEN és mtsai 2001). PITT (1973) fajhatározás céljából a mikromorfológiai adatok kiegészítéseként a telepátmérőt és telep morfológiai bélyegeket jellemzett *Penicillium* nemzetség vizsgálata során, melyet a későbbiekben a *Penicillium* monográfiájában következetesen alkalmazott 1979-től. PITT (1979) megállapította, hogy MEA (Malt Extract Agar, maláta kivonat agar) és CYA (Czapek Yeast Extact Agar, Czapek élesztőkivonatos agar) táptalajon +5 és +37°C-on nevelt tenyészetek alkalmasak a *Talaromyces* és *Eupenicillium* fajok elkülönítésére.

ROTEM „Az *Alternaria* nemzetség” című monográfiájában különféle fajok sporulálásának minimum hőmérsékletét foglalja össze táblázatos formában.

Az *Alternaria* fajok legtöbbje +5°C-os minimum hőmérséklet mellett is sporulált, kivétel ez alól az *A. dauci*, mely +10°C-on és az *A. solani*, mely +15°C-on kezdett konídiumokat

képezni. Ezeket az adatokat azonban fenntartással kell kezelnünk, mivel nem egyértelmű, hogy a megjelölt hőmérséklet a valódi minimumot vagy a vizsgált minimum hőmérsékletet jelöli. Ugyanilyen fenntartások vonatkoznak a maximum hőmérsékletre, mely +30 és +35°C között alakult. Az optimum +15-30°C közötti tartományban található. Az optimum vonatkozásában eltérő mérési adatok is szerepelnek, pl. az *A. solani* +26-28°C sporulál optimálisan RANDES (1917) szerint, míg MCCALLAN és CHAN szerint (1944) ez az érték +20°C körül található. Sajnos a hőmérséklet mellett a fényviszonyokra vonatkozó utalásokat az egyes szerzők kevésbé tüntették fel, a rendszeres fotoperiódusnak kitett Petri-csészékben ugyanis változhat a hőmérséklet. A sporuláció különböző fázisaira a hőmérséklet is különbözőképpen hat, így a magas hőmérséklet az *A. dauci*-nál a konídiumtartó képzést indukálja, míg alacsonyabb hőmérséklet optimális a konídiumok kialakulása szempontjából (LEACH 1967). Ezekben a rendszerekben ROTEM a hőmérséklet hatását a sporuláció vonatkozásában tárgyalja elsősorban a nagyspórás fajok esetén.

A hőmérséklet, a táptalaj, a pH érték, cukor- és nitrogén-tartalom *Alternaria alternata* gombára gyakorolt hatását hazánkban KOVÁCS és FISCHL (1997) tanulmányozta. A kórokozót kizárólag magházpenésszel fertőzött paprikabogyókból izolálták. A kisspórás kórokozócsoport genetikai és morfológiai tagozódása ekkor még ismeretlen volt hazánkban. A kisspórás *Alternaria* fajok makromorfológiai bélyegek alapján történő elkülönítésére ANDERSEN és mtsai (2001, 2002) tettek javaslatot. Az *alternata*, a *gaisen* és a *longipes* kisspórás *Alternaria* fajok DRYES agaron (Dichloran Rose Bengal Yeast Extract Sucrose Agar, Dichlorán-bengálrózsa-életstőkvonatos agar) különböző hőmérsékleten (6-33°C-ig) tartott tenyészetek telepátmérőjének vizsgálata során értékes adatokhoz jutottak (ANDERSEN és mtsai 2001). A vizsgálatot továbbfejlesztve 2002-ben ANDERSEN és mtsai egy újabb dolgozatot közöltek, melyben 10 fajt illetve fajcsoportot (*A. alternata*, *A. arborescens*, *A. gaisen*, *A. infectoria*, *A. limoniasperae*, *A. longipes*, *A. mali*, *A. tangelonis*, *A. tenuissima*, *A. turkisafria*) vizsgáltak vízaktivitás, hőmérséklet és pH kombinált hatását tanulmányozva. A növekedési erélyt a 7. és a 14. napon rögzítették, és az adatokat multivariáns statisztikai elemzésnek vetették alá. A főkomponens elemzéssel vizsgált izolátumok a fajoknak, illetve fajcsoportoknak megfelelően csoportosultak, nem pedig a gazdanövény szerint.

Egyéb *in vitro* vizsgálatokat NAGY és FISCHL (2003), NAGY (2004) is végzett. Kísérleteik során különböző dózisu UV kezelésnek és különböző erősségű mágneses térhatásnak vetették alá többek között egy *Alternaria alternata* kórokozót. NAGY és FISCHL (2003) kimutatta a közeli UV sugárzás és mágneses tér konídiumcsírázásra, növekedésre és sporulációra kifejtett hatását.

### 3.7. Az *Alternaria* izolátumok molekuláris jellemzése

#### 3.7.1. Vizsgálati módszerek áttekintése

A gombák evolúciójának kutatása során a fajok jellemzésénél, illetve a fajon belüli polimorfizmus vizsgálatánál ma már elengedhetetlen a genetikai információt hordozó (szemantoforetikus) molekulák vizsgálata. Ide tartozik a teljes genetikai kódot tartalmazó DNS, valamint a transzkripció termékei, vagyis a különböző RNS típusok, és fehérjék. Napjaink egyik legtöbbször alkalmazott kutatási módszere ezeknek a molekuláknak vagy egyes szegmentumoknak elektroforézissel történő szétválasztása, majd a keletkezett mintázatok összehasonlítása különböző matematikai módszerekkel.

Molekuláris eszközöket az utóbbi években gyakran használnak az *Alternaria* nemzetség biodiverzitásának tanulmányozása céljából. A kitűzött célok filogenetikai, taxonómiai, diagnosztikai és populáció genetikai vonatkozásúak. Az újabb, gyakran molekuláris vizsgálati eszközök használata révén lehetővé vált az *Alternaria* fajok eredetének és diverzitásának pontosabb meghatározása, az azonosítás és jellemzés egzaktabb megfogalmazása. Az alkalmazott módszerek közül a kutatásunk szempontjából jelentősnek tartott módszerek a következők:

- Többlokuszus vizsgálatok:
  - mtDNS RFLP (mitokondriális DNS restrikciós fragmentumok hosszúságának polimorfizmusa – **mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polimorphism**, KUSABA és TSUGE 1997).
  - RAPD (véletlenszerűen amplifikált polimorf DNS - **Random Amplified Polimorfic DNA**, COOKE és mtsai 1998, WEIR és mtsai 1998, MORRIS és mtsai 2000, ROBERTS és mtsai 2000, PRYOR és MICHALIADES 2002),
  - AFLP (sokszorosított fragmentum hosszúság polimorfizmusa - **Amplified Fragment Length Polymorphisms**, BOCK és mtsai 2002, 2005);
- egyedi genomhely vizsgálata:
  - Szekvenálás: rDNS ITS (riboszomális DNS belső átírózó régió, **ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer**, KUSABA és TSUGE 1995, PRYOR és GILBERTSON 2000, IACOMI-VASILESCU és mtsai 2001, CHOU és WU 2002, SERDANI és mtsai 2002, BERBEE és mtsai 2003), mtSSU (mitokondriális rDNS kis alegysége, **mitochondrial Small SubUnit**, PRYOR és GILBERTSON 2000)

A szerzők különböző *Alternaria* fajok, fajcsoportok között a fenotípus vizsgálatokkal párhuzamosan, összehasonlító vizsgálatokat végeztek és filogenetikai törzsfákat szerkesztettek. Egy-egy faj vizsgálata során különböző földrajzi régióban megtalálható egyedek között populáció analízist végeztek.

### 3.7.2. Rendszerezésre irányuló külföldi eredmények

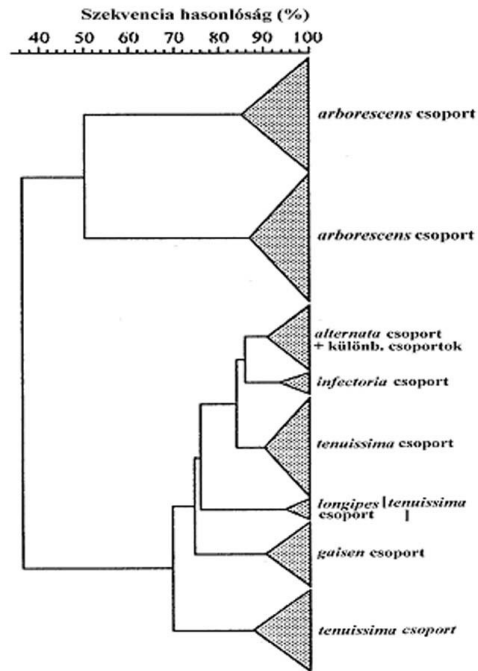
Számos munka foglalkozott a kispórás láncot alkotó *Alternaria* fajok taxonómiai kapcsolatrendszerével, amelyekben különböző módszereket használtak fel a modern morfológiai alapú faj megkülönböztetés rendszerének alátámasztására illetve bírálatára.

A szakmai közvélemény egyik ága elfogadta a SIMMONS-féle morfológián alapuló fajcsoportra tagolás elképzelést, és az elkülönítés helytállóságát molekuláris szinten RAPD módszerrel is bizonyította. Így ROBERTS és mtsai (2000) „Fajcsoportok és kispórás *Alternaria* csoportok elkülönítése morfológiai bélyegek és RAPD analízis segítségével” című munkájukban 260 elsősorban gyümölcs kultúrákból származó kispórás *Alternaria* izolátumot vizsgált meg. A molekuláris vizsgálatok során 3 különböző *primert* használt. A kapott dendrogramon (12. ábra) 5 csoportot különített el: *gaisen*, *longipes*, *tenuissima*, *arborescens* és *infectoria* csoport. A módszerrel kimutatott különbségek összhangban álltak a morfológiai, fiziológiai és biokémiai tulajdonságokkal.

A módszer helytállóságát más kultúrákból származó izolátumokon is tesztelték, az előzőekben vázolt *primerektől* eltérő indítószekvenciát alkalmazva. PRYOR és MICHALIADES (2002) a „Pisztácia foltosodást okozó *Alternaria* izolátumok morfológiai jellemzőinek, patogenitásának és molekuláris jellemzőinek vizsgálata” című munkájában az alábbiakat állapította meg:

- *alternata* és *tenuissima* morfológiai csoportok között RAPD elemzéssel genetikai távolságot nem lehet kimutatni,
- RAPD elemzéssel az *arborescens* csoportba tartozó izolátumok egymással nagy hasonlóságot mutatnak, de az *alternata* és *tenuissima* csoport egyedeitől jelentősen eltérnek,
- RAPD elemzéssel az *infectoria* csoportba sorolt fajok között jelentős különbségek figyelhetők meg, a fragmentumok mérete és száma meglehetősen különböztek az *alternata*, a *tenuissima* és az *arborescens* csoportok tagjaitól,

- kisspórás láncot alkotó *Alternaria* fajok ITS szekvenálás eredménye alapján az *alternata*, a *tenuissima* és az *arborescens* fajcsoport egy monofiletikus kládot képez, mely csoportokon belül további elhatárolások ITS szekvenciák alapján nem lehetséges a szekvenciákban megmutatkozó minimális különbségek miatt.

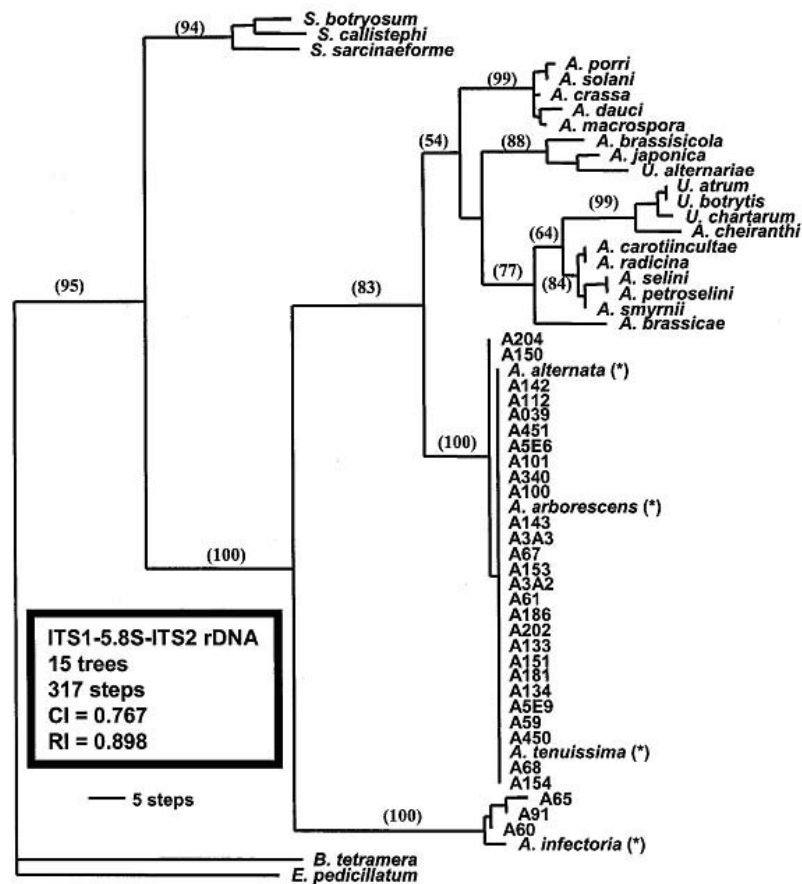


12. ábra Kisspórás *Alternaria* fajok elkülönítése RAPD elemzéssel (ROBERTS és mtsai nyomán, 2000)

A szakmai közvélemény másik ága a kisspórás fajokat nem sorolja fajcsoportokba, hanem vagy *Alternaria* spp.-ként nevezi, vagy egy közös *A. alternata* fajról, vagy gazdaspecifikus *Alternaria* fajokról beszél. A gazdanövény specifikus fajok egy részét az *A. alternata*-val azonosítja és *forma specialis*-ként jeleníti meg, pl. *A. alternata* f. sp. *lycopersici* paradicsomon, más részét pedig fajszintre emelve tárgyalja, pl. *A. mali* almán, az *A. gaisen* körtén, az *A. longipes* dohányon. Ezen vélekedést támasztja alá, hogy a kisspórás gazdaspecifikus *Alternaria* fajokat nem tudták megkülönböztetni az *A. alternata*-tól sem RFLP analízisnél alfa-fág klón Alt1 hibridizációs *primert* használva (KUSABA és TSUGE 1994), sem az ITS szakasz szekvenciabeli különbségének vizsgálatával (KUSABA és TSUGE 1995), sem mtDNS RFLP-vel (KUSABA és TSUGE 1997). Ugyanakkor ellentmondásosnak tűnik, hogy ARADHYA és mtsai 2001-ben elkészült vizsgálati eredményei szerint Alt1 klón szakasszal hibridizált RFLP mintázat elemzése során 3 kisspórás *Alternaria* csoport elkülönüléséről számolt be.

Az ITS szakasz szekvencia elemzése különös helyzetet teremtett a szakirodalomban. Az egyik forrásmunkában a nukleáris rDNS belső átíródó régiójának (ITS) szekvencia analízisével különbségeket lehetett feltárni (1-től 4 nukleotidig) a kispórás *Alternaria* fajok között (KUSABA és TSUGE 1995). A szerzők szerint ez az eredmény azonban elégtelen volt ahhoz, hogy ezeket az *A. alternata*-tól filogenetikailag különböző taxonként határozzák meg. Míg egy másik forrásmunkában PRYOR és GILBERTSON (2000) szerint az ITS régió szekvencia adatai alkalmasak az *Alternaria* fajcsoportok és csoporton belüli rokon fajok elkülönítésére.

Az ITS régió molekuláris vizsgálatokban való alkalmazásának létjogosultsága azonban megerősítésre szorul, hiszen később ellentmondva korábbi megállapításuknak PRYOR és MICHALIADES (2002) felhívta a figyelmet arra, hogy más genom szakaszok molekuláris vizsgálatára is szükség van, mert különböző fajok ITS szakaszai nagy hasonlóságot mutatnak. E hasonlóságot szemlélteti a 13. ábra, mely négy kispórás fajcsoportból tartalmaz pisztáciáról származó izolátumokat.



13. ábra A rDNS ITS1, 5.8S és ITS2 szekvenciái alapján felállított filogenetikai törzsfá (PRYOR és MICHALIADES nyomán, 2002)

További szakirodalmi forrásmunkák is tárgyalják az ITS régiók alkalmazásának lehetőségeit, melyekből megállapítható, hogy a kisspórás *Alternaria* fajoknál az ITS régió szekvenciái meglehetősen egyöntetű képet mutatnak, a különbségek csak néhány nukleotidban mutathatók ki a *tenuissima*, *arborescens* és *alternata* csoport tagjai között. A tapasztalt kis mértékű eltérések még nem adnak okot arra, hogy intraspecifikus taxonokról beszélhessünk.

Az *Alternaria* fajok rendszerezése céljából további molekuláris markereket is bevontak a vizsgálatok sorába, melyek a következők: hiszton gén (KANG és mtsai 2002), az mtSSU (PRYOR és GILBERTSON 2000), *endo*-poligalakturonáz gén (PEEVER és mtsai 2002),  $\beta$ -*tubulin* gén (MCKAY és mtsai 1999) és a *gpd* gén szekvencia elemzése (PRYOR és Bigelow 2003), izozim elemzés (PEEVER és mtsai 1999), IGS RFLP vizsgálat (HONG és mtsai 2005). Az egyes markerek többé-kevésbé jó felbontóképességűek, így alkalmasnak bizonyultak a kisspórás *Alternaria* taxonok elkülönítésére.

Külön kiemelnénk MCKAY és mtsai 1999-es munkáját, melyben lenmagról izolált *Alternaria linicola* izolátumok jellemzésével foglalkozott. Az alkalmazott módszerek a következők voltak: ITS, RAPD,  $\beta$ -tubulin gén szekvencia analízis. A levont következtetések közül figyelemre méltó, hogy MCKAY az *A. infectoria* anamorf és *Pleospora herbarum* teleomorf alak nukleinsav mintázatának homológiáját mutatta ki, melyből a szerző azt a következtést vonta le, hogy az *Alternaria*-kat a *Pleosporaceae* családba kell sorolni. Ez az első közlemény, mely molekuláris szinten bizonyítani véli, hogy az *Alternaria* fajok taxonómiai szempontból az *Ascomycota* törzs *Pleosporaceae* nemzettségébe tartoznak. Később BERBEE és mtsai (2003) az ITS régió szekvenciabeli különbségeit, valamint BOCK és mtsai (2005) az *A. brassicicola* faj AFLP vizsgálata során tapasztalt heterogenitást is erre az okra vezette vissza.

A fajok illetve fajcsoportok rendszerezésével kapcsolatban összegzésként megállapítható, hogy a molekuláris munkák nem oldották meg a kisspórás láncot alkotó *Alternaria* fajok genetikai összetartozásának problémáit, mely kihangsúlyozza ezen gombacsoport vitatott taxonómiai helyzetét. A vizsgált izolátumok és módszerek tárháza nagy diverzitást mutat. Az azonos módszerrel végzett kísérletek eltérő eredményei véleményünk szerint visszavezethetők a különböző izolátum számra, a módszer kivitelezésének különbözőségére, illetve az izolátumok bizonytalan kilétére, a morfológiai azonosítás elmaradására, avagy a nevezéktanban előforduló bizonytalanságokra. Továbbá



megállapítható, hogy az *Alternaria* nemzetség taxonómiája pillanatnyilag is átalakulásban van.

### 3.7.3. Egyes populációk szerkezetének vizsgálatára irányuló kutatások

A populációk szerkezetének vizsgálata során a probléma felvetés ugyanúgy a kispórás *Alternaria* fajok körül forog, mint az interspecifikus szinten végzett vizsgálatoknál. Kérdés az, hogy a kispórás *Alternaria* populációt egységesen kezelik-e a szerzők, vagy modern értelemben vett fajokról illetve fajcsoportokról beszélnek.

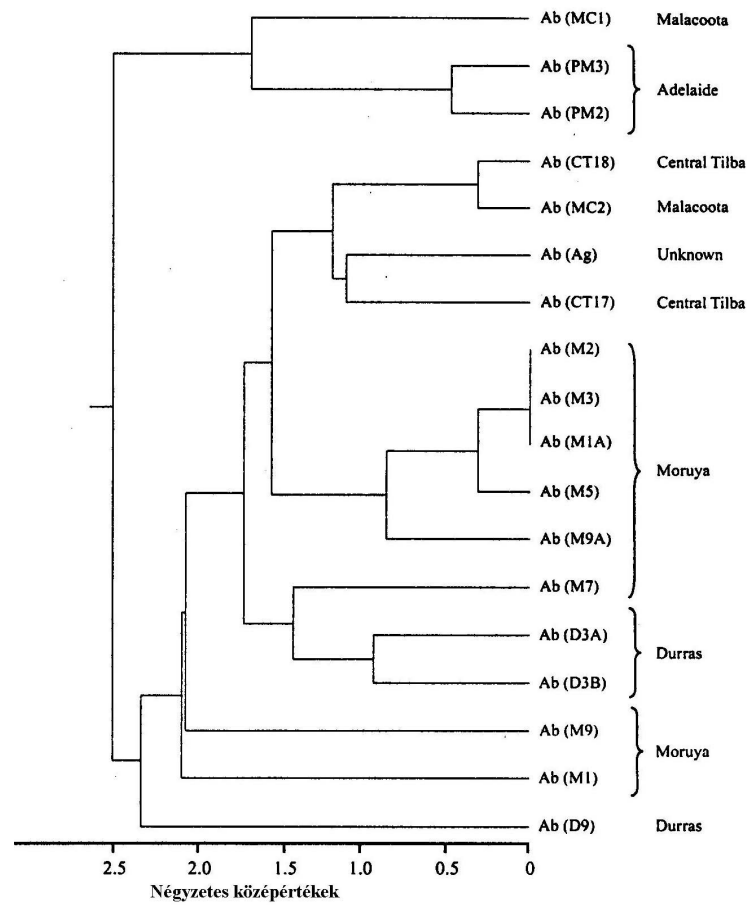
Leggyakrabban valamilyen betegséghez köthető kispórás *Alternaria* fajokat egységesen kezelő *Alternaria alternata* populációk vizsgálatával találkozunk (MORRIS és mtsai 2000, ARADHYA és mtsai 2001, PEEVER és mtsai 2002). Nem véletlen, hogy ilyen heterogén kiindulási anyag vizsgálata során az egyes szerzők különböző mértékű genetikai különbséget állapítottak meg a populáció-szerkezet tanulmányozása során.

A modern értelemben vett populáció genetikával egyedül BOCK és mtsai (2002, 2005) foglalkoztak. „AFLP alkalmazása *Alternaria brassicicola* izolátumok genetikai változatainak kivizsgálása” című munkájukban (BOCK és mtsai 2002) 18 *A. brassicicola*, 5 *A. alternata* és 1 *Rhynchosporium secalis*-t hasonlított össze AFLP-t használva. AFLP-vel a három fajt a primer kombinációktól függetlenül szét tudták választani, így az alkalmazott eljárás megbízhatónak és ismételhetőnek tűnt az *A. brassicicola* azonosítására. A 18 *A. brassicicola* izolátum elemzése során a populáción belül 16-28%-os polimorfizmust észleltek. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy az *A. brassicicola* olyan képességgel rendelkezik, mellyel szignifikánsan különböző genetikai változatokat képes létrehozni (14. ábra). BOCK és mtsai (2005) későbbi munkájában az *A. brassicicola* izolátumok körét tovább bővítve populációk szerinti tagozódást nem tudott megállapítani, ugyanakkor a nagyfokú genetikai variabilitás okát az eddig ismeretlen ivaros szaporodás okaként ismerte el.

Populáció analízissel vizsgált *Alternaria* fajok rekombinációs készsége nagy. A genetikai sokszínűség okainak felfedése még várat magára.

A morfológiai kritériumok alapján történő azonosítás korlátozottsága miatt, alkalmazott diagnosztikai eljárások kifejlesztésére is történtek előrelépések az *Alternaria* fajok pontos, korai azonosítása érdekében. Így fajspecifikus indítoszekvenciákat terveztek a sárgarépát fertőző *A. radicina*-ra (PRYOR és GILBERTSON 2001), *A. alternata* és *A. dauci*

fajokra (KONSTANTINOVA és mtsai 2002), a keresztesvirágú növényeket fertőző *A. brassicae*, *A. brassicicola* és *A. japonica* fajokra (IACOMI-VASILESCU és mtsai 2001)



14. ábra *Crambe maritima* keresztesvirágú gyomnövényről származó *Alternaria brassicicola* izolátumok populáció vizsgálatának eredménye (BOCK és mtsai nyomán, 2002)

### 3.7.4. Molekuláris elemzés mikroszatellit alapú indítószekvenciákkal

#### 3.7.4.1. Mikroszatellitek fogalma és vizsgálata

A mikroszatellitek (LITT és LUTY, 1989) abba a repetitív szekvencia családba tartoznak, amelyben igen egyszerű, di-, tri- tetra-, vagy pentanukleotidok egymást követve ismétlődnek egy szakaszon. A mikroszatellitek szinonim megnevezései a következők: **VNDR** (Variable Number of Dinucleotide Repeats - változó számú dinukleotid ismétlődések, NAKAMURA és mtsai 1987), **STR** (Short Tandem Repeat - rövid tandem ismétlődés, EDWARDS és mtsai 1991), **SSLP** (Simple Sequence Length Polymorphism – egyszerű szekvencia hossz-polimorfizmus), **ETR** (Exact Tandem Repeats – precíz egymást követő ismétlődések) vagy **SSR** (Simple Sequence Repeat - egyszerű szekvencia ismétlődés, JACOB és mtsai 1991). A mikrosatelliteket az eddig vizsgált összes prokarióta és eukarióta genomból ki tudták mutatni (ZANE és mtsai 2002). Kódoló és nem kódoló régiókban egyaránt megtalálhatók. Az eukarióta genomban mindenütt bőségesen jelen vannak és nagy polimorfizmust mutatnak az ismétlődő egységek számát tekintve. Például, 10-20 allél/lokusz gyakran előfordul, sőt hipervariabilis lokuszra is van példa, ahol 100 allél/lokusz sikerült detektálni. Tipizálásuk annak a néhány bázispár ismétlődésnek számbeli változékonyságán alapul, melyek két, csak egy-egy adott genomrészletre jellemző szekvenciárészlet között helyezkednek el. A mikrosatellit régiókra összefoglalva az alábbiak jellemzik:

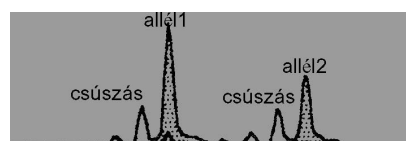
- A klónozott mikrosatellit allél szekvenciája. A mikrosatellit régió vastagon szedve látható, a körülölelő szakaszokat pedig dőlten jelöltük:

`ATGGATCCTGGAGACACACACACACACACACACACGTCAAAAGGCAAGG`  
*primer1* *primer2*

- Az ismétlődések száma allélenként és egyedenként egyaránt változik. Egy lokuszban előforduló két allélváltozat különböző hosszúságát szemlélteti a következő ábra:

Allél 1   
 Allél 2 

- Amennyiben fluorescens festékekkel jelöltek a fragmentek, akkor kapilláris elektroforézissel a következő kronogramhoz juthatunk (15. ábra):



15. ábra Mikrosatellit fluorogram, adott egyed két lokuszának allélváltozatai

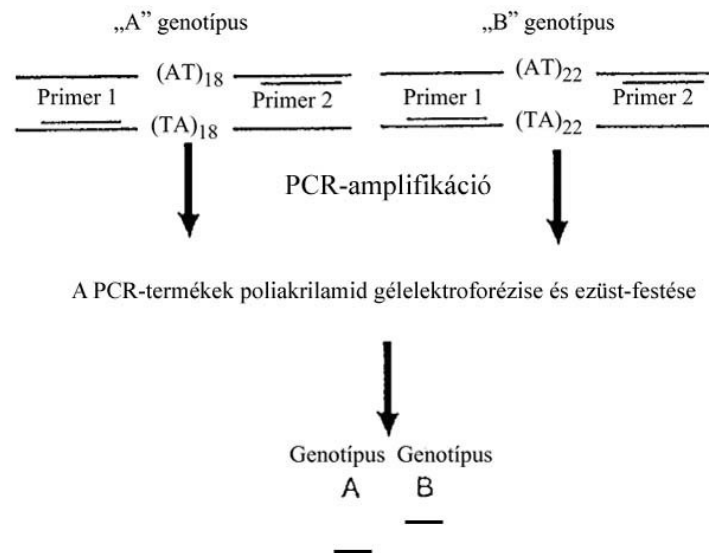
Az ismétlődő motívumsor szempontjából: perfekt, imperfekt és összetett szekvenciákat különböztetünk meg (WEBER 1990). A perfekt mikroszatellitek szabályosan ismétlődő egységekből épülnek fel. Az imperfekt mikroszatellitek esetén egy vagy több nukleotid ékelődik a perfekt sorba. Az összetett szekvenciájú mikroszatelliteknél különböző típusú ismétlődő szekvenciákból épül fel a mikrosatellit régió.

Mintegy másfél évtizeddel ezelőtt, három egymástól független szakcikk jelent meg a mikrosatellit lokuszok allél variabilitásának jellemzése céljából (LITT és LUTY 1989; TAUTZ 1989; WEBER és MAY 1989). A közölt munkákban, a mikrosatelliteket klónozták, majd szekvenálták, vagy szekvencia adatbázis alapján azonosították. A PCR *primereket* a tandem ismétlődő régiót határoló szekvenciák alapján alakították ki, és a felszaporított terméket poliakrilamid gélen futtatták. Manapság automatizált szekvenáló berendezések állnak rendelkezésre, melyekkel gyorsan és megbízhatóan lehet az egyes allélek méretét határozni. A kezdeti lépések óta, a mikrosatellit lokuszokat széleskörűen használják és nagyfokú polimorfizmusuk bizonyítást nyert. Bőséges jelenlétüknek és széleskörű elterjedésüknek köszönhetően közkedvelt és hatékony molekuláris markerré váltak. A mikrosatellit alapú markerekkel tovább bővült a választék az egyedek azonosítása területén, sőt a nagy érzékenységű PCR alapú technika alkalmazása révén új kutatási területeken is alkalmazhatók, mint pl. korlátozottan rendelkezésre álló DNS vagy degradált DNS analízise céljából. A mikrosatellitek viszonylag egyenletesen oszlanak el a genomban, ami igen jó lehetőséget nyújt a géntérképezéshez, a nagy marker variabilitást pedig igen jól lehet hasznosítani egyedi ill. fajtaazonosításban és genetikai összehasonlításokban is (CROOIJMANS és mtsai 1996; BARVE és mtsai 2001, PEEVER és mtsai 2004).

#### **3.7.4.2. Különféle markerezési technikák**

A mikrosatelliteket (SSR-eket) határoló DNS szekvenciák ugyanazon faj egyedein belül általában konzervatívak. A konzervatív DNS szekvenciák ellentétes szálaival azonos *primerekkel* a közbeeső mikrosatellitek PCR-rel megsokszorozhatók egy adott faj valamennyi genotípusában. A fragmentumokat poliakrilamid gélen választjuk el és etídium-bromiddal tesszük láthatóvá. Ezt a speciális, mikrosatellit *primerekkel* történő amplifikációt szekvenciával jelölt PCR-nek vagy **STS-PCR**-nek (**Sequence-Tagged-Site PCR**) nevezzük. A módszerrel a nukleotid ismétlődések számában („n”) meglévő különbséget tudjuk kimutatni a fragmentumok eltérő hosszúsága alapján. A 16. ábra két haploid genotípus (A és B) SSR hossz különbségét mutatja. Az „A” genotípus egy bizonyos SSR lokusznak (AT)/(TA)<sub>18</sub>

allélét hordozza, a „B” genotípusú egyed pedig az (AT)/(TA)<sub>22</sub> allélt. Mindkét genotípus egyetlen PCR-terméket, fragmentumot hoz létre. A „B” egyedtől származó fragmentum azonban nagyobb, mert több (AT)/(TA) ismétlődő egységből épül fel.



