

Néhány hazai *Monilinia* faj azonosítása és biológiai vizsgálata

Fazekas Mónika¹ – Szalóki Szilvia² – Madar Anett² – Miklós Ida² – Sipiczki Mátyás² – Holb Imre¹

¹Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Kertészettudományi Intézet, Debrecen

²Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék, Debrecen
moniqe85@freemail.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen tanulmány célkitűzése volt néhány hazai *Monilinia* faj azonosítása és biológiai vizsgálata. A vizsgálatokhoz az ország minden tájáról származó, összesen 174 fertőzött gyümölcsről 146 *M. fructigena* és 28 *M. laxa* fajt sikerült izolálni. A továbbiakban kiválasztott 10 izolátummal a Koch-féle posztulátum alapján almagyümölcsöket fertőztünk vissza a két faj izolátumaival. A fertőzött növényi részekén megjelenő, 1–2 mm nagyságú, okkersárga színű exogén sztrómák és a táptalajon megfigyelt tenyészbélyegek alapján valamennyi izolátum *M. fructigena* fajnak felelt meg. A klasszikus fajazonosítás megerősítése végett az izolátumok molekuláris biológiai módszerrel történő azonosítását is elvégeztük PCR-reakcióval, melyhez a *M. laxa*, a *M. fructigena* és a *M. fructicola* fajok kontroll törzseit használtuk fel. A keletkezett PCR termék mérete alapján, valamennyi izolátum a *M. fructigena* fajra jellemző 415 bp nagyságú sávot adta. Az eredmények igazolják azt a korábbi megfigyelést, hogy hazánkban a *M. fructigena* és a *M. laxa* fajok fordulnak elő országos szinten.

Kulcsszavak: alma, fertőzés, PCR reakció

SUMMARY

The aim of this study was to identify and biologically analyse some *Monilinia* species from Hungary. 146 *M. fructigena* and 28 *M. laxa* species out 174 infectious fruit from all over the country were used for the study. For further study 10 isolates were used and apple fruit was inoculated with them according to Koch postulate. 1–2 mm ochre exogen stromas were observed on infectious plant parts and growing signs on culture of all isolates were identical to *M. fructigena*. To affirm classical identification, isolates with molecular biological method were also prepared using PCR reaction. Control isolates of *M. laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola* were used. The size of PCR product showed that all isolates had a 415 bp band which was typical of *M. fructigena*. Results support the previous observation that *M. fructigena* and *M. laxa* species occur all over Hungary.

Keywords: apple, infection, PCR reaction

BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A *Monilinia* nemzetség az *Ascomycota* törzsbe, a *Discomycetes* osztályba és a *Sclerotiniaceae* családba tartozik. A *Monilinia* nemzetségnek két alcsoportja létezik: *Junctoriae* és *Disjunctoriae*. A *Disjunctoriae* alcsoportban ún. diszjunktörök találhatóak, míg ezek a *Junctoriae* alcsoport tagjainál hiányoznak. A diszjunktöröket nem tartalmazó *Junctoriae* szekcióba tartozó *Monilinia* fajok számos gazdanövény patogénjei, széles földrajzi elterjedésűek, többnyire érett gyümölcsö-

kön kolonizálnak, és viszonylag specializálatlanok (Batra, 1991; Byrde és Willetts, 1977).

A három régóta ismert, – *Junctoriae* alcsoportba tartozó – *Monilinia* faj: a *M. laxa* és *M. fructigena*, európai endemikus fajok, míg a *M. fructicola*, Amerikában őshonos. A legtöbb *Monilinia* faj sötétbarna színű, nedvesrothadást idéző elő a fertőzött gyümölcsökön (I. ábra, Batra, 1991).

1. ábra: *Monilinia fructigena* által előidézett gyümölcsrothadás során a felszínen koncentrikusan megjelenő exogén sztrómák



Figure 1: Concentrical exogen stromas on the surface of the fruit caused by *Monilinia fructigena*

A gomba növekedéséhez szükséges optimális hőmérséklet 22–25 °C és az intenzívebb növekedéshez fényt is igényelnek. A spórák szél, víz, rovarok, madarak segítségével juthatnak egyik növényről a másikra, és a fertőzésre fogékony szöveteken megfelelő környezeti feltételek mellett telepednek meg. A gomba a virágok bibéin és a gyümölcsök sebzésein ill. lenticelláin keresztül jut el a növény szöveibe, ahonnan a fás szöveteket is elérheti. A gyümölcsökön barna rohadás, majd azokon sárgásbarna váncospenésztelepek (exogén sztrómák) jelennek meg. Később a gyümölcs szövevei és a gombafonalak kitaróképletekké (álszkleróciumokká) fejlődnek, eközben a gyümölcsök mumifikálódnak. E mumifikálódott gyümölcsök (valamint az ágak rákos képződményei) telelnek át a következő tavaszig (Batra, 1991; Byrde és Willetts, 1977). A betegség párásabb gyümölcsstermő területeken forduló elő nagyobb gyakorisággal (Agrios, 1997).