16. ábra Adott mikroszatellit lokusz két genotípusban megnyilvánuló allél eltéréseket bemutató sematikus ábra

A 90-es évek elejétől a következő PCR-en alapuló mikroszatellit markermódszereket dolgozták ki: MP-PCR (**M**icrosatellite-**P**rimed **P**CR - PCR mikroszatellit *primerrel*; MEYER és mtsai 1993), AMP-PCR (**A**nchored **M**icrosatellite-**P**rimed **P**CR - végálló mikroszatellit *primerekkel* végzett PCR; ZIETKIEWICZ és mtsai 1994), RAMP (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **M**icrosatellites - véletlen amplifikálódott polimorf mikroszatellitek; WU és mtsai 1994), RAMPO (**R**andom **A**mplified **M**icrosatellite **P**olymorphisms - véletlen amplifikált mikroszatellit polimorfizmus; RICHARDSON és mtsai 1995), STMS (**S**equence **T**agged **M**icrosatellite **S**ites - szekvenciával jelölt mikroszatellit helyek; BECKMANN és SOLLER 1990). Ezek főleg az amplifikációhoz használt *primer*(ek) pozíciójában és típusában különböznek.

### 3.7.4.3. Polimorfizmusok kimutatásának egyik módszere – STMS

A lokusz-specifikus mikroszatellit analízis (STMS) lokusz-specifikus markereket és jól azonosítható alléleket eredményez, szemben az előzőekben felsorolt, úgyszintén mikrosatelliteken alapuló módszerekkel.

**Az STMS-módszer lépései:**

1. adott mikroszatellit szekvenciában gazdag génbank kialakítása
2. mikroszatellit ismétlődések keresése genomkönyvtárban,
3. a megfelelő klónok szekvenálása,
4. az ismétlődésekhez kapcsolódó *primerek* tervezése,
5. kromoszomális DNS amplifikálása az elkészített specifikus *primerekkel*,
6. a PCR-termékek elválasztása denaturáló gélen,
7. detektálás pl. ezüst-nitrát festéssel.

A legújabb STMS-technika alkalmazásakor az 5' és a 3' végen fluoreszcens festékekkel jelölt *primereket* és félautomata szekvenálót használnak. Így a fluoreszcens PCR-termékek az elektroforézis alatt lézerszkenneléssel kimutathatók. A kiértékelés GENESCAN szoftver programmal végezhető. A technikával egyetlen zsebben futtatott 24 különböző mikroszatellit lokuszt is lehet sávonként analizálni. A lézeres szkennelő készülék azonban nagyon drága.

**3.7.4.4. Mikroszatellit *primerek* alkalmazásának lehetőségei**

A jelenleg rendelkezésre álló mikroszatellit markerek közül az STMS-markerek egyesítik az ideális markerekre jellemző tulajdonságokból a legtöbbet. Ezek az alábbiak:

- nagyon változékonyak és informatívak,
- a PCR-rel felszaporított mikroszatellitek szekvenáló gélen történő elválasztásával lehetővé teszik az allélek pontos meghatározását és az allélgyakoriságok kiszámítását,
- az eukarióta genomban mikroszatellitek mindenütt bőségesen jelen vannak,
- valószínűleg semlegesek, mert csak kevés mikroszatellit íródik át,
- megfelelő *primerek* esetében az egyes genotípusok meghatározása PCR-rel gyors, könnyű, csak nanogramnyi templát DNS kell hozzá és automatizálható,
- az eredmények nagymértékben reprodukálhatók, ha szigorú PCR körülményeket alkalmazunk,
- a *primer* szekvenciákkal kapcsolatos információk könnyen cserélhetők az egyes laboratóriumok között.

A STMS-technika viszonylagos hátránya, hogy többé-kevésbé fajspecifikusak, ill. csak részlegesen használhatók a közel rokon fajoknál is. Az egyes lokuszokra specifikus *primerszekvenciákat* kell tervezni, aminek előfeltétele természetesen, hogy szekvencia ismerettel rendelkezünk a genom mikroszatelliteket hordozó fragmentjeiről. Ezért a

mikroszatellit markerek kifejlesztése jelentős előmunkákat igényel. További hátrányai a módszernek, hogy nagy értékű szekvenáló készülékeken lehet csak hatékonyan vizsgálni őket, mivel a különböző allélek nem ritkán csak 1-4 bázispárban térnek el egymástól illetve az allélek pontos beazonosítása is ilyen felbontású futtatást igényel. Költségesebb ez a vizsgálat azért is, mert egy PCR reakcióban csak egy lokuszra nyerünk információt. Lehetséges ugyan multiplex PCR alkalmazása is, több lokusz amplifikálása közös elegyben, ez azonban újabb további optimalizálásokat igényel.

#### 3.7.4.5. Több genomrészlet egyidejű vizsgálata – multiplex PCR

A multiplex PCR egyidejűleg több genomrészlet vizsgálatát teszi lehetővé (EDWARDS és GIBBS 1994). A PCR csőben egy mintán több különböző genomrészletre (lokuszra) specifikus *primer*pár működik. A módszer alkalmazásával jelentősen lehet csökkenteni az egy lokusz vizsgálatára vetített anyagköltséget és vizsgálati időt. Figyelembe kell venni a *primerekkel* szemben támasztott követelményeken kívül a várt termékek relatív hosszát is, ha az azonosítás nem különböző színnel jelölt *primereken* illetve PCR termékeken alapszik. A *primerek* megválasztásánál törekedni kell arra, hogy az egy elegybe kerülő *primerek* között kapcsolódás, azaz a *dimmer* képződés, minimális mértékű legyen, vagyis a *primerek* szabadon kötődhessenek, maximálisan hasznosuljanak. A különböző *primerek* kapcsolódásának egyik példáját a következők szemléltetik:

Két különböző *primer* erős kapcsolódása:

5' CCGAGAGAAGCAACATACTG 3' M9F

  | || ||| | | |||

3' CTGTCTTTCTTTCTCGACTGAACTG 5' M2F

Két különböző *primer* gyenge kapcsolódása:

5' CGTAGGGAAGACGATAAGAGAAC 3' M3F

  ||| |

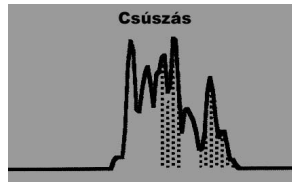
3' ATCTGGTAGCTACCATAATGGAC 5' M5f

#### 3.7.4.6. Mikroszatellit profilok illetve mintázatok kiértékelésének nehézségei

A gélek kiértékelése viszonylag egyszerű folyamat, mivel az elektroforézishez alkalmazott rendszernek nagy a felbontóképessége (akár 1 bázispár különbség is kimutatható) és az allélek jól elkülöníthetők (a mikroszatellit ismétlődések miatt minimum 2 bázispárnyi különbség mindig igazolható). A genotípusok elkülönítése kifejezetten gyors lehet, ha a DNS fragmenteket (allélek) méretét automatizált módszer segítségével határozzuk meg.

A mikroszatellit elemzés potenciális előnyei mellett meg kell említeni az eredmények kiértékelése során felmerülő félreértelmezhetőségi lehetőségeket és azok valószínűsített okait is:

- Null allél (MILLER és WAITS 2003): néhány allél felszaporodásának a hiánya. A *primer* DNS kötő helyén, azaz jelen esetben a mikroszatellit régiót határoló specifikus szakaszokon létrejövő mutáció eredménye. A PCR reakció lefutásához kialakított körülmények megváltoztatásával, vagyis a *primerek* kötődési hőmérsékletének csökkentésével néhány esetben eredményt lehet elérni. A PCR-hez használt *primer* újratervezésére is esetenként szükség lehet. Ha alacsony a templát DNS koncentrációja előfordulhat, hogy a DNS kivonási hibából adódóan az adott allél nem amplifikálódik.
- „Csúszás” (slippage, SHINDE és mtsai 2003) léphet fel a PCR reakcióban a *Taq* polimeráz enzim késése miatt. Az enzim csúszása függ az enzim minőségétől, a lokusztól és a beállított PCR reakció körülményeitől. A csúszás miatt problémás lehet az allél méretének pontos határozása. A főtermékek mellett keletkező járulékos termékek méretüket tekintve csak kis mértékben térnek el, így azok könnyen összetéveszthetők a főtermékkel. A járulékos termékek gyakran dinukleotidból felépülő lokuszok esetén jönnek létre, megnehezítve a homozigota és heterozigota genotípusok megkülönböztethetőségét. A PCR reakció körülményeinek megváltoztatása segíthet a probléma megoldásában.



- Nagy allélek kiesése (avagy kis allélek dominanciája, WATTIER és mtsai 1998) specifikusan kiválasztott rövid allélek felszaporodása miatt. Általában, a nagy allélek felszaporítása kevésbé hatékony, mint a kis alléleké. A PCR reakció körülményeinek megváltoztatásával, a *primerek* specifitása csökkenthető, de ezzel a lokusz specifitás is csökken. A mikroszatellit *primerek* vizsgálati célja ténylegesen a kis allélekre terjed ki.

Áttanulmányozva az *Alternaria* nemzetség gombáiról rendelkezésre álló hazai és külföldi szakirodalmat megállapítható, hogy napjainkban a klasszikus mikológiai vizsgálati módszerek mellett különböző molekuláris technikák alkalmazására került sor, mely egyrészt pontosítja az egyes fajok státuszát, másrészt további kérdéseket vet fel az *Alternaria* fajok rendszerezésével kapcsolatban.



## 4. Anyag és módszer

A genetikai különbségek értékelésére számos módszer áll rendelkezésre (SCHAAL és mtsai 1991). Hagyományos módszerrel a genetikai különbségekre következtetünk a mikroorganizmus alakjából (morfológia) vagy a növekedésből, mint válaszreakcióból. E megközelítés alapján a különböző fenotípussal rendelkező egyedeket (avagy az eltérő környezetből származó egyedeket) ugyanolyan körülmények közé helyezünk. Ezzel a környezet differenciáló hatását igyekszünk kiküszöbölni, feltételezhetően a fajok közötti további eltérés már genetikai eredetű.

Természetesen a DNS molekula nukleotid sorrendjében megmutatkozó variációk tükrözik legjobban a genetikai eredetű eltéréseket.

A következőkben tekintsük át, hogy milyen módszereket találtunk alkalmasnak *Alternaria* izolátumaink genetikai eltéréseinek kimutatására és mérésére, illetve milyen módszerekkel végeztük kutatásunkat a célkitűzésben megfogalmazott célok elérése érdekében.

### 4.1. Vizsgálatok helyszíne

Az *Alternaria* izolátumokkal kapcsolatos tenyésztési és morfológiai vizsgálatokat Keszthelyen a VE Georgikon Mezőgazdaságtudományi Karának Növénykórtani és Növényvirológiai Tanszékén végeztük 2002-2004-ben, itt tartjuk fenn az *Alternaria* törzstenyészteteinket is.

Az abiotikus tényezők hatását, a RAPD és az mtRFLP vizsgálatokat Budapesten, az MTA Növényvédelmi Kutatóintézet Növénykórtani osztályán végeztük, 2004-2005-ben.

A mikroszatellit markerekkel történő molekuláris analízist az Angers-i Egyetem, Természettudományi Karának laboratóriumában (UMR PaVé No. 77) végeztük, Franciaországban, 2004-2005-ben.

## 4.2. *Alternaria* izolátumok morfológiai jellemzése

### 4.2.1. Hazai *Alternaria* izolátumok

Hazánkban csak néhány napraforgóról származó fajspecifikus izolátum állt kutatásunk rendelkezésére (WALCZ 2003). Ezért saját *Alternaria* izolátumokat gyűjtöttünk be 2002-től 2004-ig terjedő időszakban. Az izolátumok begyűjtése során a következő adatokat jegyeztük fel: gazdanövény, fertőzött növényi rész, hely, időpont. Herbáriumai összehasonlító gyűjteményt készítettünk. Az izolátum gyűjteményünkben helyet kaptak fűfélék (*Lolium* spp.), gyomnövények (*Amaranthus*, *Asclepias*, *Bolboschoemus*, *Cirsium*, *Schoenoplectus*) és kultúrnövények (*Beta*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Lycopersicon*, *Oryza*, *Petroselinum*, *Vitis*) tüneteket mutató részeiről, illetve magjairól származó izolátumok. Az azonnal felhasználásra nem kerülő növényrészeket begyűjtés után szétválogatva és gondosan préselve vagy szárítva tároltuk.

Az izolálás során elsőként mindig a tipikus tüneteket mutató növényrészeket (szárat, levelet illetve magokat) válogattuk ki. Ezután a begyűjtött növényanyag számára nedves kamrát készítettünk. Ezzel a módszerrel valósítható meg leginkább az az optimális feltételrendszer, amely szinte valamennyi gomba fejlődését és szaporítóképleteik kifejlését képes biztosítani.

A begyűjtött gyommagokból gyűjtési helyenként 50-50 db mag csíráztatására került sor úgy, hogy 15 cm átmérőjű Petri-csészébe kétrétegű szűrőpapírt helyeztünk, amelyet desztillált vízzel megnedvesítettük. Ezután kb. 22 °C hőmérsékletű inkubációs szekrénybe helyeztük. A növényi részek esetében hasonló módon jártunk el, de a fertőzés tüneteit mutató levél- és szárrészek alá műanyag hálót is elhelyeztünk annak érdekében, hogy a növényi részek a nedves szűrőpapírral ne érintkezessenek, mivel ebben az esetben barnulnak, feketednek, végül vizsgálatra alkalmatlanná válnak. A műanyag háló a gomba sporulációját is elősegíti a növényanyag mindkét oldalán.

A tüneteket mutató növényi részekről 1-3 *Alternaria* izolátumot készítettünk.

Az összes kisspórás (118) izolátum közül 79 hazai és az összes nagyspórás (22) izolátum közül 6 hazai *Alternaria* izolátumot sikerült vizsgálatba vonnunk.

#### 4.2.2. Referencia izolátumok

Referencia izolátumokat szereztünk be, abból a célból, hogy az ismeretlen azonosságú izolátumaink jellemzőit össze tudjuk hasonlítani más reprezentatív, azonosított faj izolátumaival. Ezek részint törzsgyűjteményekből, részint a kutatók korábban már vizsgált autentikus izolátumai közül származtak. A külföldről beszerzett *Alternaria* izolátumaink forrásai a következők:

- ICMP (International Collection of Micro-organisms from Plants, Új-Zéland),
- UAMH (University of Alberta Microfungus Collection, Kanada)
- ATCC (American Type Culture Collection, USA) törzsgyűjteményekből valamint
- B. Andersen (BA) - Biocentrum DTU Dánia,
- P. Simoneau (PS) - UMR PaVé Université d'Angers Franciaország,
- B. M. Pryor (BMP) – Dpt Plant Pathology, University of Arizona USA;
- P. J. M. Bonants (PJMB) - Plant Research International Wageningen Hollandia;
- S. Swartz (SS) - Research Centre, Agriculture and Agri-Food Kanada;
- B. Iacomi-Vasilescu (BIV) - USAMV, Dpt Phytopathology Románia.

Kisspórás izolátumaink eredetére és gazdanövényére vonatkozó adatokat a 2. táblázat tartalmazza. A táblázatban terjedelmi okok miatt a RAPD és az mtDNS RFLP elemzése során kapott eredményeket, mint típus adatokat is feltüntettük.

A nagyspórás izolátumok a 3. táblázatban szerepelnek. A törzsgyűjteményekből származó izolátumokra további információt az izolátumnak megfelelő nemzetközi gyűjtemény honlapján kaphatunk.

2. táblázat A vizsgálatba vont kispórás *Alternaria* izolátumokra vonatkozó adatok

Izolátum	Kód	Gazdanövény és származás	Forrás	RAPD típus	RFLP típus Hin 61
<i>A. alternata</i>	4	<i>Arachis hypogea</i> , Dánia	BA, 922	4	I b
<i>A. alternata</i>	5	<i>Datura stramonium</i> , USA	BA, 923	4	I a
<i>A. alternata</i>	27	ismeretlen, USA	BMP 21-41-091, EGS 34-016	4	I a
<i>A. alternata</i>	28	ismeretlen, USA	BMP 21-41-092, EGS 34-039	4	I a
<i>A. alternata</i>	36	<i>Cirsium arvense</i>	saját	4	I a
<i>A. alternata</i>	37	<i>Cucurbita pepo</i>	saját	4	I b
<i>A. alternata</i>	40	<i>Daucus carota</i> , Hollandia	PJMB, 102	4	I a
<i>A. alternata</i>	46	<i>Lycopersicon esculentum</i>	saját	4	I b
<i>A. alternata</i>	48	<i>Oryza sativa</i>	saját	4	I c
<i>A. alternata</i>	51	<i>Lolium perenne</i>	saját	4	I b
<i>A. alternata</i>	58	<i>Asclepias syriaca</i>	saját	4	I b
<i>A. alternata</i>	59	<i>Datura stramonium</i>	saját	4	I a
<i>A. alternata</i>	65	<i>Brassica cretica</i> cv. <i>cymosa</i>	saját	4	I a
<i>A. alternata</i>	75	<i>Solanum dulcamara</i>	saját	4	I b
<i>A. alternata</i>	79	<i>Allium cepa</i>	saját	4	I a
<i>A. alternata</i>	91	<i>Triticum aestivum</i>	saját	4	I b
<i>A. alternata</i>	92	<i>Triticum aestivum</i>	saját	4	I a
<i>A. alternata</i>	99	<i>Helianthus annuus</i>	saját	4	I b
<i>A. alternata</i>	101	<i>Helianthus annuus</i>	saját	4	I b
<i>A. alternata</i>	105	<i>Alnus glutinosa</i>	saját	4	I b
<i>A. alternata</i>	106	<i>Avena sativa</i>	saját	4	I a
<i>A. alternata</i>	107	<i>Avena sativa</i>	saját	4	I a
<i>A. alternata</i>	110	<i>Phaseolus vulgaris</i> , Kanada	UAMH gyűjtemény, 1769	4	I c
<i>A. alternata</i>	128	<i>Lycopersicon esculentum</i>	saját	4	I a
<i>A. alternata</i>	133	<i>Allium cepa</i>	saját	4	I b
<i>A. alternata</i>	137	<i>Helianthus annuus</i>	saját	4	I a
<i>A. alt./A.ten.</i>	82	<i>Raphanus sativus</i>	saját	4	-
<i>A. alt./A.ten.</i>	150	<i>Dendranthema grandiflorum</i>	saját	4	-
<i>A. arborescens</i>	11	<i>Lycopersicon esculentum</i> , Dánia	BA, 1202	3	III
<i>A. arborescens</i>	17	<i>Pyrus</i> sp., USA	BA, 1220	3	III
<i>A. arborescens</i>	30	ismeretlen, USA	BMP 21-43-001, EGS 39-128	3	III
<i>A. arborescens</i>	43	<i>Malus domestica</i> , Dánia	BA, 1202	3	III
<i>A. arborescens</i>	52	<i>Petroselinum crispum</i>	saját	3	III
<i>A. arborescens</i>	53	<i>Brassica napus</i>	saját	3	III
<i>A. arborescens</i>	57	<i>Triticum aestivum</i>	saját	3	III
<i>A. arborescens</i>	64	<i>Cucumis sativus</i>	saját	3	III
<i>A. arborescens</i>	67	<i>Amaranthus retroflexus</i>	saját	3	III
<i>A. arborescens</i>	68	<i>Amaranthus retroflexus</i>	saját	3	III
<i>A. arborescens</i>	71	<i>Beta vulgaris</i>	saját	3	III
<i>A. arborescens</i>	87	<i>Reynontia japonica</i>	saját	3	III
<i>A. arborescens</i>	103	<i>Solanum tuberosum</i>	saját	3	III
<i>A. arborescens</i>	131	<i>Zea mays</i>	saját	3	III
<i>A. brassicicola</i>	35	<i>Brassica oleracea</i> , Hollandia	PJMB, 177	1	V
<i>A. brassicicola</i>	66	<i>Brassica cretica</i> convar. <i>botrytis</i>	saját	1	V
<i>A. brassicicola</i>	78	<i>Nicotina tabacum</i>	saját	1	V
<i>A. brassicicola</i>	117	<i>Brassica oleracea</i> , Új-Zéland	ICMP gyűjtemény, 10121	1	V
<i>A. brassicicola</i>	123	<i>Brassica oleracea</i> , Franciaország	PS, Abra 20	1	V
<i>A. brassicicola</i>	127	<i>Brassica oleracea</i> , Franciaország	PS, Abra 40	1	V
<i>A. brassicicola</i>	141	<i>Brassica oleracea</i>	saját	1	V
<i>A. brassicicola</i>	145	<i>Brassica oleracea</i>	saját	1	V
<i>A. brassicicola</i>	146	<i>Brassica oleracea</i>	saját	1	V
<i>A. brassicicola</i>	153	ismeretlen, Kanada	SS, Abc2	1	V
<i>A. arbusti</i>	18	<i>Pyrus</i> sp., USA	BA, 1263	6	
<i>A. cheiranthi</i>	23	<i>Cheiranthus cheiri</i> , USA	BMP 21-26-001, EGS 41-188	6	
<i>A. cheiranthi</i>	116	<i>Cheiranthus cheiri</i> , Új-Zéland	ICMP gyűjtemény, 5605	6	
<i>A. cineraria</i>	118	<i>Senecio cruentus</i> , Új-Zéland	ICMP gyűjtemény, 10235	6	
<i>A. dianthicola</i>	114	<i>Dianthus caryophyllus</i> , Új-Zéland	ICMP gyűjtemény, 2023	6	
<i>A. helianthi</i>	95	<i>Helianthus annuus</i>	saját	6	

2. táblázat folytatása

Izolátum	Kód	Gazdanövény és származás	Forrás	RAPD típus	RFLP típus Hin 6I
<i>A. infectoria</i>	15	<i>Scophulaire</i> sp., USA	BA, 1214	6	
<i>A. infectoria</i>	19	ismeretlen, USA	BMP 21-11-001, EGS 27-193	6	
<i>A. infectoria</i>	33	<i>Solanum tuberosum</i>	saját	6	
<i>A. infectoria</i>	45	ismeretlen, USA	BA, 1240	6	
<i>A. metacromatica</i>	16	<i>Triticum aestivum</i> , USA	BA, 1218	6	
<i>A. oregonensis</i>	14	<i>Triticum aestivum</i> , USA	BA, 1210	6	
<i>A. radicina</i>	39	<i>Brassica oleracea</i> , Hollandia	PJMB, 359	6	
<i>A. radicina</i>	42	<i>Daucus carota</i> , USA	BMP 21-21-030	6	
<i>A. gaisen</i>	6	<i>Pyrus</i> sp., USA	BA, 935	2	IV
<i>A. gaisen</i>	7	<i>Pyrus</i> sp., USA	BA, 936	2	IV
<i>A. gaisen</i>	8	<i>Pyrus</i> sp., USA	BA, 937	2	IV
<i>A. gaisen</i>	9	<i>Pyrus</i> sp., USA	BA, 938	2	IV
<i>A. gaisen</i>	10	<i>Pyrus</i> sp., USA	BA, 939	2	IV
<i>A. longipes</i>	1	<i>Nicotina tabacum</i> , USA	BA, 915	7	II
<i>A. longipes</i>	2	<i>Nicotina tabacum</i> , USA	BA, 917	7	II
<i>A. longipes</i>	3	<i>Nicotina tabacum</i> , USA	BA, 916	7	II
<i>A. longipes</i>	144	<i>Nicotina tabacum</i> , Új-Zéland	ICMP gyűjtemény, 5604	7	II
<i>A. tenuissima</i>	12	<i>Malus domestica</i> , Dánia	BA, 1201	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	13	<i>Triticum aestivum</i> , Dánia	BA, 1203	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	29	ismeretlen, USA	BMP 21-42-00, EGS 34-015	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	47	<i>Lolium multiflorum</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	49	<i>Bolboschoenus maritimus</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	54	<i>Zinnia elegans</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	55	<i>Cirsium arvense</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	56	<i>Helianthus annuus</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	60	<i>Triticum aestivum</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	61	<i>Schoenoplectus lacustris</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	63	<i>Vitis</i> sp.	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	69	<i>Amaranthus retroflexus</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	70	<i>Beta vulgaris</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	72	<i>Beta vulgaris</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	73	<i>Beta vulgaris</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	74	<i>Echinocystis lobata</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	76	<i>Solanum dulcamara</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	77	<i>Nicotina tabacum</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	80	<i>Allium cepa</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	81	<i>Asclepias syriaca</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	83	<i>Lycopodium clavatum</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	85	<i>Solanum dulcamara</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	86	<i>Nicotina tabacum</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	88	<i>Picea pungens</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	89	<i>Echinocystis lobata</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	90	<i>Triticum aestivum</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	94	<i>Zinnia elegans</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	96	<i>Helianthus annuus</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	97	<i>Helianthus annuus</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	98	<i>Helianthus annuus</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	100	<i>Helianthus annuus</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	104	<i>Rubus caesius</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	129	<i>Brassica napus</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	130	<i>Triticum aestivum</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	132	<i>Solanum dulcamara</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	135	<i>Sambucus nigra</i>	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	139	<i>Triticum aestivum</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	140	<i>Helianthus annuus</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	142	<i>Dendranthema grandiflorum</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	143	<i>Crataegus</i> sp.	saját	5	I a
<i>A. tenuissima</i>	147	<i>Nicotina tabacum</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	148	<i>Solanum tuberosum</i>	saját	5	I b
<i>A. tenuissima</i>	149	<i>Solanum tuberosum</i>	saját	5	I b

3. táblázat. A vizsgálatba vont nagyspórás *Alternaria* izolátumokra vonatkozó adatok

Izolátum	Kód	Gazdanövény és származás	Forrás
<i>A. brassicae</i>	20	<i>Brassica oleracea</i> , Új-Zéland	ICMP gyűjtemény, 11487
<i>A. brassicae</i>	41	<i>Brassica oleracea</i> , Hollandia	PJMB, 164
<i>A. brassicae</i>	50	<i>Brassica oleracea</i>	saját
<i>A. brassicae</i>	121	<i>Brassica oleracea</i> , Franciaország	PS, Abre 14
<i>A. brassicae</i>	122	<i>Brassica oleracea</i> , Franciaország	PS, Abre 16
<i>A. brassicae</i>	126	<i>Brassica oleracea</i> , Franciaország	PS, Abre 112
<i>A. brassicae</i>	151	<i>Brassica oleracea</i>	saját
<i>A. cucumerina</i>	119	<i>Cucumis melo</i> , Új-Zéland	ICMP gyűjtemény, 10236
<i>A. dauci</i>	24	<i>Daucus carota</i> , USA	BMP, 21-31-016
<i>A. dauci</i>	25	<i>Daucus carota</i> , USA	BMP, 21-31-018
<i>A. dauci</i>	113	<i>Daucus carota</i> , Új-Zéland	ICMP gyűjtemény, 5632
<i>A. helianthi</i>	62	<i>Helianthus annuus</i>	saját
<i>A. helianthificiens</i>	102	<i>Helianthus annuus</i>	saját
<i>A. helianthificiens</i>	138	<i>Helianthus annuus</i>	saját
<i>A. japonica</i>	31	<i>Brassica oleracea</i> , USA	BMP, 21-72-002
<i>A. japonica</i>	120	<i>Brassica oleracea</i> , Franciaország	PS, Ajap 216
<i>A. japonica</i>	124	<i>Brassica oleracea</i> , Franciaország	PS, Ajap 35
<i>A. japonica</i>	125	<i>Brassica oleracea</i> , Franciaország	PS, Ajap 108
<i>A. porri</i>	26	<i>Allium cepa</i> , USA	BMP, 21-35-002
<i>A. japonica</i>	154	<i>Brassica oleracea</i> , Kanada	SS, AR6
<i>A. japonica</i>	112	<i>Brassica oleracea</i> , Kanada	UMHT gyűjtemény, 7475
<i>A. solani</i>	134	<i>Lycopersicon esculentum</i>	saját

#### 4.2.3. Tenyésztéshez felhasznált táptalajok

- **Burgonya-dextróz agar (BDA)**

39 g porított BDA port (Scharlau Microbiology, Spanyolország) helyezünk 1 liter desztillált vízbe. E módszerrel a táptalaj azonos minősége garantálható.

A burgonya-dextróz agar tenyésztésre, izolálásra, gomba kimutatásra általánosan elterjedt tápközeg. A szén-hidrogén forrás és a burgonya főzet elősegíti a gombák növekedését, ugyanakkor az alacsonyra kalibrált pH (5.6) részlegesen gátló hatást fejt ki a kísérő és felülfertőzést okozó baktériumokkal szemben.

- **Czapek-Dox táptalaj**

NaNO <sub>3</sub>	3.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 g
Szacharóz	30.0 g
Agar	15 g
Desztillált víz	1 liter

Ezt a táptalajféléseget gyakran használják a mikológusok. Szintetikus összetétele miatt egyes összetevők koncentrációja jól befolyásolható.

- **Dichlorán-bengálrózsa-élesztőkivonat agar (Dichloran Rose Bengal Yeast Extract Sucrose Agar – DRYES, FRISVAD 1983)**

Élesztőkivonat	20 g
Szacharóz	30 g
Agar	20 g
Botran (2,6-dichloro-4-nitroaniline, Fluka)	2 mg/l
Bengálrózsa	25 mg/l
Csapvíz	1 liter

DRYES agart az *Alternaria infectoria* kisspórás fajcsoport specifikus elkülönítése céljából használtunk. Az *A. infectoria* fajcsoportba sorolható fajok DRYES agaron jellegzetes, homogén, piszkosfehér telepet képeznek (ANDERSEN és THRANE 1996).

A csapvíz alkalmazása miatt nyomelemekkel nem szükséges a táptalajt kiegészíteni.

A Botran (2,6-dichloro-4-nitroanilin) szelektív gombaölő szerként gátló hatást fejt ki *Botrytis*, *Monilinia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia* és *Sclerotium* fajokkal szemben. A közeg nem alkalmas mikromorfológiai vizsgálatokhoz szükséges gombák tenyésztésére.

- **Vizes-agar**

Bakterológiai agar	20.0 g
Desztillált víz	1 liter

A vizes-agaron vizsgált *Alternaria* izolátumok kifejezetten jól sporuláltak, a telepnövekedés lassú ezen a tápanyaghiányos agaron.

#### 4.2.4. Izolálás, monokonídiumos tenyészetek létrehozása és az izolátumok tartósítása

A 17. ábra vázlatosan foglalja össze az izolálás és tenyésztés körülményeit, melyeket a fenotípusos jellemzés különböző kísérleti fázisában alkalmaztunk. Az izolálás során az egyes léziókról származó konídiumokat mikroszkóppal is megvizsgáltuk, klasszikus mikológiai módszert, az egyszerű kaparékkészítés módszerét alkalmazva. A kaparékot lándzsatű segítségével vettük, majd a tárgylemezen elhelyezett vízcseppbe helyeztük (a preparátum elkészítéséhez desztillált vizet használtunk) és légmentesen fedőlemezrel zártuk. Az ilyen módon elkészített preparátumot fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk.

A mikroszkopizáláshoz HUND Wetzlar WILO-PRAX h 500 fénymikroszkópot használtunk. A felvételeket Nikon Coolpix 4500 típusú digitális fényképezőgéppel készítettük. Mikrofotókat is készítettünk a tanulmányozott *Alternaria* gombákról.

Így a fertőzési tüneteket mutató növényi szövetekről nyert kaparékból a gombát BDA táptalajon közvetlenül tenyésztettük ki. A táptalajt néhány esetben antibiotikus kiegészítéssel készítettünk: pl. 500 mg/l ampicillin és 10 mg/l rifampicin. Szelektív, DRYES táptalajt az *A. infectoria* faj határozása céljából készítettünk. Tiszta tenyészetet többszöri átoltás után kaptunk.

A megadott előírás szerint elkészített táptalajokból 10 ml-t öntöttünk ki előzetesen sterilizált 9 cm átmérőjű Petri-csészékbe. A kihült és megszilárdult táptalajokra nagy gondossággal, steril körülmények között, lamináris boxban vittük fel a gomba szaporítóképleteit. A leoltáshoz oltókacsot és lándzsatűt vettünk igénybe. A beoltott táptalajt termosztátban (kb. 22 °C) inkubáltuk. A gombatenyészetek így 6-7 nap alatt fejlődtek ki. A vizsgálatok során nagy figyelmet fordítottunk a vizsgálati anyagok pontos megjelölésére és a megfigyelések korrekt rögzítésére.

Monospóras tenyészetet úgy állítottunk elő, hogy *Alternaria*-val fertőzött növényi részről kaparékot vettünk, melyet vizes-agarra oltottunk 50 µl steril desztillált víz jelenlétében. 2 óra elteltével az életképes, kicsírázott konídiumokat láng felett húzott steril



üvegtűvel, fénymikroszkóp alatt, 50×-es nagyítás mellett, vizes-agarra, BDA illetve DRYES táptalajra oltottuk. A kórokozó fenntartása BDA-n történt.

Az izolátumok hosszú távú tárolása céljából többféle módszert kipróbáltunk, melyek a következők: a.) Eppendorf-csövekbe gombakorongokat (5 mm átmérő) helyeztünk és deszikkátorral kiszárítottuk tartalmukat, majd a csöveget lezártuk, b.) ferde agart (9 ml) oltottunk be gombakultúrával, melyet parafin olajjal fedtük le, c.) gombakorongokat 2 ml-es kriocsőbe helyeztünk, amelyekre parafin olajat rétegeztünk (kb. 1.5 ml). Az utóbbi módszert használtuk következetesen az izolátumaink hosszú távú tárolása céljából. Az így elkészített csöveget hűtőszekrényben tároltuk. A módszerrel gazdaságosan helyet takarítottunk meg és megoldottuk az izolátumok egyszerű szállítását is.

#### 4.2.5. Az *Alternaria*-k meghatározása

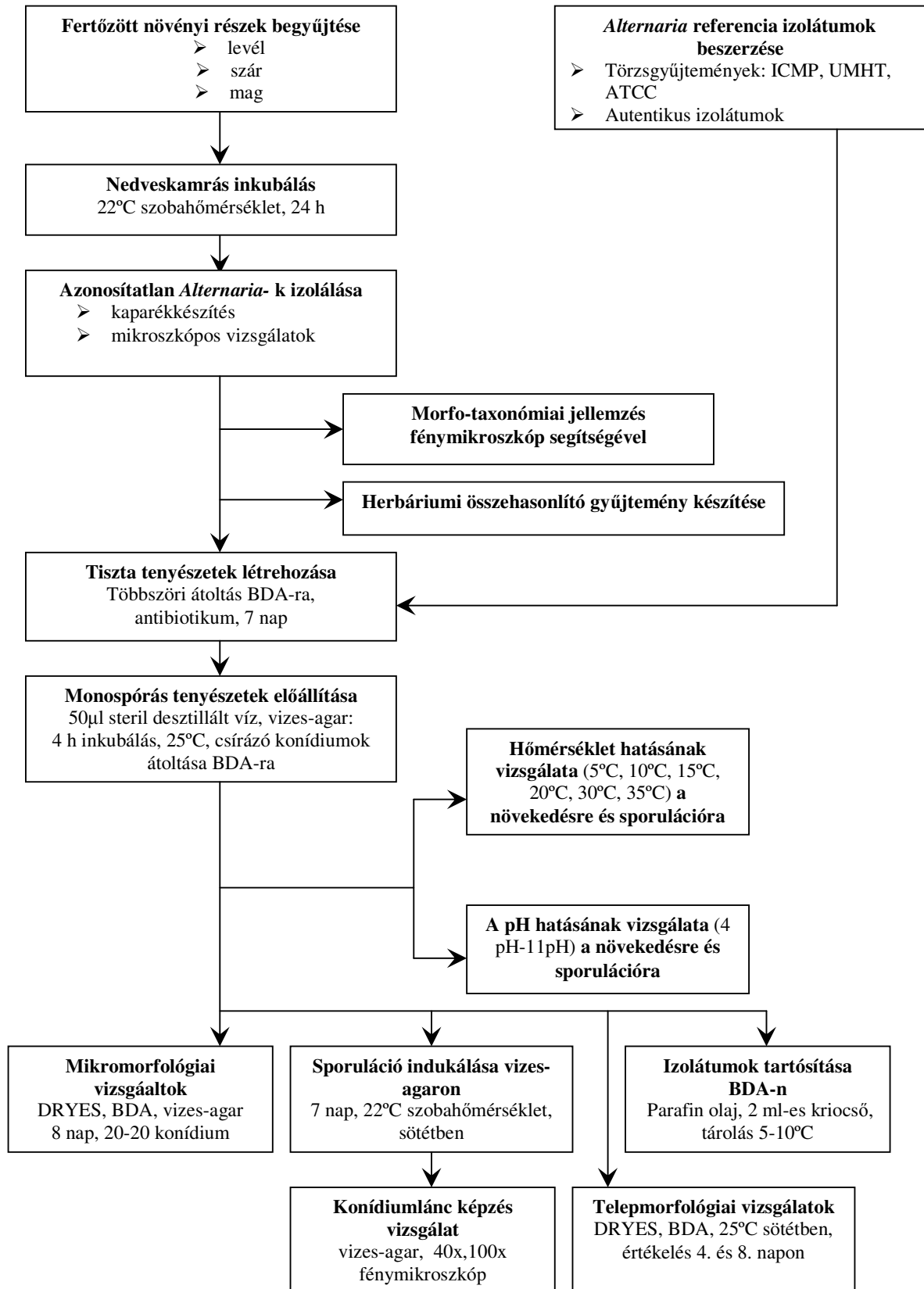
Az izolált mikroszkopikus gombák identifikálását a következő határozókönyvek és taxonómiát tárgyaló szakkikkek segítségével végeztük el

- VÖRÖS (1985)
- ELLIS (1971)
- SIMMONS és ROBERTS (1993)

Számos faj szinonim megnevezését SIMMONS (1992) ajánlása szerint fogadtuk el.

#### 4.2.6. Mikromorfológiai tulajdonságok vizsgálata fénymikroszkóp segítségével

Adott izolátum mindhárom táptalajra (BDA, DRYES, vizes-agar) oltott nyolc napos tenyészetéből kaparékot vettünk és tartós preparátumot készítettünk, melyen 20-20 érett konídiumot választottunk ki és mértük azok hosszát, szélességét, csőr hosszúságát, csőr szélességét, keresztfalak és hosszanti falak számát. A különböző táptalajon kapott értékekből szórást ( $s$ ), átlagot ( $\bar{x}$ ) és relatív szórást (CV) számoltunk. A relatív szórás ( $CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$ ) segítségével az egyes táptalajféleségeken kapott adatok szórásait összehasonlítottuk, valamint a CV % értéket abszolút értelemben a maximális szinthez tudtuk hasonlítani ( $CV_{\max} = \sqrt{n-1}$ ) (SVÁB 1973).



17. ábra Az *Alternaria* izolátumok általános kezelésével és vizsgálatával kapcsolatban általunk kialakított folyamatábra

#### 4.2.7. Konídiumlánc képzés vizsgálata

Vizes-agaron a konídiumlánc szerkezetét a 7. napon 22°C-os sötétkamrában történő inkubálást követően, fénymikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A konídiumlánc képzést 40×-es, illetve 100×-os nagyítású fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A tipikus konídiumláncokról digitális felvételeket készítettünk.

A referencia fajok tenyészeit és a konídiumképzés jellemzőit szintén feljegyeztük.

#### 4.2.8. Telepmorfológiai jellemzők vizsgálata

SIMMONS (1995, 1999) ajánlásának megfelelően, a táptalajokon végzett megfigyeléseket monospórák kolóniákból származó tenyészeteken hajtottuk végre.

A morfológiai tulajdonságok meghatározásához BDA, Czapek-Dox és DRYES táptalajt használtunk. A Petri-csészéket 25°C-on, sötétben inkubáltuk. A 4. és 8. napon feljegyeztük a telep-morfológiai bélyegeket. Vizsgáltuk a tenyészetek sugárirányú növekedési ütemét, színét, zónázottságát, szélét, tömörségét, agaros közegben fejlődött kristály, illetve pigmenttermelést. Az egyes tulajdonságokat vizuálisan értékeltük, illetve mértük.

#### 4.2.9. Hőmérséklet és pH hatásának vizsgálata *in vitro* a gomba növekedésére és sporulációjára

Az egyes fajcsoportokból 1-1 reprezentatív izolátumot választottunk ki a megfigyelt morfológiai jellemzők (és a későbbiekben tárgyalásra kerülő molekuláris vizsgálati eredmények) alapján. A továbbiakban az *in vitro* vizsgálatokat ezen izolátumokkal végeztük el (4. táblázat).

A növekedési vizsgálatokat monospórázott gombatenyészetekkel végeztük. Kilenc cm-es Petri-csészéket oltottunk be az aktívan növekvő, kb. 1 hetes telepek széléből kivágott 5 mm átmérőjű agarkorongokkal. Az inokulálást követően az izolátumokat alumínium hengerben tároltuk és  $\pm 0.5^\circ\text{C}$  hőmérséklet tűrésű kalibrált hűtő-fűtő termosztátba helyeztük. Háromszoros ismétlésben vizsgáltuk a hőmérséklet és a pH hatását a fajcsoportok növekedésére és sporulációjára. Az ismétlések során kapott eredményeket átlagoltuk.

4. táblázat Az abiotikus tényezők vizsgálatsorába bevont *Alternaria* izolátumok

Izolátum	Kód
<i>A. brassicicola</i>	141
<i>A. arborescens</i>	103
<i>A. alternata</i>	107
<i>A. gaisen</i>	10
<i>A. tenuissima</i>	72
<i>A. longipes</i>	2
<i>A. infectoria</i>	19
<i>A. brassicae</i>	50

- **Hőmérséklet hatásának vizsgálata**

A hőmérséklet hatásának vizsgálatát BDA táptalajra oltott tenyészetekkel végeztük.

- **Hőmérséklet hatása a növekedésre**

A tenyészeteket 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35°C-on termosztátban, sötétben inkubáltuk. Valamennyi izolátum értékelésére a 6. napon került sor, amikor a leggyorsabban növekedő izolátum sem érte még el a Petri-csésze szélét. Az optimális növekedési ráta az utolsó napon mért telepátmérőből számolható (növekedés mm-ben osztva az inokulációtól eltelt napok számával).

- **Hőmérséklet hatása a sporulációra**

A sporuláció vizsgálat céljából sterilizált celofán korongokat helyeztünk a BDA táptalajt tartalmazó Petri-csészék felületére. A csészéket 5 mm-es agarkoronggal oltottuk be. A tenyészeteket 5, 10, 15, 20, 25, 30 és 35°C-on termosztátban, sötétben inkubáltuk. A vizsgálatsorozatot 10 nap elteltével értékeltük, mikor a leggyéribben sporuláló tenyészet sporulációját is meg tudtuk határozni. A sporuláció napi intenzitását a 10. napon Bürker-kamrával mértük. A spóraszámából koncentrációt számoltunk, melyből napi intenzitást úgy kaptunk, hogy az így kapott értéket osztottuk az eltelt napok számával.

- **Hőmérséklet hatása a tenyészetek pH értékére**

A porított buronya-dextróz agarból előállított kultúrák indító pH értéke 5.6 volt. Ehhez képest a hőmérséklet változása révén, az anyagcsere folyamatok változása miatt, a tenyészetek pH értéke változást mutathat a kezdeti értékhez képest. Vizsgálataink során mértük a 10. napon mértük a 15, 20, 25, 30 és 35°C-on előállított tenyészetek pH értékét.

- **pH hatásának vizsgálata**

A tápközeg pH-jának hatását *in vitro* körülmények között BDA táptalajon vizsgáltuk. A pH-t vagy HCl-dal vagy NaOH oldattal állítottuk be autoklávozást követően oly módon, hogy 50 ml-es mintaadagú táptalaj pH-ját módosítottuk a kívánt mértékre nem steril körülmények között, és feljegyeztük a kiegyenlítéshez használt oldatok fogyását. Így a pH-t folyékony táptalajban állítottuk be 206-pH2 (Testo GmbH, Németország) pH-mérővel. Steril körülmények között a nagyobb mennyiségű oldathoz tudtuk adagolni a pH beállításához szükséges ismert mennyiségű oldatokat. Az inokulálást megelőző pH értékeket az eredmények fejezetben ismertetjük,  $\pm 0,02$  pontossággal. A pH pontosságot a pH-mérő készülék gyártójának igazolása alapján állapítottuk meg.

- **pH hatása a növekedésre**

A táptalajok pH-ját 4-11-ig állítottuk be a fent leírt módon. A beoltást a szokott módon végeztük el, 5 mm-es átmérőjű fiatal tenyészetek aktívan növekvő zónáiból nyert gombakorongokkal. A tenyészeteket állandó hőmérsékleten, 25°C-on tartottuk hűtő-fűtő termosztátban. A 8. napon mértük a tenyészetek növekedését és napi átlagos növekedési mutatót számoltunk.

- **pH hatása a sporulációra**

A sporulációs vizsgálatra előkészített, celofán koronggal borított BDA-n előállított tenyészeteket ugyanúgy kezeltük, mint a növekedés vizsgálatra beállított tenyészeteket. Bürker-kamrával a 10. napon mértük a konídiumszámot, melyből egységnyi térfogatra napi intenzitást számoltunk.

### 4.3. *Alternaria* izolátumok molekuláris jellemzése

Az *Alternaria* izolátumaink (4.2.2. fejezet, 2. és 3. táblázat) azonosítása céljából RAPD és mitokondriális DNS RFLP vizsgálatot hajtottunk végre. Két izolátum esetében a rDNS ITS1 és ITS2 szakaszát felszaporítottuk WHITE és mtsai (1990) módszere szerint, majd a PCR terméket szekvenáltattuk. A PCR-termékek szekvenálást a Genome Express (Grenoble, Franciaország) cég végezte megrendelés alapján.

#### 4.3.3. DNS kivonás CTAB használatával

DNS-kivonáshoz 100 ml burgonya-dextróz tápoldatot inokuláltunk 10 napos tenyészetek konídium szuszpenziójával. A beoltott gombakultúrát 72 órán keresztül rázattuk (120 rpm) 22°C-on. A képződött micéliumot textilszűrővel nyertük ki, majd liofilizáltuk és folyékony nitrogénben porítottuk. A teljes genomi DNS kivonását alapvetően MURRAY és THOMPSON (1980) módszere szerint végeztük. Egy milliliter lizáló pufferben (0,7 M NaCl, 1% CTAB, 50 mM Tris, pH 8,0, 250 mM EDTA, pH 8,0) 60 mg micéliumport tártunk fel 65°C hőmérsékleten, vízfürdőben. A sejttörmelékét centrifugálással távolítottuk el, majd extrakciót végeztünk fenol-kloroform-izoamil-alkohol (25:24:1) és kloroform-izoamil-alkohol (24:1) keverékével. A DNS-t B oldat (1% CTAB, 50 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA, pH 8,0) 1:1 arányú elegyében kicsapattuk. A pelletet lízis puffer és B oldat 1:1 arányú keverékével mostuk, majd C oldatban (10 mM Tris, pH 8,0, 0,1 mM EDTA, pH 8,0, 1 M NaCl) feloldottuk, melyből a DNS-t izopropanollal csaptuk ki, majd mostuk 70%-os etanolban, s végül 200 µl TE (10 mM Tris és 1 mM EDTA, pH 8,0) pufferben oldottuk. Ezt az anyagot kezeltük ribonukleázzal (RNáz A, Fermentas, 1 Kunitz unit/minta) és proteínázzal (Proteináz-K, Fermentas, 50 µg/minta). Újabb szerves oldószeres extrakció és alkoholos kicsapítás után 30 µl TE-ben oldottuk fel a DNS-t. A minták DNS koncentrációját spektrofotométerrel határoztuk meg (Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 2S).

#### 4.3.4. RAPD vizsgálat

A széleskörűen használt RAPD-módszer viszonylag könnyen kivitelezhető és hatékony eszköze a polimorfizmusok feltárásának, bár sokan kritizálják gyenge ismételhetősége és mesterséges információhordozó tulajdonsága miatt (ELLSWORTH és mtsai 1993, BAGLEY és mtsai 2001). Ezért úgy döntöttünk, hogy az *Alternaria* izolátumok

fajcsoportba sorolásához más kutatók által is használt indítószekvenciákkal végezzük kísérleteinket.

A teljes genomi DNS-ek polimeráz-láncreakción (PCR) alapuló felszaporításához az Operon Technologies Inc. (Alameda, Egyesült Államok) OPR-02 (5'-CACAGCTGCC), OPR-12 (5'-ACAGGTGCGT) és OPA-04 (5'-AATCGGGCTG) indítószekvenciáit (*primereket*) használtuk. Ezek közül az OPR-02 és az OPR-12 ROBERTS és mtsai (2000), míg az OPA-04 PRYOR és MICHALIADES (2002) vizsgálataiban már alkalmazásra kerültek, mint a kisspórás alternáriák elkülönítésére alkalmas szekvenciák. A 25 µl végtérfogatú PCR-elegy összetétele a következő volt: 100 ng templát DNS, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP oldat, 1 egység Taq DNS polimeráz (Fermentas), 1× Fermentas Taq puffer + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4 µmol indítószekvencia, valamint az össztérfogat eléréséhez szükséges steril MilliQ víz. A negatív kontroll DNS-t nem tartalmazott. Egy indítószekvenciával az összes mintában egyszerre végeztettük a DNS-sokszorosítást PTC-150 típusú (Perkin-Elmer) készülékkel a következő program szerint: kezdő denaturáció (94°C-on 3 perc), 36 ciklus (94°C-on 1 perc, 36°C-on 1 perc, 72°C-on 2 perc), záró inkubálás (72°C-on 10 perc). Egyenként 8 µl PCR termékkel végeztünk elektroforézist 20 cm hosszú, 1,5%-os agaróz gélben (Gibco), 0,5×TBE pufferben, 130V-on, 3 órán keresztül. A mintázatot 0,5 µg ml<sup>-1</sup> etídium-bromiddal festettük és UV megvilágításnál fényképeztük (Chemilmager 4000 UV Light Imaging System - i 3.3b Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA).

#### 4.3.5. Mitokondriális DNS RFLP vizsgálat

Jellemzően a mtDNS régió GC szekvenciákban szegényebb ugyanazon faj magi (n) DNS-éhez képest (BENDICH, 1993). Így a mitokondriális genom RFLP mintázata indirekt módon megkapható azáltal, hogy a GC-szakaszban gazdag magi DNS-t GC felismerőhelyű restrikciós endonukleázokkal emésztetjük. Ily módon a nDNS-t 1 kb-nál rövidebb szakaszokra vágjuk és a mtDNS-t kevésbé tördeljük (GROSSMAN és HUDSPETH, 1985). Az elektroforézist követően, a nagyobb molekulásúlyú mtDNS fragmentumok sokkal tisztábban lesznek láthatók, mint a háttérben lévő nDNS, hiszen azok kis méretüknél fogva a gélben viszonylag gyorsan kifelé vándorolnak (SPITZER és mtsai, 1989; TYPAS és mtsai, 1992). Az említett jellemzőkkel rendelkező enzimek pl. *Bsh*1236I, *Hae* III, *Hin* 6I és *Msp* I, melyeket mi is alkalmaztunk vizsgálataink során az *Alternaria* izolátumok teljes genomi DNS emésztéséhez.

A vizsgálathoz 15-20 µg összDNS-t emésztettünk 15 egység mennyiségű restrikciós endonukleázokkal: *Bsh1236I* (CG/CG), *Hae III* (GG/CC), *Hin 6I* (G/CGC) vagy *Msp I* (C/CGG), melyek MBI Fermentas-tól származtak (Vilnius, Litvánia).

Az emésztést 100 µl térfogatban, 37°C-on végeztettük 12 órán keresztül. A DNS kicsapásához 0.1 térfogat 3 M NaOAc (pH 5.3) és 0.54 térfogat 2-propanolt használtunk, a mintákat minimálisan 1 órán át tartottuk -20°C-on, centrifugáltuk (18 000 g, 10 perc), 70 % etanollal mostuk, majd szárítottuk. A DNS pelletet 15 µl steril MilliQ-vízben visszaoldottuk és a terméket 0.8%-os vízszintes agaróz gélben (15 × 20 cm, GibcoBRL) futtattuk. 0.5× TBE pufferben gélelektroforézist végeztünk, mely 16-20 órán át tartott 45 V-os feszültség mellett. Majd a gélét etídium-bromiddal (0.5 mg L<sup>-1</sup>) festettük, és UV megvilágításnál fényképeztük (ChemiImager4000 UV Light Imaging System, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA).

#### **4.3.6. A RAPD és mtRFLP vizsgálat adatainak feldolgozása**

A RAPD indítószekvenciák specifikitása alacsony, így azok nemcsak a teljesen azonos komplementer, hanem a hasonló szekvenciákhoz is kötődnek. Ezért annak érdekében, hogy a RAPD reakció ismételhetőségét bizonyítsuk, minden fajcsoportból kiválasztottunk néhány izolátumot, melyekkel kétszeri ismétlésben is elvégeztük a RAPD reakciót. Az értékelés során a reprodukálható fragmentumokat tekintettük markerként. Ezen DNS-darabok meglétét (1) vagy hiányát (0) értékeltük. Minden izolátum esetén azonos *primerrel* generált, azonos távolságra futó fragmentumot tekintettünk ugyanannak a markernek. Az adatokat bináris táblázatba rendeztük, melyből egyezőségi mátrixot generáltattunk egyszerű egyezőségi koefficiens használatával (SNEATH és SOKAL 1973). Végül, súlyozatlan csoportátlag (unweighted pair group method analyses - UPGMA) módszerrel klaszteranalízist végeztünk és az értékelés során dendrogramot készítettünk. Az összes számítógépes adatfeldolgozást a SYN-TAX 2000 (PODANI 2001) programcsomaggal végeztük.

A mtRFLP vizsgálat során kapott mintázatot minden izolátumnál kiértékeltek, az 1 kb-nál nagyobb fragmentumokat véve számításba.

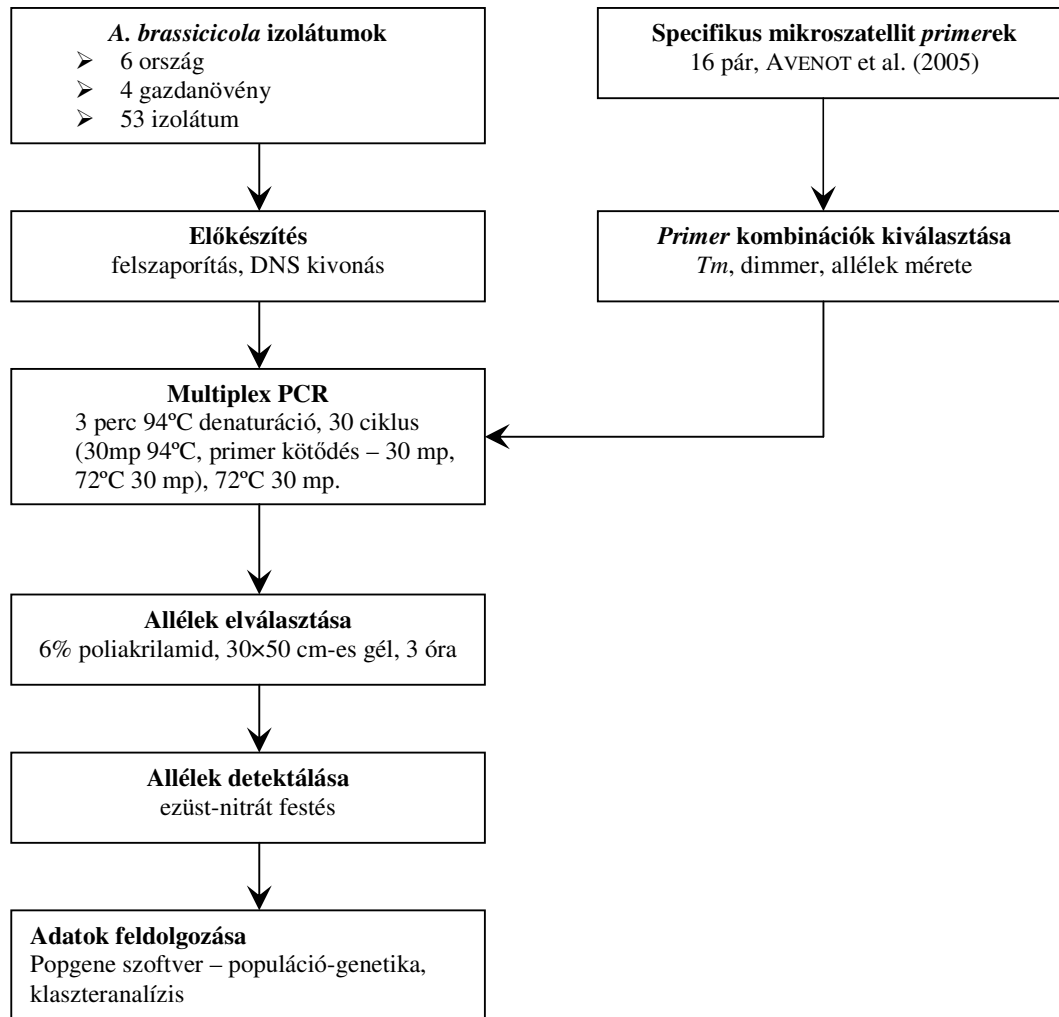


### 4.3.7. Molekuláris elemzés mikroszatellit alapú indítószekvenciákkal

A mikroszatellit *primerekkel* végzett vizsgálat egyes munkaszakaszait és vázlatos leírásait a 18. ábrán foglaltuk össze. Az egyes munkaszakaszok részletes leírását a következőkben ismertetjük.

#### 4.3.7.1. Vizsgálatba vont *Alternaria brassicicola* izolátumok

Allél variációt vizsgáltunk 53 monospóras *A. brassicicola* izolátum esetén. Az izolátumok különböző országokból (Hollandia, Kanada, Kína, Franciaország, Magyarország, Románia, Új-Zéland) és különböző gazdanövényekről (*Brassica*, *Raphanus*, *Crambe*, *Cakile*) származtak. Az izolátumok megnevezését, gazdanövényét, származási országát az 5. táblázatban tüntettük fel.



18. ábra Az *Alternaria brassicicola* populáció analíziséhez kialakított folyamatábra

5. táblázat A vizsgálatba vont *Alternaria brassicicola* izolátumok gazdanövénye és származása

Kód	Gazdanövény	Forrás	Ország
41	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
40	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
3	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
CM	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
43	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
43M	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
20	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
20M	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
Ro10	<i>Brassica oleracea</i>	BIV	Románia
Ro12	<i>Brassica oleracea</i>	BIV	Románia
Ro21	<i>Brassica oleracea</i>	BIV	Románia
Cp	<i>Brassica oleracea</i>	PS	Franciaország
7404	<i>Brassica oleracea</i>	PS	Franciaország
1650.8b	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
1661	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
1662	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
1664.1	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
1697	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
1711.3	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
1718.8	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
1721	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
27381	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
15	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
18b	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
55	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
1644.1	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
CR	<i>Brassica oleracea</i>	PS	Franciaország
1611.1	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
1694	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
4255.2	<i>Raphanus sativus</i>	PS	Franciaország
AN16	<i>Brassica oleracea</i>	saját	Magyarország
AN35	<i>Brassica cretica</i> convar. <i>botrytis</i>	saját	Magyarország
AN89	<i>Brassica oleracea</i>	saját	Magyarország
AN90	<i>Brassica oleracea</i>	saját	Magyarország
AN91	<i>Brassica oleracea</i>	saját	Magyarország
AN177	<i>Brassica oleracea</i>	PJMB, 177	Magyarország
ABC1	<i>Brassica oleracea</i>	SS	Kanada
ABC2	<i>Brassica oleracea</i>	SS	Kanada
ATCC 6650	nem ismert	SS	
ATCC 12551	nem ismert	SS	
ATCC 34622	<i>Crambe maritima</i>	SS	Kanada
DAOM 166634	<i>Brassica oleracea</i>	SS	Kanada
DAOM 169279	<i>Brassica oleracea</i>	SS	Kanada
ICMP 1103	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>ramosa</i>		Új-Zéland
ZAA1	<i>Brassica oleracea</i>		Kína
ZAA3	<i>Brassica oleracea</i>		Kína
914	<i>Thlaspi arvense</i>		USA
AN173	<i>Crambe kotschyana</i>	IPK Institut für Pflanzengenetik (CRA 12/76)	Németország
AN928	<i>Crambe maritima</i>	saját	Magyarország
CK 3005	<i>Cakile maritima</i>	PS, B and T World Seeds sarl (66675)	Franciaország
AN17	<i>Crambe pontiaca</i>	saját	Magyarország
1205 Ro	<i>Brassica oleracea</i>	BIV	Románia
AN160	<i>Brassica oleracea</i> convar. <i>botrytis</i>	saját	Magyarország

#### 4.3.7.2. Gyors DNS kivonás SDS használatával

A DNS kivonást GOODWIN és LEE (1993) módszerével végeztük. Ez a módszer praktikus abból a szempontból, hogy gyors kivitelezhetősége mellett elegendő mennyiségű DNS vonható ki a mikroszatellit lokuszok felszaporításához.

A micéliumot kb. 0.5 cm<sup>2</sup> területű tiszta tenyészet felületéről nyertük ki, kaparék formában. Az egyes mintákhoz 100 µl kivonó puffert adagoltunk (50mM Tris-HCl pH 7.2, 50mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercaptoetanol). A mintákat tartalmazó nyitott fedelű Eppendorf-csöveket mikrohullámú sütőbe helyeztük és kezeltük (400W) 15 mp, 10 mp és 5 mp ideig. A kezelések között 5-10 mp szünetet tartottunk. A mintákat tartalmazó csöveket a lehető legtávolabb helyeztük el a mikrohullámú sütőben, hogy elkerüljük az aeroszolon keresztüli fertőződést. Ezt követően minden mintához 300 µl kivonó puffert adtunk, és 10 percet 80°C-on inkubáltuk. 1 térfogat fenol-kloroform-izoamil-alkohollal (25:24:1) extrakciót végzünk. A DNS-t 2.5% Na-acetáttal (5M) és 0.5 térfogat izopropanollal csaptuk ki. A pelletet etanollal (80%) mostuk, szárítottuk, majd 100 µl TE pufferben (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0) feloldottuk. A DNS kivonás minőségének ellenőrzése céljából univerzális indítószekvenciákkal felszaporított DNS kivonataink ITS régiójának jelenlétét és a PCR termék méretét agaróz gélen vizsgáltuk.

#### 4.3.7.3. Alkalmazott mikroszatellit indítószekvenciák

Az *Alternaria brassicicola* genotípusok vizsgálatát mikroszatellit alapú semleges markerekkel vizsgáltuk. A DNS minták genotipizálását tizenhat mikroszatellit lokuszra, AVENOT és mtsai (2005) által kifejlesztett *primerekkel* végeztük (6. táblázat). A tandem ismétlődő szakaszok között 9 perfekt, 6 imperfekt és egy összetett mikroszatellit régió található meg.

#### 4.3.7.4. Mikroszatellit allélek felszaporítása multiplex PCR-rel

Az első vizsgálatsorozat után képet kaptunk az adott lokusz allélváltozatainak eloszlásáról, illetve arról, hogy milyen méret tartományban várhatók az egyes allélok előfordulása. Ezt az információt felhasználva a később vizsgálandó mintákat multiplex PCR rendszerben állítottuk elő 2-3 lokusz profiljának együttes jellemzése céljából. A multiplex rendszer összeállítása során figyelemmel voltunk a *primerek* által támasztott

követelményekre, a várható allélek eloszlására és az egyes *primer* kombinációk együttes viselkedésére. A PCR reakciót Amplify 3.1. szoftver (Macintosh környezetben) segítségével előzetesen szimuláltuk. Igyekeztünk a *primer*kombinációkat úgy megválasztani, hogy az egy rendszerbe kerülő *primerek* között a kapcsolódás, azaz a *dimmer* képződés, minimális mértékű legyen, vagyis a *primerek* szabadon kötődhessenek, maximálisan hasznosuljanak.

A mikroszatellit lokuszok polimeráz-láncreakcióval (PCR) végzett felszaporítását Thermojet típusú (EquiBio, Seraing, Belgium) készülékben végeztük. Az egyes reakciókhoz (50  $\mu$ L) a következő komponenseket használtuk fel: 1 egység *Taq* DNS-polimeráz (Promega,.), 200  $\mu$ M dNTP oldat (Promega), 0.4  $\mu$ M indítószekvencia (6.táblázat), 5  $\mu$ L a 10 $\times$ -es koncentrációjú reakciópufferből (50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> és 1-10 ng DNS. A felhasznált DNS-t GOODWIN és LEE (1993) által leírt gyors módszer alapján vontuk ki (melyet a 4.3.5.2. fejezetben részletesen leírtunk). 3 perc 94°C-os denaturációt követően, a mintákat 30 cikluson át szaporítottuk fel. A ciklusok egyenként a következők szerint épültek fel: 30 mp 94°C-os inkubálás, indító szekvenciák kötődése a megfelelő hőmérsékleten (6. táblázat) 30 mp és lánchosszabbítás 72°C-on 30 mp. A végső lánchosszabbítás 72°C-on 10 percig tartott.