A három jelentősebb *Monilinia* faj azonosítása sokáig általános morfológiai és tenyészbélyegek alapján történt (Fulton és Browen, 1997; Ioos és Frey, 2000; Leeuwen et al., 2002). Napjainkban a *Monilinia* fajok genetikai jellemzőit használják fel a fajok elkülönítésére (Holb, 2003). Specifitásuk és megbízhatóságuk miatt a DNS alapú molekuláris biológiai módszerek al-

kalmasak az azonosításra. A molekuláris biológiai vizsgálatok lehetővé teszik a gyors azonosítást (Ioos és Frey, 2000). Ez a technika kiválóan alkalmas a *Monilinia* fajok detektálására és azonosítására kultúrákból és fertőzött gyümölcsökből egyaránt (Fulton et al., 1999; Ioos és Frey, 2000; Cote et al., 2004).

Jelen tanulmány célkitűzése volt az ország különböző területeiről, különböző gazdanövényekről származó fertőzött gyümölcsökről izolált *Monilinia* fajok azonosítása, faji besorolása klasszikus, illetve molekuláris biológiai módszerek segítségével.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokhoz az ország minden tájáról származó, összesen 174 fertőzött gyümölcsöt gyűjtöttünk be. A további vizsgálatokhoz 10 db *M. fructigena* izolátumot használtunk fel (1. táblázat).

A begyűjtött gyümölcsökről spórákat, illetve penésztelepeket izoláltunk, melyeket Petri-csészén PDA táptalajon növesztettünk 22 °C-on, fény jelenlétében. A *Monilinia* fajokat a molekuláris biológiai módszerek mellett a klasszikus módszer alkalmazásával is azono-

sítottuk: a Koch-féle posztulátum alapján almagyümölcsöt fertőztük vissza (hifával benőtt táptalaj darabot helyeztük az almagyümölcsön ejtett sebbe).

A DNS izolálása a GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit segítségével történt. 50 ml PDB-be oltott *Monilinia* spp 2 napig inkubáltuk 22 °C-on rázatva. Az így kapott DNS-t gélelektroforézissel vizsgáltuk tovább. A kisebb méretű DNS molekulák gyorsabban haladnak a gélben, így ugyanannyi idő alatt hosszabb utat tesznek meg, mint a nagyobb méretű DNS molekulák. A fajok beazonosításához PCR (Polymerase Chain Reaction) reakciót alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK

A vizsgálatokhoz az ország minden tájáról származó, összesen 174 fertőzött gyümölcsről 146 *M. fructigena* és 28 *M. laxa* fajt sikerült izolálni. Ez az eredmény alátámasztja azt a korábbi megfigyelést, mely szerint hazánkban csak ez a két faj fordul elő országos szinten. A további elemzést 10 db *M. fructigena* mintával végeztem (1. táblázat).

1. táblázat

Monilinia fructigena izolátumok

Izolátum sorszáma(1)	Izolátum megnevezése(2)	Gazdanövény(3)	Begyűjtött növényi rész(4)	Gyűjtés helye(5)	Gyűjtés éve(6)
20	AH-A-1	<i>Malus domestica</i>	termés(7)	Almásháza	2009
21	KCS-GA-1	<i>Malus domestica</i> 'Golden'	termés	Kerecsend	2009
22	NK-A-1	<i>Malus domestica</i>	termés	Nagykapornak	2009
23	SK-BK-1	<i>Pyrus domestica</i>	termés	Sóskút	2009
24	SZGYV-SZ-1	<i>Prunus domestica</i> – 'Besztercei'	termés	Szentgyörgyvár	2009
25	DK-A	<i>Malus domestica</i>	termés	Detk	2009
26	TK-SZ-1	<i>Prunus domestica</i>	termés	Tárnok	2009
27	NÚ-IA-1	<i>Malus domestica</i> 'Idared'	termés	Nagyút	2009
28	SZGYV-A-1	<i>Malus domestica</i>	termés	Szentgyörgyvár	2009
29	ZCS-A-1	<i>Malus domestica</i>	termés	Zalacsány	2009