6. táblázat Mikroszatellit indítószekvenciák és lokuszok jellemzői AVENOT és mtsai (2005) nyomán

Lokusz	Primer szekvencia (5'-3')	Ismétlődő motívum	Méret tartomány (bp)	n	T <sub>m</sub> (°C)
GA <sub>1</sub>	F: C T A C T G G C T A C G C A A C G C A G R: C A C C C T T C C G T C T T T G C T C G	(GA) <sub>7</sub>	118-120	2	55
GA <sub>2</sub>	F: G T C A A G T C A G C T C T T T C T T T C T G T C R: T C C G C A G T G A T T G A C C A G T G	(TC) <sub>7</sub>	128-130	2	55
GA <sub>3</sub>	F: G C T G C G A T T T C C A T G T T G C T R: G C A C A T G C A A C C T G G T T A C G	(CT) <sub>1</sub> CC(CT) <sub>5</sub> AT(CT) <sub>3</sub>	163	1	55
GA <sub>4</sub>	F: C A C A C T T G T A C C G C C A A G C T C R: A G C G C C G C C A C C T A G C T A T T G	(CT) <sub>4</sub> CC(CT) <sub>2</sub> CC(CT) <sub>5</sub>	251	1	58
GA <sub>5</sub>	F: C G T A G G G A A G A C G A T A A G A G A A C R: C T C C T C C G A A G C A C T C G T C T T	(GA) <sub>9</sub>	111-113	2	55
GA <sub>6</sub>	F: C T G G C C T T G G C T G T C T A G C G R: T C C A G T C G A T A A G A T C A A A C C	(GA) <sub>6</sub> GG(GA) <sub>7</sub> TAGG(GA) <sub>4</sub>	93-115	4	55
GA <sub>27</sub>	F: C A G G T A A T A C C A T C G A T G G T C T A R: T C C T A C C T T G C A C G C T C C T T T A C	(GA) <sub>8</sub>	102-104	2	55
GA <sub>30</sub>	F: C G C A C G A T A C C T T T C T T A T A C R: G A A A G G A C T C G A A T A T C G A T T C	(GA) <sub>7</sub>	146	1	55
GA <sub>35</sub>	F: C C T C C A G C A A C T A G A A C C G A T R: A G T A T A G G C G T A T A T T G G G C G	(GA) <sub>8</sub>	111-113	2	55
GA <sub>39</sub>	F: G G C A G A C T C T A A T T G T T C C T G R: G T A A T C C A G G A C T T G A G G C T G	(CT) <sub>4</sub> AT(CT) <sub>3</sub> TT(CT) <sub>4</sub>	165	1	55
GAA <sub>2</sub>	F: G A G G A G G A T G G A A T A T A T A G R: A T C G T G A A G G A A C G C T C A A G	(GAA) <sub>1</sub> AA(GAA) <sub>5</sub>	153-156	2	56
GAA <sub>4</sub>	F: G G T G G T T G A G T G C T T G T A T T T G R: G T C G G G C T T G A T A T C C T T T G	(GAA) <sub>12</sub> GA(GAA) <sub>1</sub>	185-240	10	60
GAA <sub>6</sub>	F: C T T A C A G C A T C G A G G C A A A A R: G A C A T G A C A T G G C G T T G T G T	(CTT) <sub>3</sub> (CGT) <sub>2</sub> (CTT) <sub>10</sub>	146-155	4	58
GAA <sub>10</sub>	F: C C G A G A G A A G C A A C A T A C T G R: T A G G C G T G A T C T T G C C G A G G	(GA) <sub>15</sub>	93-108	6	60
ATA <sub>13</sub>	F: C T A G T T A G G T A A G T A G C G T A A G R: C G C A C A A A A G C T A C C T T T A C C T	(TTA) <sub>9</sub>	110-116	3	56
HK <sub>3</sub>	F: G G G G A C T G G A C G G G G T C G G A T T R: G T G G G G G G C A A G G G A T G A A T G	(GTT) <sub>7</sub>	109-115	3	59

T<sub>m</sub>, a primer kötődési hőmérséklete; n, allélek száma.

#### 4.3.7.5. Allélek elválasztása poliakrilamid gélelektroforézissel

Az elektroforézishez poliakrilamid alapanyagú gélt használtunk, mivel az agaróznál jobb felbontó képessége révén akár 1 bp különbség kimutatására is alkalmas. A poliakrilamid gélek típusai közül a denaturáló típust választottuk, melyre jellemző, hogy a denaturáló ágens (urea) a DNS másodlagos struktúráját megszünteti, ezért a mobilitás független a bázisösszetételtől.

A poliakrilamid gél-elektroforézishez (PAGE) a következő lépések tettük meg:

- üveglemezek (2 db, 38 × 52.3 cm) előkészítése gél-elektroforézishez
- kifolyásgátló készítése: akrilamidot öntünk a lemezeket összefogó tartályba abból a célból, hogy betömjük a lemezek közötti alsó szabadon álló rést.
- akrilamid alapanyagú gél (40 × 50 cm-es) készítése
- minta előkészítése és rétegezése
- migráció

Az üveglapokat gélmentesítettük 8%-os NaOH oldatban. Tisztításukat detergenses mosással kezdtük, majd etanollal (75%) tovább tisztítottuk. A puffertartállyal ellátott alsó üveglemezt Rain X-szel kezeltük (a szélvédőknél is alkalmazott vízlepörgést elősegítő folyadék) tapadásgátlás céljából. A felső üveglemezt ugyanúgy készítettük elő, mint az alsót azzal az eltéréssel, hogy Rain X kezelés helyett speciális tapadást fokozót használtunk Bind Silane (3 µl/[2ml abszolút etanol és 10 µl ecetsav], Sigma) formájában. Ezt a vegyületet gyakran használják üveglemezek előkezeléséhez akrilamid gélek fixálása céljából. Tekintettel az üveglemezek nagyságára és az előhívás módjára, a gélt stabilizálni szükséges, vagyis valamilyen hordozóhoz kell kötni. A Bind Silane fény és hőérzékeny anyag, vigyázni kell megfelelő használatára, különben a gél gyors letapadására számíthatunk.

A gél összetevői a következők voltak: 6 % poliakrilamid (acryl-bisacrilamid 19:1 Promega), 8.0 M urea és 1× TBE puffer. A gél polimerizálását Temed (N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin, Promega) és 40%-os ammónium-peroxiszulfát (APS Molecular Biology Grade, Promega) 1:1 arányú keverékével indukáltuk (0.01% : 0.01%). A migrációs frontot a fésű hátoldalával alakítottuk ki. A gélt 1 órán át vízszintes állapotban pihentettük a gél polimerizálódása céljából. Az előzőleg elkészített PCR termékhez 1 térfogat formamid kéket (formamid 98%, EDTA 10 mM, pH 8.0, bromfenol kék 0.1%, xylén-cyanol 0.1%) adtunk, majd denaturáltuk (94°C, 5 perc, denaturáló gél). 6-8 µl denaturált terméket rétegeztünk egyenként a 49 férőhelyes fésű fogai közötti zsebekbe. 10 bp DNS molekulatömeg markert (Invitrogen) használtunk méret referenciaként (2 µl 10 bp DNS molekulatömeg marker 1

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 38  $\mu\text{l}$  formamid kék, 30  $\mu\text{l}$  MilliQ víz), az ismert méretű klónozott allél referencia mellett. Az elektroforézist 1 $\times$ -es koncentrációjú TBE pufferben végeztük. A futtatás 100 W teljesítményen kb. 3 órán keresztül tartott.

#### 4.3.7.6. Allélek detektálása ezüst-nitrát festéssel

Az ezüst-nitráttal történő festést CRESTE és mtsai (2001) szerint végeztük. A gélt először 10% etanol és 1% ecetsav jelenlétében rögzítettük (10 perc - óvatos rázatás), majd desztillált vízben mostuk (1 perc). Ezt követően előkezelést (oxidálás) végeztünk 1.5 % salétromsav jelenlétében (3 perc, óvatos rázatás). 1 perces desztillált vizes öblítést követően a gélt impregnáltuk 0.1%-os  $\text{AgNO}_3$ -tal (15-20 perc, óvatos rázatás), MilliQ vízzel öblítettük, majd az előhívó oldatba helyeztük (30 g/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 600  $\mu\text{l/l}$  36.5-38 % formaldehid). Az előhívást a markerek kívánt intenzitásának megjelenéséig folytattuk (7-10 perc). A reakciót 5%-os ecetsav oldattal állítottuk le (5 perc, óvatos rázatás). A géleket szobahőmérsékleten szárítottuk, majd fényképeztük. A fent említett oldatokat az előhívás napján készítettük el. Az ezüst-nitrát oldatot, a MilliQ vizet és a nátrium-karbonátos oldatot használatot megelőzően 4°C-osra hűtöttük. A nátrium-karbonátos oldaton kívüli oldatok három gél előhívásához ismételten használhatók.

A gél-elektroforézissel kapott mintázatot digitalizáltuk. A poliakrilamid alapanyagú gélen előhívott fragmentek alakját hasonlítottuk a klónozott allél mintázatához, nagyságát pedig az ismert méretű referencia alléltól való eltérés alapján határoztuk meg. Az eltérések nagyságát DNS molekulatömeg marker segítségével határoztuk meg. Későbbiekben az adott lokuszhoz tartozó általunk definiált allélsorozatot, referenciaként tovább hasznosítottuk. A termékek relatív hosszának meghatározása után, a numerikus adatokat táblázat formájában rendszereztük.

#### 4.3.7.7. Mikroszatellit vizsgálat adatainak feldolgozása

Minden egyes izolátum minden egyes lokuszában értékeltük a mikrosatellit *primerrel* előállított allélvariációk jelenlétét, 1-10-ig attól függően, hogy melyik allél fordult elő az adott izolátumban. Az adatmátrix haploid adatait POPGENE szoftverrel (verziószám 1.31, YEH és mtsai 1999) elemeztük. Az értékelések kiterjedtek a megfigyelt allélek számára és a (NEI 1973), melyet kis elemszámmal korrigáltunk (NEI és CHESSER 1983). A géndiverzitásokat

felbontottuk teljes, alpopuláción belüli átlagos diverzitásra, populációk közötti abszolút és relatív genetikai differenciáltságra. Az allélgyakoriságok különbözőségének tesztelése céljából  $G^2$ -et számoltunk, mely a statisztikai próba alapja, felhasználásával megállapítható, hogy van-e szignifikáns különbség az egyes alpopulációk között (PEEVER és mtsai 1999).

Az alpopulációk közötti kapcsolat bemutatása céljából a NEI-féle genetikai távolságból (NEI 1978) dendrogramot szerkesztettünk, TFPGA szoftver segítségével (MILLER 1997).

Az egyes lokuszok alléljeihez tartozó értékekből bináris adatbázist is kialakítottunk, oly módon, hogy a lokuszoknak megfelelő egyes allélek jelenlétét 0 (nincs jelen) illetve 1 (jelen van) értékekkel jelöltük. Az adatokat felhasználva dendrogramot készítettünk. A hierarchikus klaszter felépítéséhez JACCARD-koefficienszt használtunk, a dendrogram kialakításához pedig súlyozatlan csoportátlag módszert használtunk (UPGMA). A számításokat SYN-TAX 2000 programmal végeztük (PODANI 2001).



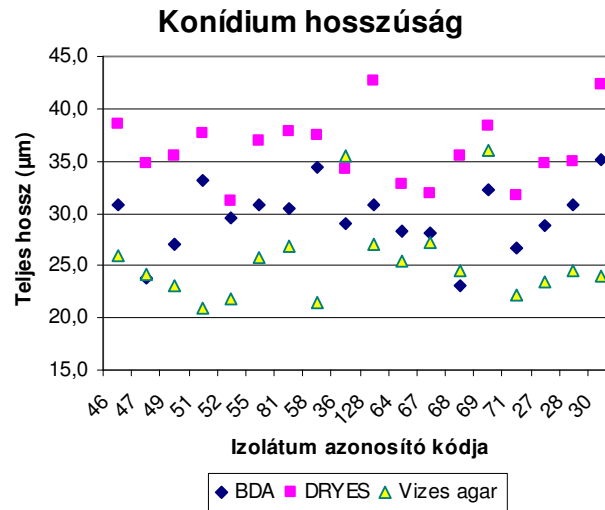
## 5. Eredmények

A szakiroldalmi áttekintésből megállítható, hogy különböző szerzők viszonylag széles körben foglalkoztak az *Alternaria* fajok összehasonlító elemzésével. Munkánk során a gyakorlat számára jelentős morfológiai vizsgálatok és a genetikai kutatások molekuláris eredményeit tovább gazdagítottuk. A táblázatokban színessel kiemelt értékek a szöveges részben külön említésre kerültek.

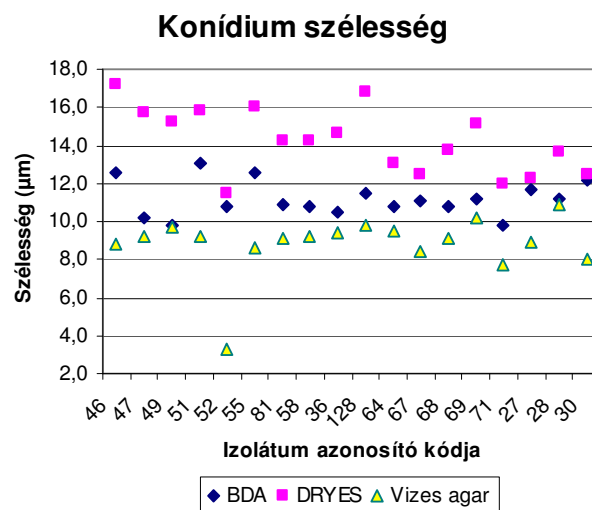
### 5.2. *Alternaria* izolátumok morfológiai vizsgálatának eredményei

#### 5.2.3. Mikromorfológiai tulajdonságok

A konídiumok morfológiai vizsgálatokor hosszúság, szélesség, keresztfal illetve hosszanti falak számában állapítottunk meg nagyobb különbségeket adott izolátum különböző táptalajról származó konídiumai között. A konídiumok mérhető adatai közül kiemeljük a konídium hosszban és szélességben megnyilvánuló eltéréseket (19. ábra, 20. ábra). A 19. ábrán és a 20. ábrán a 7. napon intenzíven sporuláló tenyészetek vizsgálati eredményeit tüntettük fel. DRYES agar esetén szinte minden izolátumnál tömeges konídiumképzést figyeltünk meg. A konídiumok világosabbak, nagyobbak és a harántfalaknál befűzöttebbek voltak, mint a BDA-ról származó ugyanazon izolátum konídiumai. A konídiumok méretei vizes-agaron voltak a legkisebb. Az egyes táptalajfélések esetén számolt szórások átlaghoz viszonyított arányából a vizes-agaron kaptuk a legnagyobb értékeket CV=16.9% konídium hosszúság és CV=17.8% konídium szélesség vizsgálat során, mely abszolút értelemben alacsony értéket képvisel ( $CV_{max}=400\%$ ). A relatív szórások közel azonos mértéket mutattak, pl. konídium hosszág vonatkozásában BDA-n CV=10.9%, DRYES agaron CV=9.1%.



19. ábra Burgonya-dextróz agaron, Dichlorán-bengálrózsa-élesztőkivonatós agaron és vizes-agaron tenyésztett kispórás *Alternaria* izolátumok konídium hosszúságában megmutatkozó eltérések



20. ábra Burgonya-dextróz agaron, Dichlorán-bengálrózsa-élesztőkivonatós agaron és vizes-agaron tenyésztett különböző kispórás *Alternaria* izolátumok konídium szélességében megmutatkozó különbségek

#### 5.2.4. Sporuláció típusok vizes-agaron

Vizes-agaron a korai fázisban a sporulációs típusra még nem jellemző láncképzés figyelhető meg. Ugyanis a sűrűn elágazó konídium lánc típus helyett csak helyenként elágazó, magányos láncok rajzolata látható. Tapasztalatunk szerint a vizes-agarra történő leoltást követő 7. napon túl érdemes a sporuláció típusát kiértékelni. Idős (1-2 hónapos) tenyészeteknél a konídiumlánc szerkezet ugyanolyan strukturáltságot mutat, mint néhány hetes korban;

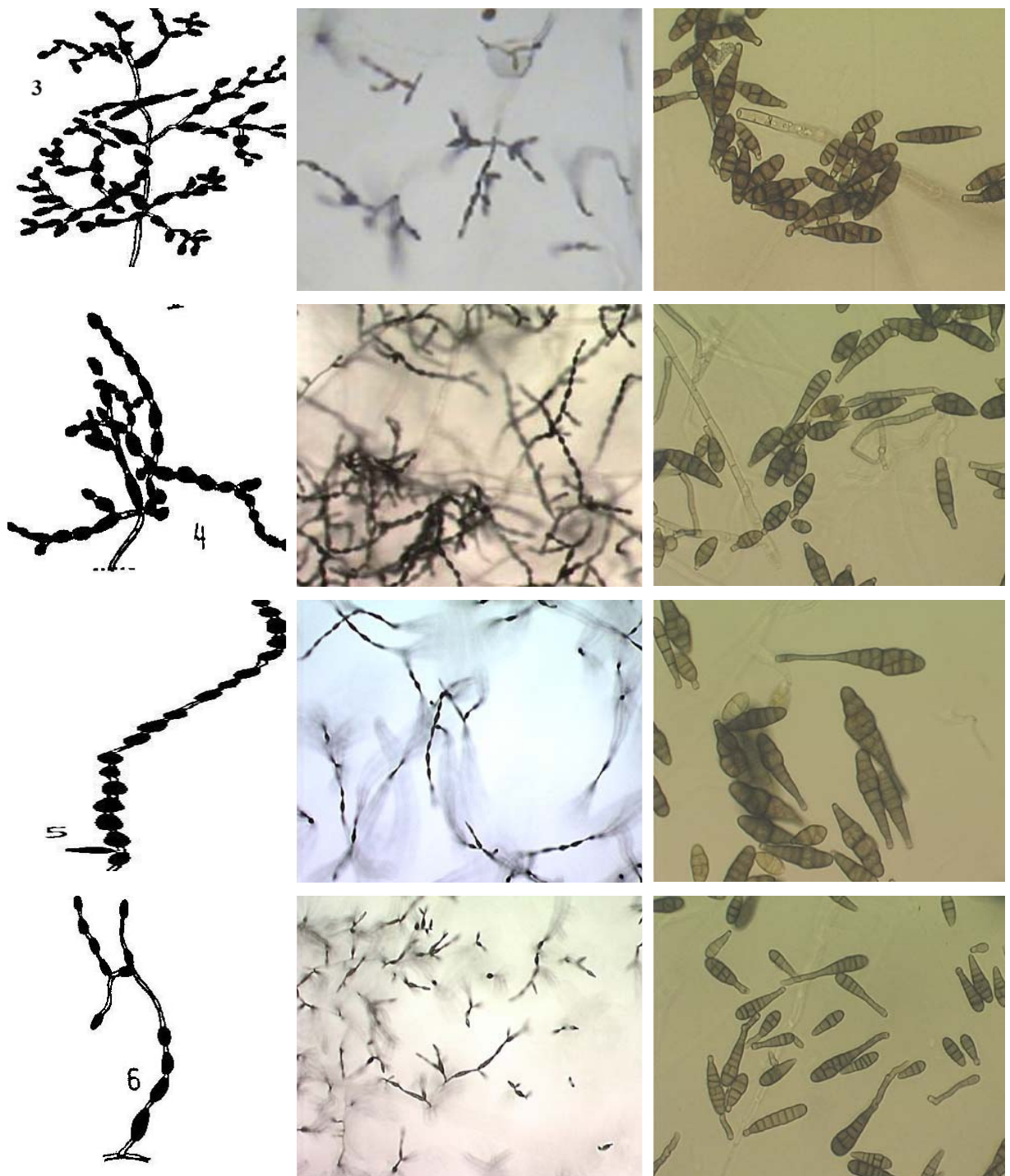
csupán a láncot alkotó konídiumok színében és formájában figyelhető meg változás, illetve torzulás. Az öregedés folyamán a konídiumok sötétebbé és befűzöttebbé válnak. A konídiumláncok a leoltási helyet határoló régiókban tömegesen jelennek meg. A leoltási helytől távolodva a konídiumláncok hosszúsága csökken, a láncok elágazása is jelentős mértékben ritkul.

A vizes-agaron kifejlődött konídiumláncok háromdimenziós szerkezete alapján öt csoportot tudunk elkülöníteni. A 3-as *A. arborescens* fajcsoportba 14 izolátumot, a 4-es *A. alternata* fajcsoportba 28 izolátumot, 5-ös *A. tenuissima* fajcsoportba 43 izolátumot, 6-os *A. infectoria* fajcsoportba 5 izolátumot soroltunk. Az egyes konídiumlánc képzési típusról, valamint adott típushoz tartozó konídiumokról digitális felvételt készítettünk, melyet kiegészítettünk SIMMONS és ROBERTS-által (1993) közölt sematikusan ábrázolt konídiumláncokkal. Az így készült összeállításunkat a 21. ábrán mutatjuk be.

Az *A. arborescens* csoport (3-as típus) tagjai rövid, sötét színű, sűrű, faágszerűen elágazó konídiumláncot képeznek. A konídiumláncok rövidek 4-5 tagúak, a másodszerint képződött konídiumláncok 2-3 tagúak. 25×-es nagyítás mellett a szembetűnő „fácskák” jól elkülönülnek, és kompakt tömörüléseket képeznek. Erre a sporulációs típusra jellemző a bőséges konídium képzés. A hosszú elsődleges konídiumtartók az agaros felszínen helyezkednek el, a közegetől nehezen különíthetők el. Másodlagos konídiumtartók nem figyelhetők meg. Az *A. gaisen* sporulációs típust csak referencia fajokon találtuk meg.

Az *A. alternata* fajcsoport konídiumképzésére (4-es típus) rövid, gyakran elágazó láncstruktúra jellemző, mely tipikusan 10-nél kevesebb konídiumból épül fel. A konídiumokból felépülő struktúrák bokrosodó, csoportosuló elrendeződést mutatnak már 25×-es nagyítás mellett is. A konídiumláncok gyakran alul elágaznak és az elágazásokat követő láncszakaszok is sok tagból (4-8) épülnek fel. A konídiumtartó általában színtelen, rövid, szinte észrevehetetlen. A fajcsoportra bőséges sporuláció jellemző. A konídiumláncok halmaza olyan sűrűn keletkezik, hogy szinte már összeolvadnak a különböző eredésű láncolatok. Az *A. alternata* típus gyakori ugyan, de nem a leggyakoribbak voltak a vizsgált izolátumok körében.

Az *A. tenuissima* csoportra (5-ös típus) jellemző, hogy a konídiumtartó agaros felületen közepesen hosszú, illetve hosszú 10-15 (-20) tagú konídiumláncot képez. A láncok elágazása kevésbé jellemző. Elágazás esetén is az újonnan képződött láncolat viszonylag rövid, 3-4 konídium tagból épül fel. A konídiumláncok vékony megjelenésűek még 50×-es nagyítás mellett is. Bőséges sporuláció figyelhető meg. Ezt a sporuláció típus volt a leggyakoribb a hazai izolátumok körében.



21. ábra Kisspórás *Alternaria* fajcsoportok láncképzése

Felülről lefelé és balról jobbra haladva: első kép általános lánckonformáció, mellette: láncképzés vizes-agaron, mellette adott fajcsoporthoz tartozó konídiumok mikrofotója. Első sor: *A. arborescens* (3) második sor: *A. alternata* (4), *A. tenuissima* (5), *A. infectoria* (6) fajcsoportok (Konídiumláncokról a felvételek 50x-es nagyítással, a konídiumokról a mikrofotók 100x-os nagyítással készültek).

Az *A. infectoria* csoport (6-os típus) esetén rövid, 1-4 konídiumból felépülő elágazó konídiumlánc képződik. E csoportnál a konídiumok gyakran csőr nélküliek vagy hosszú másodlagos csőrt képeznek (ún. álcsőrt, vagy másodlagos konídiumtartót). A másodlagos konídiumtartók sokkal kevésbé jellemzően erednek a konídium központi, vagy oldalsó sejtjeiből. Szerepük a konídiumlánc tagjainak összeköttetése, egy megnyúlt konídiumtartó biztosításával. Gyér sporuláció tapasztalható, mely a konídiumlánc képzés módjával van összefüggésben.

Számos olyan izolátumot találtunk, melyek e csoportban vagy a megelőző csoportok egyikébe sem sorolhatók. Később újból, nagyobb nagyítás mellett (50x-es) megvizsgálva ezen izolátumokat, az *infectoria* csoportra jellemző megnyúlt másodlagos konídiumtartót is azonosítottuk. Többnyire a külföldi izolátumok között találtunk e spóratípusba tartozó izolátumokat. Hazai izolátumok közül burgonyáról és napraforgóról 1-1 olyan izolátumot azonosítottunk, mely sporulációja alapján e csoportba tartozik. Más gazdanövényről pl. búzáról is sikerült ilyen izolátumot találnunk.

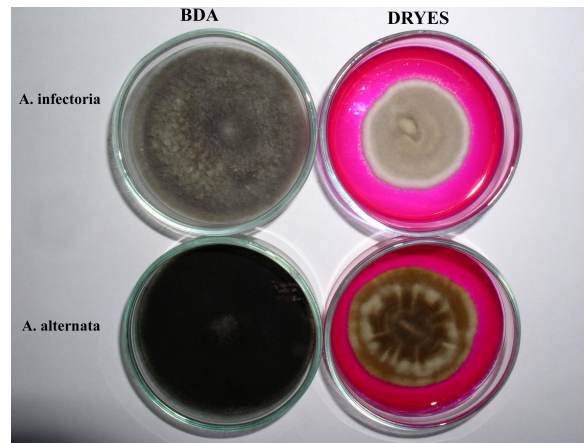
Az *A. gaisen* spóracsoportba tartozó izolátumok kizárólag külföldi származásúak voltak. Ezekről mikrofotó felvételsort nem állítottunk össze. A konídiumtartó rövid vagy közepesen hosszú (max. 10 konídiumból épül fel) el nem ágazó konídiumláncot képez. A konídiumok általában robosztus megjelenésűek. Másodlagos konídiumtartók nem szembeszökőek.

Egy atipikus izolátummal is találkoztunk, mely krizantémről származott (kód: 150). Az izolátum gyér sporulációt mutatott, mely alapján a konídiumképzés típusát nem lehetett egyértelműen behatározni.

Saját izolátumainkkal párhuzamosan a referencia fajokkal is elvégeztük a tenyészet-, konídium- és konídiumlánc morfológiai vizsgálatokat. Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált referencia fajok fajcsoportjai megegyeznek a külföldön kapott eredményekkel (PRYOR és MICHALIADES 2002).

### 5.2.5. Telepmorfológiai jellemzők

Telepmorfológiai bélyegek közül színben, növekedési erélyben és a telep szerkezetében tapasztaltunk nagyobb eltéréseket ugyanazon izolátum BDA, Czapek-Dox és DRYES agarra oltott tenyészeténél. Példaként a 22. ábrán bemutatjuk az *A. infectoria* és *A. alternata* tenyészetünket BDA-n és DRYES agaron. Az *A. infectoria* DRYES agaron létrejött fehér színű telepe jól megkülönböztethető az *A. alternata* barnás színű telepétől.



22. ábra Két izolátum: az *A. infectoria* és az *A. alternata*, tenyészei

A beszerzett összes referencia izolátum megfelelt az eredetileg azonosított taxonnak. Így a genetikai vizsgálatokba ezen izolátumokat fenntartás nélkül vontuk be.

### 5.2.6. Hőmérséklet és pH hatása *in vitro* a növekedésre és sporulációra

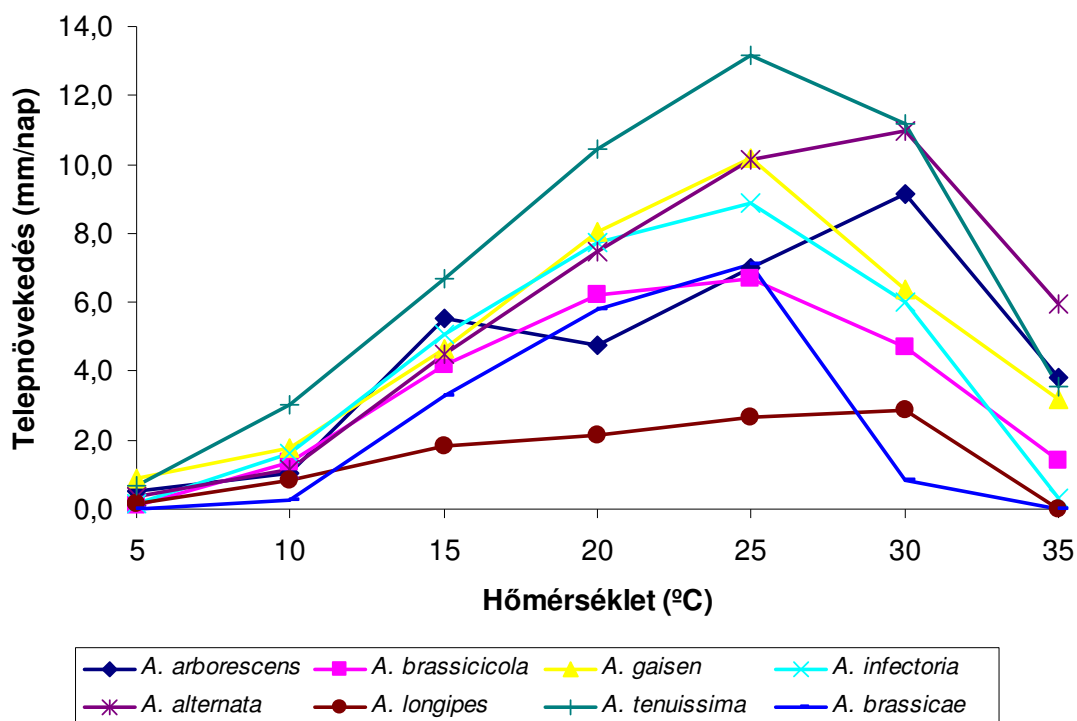
- **Hőmérséklet hatása a növekedésre**

Az *Alternaria* fajok illetve fajcsoportok számára nem közömbös a környezet hőmérséklete. A hőmérséklet hatását *in vitro* körülmények között vizsgálva az alábbi számszerűsített eredményeket kaptuk (7. táblázat, 23. ábra). Az egyes izolátumok legkedvezőbb növekedésének 25-30°C hőmérsékleti tartomány felel meg. (23. ábra). Az optimális hőmérsékletigény alapján az *Alternaria* izolátumok a mérsékelt mezofil kórokozók közé sorolhatók. A legnagyobb napi átlagos növekedést (13.2 mm/nap) az *A. tenuissima* izolátum éri el 25°C-on. A legkisebb optimális növekedés (2.9 mm/nap) az *A. longipes* izolátumra jellemző. +5°C-on a kísérletbe vont *A. brassicae* izolátum már nem fejlődik, szemben a többi kisspórás fajcsoportok képviselőivel, melyek még ezen az alacsony hőmérsékleten is képesek fejlődni. Az *A. gaisen* fajcsoport képviselője reagál leginkább a +5°C-os hőmérsékletre, melyen átlagosan naponta 0.9 mm-t növekszik. Az *A. longipes* és az *A. brassicae* izolátumok növekedése 35°C-on teljesen leáll. Az *A. alternata* izolátum ezen a hőmérsékleten még mindig jól fejlődik, mint leolvasható tenyésze 5.9 mm-t növekszik naponta. Az egyes izolátumokat egészen szélsőséges körülmények közé is helyeztük, megvizsgáltuk a 0°C és a 40°C hőmérséklet hatását. Ezekon a hőmérsékleti értékeken nem tapasztaltunk növekedést. Ugyanakkor megfigyeltük, hogy e körülmények sem jelentenek

letális hatást az izolátumokra, mivel néhány napos szélsőséges körülmény között tartott izolátumot áthelyezve 25°C-os hűtő-fűtő termosztátba az izolátumok ismét növekedésnek indultak.

7. táblázat Az *Alternaria* fajok illetve fajcsoportok átlagos telepnövekedése (mm/nap) a hőmérséklet függvényében

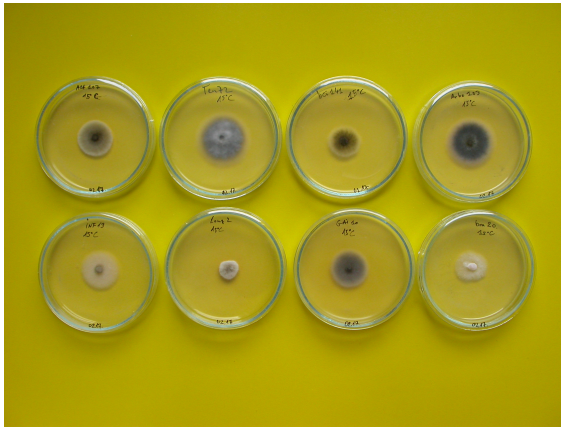
Faj / fajcsoportok	pH értékek							
	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>A. brassicicola</i>	4,2	8,0	7,3	5,8	5,8	6,3	5,5	6,7
<i>A. arborescens</i>	3,8	7,7	7,7	11,3	11,3	10,8	9,2	6,3
<i>A. alternata</i>	5,8	8,8	9,2	9,7	10,8	10,8	9,0	6,3
<i>A. gaisen</i>	5,0	7,8	10,2	10,0	10,3	10,8	8,7	5,8
<i>A. tenuissima</i>	7,2	12,5	14,2	14,3	14,2	14,0	12,2	8,0
<i>A. longipes</i>	3,0	3,7	3,7	5,2	4,7	4,3	3,8	3,3
<i>A. infectoria</i>	3,2	9,0	9,3	8,8	8,3	8,3	7,0	5,7
<i>A. brassicae</i>	0,8	1,8	1,8	2,0	1,7	0,8	0,8	3,3



23. ábra Az *Alternaria* fajok illetve fajcsoportok napi átlagos sugárirányú telepnövekedése a hőmérséklet függvényében

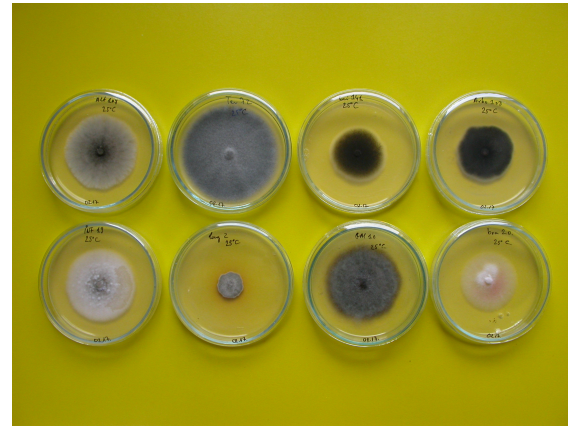
A tenyészetek növekedésére kifejtett hőmérséklet hatását példaként két felvételen mutatjuk be. Az 24. ábrán 15°C-on, a 25. ábrán 25°C-on előállított különböző fajcsoportokba tartozó egyidős tenyészetekről készült felvételt láthatunk.





24. ábra Különböző fajcsoportokba sorolt izolátumok növekedése 15°C-on

Balról jobbra haladva a következő izolátumok szerepelnek: fent: *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. brassicicola*, *A. arborescens*, lent: *A. infectoria*, *A. longipes*, *A. gaisen*, *A. brassicae*.



25. ábra Különböző fajcsoportokba sorolt izolátumok növekedése 25°C-on

Balról jobbra haladva a következő izolátumok szerepelnek: fent: *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. brassicicola*, *A. arborescens*, lent: *A. infectoria*, *A. longipes*, *A. gaisen*, *A. brassicae*.

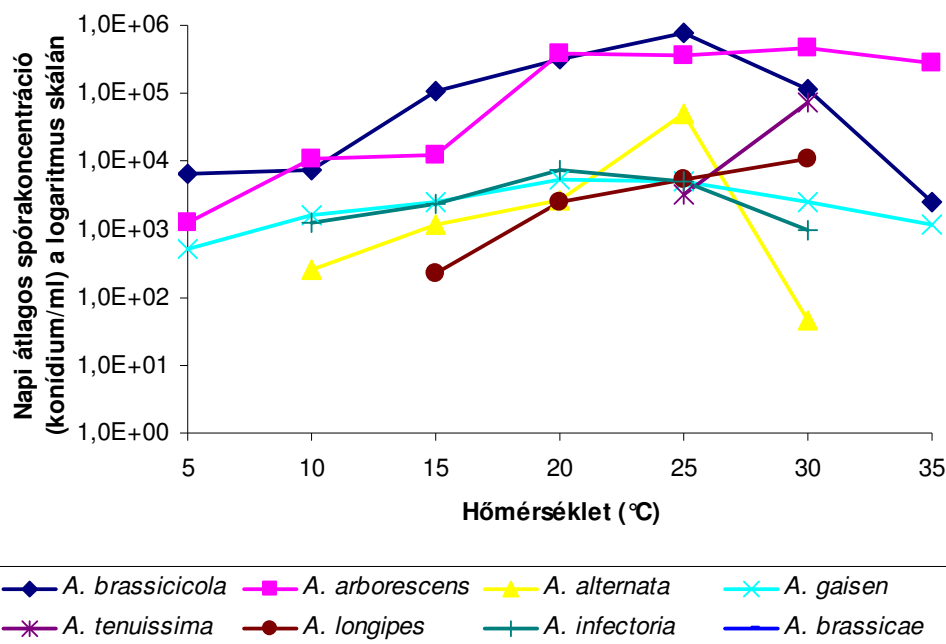
- **Hőmérséklet hatása a sporulációra**

Megvizsgáltuk a hőmérséklet hatását a sporulációra. Eredményeink (8. táblázat, 26. ábra) szerint az *A. brassicicola* ( $8 \times 10^5$  db/nap/ml) és az *A. arborescens* ( $3.6 \times 10^5$  db/nap/ml) izolátumok sporulálnak a legjobban 25°C-on. A sporuláció maximális intenzitása eléri a napi százezer konídium/ml nagyságrendet. A két izolátum sporulációs spektruma a teljes vizsgált tartományban egyaránt nagy intenzitást mutat. Az *A. gaisen* izolátum sporulációs maximuma a legkisebb mértékű,  $5.5 \times 10^3$  db/nap/ml. A vizsgált hőmérsékleti minimumon, +5°C-on, és maximumon, +35°C-on, csak az *A. brassicicola*, az *A. arborescens* és az *A. gaisen* izolátumok sporulálnak. Az optimális sporuláció 20-30°C között van (26. ábra), ekkor a legnagyobb mértékű a sporuláció. Sporulációs minimumról (vagyis olyan hőmérsékletről, mikor még minimálisan sporulálnak a tenyészetek) *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. longipes*, *A. infectoria* izolátumok esetén beszélhetünk. Sporulációs maximum *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. longipes* és *A. infectoria* izolátumok esetén figyelhető meg a vizsgált hőmérsékleti tartományban. Megfigyelhető, hogy az *A. alternata* és az *A. tenuissima* izolátumok sporulációs maximuma milyen mértékben nő +25 és 30°C környékén, illetve, hogy az egyéb hőmérsékleti tartományokban milyen nagymértékben esik vissza a sporuláció intenzitása. Az *A. brassicae* izolátum nem sporulált az egyik vizsgált hőmérsékleten sem.



8. táblázat Az *Alternaria* fajok illetve fajcsoportok tenyésztéseinek napi átlagos sporulációja (konídium/ml) a hőmérséklet (°C) függvényében

Fajok / fajcsoportok	Hőmérséklet (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
<i>A. brassicicola</i>	6,4E+03	7,2E+03	1,1E+05	3,2E+05	8,0E+05	1,1E+05	2,5E+03
<i>A. arborescens</i>	1,2E+03	1,1E+04	1,2E+04	3,7E+05	3,6E+05	4,6E+05	2,9E+05
<i>A. alternata</i>	0,0E+00	2,5E+02	1,2E+03	2,7E+03	5,0E+04	4,7E+01	0,0E+00
<i>A. gaisen</i>	5,2E+02	1,6E+03	2,5E+03	5,5E+03	5,0E+03	2,5E+03	1,2E+03
<i>A. tenuissima</i>	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,3E+03	7,3E+04	0,0E+00
<i>A. longipes</i>	0,0E+00	0,0E+00	2,3E+02	2,5E+03	5,5E+03	1,1E+04	0,0E+00
<i>A. infectoria</i>	0,0E+00	1,2E+03	2,4E+03	7,5E+03	5,0E+03	1,0E+03	0,0E+00
<i>A. brassicae</i>	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00



26. ábra A napi átlagos spórákoncentráció (konídium/ml) változása logaritmikus skálán a hőmérséklet függvényében

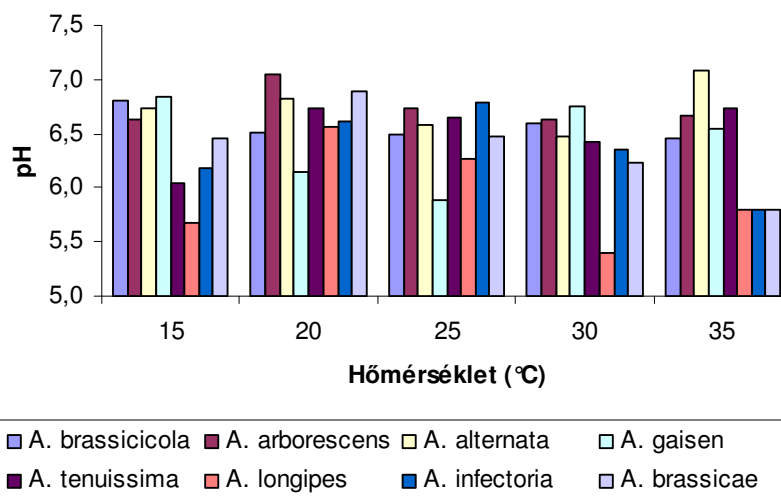
- **Hőmérséklet hatása a tenyészetek pH értékére**

A kísérletek során megfigyeltük, hogy a tenyészetek H-ion koncentrációja miként alakul az egyes hőmérsékleti tartományokban. Az induló pH érték 5.6 volt. Az eredményekből látható, hogy a vizsgálatba vont izolátumok tenyésztének pH értékét az adott hőmérséklet milyen mértékben befolyásolta (9. táblázat, 27. ábra). A maximális pH az *A. alternata* fajnál pH=7.1 értékű, +20°C-on. A legkisebb pH értéket (pH 5.4) az *A. longipes* faj

esetén mértünk, +30°C-on. Az adott hőmérsékleti értéken általában a tenyészetek pH-ja a lúgos tartomány irányába mozdult el.

9. táblázat Az *Alternaria* fajok illetve fajcsoportok tenyészetének átlagos pH-ja különböző hőmérsékleti (°C) tartományokban

Fajok / fajcsoportok	Hőmérséklet (°C)				
	15	20	25	30	35
<i>A. brassicicola</i>	6,8	6,5	6,5	6,6	6,5
<i>A. arborescens</i>	6,6	7,0	6,7	6,6	6,7
<i>A. alternata</i>	6,7	6,8	6,6	6,5	7,1
<i>A. gaisen</i>	6,8	6,1	5,9	6,8	6,5
<i>A. tenuissima</i>	6,1	6,7	6,7	6,4	6,7
<i>A. longipes</i>	5,7	6,6	6,3	5,4	5,8
<i>A. infectoria</i>	6,2	6,6	6,8	6,4	5,8
<i>A. brassicae</i>	6,5	6,9	6,5	6,2	5,8



27. ábra A tenyészetek pH-jának változása a hőmérséklet függvényében

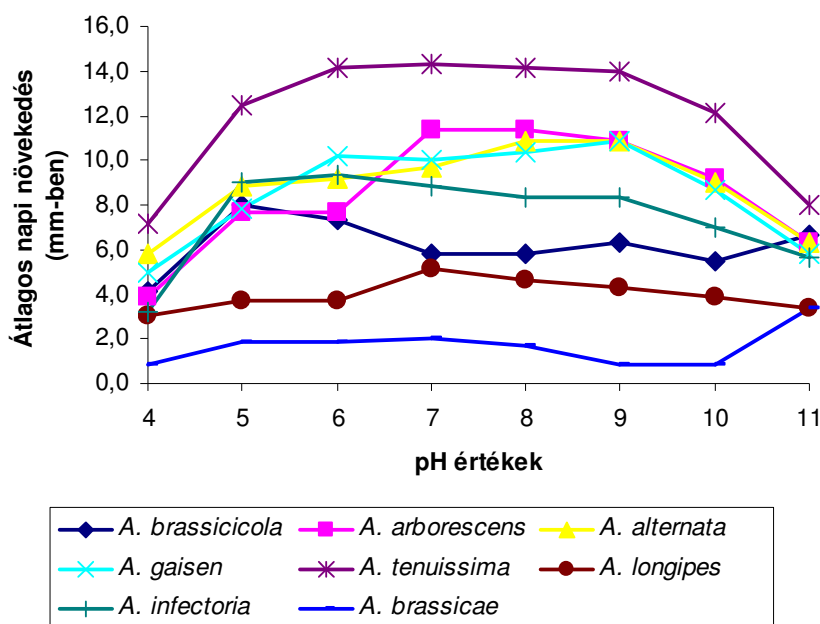
- **pH hatása a növekedésre**

Az egyes *Alternaria* fajok illetve fajcsoportok pH-igénye eltérő (10. táblázat) és eltérést tapasztaltunk a pH-optimumok (az a pH érték, ahol maximális a növekedés) között is (28. ábra). Az *A. tenuissima* izolátum pH optimuma széles sávban mozog a pH 6.0-9.0-es értékekig. Az *A. brassicae* izolátum esetén is széles az optimális pH tartomány (pH 5.0-8.0). Más izolátumoknál az optimum egy jóval keskenyebb sávban mozog, így az optimális növekedéshez szükséges pH az *A. brassicicola*-nál 5.0, az *A. arborescens*-nél 7.0, az *A. alternata*-nál 9.0, az *A. gaisen*-nél 9.0, az *A. longipes*-nél 7.0, az *A. infectoria*-nál 6.0 pH értékek körül mozog. A vizsgált összes pH értéken tapasztaltunk növekedést, így pH-

minimumot, –maximumot illetve pH tőrést nem lehet megkülönböztetni. Minimális növekedési erély a kisspórás fajcsoportok körében az *A. longipes* izolátumnál (3.0 mm/nap) tapasztalható 4.0 pH mellett, míg maximális növekedés az *A. tenuissima* izolátum (14.3 mm/nap) 7.0 pH értéken fordul elő.

10. táblázat Napi átlagos sugárirányú telepnövekedés (mm/nap) különböző pH-jú táptalajon

Fajok / fajcsoportok	pH értékek							
	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>A. brassicicola</i>	4,2	8,0	7,3	5,8	5,8	6,3	5,5	6,7
<i>A. arborescens</i>	3,8	7,7	7,7	11,3	11,3	10,8	9,2	6,3
<i>A. alternata</i>	5,8	8,8	9,2	9,7	10,8	10,8	9,0	6,3
<i>A. gaisen</i>	5,0	7,8	10,2	10,0	10,3	10,8	8,7	5,8
<i>A. tenuissima</i>	7,2	12,5	14,2	14,3	14,2	14,0	12,2	8,0
<i>A. longipes</i>	3,0	3,7	3,7	5,2	4,7	4,3	3,8	3,3
<i>A. infectoria</i>	3,2	9,0	9,3	8,8	8,3	8,3	7,0	5,7
<i>A. brassicae</i>	0,8	1,8	1,8	2,0	1,7	0,8	0,8	3,3



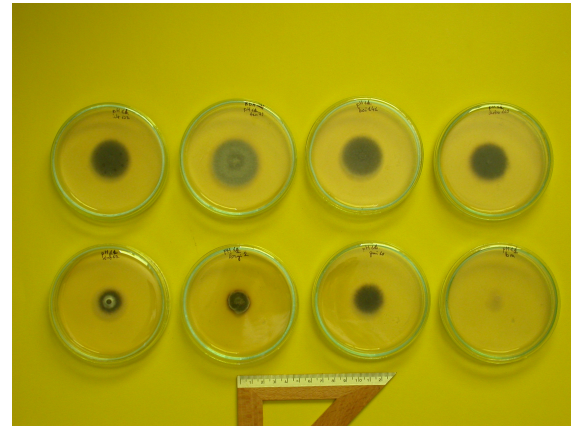
28. ábra. Napi átlagos sugárirányú telepnövekedés BDA-n adott pH értéknek megfelelően

A tenyészetek növekedésére kifejtett H-ion koncentráció hatását a következőkben szemléltetjük. A 29. ábrán az *A. infectoria* izolátum tenyészeinek eltérő növekedését láthatjuk különböző pH értékek mellett (4-10 pH). A 30. ábrán a pH 11.0-re beállított pH-érték növekedésre kifejtett hatását láthatjuk különböző fajcsoportba sorolt izolátumok esetén.



29. ábra Az *A. infectoria* tenyészteteinek növekedése eltérő pH értékek mellett

Balról jobbra haladva a következő sorrendben, fent: balra pH 4, fent jobbra pH 7, lent balra pH 8, lent jobbra pH 10.



30. ábra A 11-es pH-jú táptalajon nőtt tenyészetek

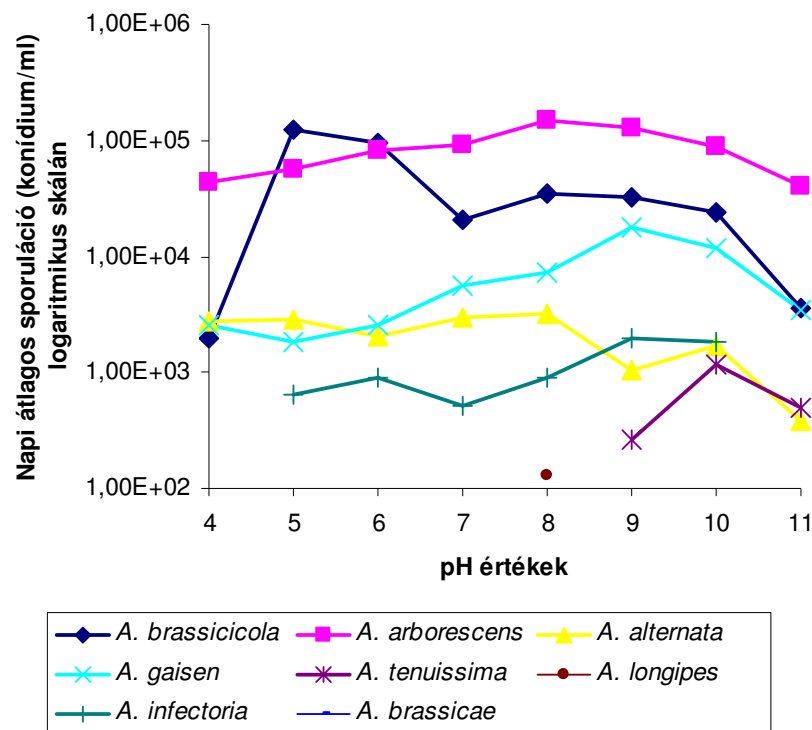
Balról jobbra haladva a következő sorrendben, fent: *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. brassicicola*, *A. arborescens*, lent: *A. infectoria*, *A. longipes*, *A. gaisen*, *A. brassicae*.

- pH hatása a sporulációra

Az előbbieken láthattuk, hogy a pH micélium növekedésre kifejtett hatása fajonként eltérő. A hidrogénion-koncentráció hatása a sporuláció esetében is megmutatkozik (11. táblázat, 31. ábra). A legmagasabb napi spórakoncentráció emelkedés az *A. arborescens* izolátum esetén látható, pH 8.0-as értéken. A legalacsonyabb koncentráció pedig az *A. longipes* faj, pH 8.0-as tenyészeténél fordul elő. A pH változásra legérzékenyebben az *A. brassicicola* izolátum reagált, hiszen pH 4.0-es táptalajon a sporuláció  $1,95 \times 10^3$  db/ml volt, míg pH 5.0-nál ez az érték közel 100-szorosára nőtt, így  $1,24 \times 10^5$  db/ml értéket mutatott. Az egyes izolátumok sporuláció maximuma a következő: *A. brassicicola*  $1,25 \times 10^5$  db/ml, pH 5.0; *A. arborescens*  $1,51 \times 10^5$  db/ml, pH 8.0; *A. alternata*  $3,25 \times 10^3$  db/ml, pH 8.0; az *A. gaisen*  $1,81 \times 10^4$  db/ml, pH 9.0; az *A. tenuissima*  $1,17 \times 10^4$  db/ml, pH 10.0; az *A. longipes*  $1,30 \times 10^2$  db/ml, pH 8.0 és az *A. infectoria* izolátum  $1,95 \times 10^3$  db/ml, pH 9.0-es érték körüli.

11. táblázat Az *Alternaria* fajok illetve fajcsoportok sporulációjára jellemző értékek (konídium/ml) különböző pH-jú táptalajon

Fajok / fajcsoportok	pH értékek							
	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>A. brassicicola</i>	1,95E+03	1,24E+05	9,42E+04	2,07E+04	3,54E+04	3,28E+04	2,40E+04	3,65E+03
<i>A. arborescens</i>	4,39E+04	5,71E+04	8,23E+04	9,17E+04	1,51E+05	1,29E+05	8,75E+04	4,03E+04
<i>A. alternata</i>	2,73E+03	2,85E+03	2,08E+03	2,98E+03	3,25E+03	1,04E+03	1,68E+03	3,83E+02
<i>A. gaisen</i>	2,60E+03	1,82E+03	2,60E+03	5,60E+03	7,42E+03	1,81E+04	1,19E+04	3,50E+03
<i>A. tenuissima</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,60E+02	1,17E+03	5,00E+02
<i>A. longipes</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,30E+02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
<i>A. infectoria</i>	0,00E+00	6,51E+02	9,11E+02	5,21E+02	9,11E+02	1,95E+03	1,82E+03	0,00E+00
<i>A. brassicae</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00



31. ábra A napi átlagos sporuláció (konídium/ml) logaritmus skálán a pH értékek függvényében

Az autökológiai vizsgálatot a hőmérséklet és pH hatásának vizsgálatára építettük fel. Általánosságban megállapítható, hogy a kapott eredmények a kisspórás *Alternaria* izolátumok rendszerezése kapcsán fontos szerepet játszanak az egyes környezeti tényezők hatásának megismerése céljából, habár ezek a tényezők az *Alternaria* fajok esetén fajspecifikus hatást nem mutatnak.

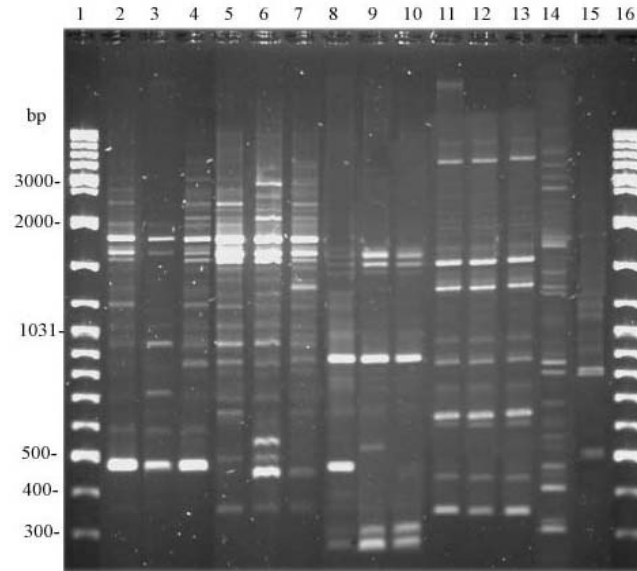
### 5.3. *Alternaria* izolátumok molekuláris vizsgálatának eredményei

E fejezet az *Alternaria* izolátumok molekuláris diverzitásának kérdéskörét foglalja magába és a hazai kispórási alternáriák besorolását teszi lehetővé klasszikus morfológiai eredményeket megerősítő molekuláris vizsgálat segítségével. A polimorfizmus kimutatás alkalmazható eszközei között többlokuszos vizsgálat céljából az összDNS RAPD elemzést és a mitokondriális DNS RFLP elemzést használtuk. Az *Alternaria brassicicola* populációk variánsainak feltérképezésére, az egyedi genomhely vizsgálati eszközök közül, a mikroszatellit markerekkel történő elemzést alkalmaztuk.

#### 5.3.3. RAPD vizsgálat eredményei

A fajcsoportokra jellemző reprezentatív mintázatokat az 32. ábrán tüntettük fel. Az OPR-12-es indítószekvenciával kapott RAPD mintázatot különböző *A. tenuissima*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. brassicicola* és *A. infectoria* izolátumok bemutatásával szemléltetjük. Az egyes fajokra jellemző mintázatok specifikusságot tükröznek. Oligonukleotidonként 40–45, azaz összesen 122 markert azonosítottunk és értékeltünk. A legtöbb fragmentum nagysága 300 és 3000 bp között változott. Megjegyezzük, hogy csak azokat a sávokat fogadtuk el RAPD-markereknek, melyek következetesen elegendő intenzitással festődtek.

Az egyes indítószekvenciákkal létrehozott mintázatok jól elkülöníthetők, a fajcsoportokra jellemzők, s mindhárom *primer* külön-külön is alkalmas arra, hogy értékelhető különbségeket állapítsunk meg a vizsgált kispórási fajcsoportok között. A kapott mintázatok jól egyeztek az egyes fajcsoportokra jellemző, szakirodalomban megjelent RAPD mintázatokkal (ROBERTS és mtsai 2000, Pryor és MICHALIADES 2002).



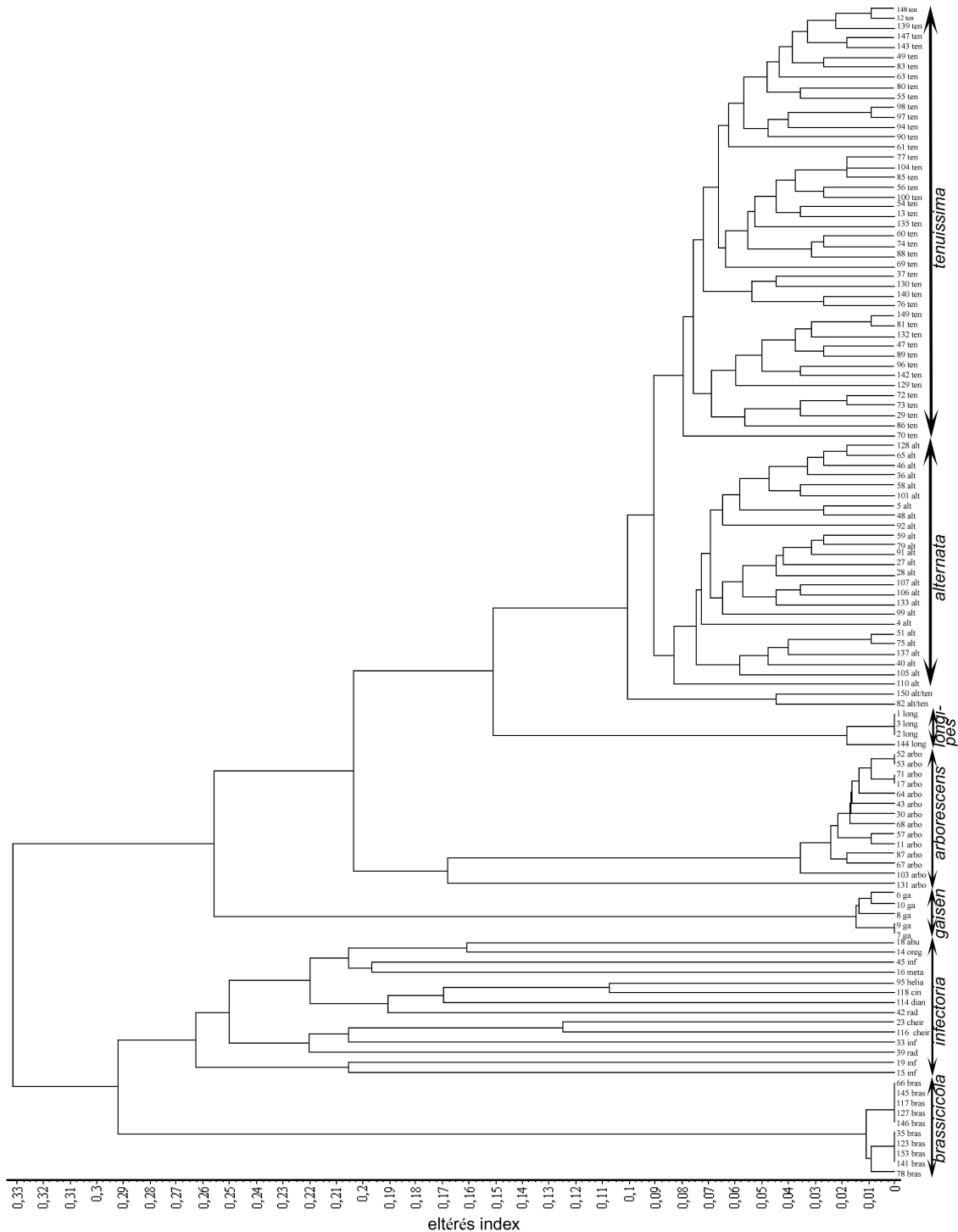
32. ábra OPR-12-es indítószekvenciával kapott RAPD mintázatok különböző fajcsoportokra jellemző mintázatai

Az ábrán látható jellemző mintázatok a következők: *A. tenuissima* (2., 3., 4. sávok), *A. alternata* (5., 6., 7. sávok), *A. arborescens* (8., 9., 10. sávok), *A. brassicicola* (11., 12., 13. sávok) és *A. infectoria* (14., 15. sávok) izolátum. Az ábra két szélén (1. és 16. sáv) molekulatömeg-marker (Generuler SM 0333, Fermentas) látható.

A 118 kispórás izolátumra kapott adatok számítógépes feldolgozásának eredményét dendrogram formájában közöljük (33. ábra), mely alapján az alábbiakat állapítottuk meg. A *tenuissima* és *alternata* izolátumok nagy számarányukhoz képest egy közös, kevésbé polimorf csoportot képeztek. RAPD mintázataik jól elkülönültek más csoportokétól, s mindhárom primerrel két alcsoportot tudunk elkülöníteni, melyek megfeleltek az *alternata* és *tenuissima* fajcsoportoknak. A közöttük fennálló nagyfokú rokonság a hasonló mintázataik alapján is jól látható volt (32. ábra). Az *alternata* csoportban két atipikus mintázatú törzset figyeltünk meg. Az egyiket retekéről (82), a másikat muskátliról (150) izoláltuk. A két izolátum összesített RAPD mintázata alapján megállapítottuk, hogy mindössze 10%-ban különbözött el az *alternata* és a *tenuissima* fajcsoportoktól, melyektől a még hozzájuk legközelebb álló *arborescens* fajcsoport is lényegesen nagyobb mértékben különbözött. Itt említjük meg, hogy e két izolátum rDNS ITS szekvenáltatását követően a következő eredményekre jutottunk: a két izolátum azonos volt egy génbankban elérhető szekvenciájú *A. tenuissima* izolátummal (génbanki elérhetőség: AY751455.1), ugyanakkor a többi GenBank-ban fellelhető *alternata* vagy *tenuissima* izolátum szekvenciájától legalább egy nukleotidban különbözött.

A gazdanövény szerinti tagolódásból láthatjuk (2. táblázat, 4.2.2. fejezet) hogy a *brassicicola*, *gaisen* és a *longipes* kispórás izolátumok kifejezetten 1-1 gazdanövényről vagy

gazdanövény-családról származnak, míg az *arborescens*, *infectoria*, *alternata* és *tenuissima* fajcsoportokba tartozó izolátumok nem jellemezhetők egy-egy specifikus gazdanövénnyel.