Table 1: Isolates of *Monilinia fructigena*

No. of isolates(1), Isolate name(2), Host plant(3), Collected vegetable part(4), Place of collection(5), Year of collection(6), Yield(7)

A Koch-féle posztulátum alapján almagyümölcsöt fertőztünk vissza (2. ábra: a), illetve burgonya-dextróz agaron (2. ábra: b) figyeltük meg a faj morfológiáját. A fertőzött növényi részekeken megjelenő, 1–2 mm nagyságú, okkersárga színű exogén sztrómák és a táptalajon megfigyelt tenyészbélyegek alapján valamennyi izolátum *M. fructigena*-nak felelt meg.

A klasszikus fajazonosítás megerősítése végett elvégeztük az izolátumok molekuláris biológiai módszerrel történő azonosítását is PCR-reakcióval, melyhez a *M. laxa* és *M. fructigena* fajok kontroll törzseit használtuk fel (3. ábra). A keletkezett PCR termék mérete alapján, mely a *M. fructigena* fajra jellemző 415 bp nagyságúnak adódott, az izolátumaimat egyértelműen a fent említett fajhoz sorolhattuk.

2. ábra: a) A visszafertőzött almán megjelenő okkersárga telepek és b) *Monilinia fructigena* telepe burgonya-dextróz agaron

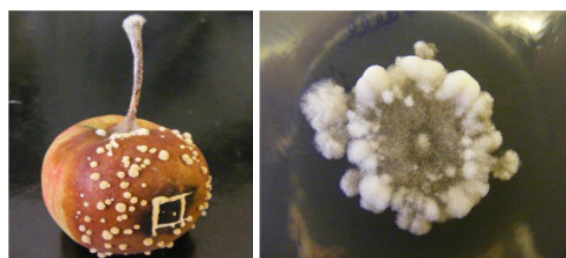
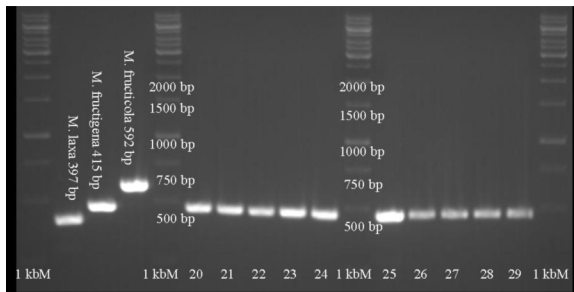


Figure 2: a) Ochre stromas on apple b) *Monilinia fructigena* on PDA

3. ábra: *Monilinia* fajok azonosításaFigure 3: Identification of *Monilinia* species with control isolates

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A tanulmányt az NKTH (OM-00227/2008), az OTKA (K 78399), valamint a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatták.

IRODALOM

- Agrios, G.N. (1997): Plant Pathology. Academic Press. New York. USA. 635.
- Batra, L.R. (1991): World species of *Monilinia* (Fungi): their ecology, biosystematics and control. Mycologia Memoir. No. 16. J. Cramer. Berlin. 246.
- Byrde, R.J.W.–Willettts, H.J. (1977): The Brown Rot Fungi of Fruit: their biology and control. Pergamon Press. Oxford. 171.
- Cote, M.J.–Tardif, M.C.–Meldrum, A.J. (2004): Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. Plant Disease. 99. 11: 1219–1225.
- Fulton, C.E.–Brown, A.E. (1997): Use of SSU rDNA group-1 intron to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. FEMS Microbiology Letters. 157: 307–312.
- Fulton, C.E.–Leeuwen, G.C.M.–Brown, A.E. (1999): Genetic variation among and within *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruits. European Journal of Plant Pathology. 105. 5: 495–500.
- Holb, I.J. (2003): The brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.): I. Important features of their biology. International Journal of Horticultural Science. 9. 3–4: 23–36.
- Ioos, R.–Frey, P. (2000): Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. European Journal of Plant Pathology. 106: 373–378.
- Leeuwen, G.C.M.–Baayen, R.P.–Holb, I.J.–Jeger, M.J. (2002): Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. Mycological Research. 106. 4: 444–451.