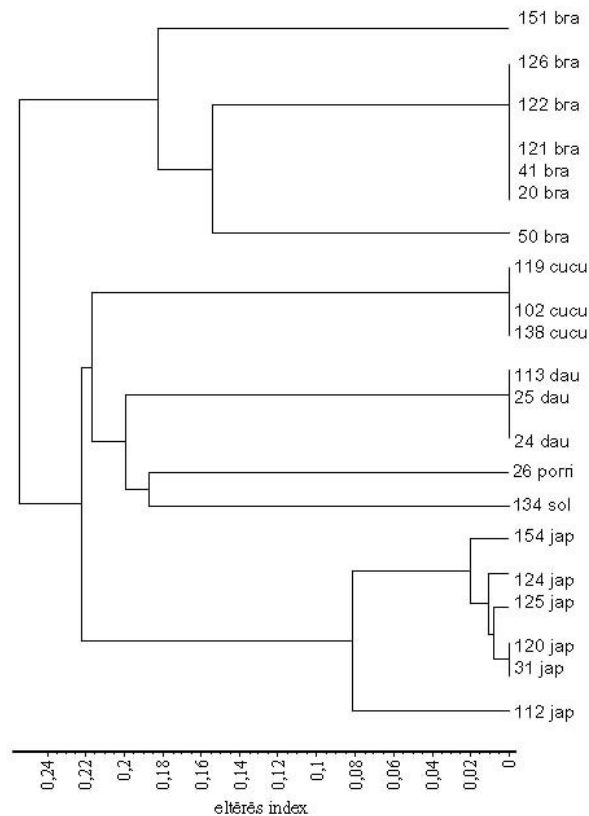


33. ábra *Alternaria* izolátumok RAPD mintázatai alapján készült dendrogram

Az ábrán feltüntetésre kerültek az izolátumok kódszámai, rövidített fajnevei (ten-*A. tenuissima*, alt-*A. alternata*, arbo-*A. arborescens*, ga-*A. gaisen*, abu-*A. arbusti*, oreg-*A. oregonensis*, meta-*A. metacromatica*, helia-*A. helianthi*, cheir-*A. cheiranthi*, dian-*A. dianthicola*, cin-*A. cinerariae*, inf-*A. infectoria*, rad-*A. radicina*, bras-*A. brassicicola*) és a megfelelő fajcsoportok.



A nagyspórás fajok RAPD *primerekkel* kapott: OPA-04-es, az OPR-02-es és az OPR-12-es indítószekvenciákkal készített mintázata látható a 34. ábrán. Az ábra alapján az *A. brassicae*, *A. helianthificiens*, *A. porri*, *A. dauci* és az *A. solani* fajok jól elkülönülnek egymástól. Az egyes fajok fajszinten jól elhatárolhatók egymástól (34. ábrán) és a kisspórás *Alternaria* fajoktól (nem bemutatott eredmény). Az *A. brassicae* fajt képviselő néhány izolátuma között nagy genetikai különbséget (eltérés index = 0.18) észleltünk, szemben más nagyspórás fajokkal.



34. ábra Az egyes nagyspórás fajok genetikai kapcsolatát bemutató dendrogram

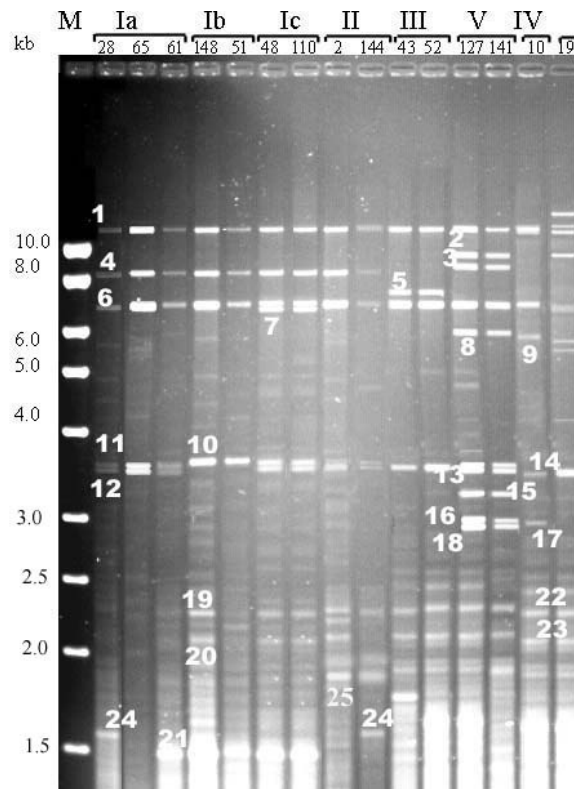
Az ábrán feltüntetésre kerültek az izolátumok kódszámai és rövidített fajnevei (bra-*A. brassicae*, cucu-*A. cucumerina*, dau-*A. dauci*, porri-*A. porri*, sol-*A. solani*, jap-*A. japonica*).

#### 5.3.4. Mitokondriális DNS RFLP elemzése

Megvizsgáltuk, hogy lehetséges-e mtDNS RFLP vizsgálattal a kisspórás *Alternaria* fajokat, illetve fajcsoportokat elkülöníteni.

Első lépésben teszteltük az enzimeket a fajcsoportok 2-2 képviselőjén. Célunk volt, hogy kiválasszuk azon enzimeket, melyek könnyen azonosítható és lehetőleg polimorf

mintázatot adnak. A mások által (MAVRIDOU és TYPAS 1998, RUPE és mtsai 2001, LÁDAY és mtsai 2004) a fonalas gombák tanulmányozása céljából használt *Hae* III és *Msp* I enzimek nehezen értékelhető, több sávos mintázatot generáltak. Ráadásul a markerek többsége túl gyenge volt ahhoz, hogy eldöntsük valódi, vagy részleges emésztés eredményeként jöttek létre. Sem ezen enzimek mennyiségének növelésével, sem más izolátumok DNS-einek használatával az eredmények kiértékelhetősége nem javult. Következésképpen a *Hae* III és a *Msp* I enzimeket kizártuk a vizsgálandó enzimek sorából. A *Bsh*1236I és *Hin* 6I enzimmel kapott RFLP mintázatok viszont könnyen kiértékelhetők voltak, jól látható és elhatárolható DNS markereket produkáltak (35. és 36. ábra).

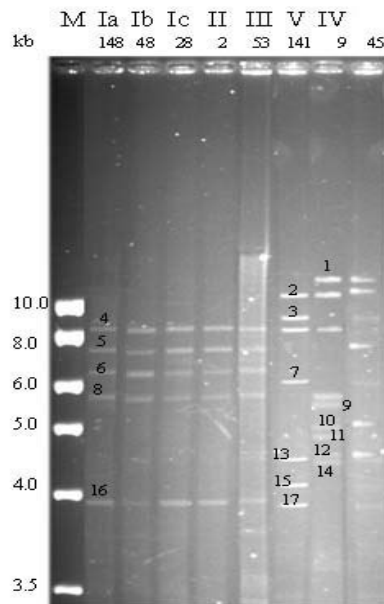


35. ábra *Hin*6I restrikciós enzimmel emésztett teljes genomi DNS-ek agarózgél-elektroforézisével kapott mtRFLP haplotípusok (Ia-V)

Fent az egyes fajcsoportok képviselőinek kódszámai olvashatók a következő felbontásban: *A. alternata* (28, 65, 51, 48, 110), *A. tenuissima* (61, 148), *A. longipes* (2,144), *A. arborescens* (43, 52), *A. brassicicola* (127, 141), *A. gaisen* (10), *A. infectoria* (19) fajcsoport. M- molekulatömeg-marker (Massruler SM0403, Fermentas).

A *Bsh*1236I enzimmel történő emésztés (36. ábra) nem különítette el az *A. alternata*, az *A. arborescens*, az *A. longipes* és az *A. tenuissima* izolátumokat, annak ellenére, hogy ezen izolátumok között morfológiai különbségek és RAPD mintázatban megmutatkozó különbségek is vannak. Az enzim az *A. gaisen*, az *A. brassicicola* és az *A. infectoria*

izolátumok vonatkozásában eltérő RFLP mintázatot generált. Az *A. infectoria* csoporton belül is az izolátumok eltérő mintázatúak voltak.



36. ábra *Bsh*1236I enzimmel emésztett összDNS agaróz gélelektroforézisével kapott mtRFLP mintázat

Fent az mtDNS haplotípusok betűjelei (Ia-V) láthatók. Alattuk az egyes fajcsoportok képviselőinek kódszámai olvashatók a következő felbontásban: *A. alternata* (48, 28), *A. tenuissima* (148), *A. longipes* (2), *A. arborescens* (53), *A. brassicicola* (141), *A. gaisen* (9), *A. infectoria* (45) fajcsoport. M- molekulatömegmarker (Massruler SM0403, Fermentas).

A mitokondriális genom *Hin* 6I enzimmel kapott mintázata 25 azonosítható markert eredményezett, 1.5-15.0 kb tartományban, melyek közül 14 marker fajcsoport specifikusnak mutatkozott (35. ábra, 12. táblázat). A 12. táblázatban összesítettük az egyes fajcsoportokra jellemző markereket, megjelölve azok méretét. A táblázatból kiolvasható, hogy mely markerek voltak specifikusak egy-egy fajcsoportra.

Azokat a markereket, melyek nem voltak következetesen értékelhetők, vagy relatív intenzitásuk nagy változatosságot tükrözött a különböző gélekben, nem értékeltük pl: 4.0-6.0 kb tartományban.

A kis méretű RFLP szakaszok kevésbé tisztán voltak láthatók feltételezhetően a magi DNS-re jellemző szakaszok feldúsulása miatt, így csak a 1.5 kb-nál nagyobb szakaszokat értékeltünk ki.

Összességében 5 különböző mitokondriális haplotípust azonosítottunk. Az *A. infectoria* fajcsoportba tartozó izolátumok mindegyike eltérő fragmentum mintázattal rendelkezett, mely alapján az összes e csoportba sorolt egyedre lehetett volna egy-egy

haplotípust definiálni. Az azonosított haplotípusok néhány kivétellel fajcsoporton belül azonosak, fajcsoportok között viszont különbözőek voltak. A kivételek a következők: az *A. alternata*, *A. tenuissima* izolátumok külön-külön az Ia, Ib és Ic alhaplotípusba sorolhatók (12. táblázat). Ezek a típusok közeli rokonságban lévők, hiszen csak 1-4 lokuszban különböznek egymástól. A polimorf szakaszok közül egy kb. 3.7 kb-os szakasz az Ib haplotípusra, egy kb. 6.8 kb-os az Ic típusra és két (3.65 és 3.55 kb) szakasz az Ia és Ic haplotípusokra jellemző.

12. táblázat A *Hin6I* enzimmel generált mtDNS RFLP mintázatok tipikus markerei

Méret bp	Marker sorszám	<i>alternata</i> és <i>tenuissima</i>			<i>longipes</i>	<i>arborescens</i>	<i>Gaisen</i>	<i>brassicicola</i>
		Ia	Ib	Ic	II	III	IV	V
15000	1	1	1	1	1	1	1	1
10000	2							1
9000	3							1
8500	4	1	1	1	1			
7500	5					1		
7000	6	1	1	1	1	1	1	1
6800	7			1				
6000	8							1
5900	9						1	
3700	10		1					
3650	11	1		1	1			
3600	13							1
3550	12	1		1	1	1		1
3450	14						1	
3250	15							1
2950	16							1
2900	17						1	
2850	18							1
2300	19		1	1		1		1
2250	22						1	
2100	20		1	1		1		1
2050	23						1	
1800	25				1			
1600	24	1			1			
1500	21	1	1	1				

Bal oldalt az egyes markerekhez tartozó méretek, mellette a marker sorszámok láthatók. Minden egyes fajcsoportnál szerepelnek a fajcsoportra jellemző markerek. Színessel azokat a markereket emeltük ki, melyek specifikusan jellemzők egy-egy fajcsoportra.

Az *A. longipes* izolátumokra jellemző II-es haplotípus nagy hasonlóságot mutatott az Ia haplotípussal, megkülönböztető markere a 1.8 kb-os DNS-fragmentum. Az *A. arborescens* izolátumok (III) egy specifikus 7.5 kb nagyságú (5-ös sorszámú) markerrel rendelkeztek. Az *A. brassicicola* izolátumok (V) egyedi 10.0, 9.0, 6.0, 3.6, 3.25, 3.95 és 2.85 kb nagyságú DNS-szakaszok révén különülnek el. Az *A. gaisen* csoportba tartozó izolátumok (IV) a következő specifikus szakaszok jelenlétével azonosíthatók: 5.9, 3.45, 2.9 kb. Az *A. infectoria*

csoport (VI) izolátumai jelentős RFLP mintázat különbséggel rendelkeztek, ugyanakkor ezek a mintázatok jól elkülöníthetők más csoportokat képviselő mintázatoktól (I-V).

Megjegyezzük, hogy a 82-es retokról és a 150-es krizantémról származó hazai izolátumot nem lehetett egyik haplotípusba sem besorolni, sajátos mintázatuk miatt.

Az Ia haplotípusba tartozó izolátumok száma volt a legnagyobb, azaz 40 izolátum a vizsgált 118 kispórás izolátum közül (34%). Az Ib haplotípusba 27 izolátum sorolható, vagyis az *A. alternata* és az *A. tenuissima* csoport izolátumszámához (72) képest 37,5%. Az Ic haplotípusba csak két izolátum tartozik, az egyik saját gyűjteményből rizs bugáról, a másik Kanadából babbüvelyről származik. A 2. táblázatban (4.2.2. fejezet) az egyes izolátumok származása mellett eredményként feltüntettük az izolátumoknál tapasztalt haplotípus azonosítót (Ia-V). E táblázatból kiolvasható, hogy az I-es haplotípusba sorolható izolátumok képezték a vizsgált izolátumok legnagyobb hányadát. A különböző mtDNS típusokba tartozó izolátumok ismert származási helyéből következtethetünk arra, hogy ezek a csoportok szinte a világon mindenütt megtalálhatók.

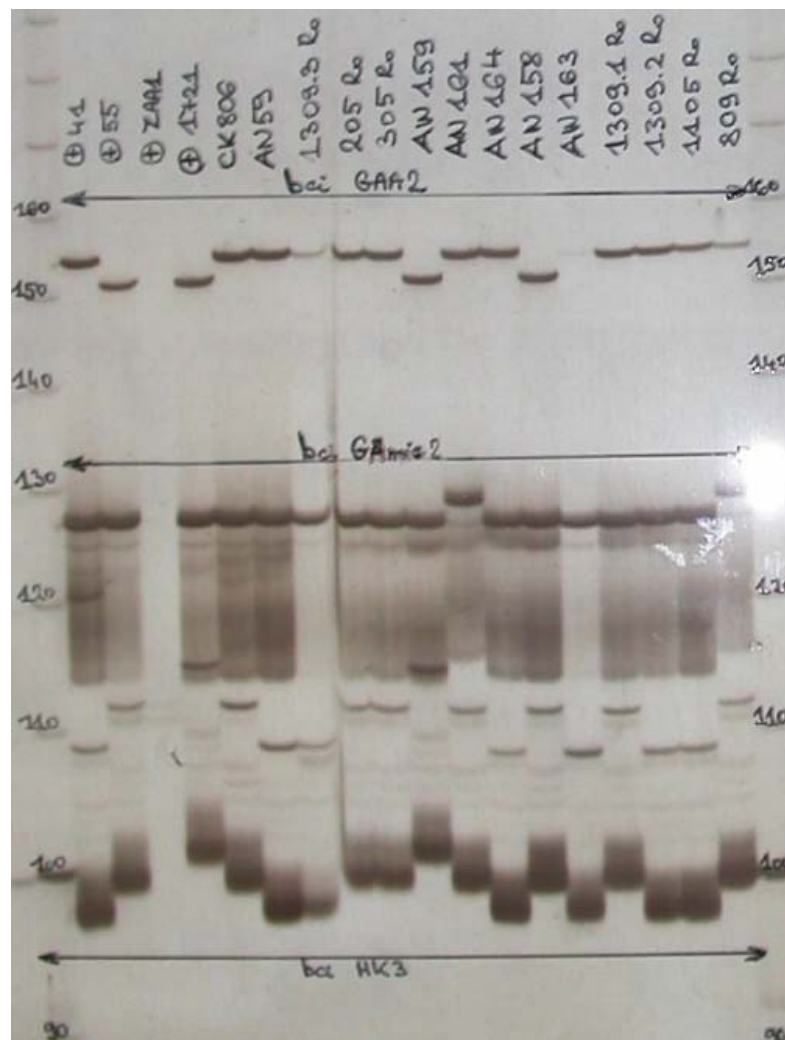
A *Hin6I* enzimmel kombinált kettős emésztések (pl. *Hin6I* + *MspI* vagy *Bsh12361*) nem hoztak specifikus vagy részletesebb információt a rendszerezés szempontjából.

### 5.3.5. Az *Alternaria brassicicola* faj mikroszatellit profiljának jellemzése

A mikroszatellit indítószekvenciák (6. táblázat, 4.3.5.4 fejezet) közül 12 pár polimorf és 4 pár monomorf profilt adott a vizsgált 53 *A. brassicicola* izolátumnál.

Allél kiesést nem tapasztaltunk, azaz minden izolátum összes vizsgált lokuszában találtunk specifikusan felszaporítható mikroszatellit régiót. Vizsgálataink során csak haploid allélváltozatot figyeltünk meg. Minden lokusz egyedi mintázatot mutatott. A polimorf lokuszok allélváltozatai minimálisan 2 bp különbséget mutattak. A járulékos termékek megjelenése nem okozott problémát az allél méretek pontos meghatározásánál, hiszen a klónozott mikroszatellit allél szekvenciáját ismertük, Amplify 3.0 programmal a méretét meghatároztuk, és profilját referenciaként használtuk. Az allélek méret tartománya 93 (GAA<sub>10</sub>-es lokusz) és 251 bp (GA<sub>4</sub>-es lokusz) között mozgott. Azonos méretű allélek fordultak elő a GAA<sub>2</sub> és a GAA<sub>6</sub>, valamint a HK<sub>3</sub>, GA<sub>35</sub>, GA<sub>5</sub> lokuszokban. A detektált polimorf allélek száma: 42, ami lokuszonként 2-10 között változott (átlagosan 3.5).

A multiplex rendszerben előállított PCR termékek poliakrilamid mátrixban előállított egyik mintázatát szemlélteti a 37. ábra. A poliakrilamid gélzt ezüst-nitrát festési eljárással hívtuk elő. A  $GAA_2$  és a  $GA_2$  lokuszban két-két allélváltozatot figyelhetünk meg, míg a  $HK_3$  lokuszban három allélváltozat fordul elő ugyanazon izolátumoknál. Az erősebb barna színezetű sávok felelnek meg a felszaporított terméknek. A  $GAA_2$ -es lokuszban árnyék termékek nincsenek. A termékek mérete 153 és 156 bp. A  $GA_2$  lokuszban halvány színezetű elmosódott sávok mellett, egy-egy erősebben felszaporodott géntermék látható, melynek megállapított mérete 128 illetve 130 bp. A  $HK_3$  lokuszban az erőteljesen felszaporított géntermékekkel párhuzamosan halványabb és vékonyabb profilú marker mintázatot is láthatunk. A termékek mérete egyenként 109, 112 illetve 115 bp.



37. ábra Három mikroszatellit régió multiplex rendszerben előállított egyik mintázata

A gél felső részében az egyes sávok felett a vizsgált izolátum azonosítóját láthatjuk. A kép szélén szereplő beosztások a molekulatömeg markert jelölik 10 bp nagyságú felosztásban 90 bp-tól 160 bp-ig.

### 5.3.5.1. Alpopulációk genetikai diverzitása

Az egyes izolátumokat külön-külön kétféle felbontásban, alpopulációkra bontottuk. Földrajzi eredet szerint három, gazdanövények szerint két alpopulációt különítettünk el. A földrajzi származás alapján kialakított alpopulációk a következők:

- Nyugat-Európa (Ny-Eu): francia, holland és német izolátumok – 26 db (pop1)
- Közép és Kelet-Európa (K-K-Eu): magyar és román izolátumok – 12 db (pop2)
- Észak-Amerika (É-Am): amerikai és kanadai izolátumok – 6 db (pop3)

Az Észak-Amerika-i alpopulációt kis elemszáma ellenére célszerűnek tartottuk bevonni a vizsgálatok sorába.

Az egyes alpopulációkra kiszámított eredményeket táblázat formájában összesítettük (13. táblázat).

13. táblázat Földrajzi eredet szerint képzett alpopulációk NEI-féle géndiverzitásának fontosabb mérőszámai

Populációk	Ht	±SE	Hs	±SE	Dst	Gst	G <sup>2</sup>	P
3 pop(Ny-Eu+K-Eu+É-Am)	0.3142	±0.0908	0.2992	±0.0814	0.0150	0.0477	67,0200	0,3000
Ny-Eu+K-Eu	0.2988	±0.0922	0.2900	±0.0871	0.0088	0.0294	34,0000	0,2000
Ny-Eu+É-Am	0.3171	±0.0883	0.3070	±0.0824	0.0101	0.0319	30,5200	0,3800
K-Eu+É-Am	0.3279	±0.0978	0.3099	±0.0871	0.0180	0.0549	34,7900	0,1300

Ht: teljes géndiverzitás. Hs: alpopuláción belüli géndiverzitás. Dst: alpopulációk közötti abszolút géndiverzitás

Gst: alpopulációk közötti relatív géndiverzitás SE: standard hiba

G<sup>2</sup>: allélgyakoriságok valószínűségi aránya

P: alpopulációk differenciáltsága statisztikailag nem szignifikáns, P>0.05

- nullhipotézis nincs különbség az alpopulációk között

A páronkénti és a három alpopuláció együttes összehasonlításakor az alábbiakat állapítjuk meg:

- azonos fokú genetikai változékonyság volt megfigyelhető, mind Ht-re és Hs-re.
- az alpopulációk közötti genetikai különbözőség statisztikailag nem igazolt, azaz P minden esetben nagyobb, mint 0.05.
- a differenciáltság abszolút mértéke igen alacsony (0.0088 és 0.018 közötti), ami arra utal, hogy az alpopulációk között viszonylag szabad a génáramlás, melyet a földrajzi hovatartozás sem korlátoz.
- a teljes változékonyságnak csak igen kis hányada köszönhető az alpopulációk közötti különbözőségnek (lásd az alacsony Gst értékeket). Százalékban kifejezve csak maximum 5.49%, azaz az alpopulációk nem izoláltak egymástól, s szintén megállapítható, hogy valószínűleg nem korlátozott közöttük a génáramlás.

- a páronkénti összehasonlítások közül K-K-Eu+É-Am járult a teljes változékonysághoz, ill. különbözőséghez, a legnagyobb mértékben, majd Ny-Eu+É-Am és végül pedig NyEu+K-K-Eu (lásd Gst értékek).

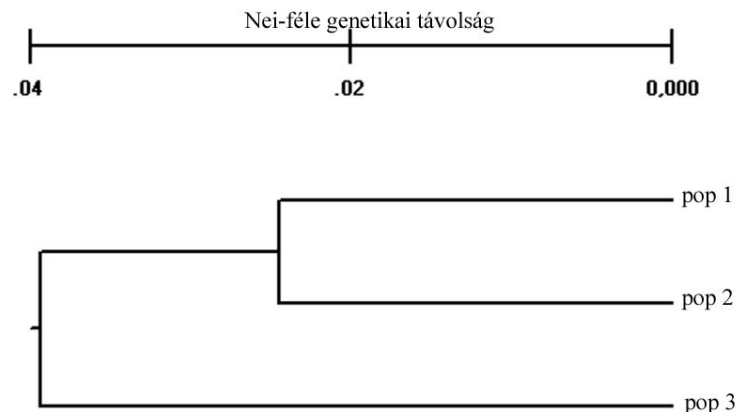
A NEI-féle genetikai távolságot a 14. táblázatban tüntettük fel. A genetikai azonosság értékei 0.9753-tól, 0.9927-ig terjednek.

14. táblázat NEI-féle genetikai azonosságot kifejező értékszámok

Populáció	1	2	3
1	*****	0.9869	0.9927
2	0.0132	*****	0.9753
3	0.0073	0.0251	*****

A genetikai azonosság (fent diagonálisan), a genetikai távolság (lent diagonálisan) olvasható.

Az alpopulációk genetikai távolságaira alapozott dendrogramon látható, hogy a három alpopulációra tagolt csoport közül az 1-es populáció és a 2-es populáció, azaz a Nyugat-Európa-i valamint Közép és Kelet-Európa-i származású izolátumok közelebb kerültek egymáshoz, mint az Észak-Amerika-i izolátumokhoz (38. ábra).



38. ábra *A. brassicicola* populációk UPGMA dendrogramja

Az izolátumokat egy újabb felbontási rendszerben a gazdanövény alapján csoportosítottuk, így két alpopulációt különítettünk le:

- *Raphanus* spp. – 22 db
- *Brassica* spp. – 19 db

A gazdanövények alapján felbontott és populációgenetikai módszerekkel elemzett értékekből a származás szerinti felbontáshoz hasonló megállapításokat lehet tenni. Azaz a két gazdanövényről (*Raphanus* spp. és *Brassica* spp.) származó *A. brassicicola* izolátumok



populációi között viszonylag szabad a génáramlás, az alpopulációk között nincs szignifikáns eltérés ( $P > 0.05$ ) (15. táblázat).

15. táblázat Gazdanövény szerint képzett *Alternaria brassicicola* alpopulációk NEI-féle géndiverzitásának fontosabb mérőszámai

Populációk	Ht	±SE	Hs	±SE	Dst	Gst	G <sup>2</sup>	P
2 pop ( <i>Raphanus+Brassica</i> )	0,2820	0,0841	0,2758	0,0814	0,0062	0,0220	35,9000	0,2100

Összességében az alpopulációk egyik összehasonlításban sem differenciáltak.

### 5.3.5.2. Genotípusok klaszteranalízise

A vizsgálatba vont *A. brassicicola* populáció szegregált alpopulációkra való tagolódását nem lehetett igazolni, ezért az izolátumok halmazát a továbbiakban egyetlen multipopulációként tekintettük, s vizsgáltuk, hogy az egyes lokuszok milyen mértékben járulnak hozzá a genetikai variabilitáshoz.

Az izolátumok közötti allél variabilitást diverzitás számítással igazoltuk (16. táblázat).

16. táblázat A vizsgált *A. brassicicola* izolátumok egyes lokuszaihoz tartozó alléldiverzitások értékei és átlagai

Lókuszt	Na	h
<i>GA</i> <sub>1</sub>	2.0000	0.2293
<i>GA</i> <sub>2</sub>	2.0000	0.0726
<i>GA</i> <sub>3</sub>	1.0000	0.0000
<i>GA</i> <sub>4</sub>	1.0000	0.0000
<i>GA</i> <sub>5</sub>	2.0000	0.4998
<i>GA</i> <sub>6</sub>	5.0000	0.5532
<i>GA</i> <sub>27</sub>	2.0000	0.0370
<i>GA</i> <sub>30</sub>	1.0000	0.0000
<i>GA</i> <sub>35</sub>	2.0000	0.0370
<i>GA</i> <sub>39</sub>	1.0000	0.0000
<i>GAA</i> <sub>6</sub>	2.0000	0.4486
<i>GAA</i> <sub>10</sub>	10.0000	0.8095
<i>GAA</i> <sub>2</sub>	4.0000	0.4293
<i>GAA</i> <sub>4</sub>	6.0000	0.7569
<i>ATA</i> <sub>13</sub>	3.0000	0.5354
<i>HK</i> <sub>3</sub>	3.0000	0.4834
Átlag	2.9375	0.3058
SE	1.2131	0.5840

Na: lókuszonkénti tényleges allélszám

h: Nei-féle (1973) géndiverzitás

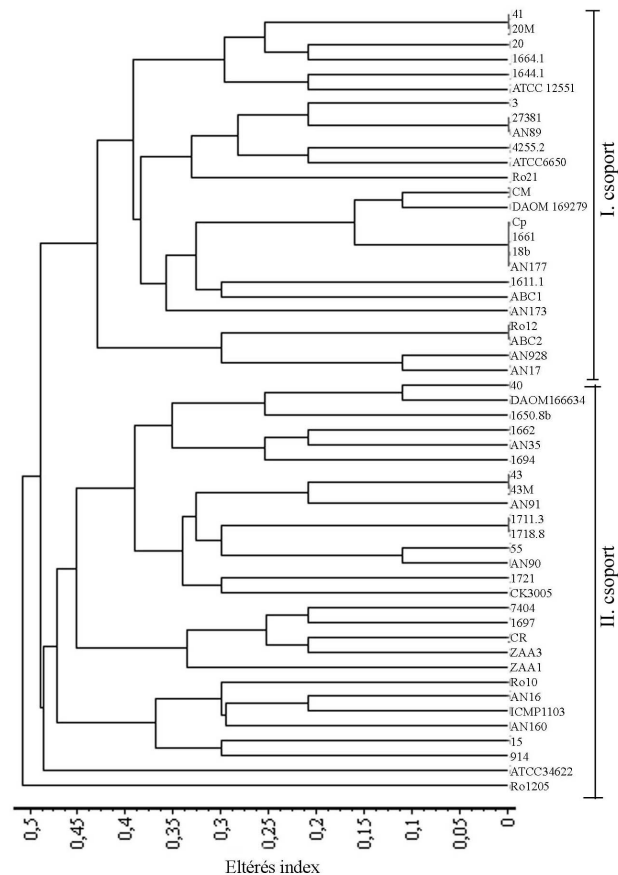
SE: standard hiba

A legkisebb diverzitást  $h=0.0370$  a  $GA_{35}$ -ös lokuszban, míg a legnagyobbat  $h=0.8095$  az  $GAA_{10}$ -es lokuszban tapasztaltuk. Az átlagos NEI-féle diverzitás mutató  $h=0.3058$  értékű. A táblázatban feltüntettük a tapasztalt allélek számát ( $N_a$ ) is. A genetikai változékonyság mértéke összefüggésbe hozható az egyes lokuszok polimorfizmusával. Így látható, hogy a legpolimorfabb lokuszban volt a legnagyobb a genetikai változékonyság mértéke. A legkisebb változékonyságot pedig olyan lokuszban tapasztaltuk, ahol a lokusz csak két allélváltozattal fordult ugyan elő, de ezen változatok közül az egyik csak egy izolátumnál volt megtalálható. Az egyes genotípusok közötti távolságokat felhasználva, UPGMA klaszteranalízissel dendrogramot készítettünk. A dendrogramon a markerek 45 többlokuszos formát képviseltek (39. ábra).

A populáción belüli allélek megoszlása összességében két csoportot eredményezett (I. csoport, II. csoport). Ezen csoportok mindegyikében különböző földrajzi helyről és különböző gazdanövényről származó izolátumok is megtalálhatók. Azonos haplotípust négy esetben figyeltünk meg, melyek a következők:

1. a 27381-es (rettek, Franciaország) és az AN89-es (káposzta, Magyarország);
2. a Cp (káposzta, Franciaország), a 1661-es (rettek, Franciaország), a 18b (rettek, Franciaország) és a AN177-es (káposzta, Hollandia);
3. a Ro12-es (káposzta, Románia) és a ABC2 (káposzta, Kanada);
4. a 1711.3-as (rettek, Franciaország) és a 1718.8-as (rettek, Franciaország) izolátumok között.

Szükséges megemlíteni, hogy kezdetben csak egy vad keresztesvirágú növényről származó (ATCC 34622 - *Crambe maritima*) *A. brassicicola* izolátummal rendelkezünk, mely allél kombinációja elkülönült a többi izolátumtól. Ezért néhány egyéb vadfajú keresztesvirágú növényről származó izolátumot is bevontunk a vizsgálatainkba. Így lépéseket tettünk a vadfajokról és a kultúrnövényekről származó izolátumok mikroszatellit profil összehasonlításra. Ezen vizsgálatok kezdeti eredményei alátámasztani látszanak, hogy sem a vadnövényekről sem a kultúrnövényekről származó *A. brassicicola* populációk nem szegregálódnak.



39. ábra *Alternaria brassicicola* izolátumok mikroszatellit profilja alapján készült dendrogram

### 5.3.5.3. A kórokozó diagnosztizálása mikroszatellit típusú specifikus markerekkel

További polimorfizmus vizsgálat céljából ugyanazon DNS kivonási technikát és PCR reakció körülményeket alkalmazva más *Alternaria* nemzetségbe tartozó közel rokon fajokon is elvégeztük a rendelkezésünkre álló mikroszatellit *primerekkel* a profil vizsgálatot: *A. porri* (egy izolátum), *A. solani* (egy izolátum), *A. petroselini* (egy izolátum), *A. dauci* (két izolátum), *A. bataticola* (egy izolátum), *A. alternata* (egy izolátum), *A. radicina* (két izolátum), *A. arborescens* (egy izolátum), *A. longipes* (egy izolátum), *A. japonica* (két izolátum), *A. brassicae* (két izolátum). A vizsgált izolátumok egyikénél sem tapasztaltunk DNS felszaporodást. A tervezett *primerek* tehát alkalmasak az *A. brassicicola* faj genetikai diverzitásának tanulmányozására.

## 6. Következtetés

Kutatómunkánk során foglalkoztunk az *Alternaria* nemzetségbe tartozó izolátumaink morfológiai tulajdonságával, genetikai azonosításával és az *A. brassicicola* faj populációszerkezetének vizsgálatával. A továbbiakban tekintsük át kísérleti eredményeinkből levont következtetéseinket és javaslatainkat.

### 6.2. Morfológiai vizsgálatok eredményeinek megvitatása

Az *Alternaria* jellegű *Hyphomycetes*-eknél alkalmazott klasszifikációs rendszerek a nemzetközi szakirodalomban elsősorban SACCARDO, NEERGARD, JOLY, ELLIS és SIMMONS nevéhez köthetők. A klasszikus morfológián alapuló rendszertan a konídiumok morfológiáján alapuló rendszerezéshez kötődik. Ugyanakkor ma már tényként fogadható el, hogy adott fajon belüli morfológiai variációk és a különböző fajok morfometriai adatainak átfedése szinte lehetetlenné teszi a morfológiai szempontok alapján történő fajszerű diagnosztizálást (ROTEM 1994).

Az *Alternaria* konídiumok kialakulása során számos abiotikus tényező befolyása érvényesülhet, mint például: a hőmérséklet, a pH, a tápanyag, a nedvesség és a megvilágítás. A környezeti tényezők hatással vannak az izolátumok konídium jellemzőire, mint pl. a méretre, alakra, szeptáltságra, lánchosszúságra stb. Mindezek tudatában törekedtünk olyan morfológiai bélyegeket kiválasztani és részletesen vizsgálni, melyek az azonosítás során előrelépést jelentenek. Ezért a fenotípus alapján történő különböző azonosítási eljárásokra nagy hangsúlyt fektettünk. A klasszikus rendszertannak megfelelő mikromorfológiai tényezők vizsgálatát kevésbé tartottuk jelentősnek. Ezzel szemben a vizes-agaron képződött sporuláció típusok leírását és néhány abiotikus tényező hatásának vizsgálatát újszerűségénél fogva jobban kihangsúlyoztuk.

A gombák pontos azonosítása fontos a gyakorlat szempontjából, nemcsak a növénykórtan, hanem biotechnológiai, klinikai, környezetvédelmi alkalmazásokban egyaránt. A taxonómiai rendszerek elsősorban természetesen a klasszikus módszerekre épülnek és többnyire a közvetlenül felismerhető morfológiai tulajdonságokon alapulnak. Ezen okok miatt a minél pontosabb fenotípus jellemzésre továbbra is szükség van. A modern technológiai háttér elérhetőségével és használatával sok új kutatási terület nyílt meg a gombák rendszerezése kapcsán, ugyanakkor lehetővé vált a klasszikus módszerek fejlődése is. A numerikus taxonómia, a hatékony statisztikai csomagok valamint a számítógépes

alkalmazások a morfológiai vizsgálatok reneszánszának lehetőségét vetik fel. Mi sem szerettünk volna kimaradni ebből a fejlődésből, ezért *Alternaria* konídiumokról készült digitális felvételek elkészítésével segítettük digitális azonosító kulcsok kifejlesztését, az „Egzakt minősítő és osztályozó rendszer fejlesztése növénynevelési és növénykórtani vizsgálatokhoz digitális képfeldolgozás alkalmazásával” című helyi kezdeményezésű program megvalósulása érdekében (BERKE és mtsai 2005).

### 6.2.3. Mikromorfológiai tulajdonságok

Mikromorfológiai tulajdonságokat vizsgáltunk BDA, DRYES és vizes-agaros közeg felületéről kinyert konídiumok esetében. A monospórás tenyészetek rendkívül heterogén voltát tapasztaltuk. A kisspórás *Alternaria* fajok konídiumainak tulajdonságai alapján nem lehetett fajcsoportokat elkülöníteni. A táptalaj hatása a konídiumhosszúság és szélesség alakulásában egyaránt megmutatkozott.

A nagyspórás *Alternaria* fajok határozása klasszikus értelemben táptalajon nem volt lehetséges, hiszen ezek a gombák táptalajon elveszítették sporuláló képességüket, illetve, amennyiben sporuláltak, a konídiumaik hosszúságában és szélességében elmosódnak a fajra jellemző specifikus tulajdonságok. Így megállapítható, hogy a nagyspórás fajok határozása a gazdanövény ismerete nélkül bizonytalan, fontos az onnan lekerülő konídiumok méretezésével megállapítani a nagyspórás *Alternaria* fajok azonosságát.

### 6.2.4. Sporuláció típusok

A vizes-agarra oltott tenyészeteknél a leoltási pont környékén jól megfigyelhető és szabad szemmel is látható gombaelemekből felépülő strukturáltságot figyeltünk meg. 50x-es nagyítás mellett azonban a gyakorlott szem előtt feltűnő, sötét színű konídiumlánc struktúrák jelennek meg. Szakirodalmi forrásmunkák segítségével azonosítottuk a sporuláció típusára jellemző bélyegeket, úgy mint a sporuláció intenzitását, a konídiumlánc csoportosulását és a konídiumlánc elágazását illetve mértékét, a konídiumlánc tagjainak számát, másodlagos konídiumtartók kialakulását valamint néhány esetben az elsődleges konídiumtartók szerkezetét. Ezek összességében megfelelnek azon morfológiai bélyegeknél, melyeket a szakirodalom is közöl, bár SIMMONS és ROBERTS (1993) a PCA (burgonya-sárgarépa agar, **P**otato-**C**arrot **A**gar) táptalajt ajánlja az izolátumok sporulációs típusának vizsgálatára. A vizes-agaros közeg sporuláció típus jellemzés céljából történő alkalmazhatósága az

előzőeknek megfelelően bizonyítást nyert. Az ilyen közegben létrejövő konídium struktúrák képzéséhez megvilágításra nincs szükség, szemben a PCA-n alkalmazott tenyésztési eljárással.

Általában véve az *Alternaria* fajok azonosítása során problémát okoz, hogy a táptalajon nevelt *Alternaria* tenyészetek gyakran bőséges konídiumképzéssel reagálnak a közegben jelenlévő tápanyagokra és megvilágításra. Ezzel szemben vizes-agarral végzett kísérletek során e két környezeti tényező befolyásoló hatásától mentesülni lehet. Nincs szükség a tápanyagtartalom csökkentése révén növelni az esetleg kevésbé sporuláló tenyészetek konídiumképzését. Tömegtenyésztés céljából azonban a csökkentett tápanyagtartalmú táptalajok továbbra is ajánlhatók (KOVÁCS és FISCHL 1997). Mivel a konídiumláncok a leoltási hely környékén jelentkeznek, a konídiumlánc struktúrák könnyen észrevehetőek. Gyakran a szomszédos konídiumláncok jól elkülönülnek egymástól. A kiértékelhetőséget növeli a közeg színtelen, vagy piszkos fehér volta, hiszen a színezet nem jelent zavaró tényezőt a binokuláris fénymikroszkóppal végzett vizsgálatok során, szemben más élénk színezetű táptalajon végzett vizsgálatokkal.

A közeg gyors, egyszerű kivitelezhetősége és praktikussága révén lehetne jelentős az *Alternaria* fajok morfo-típusának határozása szempontjából, mivel a sporuláció típusának közvetlen morfológiai vizsgálata a legfontosabb lépés a kisspórás *Alternaria* fajok azonosítása szempontjából (ANDERSEN és mtsai 2001). E tenyésztési eljárás előnyei és alkalmazhatósági határai bemutatásra kerültek. Az eljárás hátrányai nem ismeretesek.

### 6.2.5. Telepmorfológiai jellemzők

Eredményeink szerint a telepmorfológiai tulajdonságok az egyes izolátumok elkülönítése szempontjából jelentős segítséget nyújtanak. A DRYES agaron vizsgált telepmorfológiai bélyegek közül a tenyészet színe mutat jelentős eltérést az egyes *Alternaria* izolátumok vizsgálata során. Az *A. infectoria* fajok DRYES agaron fehér színű kolóniát fejlesztettek, mely stabil jellemzőnek tudható be az *Alternaria* fajok osztályozása szempontjából. Megállapítottuk, hogy a telepmorfológiai bélyegek önmagukban nem alkalmasak az izolátumok rendszerezése céljából.

### 6.2.6. *In vitro* vizsgálatok eredményeiből levont következtetések

Eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált hőmérséklet és pH tényezői külön-külön hatnak a különféle *Alternaria* fajcsoportok növekedésére és konídiumképzésére. A vizsgált fajok illetve fajcsoportok hőtűrése, illetve hőigénye széles határok között mozog. Mindenesetre megállapítható, hogy az izolátumok a mezofil mikroorganizmusok közé sorolhatók. Ez ellentmondani látszik FASSATIOVA (1984) megállapításával, mely szerint az *A. alternata* faj a pszichrofil fajok közé sorolható. A sporulációs optimum hőmérséklete néhány esetben eltér a növekedési optimumhoz tartozó hőmérséklet igénytől.

A táptalaj H-ion koncentrációja az egyes fajcsoportok növekedésére és sporulációjára is eltérő módon hatott. A hőmérséklet és a pH hatás jól differenciálja az egyes csoportokat. Nagyobb elemszámú kispórás *Alternaria* populáció elkülönítése céljából az optimális hőmérsékleti tartományban (+25-30°C) és az optimális pH tartományban (pH 5.0-8.0) javasoljuk a növekedési tesztek elvégzését. Ezekben a tartományokban a vizsgált csoportképviselő izolátumok a leginkább voltak differenciálhatók. Természetesen az izolátumok alapos morfológiai vizsgálatok nélkül önmagában hőmérséklet teszttel vagy pH teszttel nem azonosíthatók.

Általánosságban megállapítható, hogy a kapott eredmények a kispórás *Alternaria* izolátumok rendszerezése kapcsán fontos szerepet játszanak az egyes abiotikus tényezők hatásának megismerése céljából, annak ellenére, hogy ezek a tényezők az *Alternaria* fajok esetén fajspecifikus hatást nem mutatnak. Ezen felül, kétségtelen előnye a makromorfológiai vizsgálatoknak, hogy a tenyészetek átmérőinek mérése sokkal kevésbé munka és befektetés igényes feladat, mint a molekuláris eszközök alkalmazása.

### 6.3. Molekuláris vizsgálatok eredményeinek megvitatása

A molekuláris vizsgálati módszerek közül az *Alternaria*-k kutatásában a nemzetközi szinten is hangsúlyos szerepet kapó RAPD elemzést és egy új vizsgálati módszert, a mitokondriális DNS RFLP elemzést választottuk ki az identifikálás eszközeként. A mikroszatellit profilelemzést az *A. brassicicola* faj populáció-szerkezetének vizsgálata céljából alkalmaztuk.

### 6.3.3. RAPD mintázatok

Molekuláris markereket gyakran használnak az *Alternaria* fajok különböző populációinak összehasonlítása céljából. A RAPD vizsgálat során elérendő cél reprodukálható genetikai „ujjlenyomat” kimutatása az *Alternaria* populációk elkülönítése (PRYOR és MICHALIADES 2002) vagy egyes fajok genetikai variabilitásának feltérképezése érdekében (SHARMA és TEWARI 1998, MORRIS és mtsai 2000). RAPD mintázat alapján nagy genetikai variabilitást figyeltek meg a kisspórás, gyümölcskultúrákból származó *Alternaria* fajcsoportok között (ROBERTS és mtsai 2000 és PRYOR és MICHALIADES 2002). A hazai *Alternaria* izolátumok populációinak összetételéről nem álltak rendelkezésre adatok.

A jelen munkában jelentős interspecifikus RAPD polimorfizmust tapasztaltunk az egyes kisspórás fajcsoportok között. Az *alternata* és *tenuissima* izolátumok nagy számarányából látható, hogy ezen izolátumok szaprotróf/nekrotróf életmódjuknak köszönhetően valóban széleskörben elterjedtek.

ROBERTS és mtsai (2000) valamint PRYOR és MICHALIADES (2002) szerint az *arborescens* izolátumok két alcsoportra különíthetők el RAPD mintázataik alapján. Saját vizsgálatainkkal ezt nem tudtuk egyértelműen alátámasztani. Feltehetően azért, mert viszonylag kevés törzs állt rendelkezésünkre, jöllehet egy izolátum (131) meglehetősen távol került a többi *arborescens*-től. Az *infectoria* fajcsoport tagjai alkották a legváltozatosabb csoportot. Ez azért nem meglepő, mert közöttük olyan formálisan leírt fajok szerepelnek, melyek morfológiailag meglehetősen eltérnek, csupán azonos módon képezik konídiumláncukat (SIMMONS 1995). Érdekesség, hogy a spóraláncot az *alternata*-kkal azonos módon képező *brassicicola* izolátumok egymástól igen távolra kerültek a dendrogramon. Ez pedig arra utal, hogy a sporuláció típusa, mint egyik igen lényeges morfológiai határozóbélyeg alapján nem minden esetben lehet a fajcsoportokat azonosítani. Mivel azonban az *alternata* és *brassicicola* fajcsoportok között jól kimutatható egyéb morfológiai különbségek is vannak, jelenlegi elhelyezkedésük a dendrogramon mégsem meglepő. A *brassicicola* izolátumok kismértékű polimorfizmusa valószínűleg szintén a viszonylag kevés izolátumszámra vezethető vissza.

Gazdanövények, illetve földrajzi eredet szerinti tagozódást nem tapasztaltunk. Érdekes, hogy a különböző származású *A. arborescens* izolátumok rendkívül homogén képet mutattak RAPD mintázataikban és morfológiájukban egyaránt. ANDERSEN és mtsai (2002) is hasonló eredményekről számolt be az *A. arborescens* izolátumok anyagcseretermékeinek vizsgálata során.



Az egyes nagyspórás fajokat RAPD vizsgálattal el tudtuk különíteni egymástól és a kisspórás *Alternaria* fajoktól. A nagyspórás *Alternaria* fajok populáció összetételére vonatkozóan nem lehet következtetést levonni, hiszen viszonylag kevés izolátum állt rendelkezésünkre. Mindenesetre az *A. brassicae* populáción belül tapasztalt nagyfokú változékonyság nem feltétlen ered a populáció különböző összetételéből, hiszen az izolátumok azonosságát nagyspórás fajok esetén sporuláció elmaradás miatt nem lehet eleve egyértelműen bizonyítani. Feltételezhető, hogy ilyen eredmények esetén a külföldről beszerzett tenyészetek valóban nem az *A. brassicae* faj izolátumai. Továbbá az sem kizárt, hogy az *A. brassicae* faj populációja valóban ennyire változatos. A fentiekben leírtak értelmében az *A. brassicae* izolátumok faj azonossága biztonságosan specifikusan kötődő primerek segítségével állapítható meg.

Ezekből az eredményekből is következtetni lehet azonban arra, hogy a nagyspórás fajok különböző összetételű populációt képeznek, mely összhangban áll SIMMONS (2000) morfológiai alapon tett megállapításaival.

A nagyspórás fajok kutatásával kevesen foglalkoztak a szakirodalomban. Ugyanakkor az ide tartozó kórokozók gazdaspecifikus patogén szervezetek. A továbbiakban is érdekes lehet tanulmányozásuk filogenetikai, taxonómiai és diagnosztikai vonatkozásban egyaránt.

#### 6.3.4. Mitokondriális DNS RFLP mintázatok

Ezidáig nem álltak rendelkezésre adatok a hazánkban jelenlévő kisspórás *Alternaria* aggregátum összetételéről. A mtRFLP elemzést fajcsoport azonosítás céljából az alternáriáknál eddig még a külföldi kutatásokban sem alkalmazták, így ez a módszer új molekuláris információval szolgál a kisspórás *Alternaria* fajok illetve fajcsoportok azonosítása szempontjából.

A kisspórás *Alternaria* izolátumok mitokondriális DNS variabilitását vizsgáltuk meg, mivel a mtDNS RFLP elemzése talán az egyik legalkalmasabb módszer a gomba taxonok intra- és interspecifikus elkülönítésére (TAYLOR 1986). A fajok közötti és fajon belüli genetikai polimorfizmus kimutatás szempontjából a mtDNS kedvező alapot biztosít, hiszen kis méretű és nagy mutációs rátával rendelkezik szemben a magi DNS-sel.

Ez idáig kevés tanulmány foglalkozik az *Alternaria* fajok mtDNS analízisével. E régió differenciáltságának tanulmányozása céljából kétféle módszert alkalmaztak: a mtDNS rDNS SSU szekvenálását (PRYOR és GILBERSON 2000) és mtDNS RFLP-t követő Southern hibridizációt (KUSABA és TSUGE 1997). E munkák egyrészt a kisspórás *A. infectoria*

csoporton belüli filogenetikai kapcsolatok vizsgálatára, másrészt a korábban *A. alternata*-ként ismert HST-termelő fajok elkülönítésére összpontosulnak. Az SSU szekvencia elemzés referencia fajai között 1-1 *brassicicola*, *alternata* és *tenuissima* faj szerepel. Mindenesetre egyik tanulmány sem tartalmaz olyan sok fajcsoportot és izolátumot, mint amennyivel mi foglalkoztunk. Ugyanakkor a mtDNS-t alkalmasnak találtuk az egyes fajcsoportok azonosítása céljából.

Nagyobb fokú restriktív fragmentum-hossz különbségeket tártunk fel az *Alternaria* nemzetség kispórás izolátumainak körében. Ilyen különbségeket korábban is azonosítottak valódi gombák mtDNS elemzése során, például a következő faj-aggregátumoknál: *Neurospora intermedia* (RIECK és mtsai 1982), *Claviceps purpurea* (TUDZYNSKI és ESSER 1986), *Fusarium oxysporum* (KISTLER és BENNY 1987), *Trichoderma viride* (MEYER 1991), *Aspergillus niger* (VARGA és mtsai 1993). Ugyanakkor a mitokondriális DNS ilyen fokú variabilitására nem számítottunk, mivel egy korábbi közlemény szerint a mtRFLP-vel vizsgált kispórás HST-termelő *Alternaria* fajok nem különülnek el az *A. alternata*-tól (KUSABA és TSUGE 1997). Igaz, hogy az akkor vizsgált hat faj közül vizsgálatunkban csak két HST-termelő fajjal, az *A. longipes*-szel és az *A. gaisen*-nel (syn. *A. kikuchiana*) foglalkoztunk. A vizsgálatba vont két HST-t termelő faj, mind morfológiailag, mind RFLP típusát tekintve jól elhatárolható volt az *A. alternata* fajcsoporttól. KUSABA és TSUGE (1997) nem tudott különbséget tenni mtDNS RFLP vizsgálattal e fajok genetikai diverzitását tárgyalva, ez valószínűleg az akkor alkalmazott enzim kisebb felbontóképességére vezethető vissza.

Eredményeink alapján a vizsgált mtDNS-ben tapasztalt eltérések enzimenként eltérő mintázatot mutattak. *Hin 6I* emésztéssel öt haplotípust különítettünk el. Közeli alhaplotípusok Ia, Ib és Ic az *alternata/tenuissima* aggregátumból kerültek ki. Megjegyezzük, hogy az *A. infectoria* fajcsoportba tartozó izolátumok mindegyike eltérő fragmentum mintázattal rendelkezett, mely alapján az összes e csoportba sorolt egyedre lehetett volna egy-egy haplotípust definiálni. Az általunk megnevezett haplotípusok jellegzetes DNS fragmentummal rendelkeztek, melyek diagnosztikai jelentőségűek az *A. alternata/tenuissima* aggregátum (Ia, Ib, Ic), az *A. longipes* (II), az *A. arborescens* (III), az *A. gaisen* (IV) és az *A. brassicicola* (V) fajcsoport elkülönítése szempontjából. Minden izolátum mtDNS mintázata besorolható volt egy-egy fajcsoportba, kivéve két izolátumot a 82-es és a 150-e izolátumokat. A konídiumlánc struktúráját megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a 82-es izolátum *alternata*-ra jellemző, míg a 150-es izolátum ettől helyenként eltérő láncképzést mutat. A morfológiai vizsgálat és az ITS szekvencia-elemzés alapján ezen izolátumokat egy közös *A. alternata/tenuissima* csoportba soroltuk. Az mtDNS RFLP vizsgálat azonban nem támasztotta alá ezen csoportosításunkat.

Más enzimmel nem tudunk a fent említett következtetésre jutni. A *Bsh1236I* enzimmel az *alternata*, *tenuissima*, *longipes* és *arborescens* fajcsoportok vizsgált egyedei között nem lehetett különbséget tenni. Különböző kombinációban alkalmazott enzimpárosok nem hoztak létre specifikus mintázatot vagy részletesebb információt a mtDNS szerveződéséről.

Összehasonlítva a két enzimmel kapott mtDNS mintázatot megállapítható, hogy *Hin 6I* enzimmel sokkal több markert lehetett előállítani és nagyobb mértékű polimorfizmust lehetett kimutatni, mint a *Bsh 1236I* enzimmel. A *Hin 6I* enzim differenciáló hatása tehát jobban érvényesült.

Mindenesetre a mtDNS RFLP elemzés típus izolátumokon és hazai izolátumokon egyaránt jelentős genetikai különbségeket tárt fel, mely nagyban megkönnyíti az *Alternaria* nemzetség kispórás fajcsoportjainak azonosítását.

A mtDNS RFLP és a RAPD vizsgálati eredményeket összehasonlítva a következőket állapítottuk meg. Először, RAPD vizsgálattal több reprodukálható markert lehetett biztonságosan elkülöníteni, mint RFLP vizsgálattal. Ez a különbség a két módszer közötti módszertani különbségek eredménye. RAPD vizsgálattal stabil körülmények között, kis koncentrációjú DNS-t sokszorosán szaporítunk fel RAPD *primerek* segítségével, szemben az RFLP vizsgálattal, ahol nem végzünk DNS felszaporítást, hanem közvetlenül nagy koncentrációjú DNS-t emésztünk. Másodszor, RAPD vizsgálattal az *alternata* és *tenuissima* fajcsoportokat el lehetett egymástól határolni, nem így az RFLP vizsgálattal, mely alapvetően három részre osztotta az *alternata/tenuissima* aggregátumot. Harmadszor, az RFLP és RAPD vizsgálat egybevágó eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a mtDNS RFLP a RAPD módszert kiváltó egyik alternatíva lehet a kispórás *Alternaria* fajcsoportok azonosításának területén. A módszer egyszerűbb abból a szempontból is, hogy nincs szükség speciális laborfelszerelésre (pl: PCR készülékre).

Az előzőekből látható, hogy a hazánkban is széleskörűen elterjedt, a kispórás *Alternaria* fajokat pontatlanul azonosító *A. alternata* fajmegjelölés valójában milyen fajcsoportokat takar. Így a kispórás izolátumok korrekt megnevezése céljából, a SIMMONS-szerinti fajcsoport szintű azonosítás mindenképpen javasolt, szemben a NEERGARD-féle csoportosítással.

Összességében a mtDNS RFLP és a RAPD-módszer alkalmasnak bizonyult a hazai *Alternaria* fajcsoportok és fajok elkülönítésére. Eredményeink összhangban állnak a morfológiai jelek alapján kapott adatokkal.

### 6.3.5. Mikroszatellit genotípusok

A kórokozók biodiverzitásának vizsgálata kapcsán az *Alternaria brassicicola* faj genetikai variabilitását vizsgáltuk meg neutrális, mikroszatellit típusú markerekkel. A maggal terjedő *Alternaria* fajok genetikai variabilitását korábban is vizsgálták RAPD markerekkel és ITS régió szekvenciájának összehasonlításával (IACOMI-VASILESCU és mtsai 2001, GUILLEMETTE és mtsai 2004). Ezzel a megközelítéssel molekuláris szempontból egységesen el lehetett ugyan különíteni az egyes fajokat, de ezekkel az eszközökkel csak csekély mértékű intraspecifikus polimorfizmust lehetett kimutatni. Ezért egy új molekuláris eszköz alkalmazását fejlesztettük ki, melyet intraspecifikus szinten is eredményesen lehet használni. A mikroszatellit markerekre a nagyfokú megbízhatóságuk és erőteljes polimorfizmusuk miatt esett a választás.

A keresztesvirágú növényekről származó *Alternaria brassicicola* izolátumok mikroszatellit markerekkel történő elemzése nagyfokú genetikai sokszínűséget tárt fel. Az 53 izolátumos populációban 45 haplotípust tudtunk kimutatni a hierarchikusan megtervezett modellben. E faj genetikai diverzitását vizsgáló kutatók (BOCK és mtsai 2005) is nagyfokú polimorfizmusról számoltak be. Ez a megfigyelés vezetett ahhoz a megállapításhoz, hogy az *A. brassicicola* fajnak létezik egy alkalmanként jelentkező ivaros formája is, legalább is a Dél-Kelet Ausztrália partjain elterülő *Crambe maritima*-t fertőző populáció vonatkozásában (BOCK és mtsai 2005).

A távoli országokból begyűjtött izolátumok azonos haplotípusba sorolódásából kétféle következtetést vontunk le. Egyrészt bizonyos klónok nagy távolságra eljutottak a szaporítóanyag kereskedelem révén világviszonylatban, és ott genetikailag nem módosultak. Másrészt a keresztesvirágú kultúrnövényeket fertőző *A. brassicicola* faj megbetegítő képessége nem korlátozott egy adott növényre.

Érdekes lenne megvizsgálni és összehasonlítani a genetikai változékonyság mértékét a vad és a termesztett növényekről származó izolátumok populációi körében. Ehhez azonban nem rendelkezünk elég számú izolátummal a vad növényfajokról származó izolátumokat illetően. Ugyanakkor számításba véve, hogy néhány vad növényfajról származó izolátum allél kombinációi nem különültek el a kultúrnövényekétől, azt feltételezhetjük, hogy a vad és a termesztett növényekről származó *A. brassicicola* izolátumok nem különülnek el egymástól. Genetikai állományukat tekintve nagyon hasonlóak és esetleg ugyanazon egyedek képesek megbetegíteni a vad és kultúrnövényeket.

Ígéretes lenne megvizsgálni, hogy milyen genetikai variabilitást kapnánk egy szűk földrajzi régióból származó izolátumkör esetén. Esetleg csak egyféle haplotípussal találkoznánk?

A mikroszatellit lokuszok vizsgálata mindenesetre hasznos információt szolgáltat az *A. brassicicola* faj genetikai diverzitásának elemzése szempontjából.

## 7. Összefoglalás

A kutatómunka során foglalkoztunk az *Alternaria* nemzetségbe tartozó hazai kisspórás és nagyspórás izolátumaink morfológiai tulajdonságával, genetikai azonosításával és az *A. brassicicola* faj populáció-szerkezetének vizsgálatával. A vizsgált 140 izolátum közül 56 különféle törzsgyűjteményekből vagy neves kutatók korábban már vizsgált, autentikus izolátumai közül kerültek ki. A populáció-szerkezet vizsgálatához újabb 49 külföldi izolátumot vontunk be.

A morfológiai tulajdonságok vizsgálatára ugyanúgy nagy hangsúlyt fektettünk, mint a genetikai vizsgálatokra. Ezzel is ki szeretnénk volna fejezni, hogy a morfológiai vizsgálatok eredményeinek pontosítására a modern technika eszközeinek felhasználásával ugyanúgy szükség van, mint az elméleti kérdések megválaszolására modern molekuláris eszközök segítségével.

A kutatómunka első szakaszában a mikro- és makromorfológiai tényezők változékonyságát tanulmányoztuk elsősorban a kisspórás *Alternaria* izolátumok illetve fajcsoportok vonatkozásában. A mikromorfológiai tulajdonságok alapján kapott értékek valóban a sokat vitatott azonosíthatóság problémáját vetették fel, mivel az eredmények rendkívül heterogén képet mutattak és azonosítást szolgáló összefüggést nem találtunk az egyes értékek között.

A szakirodalomban nagy hangsúlyt képviselő konídiumképzés típust vizes-agaron vizsgáltuk. A referencia fajok vizsgálatával meg tudtuk állapítani, hogy eredményeink összevágna-k-e más típusú táptalajról származó konídiumlánc szerkezet leírásával. Igazolódott feltételezésünk, ezért a vizes-agaron nyert konídiumlánc szerkezet vizsgálatot tekintettük és alkalmaztuk izolátumaink fajcsoportokba sorolása céljából. Telepmorfológiai bélyegek vizsgálata kapcsán szintén heterogén képet kaptunk. Megállapítottuk, hogy az izolátumok rendszerezésére vonatkozóan ezek a tulajdonságok önmagukban nem használhatók.

A hőmérséklet és a pH hatását *in vitro* kísérletben vizsgáltuk abból a célból, hogy választ kapjunk arra, hogy az egyes fajcsoportok különböző növekedési reakcióval vagy sporuláció intenzitással válaszolnak-e a kitett hatásokra és ezáltal az egyes csoportok elkülöníthetők-e egymástól. Viszonylag tág határok között folytattuk kísérleteinket. Így 5-35°C, 5°C-ként növekvő hőmérséklet és 4-11, egész egységként emelkedő pH tartományban vizsgáltuk az egyes sporulációs típust képviselő izolátumokat, háromszori ismétlésben. Az optimális növekedéshez tartozó hőmérséklet néhány esetben nem esett egybe az optimális sporulációhoz tartozó hőmérséklettel. Tehát bizonyos esetekben eltérő hőmérsékleti igény

bizonyult optimálisnak a növekedés és a sporuláció szempontjából. Ugyanez elmondható a kémhatás vonatkozásában is. Fajcsoport azonosításra szolgáló növekedési tesztek elvégzését az egyes fajcsoportok optimális hőmérsékleti (+25-30°C) tartományban és optimális pH (5.0-8.0 pH) tartományban tartjuk célszerűnek elvégezni *in vitro* körülmények között, mert ezekben a tartományokban reagáltak legnagyobb növekedéssel az egyes izolátumok a meghatározott abiotikus feltételekre. Megállapítottuk, hogy az egyes csoportok azonosítása és elkülönítése a vizsgált paraméterekkel egyértelműen nem lehetséges.

A kutatások második részében az *Alternaria* izolátumok molekuláris azonosítását végeztük el, RAPD elemzéssel, mely vizsgálat szakirodalmi forrásmunkák alapján pozitív eredményekkel szolgál az *Alternaria* izolátumok elkülönítése szempontjából. Ezt a vizsgálatot a morfológiai alapon tett csoportba sorolásunk megerősítése érdekében alkalmaztuk. A vizsgálatba nagyspórás izolátumokat is bevontunk. Az mtDNS RFLP elemzését a szakirodalom más gombák azonosítása céljából bevált módszerként említi, így e módszert az *Alternaria* izolátumok rendszerezése céljából elsőként próbálhattuk ki. Mindkét molekuláris módszerrel az izolátumokat fajcsoportba tudtuk sorolni és ezzel egyértelműen megállapítottuk, hogy a hazánkban is elterjedt, általánosságban *A. alternata* fajként vagy *Alternaria* spp.-ként azonosított izolátumok voltaképpen milyen fajcsoportokat takarnak. A két módszert összehasonlítva arra a következtetésre jutottunk, hogy az mtDNS RFLP vizsgálat akár a sokkal körülményesebb feltételeket igénylő RAPD vizsgálat egyik alternatívája lehetne.

Harmadik részben, az *A. brassicicola* faj populációjának intraspecifikus genetikai variabilitását vizsgáltuk meg mikroszatellit profilelemzéssel. A vizsgálat lebonyolításához szükséges háttérrel a francia partnerünk biztosította. Az elemzéssel sem földrajzi eredet, sem gazdanövény szerint nem lehetett alpopulációkat elkülöníteni. Az 53 izolátumos populációban 45 különböző haplotípust különítettünk el, mely alapján nagyfokú genetikai sokszínűséget tártunk fel.

Hosszú távon a klasszikus és a molekuláris taxonómia megfelelő szintéziséhez további interspecifikus és intraspecifikus különbségeket szolgáltató molekuláris markereket szükséges alkalmazni. Ezeket akár önállóan, akár együttesen használva jutunk majd olyan megfelelő adatokhoz, amelyek e konídiumos gombák rendszerezésének teljes értelmezéséhez vezet.

Megítélésünk szerint az alábbi területeken végzett kutatások további perspektívát jelenthetnek: aeromikológia, digitális képelemzés és elektronikus méretezés, másodlagos anyagcseretermékek, sejtfal összetétel, protein szerveződés és molekuláris analízisek.

## 8. Új tudományos eredmények

### 8.1. Új tudományos eredmények magyar nyelven

1. A mikromorfológiai tényezők közül sporuláció vizsgálat céljából vizes-agart használtunk, melyen elsőként mutattuk ki a különböző kispórás *Alternaria*-kra jellemző konídiumképzés típusokat.
2. Konídiumlánc struktúra alapján kispórás fajcsoportokba soroltuk a hazai, ismeretlen izolátumainkat.
3. *In vitro* kísérletek során vizsgáltuk az egyes fajcsoportok micéliumnövekedés és sporuláció intenzitásának válaszreakcióit az 5-35°C hőmérséklet és 4-11 pH tartományban. Az *in vitro* kísérletek közül a hőmérséklet és a pH hatásának vizsgálata hozott új eredményeket a sporuláció intenzitásának szempontjából. Kísérleti úton elsőként megállapítottuk, hogy az egyes *Alternaria* fajcsoportokat képviselő izolátumok milyen intenzitással sporulálnak a hőmérséklet és pH függvényében.
4. RAPD vizsgálattal molekuláris szinten azonosítottuk a hazai izolátumok fajcsoportjait és egyben megerősítettük az izolátumok morfológiai alapon tett fajcsoportba sorolásának státuszát.
5. A mitokondriális DNS RFLP elemzését elsőként alkalmaztunk különféle kispórás *Alternaria* izolátumok azonosítása céljából. A vizsgált négy restriktív enzim közül, a *Hin* 6I enzimmel lehetett a legtöbb és legpolimorfabb markereket előállítani. Öt mitokondriális haplotípust határoztunk meg. A feltárt különbségek alapján a módszert alkalmasnak találtuk a kispórás *Alternaria* fajcsoportok elkülönítése céljából.
6. Az *Alternaria brassicicola* izolátumok populáció-szerkezetének vizsgálatát specifikusan kifejlesztett mikroszatellit típusú molekuláris markerekkel hazánkban és külföldi viszonylatban egyaránt elsőként végeztük el. Az elemzés alapján nagyfokú genetikai sokszínűséget tártunk fel.



## 8.2. Új tudományos eredmények angol nyelven - New scientific results

1. Among the micromorphological attributes, for the sporulation apparatus examination, we used water-agar medium. In this medium we have firstly demonstrated the different type of conidial chain formation of small spored *Alternaria* isolates.
2. Based on the conidial chain structure, the Hungarian unidentified isolates were grouped into species-groups respectively.
3. *In vitro* experiments was involved to assess mycelial growth and sporulation responses of different species groups for the effect of temperature (5-35°C) and pH (4-11 pH). Among these experiments, the temperature and pH effects were proved to bring new results concerning the evaluation of sporulation intensity respectively. Based on our experiments, we determined for the first time the degree of sporulation intensity of different small spored *Alternaria* isolates in function of temperature and pH effects.
4. By RAPD analysis we identified the species groups of our Hungarian isolates on molecular level, and in the same time we confirmed the segregation of species groups based on morphological characters.
5. The mitochondrial DNA RFLP analysis was applied for the first time to identify the small spored *Alternaria* isolates. Among the examined four restriction enzymes, the *Hin* 6I enzyme supplied the most and best discriminative markers. In the mtDNA RFLP analysis, five haplotypes were resolved. The analysis confirmed to be suitable to discriminate the small spored *Alternaria* species-groups.
6. To analyse the population structure of *A. brassicicola* isolates, previously developed specific microsatellite primers were used for the first time in Hungary and in the World equally, for the genus *Alternaria*. Using population genetic methods the segregation of subpopulations could not be verified. Based on cluster analysis of SSR data, a great genotype diversity was found.

## 9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton fejezem ki külön köszönetemet **Dr. Horváth József** akadémikus úrnak a Doktori Iskola első vezetőjének és **Dr. Gáborjányi Richárd** professzor úrnak a Doktori Iskola jelenlegi vezetőjének, akik lehetőséget biztosítottak számomra, hogy sikeresen elvégezhessem a doktori tanulmányaimat.

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek **Dr. habil. Fischl Géza**, a Növénykórtani és Növényvirológiai Tanszék tanszékvezető egyetemi tanárának, aki a három éves doktori tanulmányaim folyamán a tudomány és szakma területén mindig készségesen támogatott és segítségemre volt tanácsaival a kísérletek elvégzése és az eredmények kiértékelése során, valamint ezen doktori értekezéshez nyújtott sokrétű és nélkülözhetetlen segítségéért.

Megköszönöm **Dr. Bakonyi Józsefnek**, az MTA Növényvédelmi Intézete Növénykórtani Osztálya tudományos főmunkatársának hathatós segítségét, amelyet az értekezésemhez nélkülözhetetlen molekuláris vizsgálatok elvégzéséhez és az eredmények kiértékeléséhez nyújtott.

Külön köszönettel adózom **Dr. Philippe Simoneau**, az Angers-i Egyetem mikrobiológia professzorának, akinek a laboratóriumában a Francia Köztársaság Kormányának ösztöndíjasaként kétszer három hónapot tölthettem, mint kutató. Az ösztöndíjaknak köszönhetően lehetőségem adódott, hogy a mikroszatellit marker analízist elméletileg és gyakorlatilag elsajátítsam és növénykórtani vonatkozásban az *Alternaria* nemzetség gombáinak kutatásában elsőként alkalmazzam.

Köszönettel adózom szüleimnek a megértésükért, támogatásukért és bátorító erkölcsi segítségükért.

Végül, de nem utolsósorban pedig ezúton is hálás köszönetem fejezem ki páromnak, **Dr. Reznicek-Skenderovich Tamásnak**, a tanulmányaim során nyújtott erkölcsi és mindennemű támogatásáért, amely nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

## 10. Irodalomjegyzék

- AGRIOS, G. N. (1997): Plant pathology, 4<sup>th</sup> edition. Academic Press. USA.
- ANDERSEN, B., THRANE, U. (1996): Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles, and cultural characteristics. Canadian Journal of Microbiology, **42**: 685–689.
- ANDERSEN, B., KRØGER, E., ROBERTS, R. G. (2001): Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Research, **105**: 291–299.
- ANDERSEN, B., KRØGER, E., ROBERTS, R. G. (2002): Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima*. Mycological Research, **106**: 170–182.
- ARADHYA, M. K. CHAN, H. M., PARFITT, D. E. (2001): Genetic variability in the pistachio late blight fungus, *Alternaria alternata*. Mycological Research, **105**: 300–306.
- AVENOT, H., DONGÓ, A., BATAILLÉ-SIMONEAU, N., IACOMI-VASILESCU, B., HAMON, B., PELTIER, D., SIMONEAU, P. (2005): Isolation of twelve polymorphic microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*. Molecular Ecology Note. (megjelenés alatt)
- BAGLEY, M. J., ANDERSON, S. L., MAY, B. (2001): Choice of methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints. Ecotoxicology, **10**: 239–244.
- BALÁZS, A., BUDAI, P., KADLICKÓ, S., KOVÁCS, J. (2001): Dominance relationship of bean pathogens at Lake of Balaton. Medelingen – Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent, **66**: 233–240.
- BARVE, M. P., HAWARE, M. P., SAINANI, M. N., RANJEKAR, P. K., GUPTA, V. S. (2001): Potential of microsatellites to distinguish four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* prevalent in India. Theoretical and Applied Genetics, **102**: 138–147.
- BECKMANN, J. S., SOLLER, M. (1990): Toward an unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Biotechnology, **8**: 930–932.
- BECZNER, L., BODOR, J., PAIZS, L. (1970): Zöldségfélék növényvédelme. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
- BENDICH, A. J. (1993): Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure. Current Genetics, **24**: 279–290.
- BENE L., EÖRI T. (1992): Hatékony új csávázószer a cukorrépában. Növénytermelés, **41**: 237–244.
- BERBEE, M. L., PAYNE, B. P., ZHANG, G., ROBERTS, R. G., TURGEON, B. G. (2003): Shared ITS DNA substitutions in isolates of opposite mating type reveal a recombining history for three presumed asexual species in the filamentous ascomycete genus *Alternaria*. Mycological Research, **107**: 169–182.
- BERKE J., FISCHL G., GERGELY L., POLGÁR ZS., DONGÓ A. (2005): Egzakt minősítő és osztályozó rendszer fejlesztése növénynemesítési és növénykórtani vizsgálatokhoz. Informatika a felsőoktatásban 2005 - konferencia. Debrecen. 7 p.
- BÉRES, I., FISCHL, G., MIKULÁS, J. (2000): Biological weed control with fungal pathogens in Hungary. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz Sonderheit, **17**: 667–670.

- BOCK, H. C., THRALL, H. P., BURDON, J. J. (2005): Genetic structure of populations of *Alternaria brassicicola* suggests the occurrence of sexual recombination. *Mycological Research*, **109**: 227–236.
- BOCK, H. C., THRALL, H. P., BRUBAKER, L. C., BURDON, J. J. (2002): Detection of genetic variation in *Alternaria brassicicola* using AFLP fingerprinting. *Mycological Research*, **106**: 428–434.
- BRIDGE, P. D. (1985): An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterization of species of *Penicillium* subsection *fasciculata*. *Journal of Genetical Microbiology*, **131**: 1887–1895.
- CHAMPION, R. (1997): Identifier les champignons transmis par les semences. INRA, Paris.
- CHOU, H. H., WU, W. S. (2002): Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research*, **106**: 164–169.
- CHRISTIAS, C. H., HATZIPAPAS, P., DARA, A., KALIAFAS, A., CHRYSANTHIS, G. (2001): *Alternaria alternata*, a new pathotype pathogenic to aphids. *Biocontrol*, **46**: 105–124.
- COOKE, D. E., FORSTER, J. W., JENKINS, P. D., GARETH-JONES, D., LEWIS, D. M. (1998): Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR. *Annals of Applied Biology*, **132**: 197–209.
- CRESTE, S., TULMANN-NETO, A., FIGUEIRA, A. (2001): Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, **19**: 299–306.
- CROOIJMANS, R. P. M. A., GROEN, A. F., KAMPEN, A. J. A., BEEK, S., POEL-FORD, E. B. (1996): Polymorphism and taxonomy. In: HUXLEY, J. (szerk.): *The new systematics*. Oxford Univ. Press. Clarendon. London and New York. 493-513 p.
- DOWNES, S., MITAKAKIS, T. E., MARKS, G. B., CAR, N. G., BELOUSOVA, E. G., LEÜPPI, J. D., XUAN, W., DOWNIE, S. R., TOBIAS, A., PEAT, J. K. (2001): Clinical importance of *Alternaria* exposure in children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **164**: 455–459.
- EDWARDS, M. C., GIBBS, R. A. (1994): Multiplex PCR: advantages, development and applications. *PCR Methods and Applications*, **3**: 65–75.
- EDWARDS, A., CIVITELLO, A., HAMMOND, H. A., CASKEY, C. T. (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, **49**: 746–756.
- ELLIS, M. B. (1971): *Dematiaceous, Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. ICEW. Anglia.
- ELLIS, M. B. (1976): *More Dematiaceous, Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. ICEW. Anglia.
- ELLSWORTH, D. L., RITTENHOUSE, K. D., HONEYCUTT, R. L. (1993): Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*, **2**: 214–217.

- ERICKSON, O. E., HAWKSWORTH, D. J. (1991): Outline of the *Ascomycetes*. Systematic of *Ascomycetes*, **9**: 39-271.
- FASSATIOVA, O. (1984): Penészek és fonalas gombák az alkalmazott mikrobiológiában. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
- FISCHL G, KOVÁCS J. (1990): Paprika genotípusok és *Alternaria alternata* izolátumok kölcsönhatása. Növényvédelem, **26**: 391–396.
- FISCHL G., BAKONYI J., SZUNICS L. (1993): A búzaszemek fekete-csírájúsága. Növénytermelés, **42**: 419–429.
- FRISVAD, J. C. (1983): A selective and indicative medium for groups of *Penicillium viridicatum* producing different mycotoxins in cereals. Journal of Applied Bacteriology, **54**: 409–416.
- GOODWIN, D. C., LEE, S. B. (1993): Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. Biotechniques, **15**: 438–444.
- GROSSMAN, L. I., HUDSPETH, M. E. S. (1985): Fungal mitochondrial genomes. In: BENNETT, J. W., LASURE, L. L. (szerk.): Gene manipulations in fungi. Academic Press. New York. USA. 65-103 p.
- GROVES, J. W., SKOLKO, A. J. (1944): Notes on seed-borne fungi; II. *Alternaria*. Canadian Journal of Botany, **22**: 219–234.
- GUARRO, J., GENÉ, J., STCHIGEL, A. M. (1999): Developments in Fungal Taxonomy. Clinical Microbiology Reviews, **12**: 454–500.
- GUILLEMETTE, T., IACOMI-VASILESCU, B., SIMONEAU, P. (2004): Conventional and real-time PCR-based assay for detecting *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. Plant Disease, **88**: 490–496.
- HASIJA, S. K., GULYÁS, F., SZEGI, J. (1979): Cellulose decomposition by phytopathogenic species of *Alternaria*. Acta Phytopathologica Hungarica, **14**: 13–15.
- HAWKSWORTH, D. J., KIRK, P. M., SUTTON, B. C., PEGLER, D. N. (1995): Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi, 8<sup>th</sup> edition. CAB International. Wallingford. Anglia.
- HÓDOSY S. (1967): A paradicsom alternáriás betegsége és a védekezés lehetőségei. Doktori disszertáció. Kecskemét.
- HOOG, G. S., YURLOWA, N. A. (1994): Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. Antonie Leeuwenhoek Internationales. Journal of Genetica, **65**: 41–54.
- HONG, G. S., LIU, D., PRYOR, B. M. (2005): Restriction mapping of IGS regions from *Alternaria* spp. and their taxonomic implication. Mycological Research, **109**: 87–95.
- HORVÁTH, S. (1980): Mikrobiológiai praktikum. Tankönyvkiadó. Budapest.
- IACOMI-VASILESCU, B., BLANCARD, D., GUÉNARD, M., MOLINERO-DEMILLY, V., LAURENT, E., SIMONEAU, P. (2001): Development of a PCR-based diagnostic assay for detecting pathogenic *Alternaria* species in cruciferous seeds. Seed Science and Technology, **30**: 87–95.

- JACOB, H. J., LINDPAINTNER, K., LINCOLN, S. E., KUSUMI, K., BUNKER, R. K., YI-PEI, M., GANTEN, D., DZAU, V. J., LANDER, E. S. (1991): Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. *Cell*, **67**: 213–224.
- JASALAVICH, C. A., MORALES, V. M., PELCHER, L. E., SÉGUIN-SWARTZ, G. (1995): Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycological Research*, **99**: 604–614.
- JOLY, P. (1964): Le genre *Alternaria*. In: CHEVALIER, J. P. (szerk.): Encyclopédie mycologique. Parizs. Franciaország. 1-250 p.
- KÁDÁR I., MARTON L., HORVÁTH S. (2000): A burgonya (*Solanum tuberosum* L.) műtrágyázása csernozjom talajon. *Növénytermelés*, **49**: 291–306.
- KANG, J. H., CROUS, P. W., MCHAU, G. R. A., SERDANI, M., SONG, S. M. (2002): Phylogenetic analysis of *Alternaria* spp. associated with apple core rot and citrus black rot in South Africa. *Mycological Research*, **106**: 1151–1162.
- KIFFER, E., MORELET, M. (1997): Les *Deuteromycetes*. Classification et clés d'identification générique. INRA. Parizs. Franciaország.
- KIMMEL, J. (1995): Cukorrépa gomolyok gombaflórája és az ezekről gyűjtött *Alternaria* és *Fusarium* izolátumok patogenitása. *Növényvédelem*, **31**: 279–283.
- KISS E., POTYONDI L. (2000): Összefüggés a tápanyagellátás és a cukorrépa betegségek között, integrált növényvédelem. *Cukoripar*, **53**: 32–37.
- KISTLER, H. C., Benny, U. (1987): The mitochondrial genome of *Fusarium oxysporum*. *Plasmid*, **22**: 86–89.
- KOENIG, H. (1995): Guide de mycologie médicale. Editions Ellipses. Párizs. Franciaország.
- KOLTE, S. J. (1985): Diseases of annual edible oilseed crops. Rapeseed, mustard and sesame diseases II. CRC Press. Boca Raton, Florida. USA.
- KONSTANTINOVA, P., BONANTS, P. J. M., VAN GENT-PELZER, M. P. E., VAN DER ZOUWEN, P., VAN DEN BULK, R. (2002): Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycological Research*, **106**: 23–33.
- KOVÁCS J. (2001): Környezeti tényezők hatása a paradicsom alakú paprika magházpenész betegségére. Doktori PhD értekezés. VE Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar. Keszthely.
- KOVÁCS J., FISCHL G. (1997): Abiotikus és biotikus tényezők hatása a paprika alternáriás termésrothadására. *Növényvédelmi Tudományos Napok*. Budapest. 105.
- KUSABA, M., TSUGE, T. (1994): Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 3055–3062.
- KUSABA M., TSUGE T. (1995): Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Current Genetics*, **28**: 491–498.

- KUSABA, M., TSUGE, T. (1997): Mitochondrial DNA variation in host-specific toxin-producing pathogens in the genus *Alternaria*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, **63**: 463–469.
- KWASNA H. (1992): Ecology and nomenclature of *Alternaria*. In: CHELKOVSKI, J., VISCONTI, A. (szerk.): *Alternaria* biology, plant diseases and metabolites. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. Hollandia. 63-100 p.
- LÁDAY, M., JUHÁSZ, Á., MULE, G., MORETTI, A., SZÉCSI, Á., LOGRIECO, A. (2004): Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zae*). *European Journal of Plant Pathology*, **110**: 545–550.
- LEACH, C. M. (1967): Interaction of near-ultraviolet light and temperature on sporulation of the fungi *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium*, *Helminthosporium* and *Stemphylium*. *Canadian Journal of Botany*, **45**: 1999–2016.
- LITT, M., LUTY, J. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, **44**: 397–401.
- MAGYAR, D., FRENGUELLI, G., BRICCHI, E., TEDESCHINI, E. (2000): A szőlő aeromikoflórája. Környezeti ártalmak és a légzőrendszer - konferencia. *Hévíz*. **10**: 248–258.
- MAURICIO, L. R. C., TYLER, B., MITCHELL, T., BROWN, S., KNUDSON, D., CLIFTON, S., LAWRENCE, C. (2005): The *Alternaria brassicicola* genome sequencing project. XXIII Fungal Genetics Conference. *Fungal Genetics Newsletter*, **52**: 89.
- MAVRIDOU, A., TYPAS, M. A. (1998): Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. *Mycological Research*, **102**: 1233–1241.
- MCCALLAN, S. E. A., CHAN, S. Y. (1944): Inducing sporulation of *Alternaria solani* in culture. *Contributions from Boyce Thompson Institute*, **13**: 323–335.
- MCGINNIS, M. R., SALKIN, I. F. (1986): Identification of molds commonly used in proficiency test. *Laboratory Medicine*, **17**: 138–142.
- MCKAY, J. G., BROWN, E. A., BJORSON, J. A., MERCER, C. P. (1999): Molecular characterisation of *Alternaria linicola* and its detection in linseed. *European Journal of Plant Pathology*, **105**: 157–166.
- MCMEEKIN, Y. T. A., ROSS, T. (1996): Shelf life prediction: status and future possibilities. *International Journal of Food Microbiology*, **33**: 65–81.
- MEYER, R. J. (1991): Mitochondrial DNAs and plasmids as taxonomic characteristics in *Trichoderma viride*. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 2269–2276.
- MEYER, W., MITCHELL, T. G., FREEDMAN, E. Z., VILGALYS, R. (1993): Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, **31**: 2274–2280.
- MILLER, C. R., WAITS, L. P. (2003): The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): Implications for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **100**: 4334–4339.

- MILLER, M. P. (1997): Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA): a Windows program for analysis of allozyme and molecular population genetic data. Version 1.3.
- MISAGHI, I. J., GROGAN, R. G., DUNIWAY, J. M., KIMBLE, K. A. (1978): Influence of environmental and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, **68**: 29–34.
- MOESZ G. (1928): A burgonya legfontosabb betegségei. *Természet-Tudományi Közlemények Pótfüzet*: 15–30.
- MOLNÁR T. (2002): Őszi búzafajták levélfoltosságát okozó gombafajok, a betegség elterjedése és tünettana. Diplomamunka. Nyugat-Magyarországi Egyetem Mezőgazdaságtudományi Kar. Növényvédelmi Tanszék. Mosonmagyaróvár.
- MORRIS, P. F., CONNOLLY, M. S., STCLAIR, A. (2000): Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycological Research*, **104**: 286–292.
- MURRAY, M. G., THOMPSON, W. F. (1980): Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, **8**: 4321–4325.
- NAGY P. (2004): Statikus és 50 Hz frekvenciájú mágneses tér hatása néhány növénypatogén gombára. *Növényvédelem*, **40**: 131–136.
- NAGY P., FISCHL G. (2003): UV-C sugárzás hatása *Alternaria alternata* és *Curvularia inaequalis* konídiumainak csírázására. *Növényvédelem*, **39**: 603–606.
- NAKAMURA, Y., LEPPERT, M., O'CONNELL, P., WOLFF, R., HOLM, T., CULVER, M., MARTIN, C., FUJIMOTO, E., HOFF, M., KUMLIN, E., WHITE, R. (1987): Variable number tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, **235**: 1616–1622.
- NEERGARD, P. (1945): Danish Species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Oxford University Press. London. Anglia.
- NEES, E. C. G. (1816): Das System der Pilze und Schwämme. Würzburg. Stahelschen Buchhandlung. Németország.
- NEI, M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **106**: 283–292.
- NEI, M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583–590.
- NEI, M., CHESSEY, R. K. (1983): Estimation of fixation indexes and gene diversities. *Annals of Human Genetics*, **47**: 253–259.
- PATERSON, R. R. M., BRIDGE, P. D. (1994): Biochemical techniques for filamentous fungi. CAB International. Wallingford. Anglia.
- PEEVER, T. L., IBANEZ, A., AKIMITSU, K., TIMMER, W. (2002): Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen. *Phytopathology*, **92**: 794–802.
- PEEVER, T. L., SALIMATH, S. S., SU, G., KAISER, W. J., MUEHLBAUER, F. J. (2004): Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) in the Pacific Northwest of the United States. *Molecular Ecology*, **13**: 291–309.



- PEEVER, T. L., CANIHOS, Y., OLSEN, L., IBAÑEZ, A., LIU, Y. C., TIMMER, L. W. (1999): Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of *Minneola tangelo* and rough lemon in Florida. *Phytopathology*, **89**: 851–860.
- PINTÉR CS., KLATSMANYI J., FARKAS I. (1995): Légköri gombaallergének. *Háziorvosi szemle*, **1**: 32–33.
- PITT, J. I. (1973): An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia*, **65**: 1135–1157.
- PITT, J. I. (1979): The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press. London. Anglia.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D. (1997): *Fungi and food spoilage*. 2<sup>nd</sup> edition. Blackie Academic and Professional. London. Anglia.
- PODANI, J. (2001): SYN-TAX 2000. Computer programs for data analysis in ecology and systematics. User's manual. Scientia. Budapest.
- PRYOR, B.M., BIGELOW, D. M. (2003): Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia*, **95**: 1141–1154.
- PRYOR, M. B., GILBERTSON, R. L. (2000): Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research*, **104**: 1312–1321
- PRYOR, B. M., GILBERTSON, R. L. (2001): A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* from carrot seed. *Plant Disease*, **85**: 18–23.
- PRYOR, M. B., MICHALIADES, T. J. (2002): Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology*, **92**: 406–416.
- RÁDULESCU E., NEGRU A. (1971): *Magkártevők és betegségek határozója*. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
- RANDS, R. D. (1917): Early blight of potato and related plants. Wisconsin Agricultural Experimental Station Bulletin, **42**: 1–48.
- RICHARDSON, T., CATO, S., RAMSER, J., KAHL, G., WEISING, K. (1995): Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Research*, **23**: 3798–3799.
- RIECK, A., GRIFFITHS, A. J. F., BERTRAND, H. (1982): Mitochondrial variants of *Neurospora intermedia* from nature. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, **24**: 741–759.
- ROBERTS, R. G., REYMOND, S. T., ANDERSEN, B. (2000): RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research*, **104**: 151–160.
- ROTEM, J. (1994): *The Genus Alternaria: biology, epidemiology and pathogenicity*. American Phytopathological Society Press. St Paul. USA.

- RUPE, J. C., CORRELL, J. C., GUERBER, J. C., BECTON, C. M., GBUR, E. E., CUMMINGS, M. S., YOUNT, P. A. (2001): Differentiation of the sudden death syndrome pathogen of soybean, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, from other isolates of *F. solani* based on cultural morphology, pathogenicity, and mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms. *Canadian Journal of Botany*, **79**: 829–835.
- SACCARDO, P.A. (1882): *Sylloge Fungorum. PataVII: sumptibus auctoris typis seminarii*. Berlin.
- SCHAAL, B., WESLEY, A., LEVERICH, J., ROGSTAD, S. H. (1991): Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. In: FALK, D. A., HOLSINGER, K. E. (szerk.): *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press. New York. USA. 123-134 p.
- SERDANI, M., KANG, J. C., ANDERSEN, B., CROUS, W. P. (2002): Characterisation of *Alternaria* species groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research*, **106**: 561–569.
- SHABANA, Y. M., CHARUDATTAN, R., ELWAKIL, M. A. (1995): Identification, pathogenicity, and safety of *Alternaria eichhorniae* from Egypt as a mycoherbicide agent for waterhyacinth. *Biological Control*, **5**: 123–135.
- SHARMA, T. R., TEWARI, J. P. (1998): RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycological Research*, **102**: 807–814.
- SHINDE, D., LAI, Y. L., SUN, F. Z., ARNHEIM, N. (2003): Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)<sub>(n)</sub> and (A/T)<sub>(n)</sub> microsatellites. *Nucleic Acid Research*, **31**: 974–980.
- SIMAY, E. I. (1994): Phylloplane inhabiting fungi of *Chamacereus silvestrii* (spg.) Br. et R. (*Cactaceae*). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, **29**: 77–80.
- SIMMONS, E. G. (1967): Typification of *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. *Mycologia*, **59**: 67–92.
- SIMMONS, E. G. (1986): *Alternaria* themes and variations (22-26). *Mycotaxon*, **25**: 287–308.
- SIMMONS, E. G. (1992): *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: CHELKOVSKI, J., VISCONTI, A. (szerk.): *Alternaria* biology, plant diseases and metabolites. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. Hollandia. 1-35 p.
- SIMMONS, E. G. (1995): *Alternaria* themes and variations (112-144). *Mycotaxon*, **55**: 55–163.
- SIMMONS, E. G. (1999): *Alternaria* themes and variations (236-243). Host-specific toxin producers. *Mycotaxon*, **70**: 325–369.
- SIMMONS, E. G. (2000): *Alternaria* themes and variations (244-286). Species on *Solanaceae*. *Mycotaxon*, **70**: 1–115.
- SIMMONS, E. G., ROBERTS, R. G. (1993): *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon*, **48**: 108–140.
- SNEATH, P. H. A., SOKAL, R. (1973): *Numerical Taxonomy*. Freeman WH and Company. San Francisco. California. USA.

- SPITZER, E. D., LASKER, B. A., TRAVIS, S. J., KOBAYASHI, G. S., MEDOFF, G. (1989): Use of mitochondrial and ribosomal DNA polymorphisms to classify clinical and soil isolates of *Histoplasma capsulatum*. *Infection and Immunity*, **57**: 1409–1412.
- SPURR, H. V. J. (1977): Protective applications of conidia of non-pathogenic *Alternaria* sp. isolates for control of tobacco brown spot disease. *Phytopathology*, **67**: 128–132.
- STRANDBERG, J. O. (1992): *Alternaria* species that attack vegetable crops: biology and potions for disease management. In: CHELKOWSKI, J., VISCONTI, A. (szerk.): *Alternaria* biology, plant disease and metabolites. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. Hollandia. 175-208 p.
- SVÁB J. (1973): Biometriai módszerek a kutatásban. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
- SZÉCSI Á. (1997): Mikotoxinok. In: ÉRSEK T., GÁBORJÁNYI R. (szerk.): Növénykórokozó mikroorganizmusok. ELTE Eötvös Kiadó. Budapest. 233-251 p.
- SZÉCSI Á., ÉRSEK T., VARGA J. (2003): A gombák filogenetikai rendszere. In: JAKUCS E., VAJNA L. (szerk.): Mikológia. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft. Budapest. 71-137 p.
- SZIGETI, G., NAGY, G., SZÉCSI, Á., NÉMETHNÉ, K. (1994): A mycological survey on feed cereals kept in stock of the crops of 1994. *Magyar Állatorvosok Lapja*, **50**: 511–514.
- SZUNICS L., FISCHL G., SZUNICSNÉ L. (1996): Feketevégeúség, csúcsbarnulás, feketecsfrájúság. MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete közleményei. MartonVásár, **96**: 18–19.
- TAUTZ, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, **17**: 6463–6471.
- TAYLOR, J. W. (1986): Topical review: Fungal evolutionary biology and mitochondrial DNA. *Experimental Mycology*, **10**: 259–269.
- TEWARI, J. P. (1991): Structural and biochemical bases of the blackspot disease of crucifers. *Advances in Structural Biology*, **1**: 325–349.
- TUDZYNSKI, P., ESSER, K. (1986): Extrachromosomal genetics of *Claviceps purpurea*. II. Plasmids in various wild strains and integrated plasmid sequences in mitochondrial genomic DNA. *Current Genetics*, **10**: 463–467.
- TYPAS, M. A., GRIFFEN, A. M., BAINBRIDGE, B. W., HEALE, J. B. (1992): Restriction fragment length polymorphism in mitochondrial DNA and ribosomal RNA gene complexes as an aid to the characterization of species and sub-species populations in the genus *Verticillium*. *FEMS Microbiology Letters*, **95**: 157–162.
- URBÁNSZKY, K., ULECZKI, G., BALOGH, P. (2003): Alternáriás levélfoltosság a görögdiannyén és az uborkán. *Növényvédelem*, **39**: 117–122.
- VAJNA L. (1987): Növénypatogén gombák. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
- VARGA, J. F., KEVEL, CS., FEKETE, A., COENEN, Z., KOZAKIEWICZ, Z., CROFT, J. H. (1993): Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. *Mycological Research*, **97**: 1207–1212.
- VERMA, P. R., SAHARAN, G. S. (1994): Monograph on *Alternaria* Disease of Crucifers. Saskatoon Reaseach Centre Technical Bulletin. Agriculture and Agri-Food Canada. Saskatoon. Kanada.

- VÖRÖS J. (1985): *Deuteromycetes*. In: BÁNHEGYI J., TÓTH S., UBRIZSY G., VÖRÖS J. (szerk.): Magyarország mikroszkópikus gombáinak határozókönyve II. Akadémiai Kiadó. Budapest. 871-1107 p.
- VÖRÖS J., HUSZ B. (1965): *Deuteromycetes*. In: UBRIZSY G. (szerk.): Növénykórtan II. Akadémiai Kiadó. Budapest. 579-812 p.
- WALCZ I. (1989): A napraforgó károsítói. In: FRANK J., SZABÓ L. (szerk.): Magyarország kultúrflórája: A napraforgó. Akadémiai Kiadó. Budapest. 181-206 p.
- WALCZ I. (2003): Adatok a napraforgón előforduló *Alternaria* fajok morfológiájához. 49. Növényvédelmi Tudományos Napok – konferencia. Budapest. 172 p.
- WATTIER, R., ENGEL, C. R., SAUMITOU-LAPRADE, P., VALERO, M. (1998): Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (*Rhodophyta*). *Molecular Ecology*, **7**: 1569–1573.
- WEBER, J. L. (1990): Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>.(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, **7**: 524–530
- WEBER, J. L., MAY P. E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, **44**: 388–396.
- WEIR, T. L., HUFF, D. R., CHRIST, B. J., ROMAINE, C P. (1998): RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia*, **90**: 813–821.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in PCR Protocols. In: INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., WHITE, T. J. (szerk.): A guide to methods and applications. Academic Press Inc. San Diego. USA. 315-322 p.
- WU, K., JONES, R., DANNEBERGER, L., SCOLNIK, P. A. (1994): Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research*, **22**: 3257–3258.
- YEH, F. C., BOYLE, T., YANG, R. C., YE, Z., MAO, J. X. (1999): POPGENE version 1.31. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Kanada.
- ZANE, L., BARGELLONI, L., PARATNELLO, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, **11**: 1–16.
- ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**: 176–183.