

Az ukrajnai *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr szubpopulációk megjelenése kocsánytalan tölgyön (*Quercus petraea*)

Radócz László – Tarcali Gábor – Irinyi László – Göröcsös Gábor

Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma Mezőgazdaságtudományi Kar Növényvédelmi Intézet Debrecen
gorcsosgabi@hotmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS

A *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr az elmúlt évtizedek során megkérdőjelezhetetlenül a szelídgesztenye (*Castanea sativa*) leg súlyosabb kórokozójává vált. Gyakorlatilag a betegség megállíthatatlanul söpört végig Észak Amerikán, majd egész Európán. Fontos megemlíteni azt is, hogy nemcsak a szelídgesztenye fenyegetett a betegség által, hanem a tölgy fajok (*Quercus* spp.) is. A Kárpát-medencében is őshonos szelídgesztenye Magyarországon a Mecsekben, a Zalai dombságban, a Somogyi dombságban, valamint az Alpokalján található jelentősebb populációban, de fellelhető a Dunakanyar körzetében és az Északi-középhegység egyes részein is. Határainkon kívül természetük a szlovákiai Felvidék több körzetében, Kárpátalja hegyoldalain, Észak-Erdélyben a Kőhát- és Gutin-hegység Nagybánya környéki déli lankáin és völgyeiben, valamint a határ menti horvát, szlovén és osztrák területeken is. 2011. április 23-án az Ukrajnai Bobovyshe, Serednje és Rostovjatica környékéről gyűjtöttünk kéregmintákat. Egy korábbi 2009-es állapotfelméréshez képes a betegséggel fertőzött fáknál a pusztulási arány meghaladta a 90%-ot. Bobovyshe környékén, a pusztuló szelídgesztenye fák mellett kocsánytalan tölgyön is észrevettük a kórokozó kártételét. Ezért a szelídgesztenye fákról nyert kéregminták mellé a tölgyekről is vettünk mintát. A mintákat a Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma Mezőgazdaságtudományi Kar Növényvédelmi Intézet kórtani laborjában morfológiai és molekuláris biológiai vizsgálatoknak vetettük alá annak érdekében, hogy bebizonyosodjon, hogy a mintául szolgáló fákat a szelídgesztenye kéregrák támadta meg. A vizsgálatok során megerősítésre került a fent említett feltételezés. A kapott eredmények újabb bizonyítékot szolgáltatnak, arra hogy a *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr megtámadhatja a kocsánytalan tölgyet is. További vizsgálatok célját képezi, hogy kiderüljön a megtalált törzs a VCG (Vegatative Compatibility Group) teszt során mely kompatibilitási csoportba tartozik.

SUMMARY

Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr, the casual agent of chestnut blight disease, which is one of the most important fungal pathogens of chestnut (*Castanea sativa*). The disease seriously affected the chestnut in Northern-America and in Europe as well. It is important to mention that the pathogen does not only infect the chestnut but oak species (*Quercus* spp.) also. In the Carpathian-Basin, the chestnut is endemic in the Mecsek mountains, in Zala, in Somogy counties but it also can be found in the Danube-Bend. In the Carpathian-Basin (outside Hungary) the chestnut is found in Slovakia, Ukraine, Romania. In our study bark samples infected by *Cryphonectria parasitica* were collected from Bobovyshe, Serednje and Rostovjatica (Ukraine). The rate of infected chestnut tree were higher than 90% around Bobovyshe and beside chestnut, the symptoms were detected on oak trees as well. We collected bark samples from chestnut and oak as well and then we isolated the pathogen *Cryphonectria parasitica* in the lab of University of Debrecen. Symptomatological observations, laboratory examinations on fungus morphology, as well as comparisons of ITS sequency homology were made and approved that the causal agent of new disease was *Cryphonectria parasitica*. Our results proved that the *Cryphonectria parasitica* infects oak trees beside chestnut in the Carpathian-Basin. Further studies are needed to determine the VCG (Vegatative Compatibility Group) group of the *Cryphonectria parasitica* found on oak trees.

Kulcsszavak: *Cryphonectria parasitica*, szelídgesztenye, kocsánytalan tölgy, VCG (Vegatative Compatibility Group) teszt

Keywords: *Cryphonectria parasitica*, chestnut, oak, VCG (Vegatative Compatibility Group) test

BEVEZETÉS

Magyarország területének egyötödét 1, 9 millió hektárt borított erdő 2008-ban, 130 ezerrel többet, mint az ezredfordulón. 2000 óta az erdőtelepítések és fásítások nyomán évente mintegy 14 ezer hektárral nőtt az erdőterület nagysága, ebből 2 ezer hektár a pótlás, és átlagban 26 ezer hektáron végeztek erdőfelújítást. A magyar erdők egészségi állapotára leginkább az időjárási viszonyok (aszály, fagy, jég, szél) és egyes biotikus károsítók (gomba, rovarkárokozók) vannak befolyással, de nem elhanyagolható a vadállomány által okozott károk nagysága sem (Internet 1).

A héjasok összefoglaló néven emlegetett gazdasági növényeink (dió, gesztenye, mandula és a mogyoró) ökológiai igényeik, botanikai jellemzőik és termesztési sajátosságaik tekintetében is lényegesen különböznek egymástól (Radócz, 2002).

Soó (1962) szerint az európai szelídgesztenye (*Castanea sativa*), kontinensünk jelentős fafajai közé tartozik. A Kárpát-medencében is őshonos fafaj Magyarországon a Mecsekben, Zalai dombságban, Somogyi dombságban, valamint az Alpokalján található jelentősebb populációban, de fellelhető a Dunakanyar körzetében és az Északi-középhegység egyes részein is. Határainkon kívül természetük a szlovákiai Felvidék több körzetében, Kárpátalja hegyoldalain, Észak-Erdélyben a Kőhát- és Gutin-hegység nagybánya környéki déli lankáin és völgyeiben, valamint határ menti horvát, szlovén és osztrák területeken is.

A szelídgesztenye termesztésének egyik legveszedelmesebb ellensége a szelídgesztenye kéregrákosodását előidéző *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr (syn: *Endothia parasitica* (Murr.) Anderson) gombafaj. E kórokozó, valamint a szelídgesztenye másik fontos betegségét előidéző két jelentős gombafaj a *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman és a *Phytophthora cinnamomi* (Rands.) az elmúlt száz év folyamán világszerte óriási pusztításokat végzett a szelídgesztenye állományokban (Radócz, 1995).

Különösen nagy károkat okozott a kéregrákosodást előidéző gomba Észak-Amerikában, valamint Európában (Anagnostakis, 1987).

A kórokozó először a XX. század elején vált ismertté az Egyesült Államok keleti részén, majd szinte az egész országban elterjedt. 40 év alatt a teljes amerikai szelídgesztenye (*Castanea dentata*) állományt megfertőzte, és majdnem teljesen el is pusztította, közel 4 millió ha-on (Barr, 1978).

Radócz (2010) szerint a kéregrákosodás jelenleg is intenzíven terjed, s ma már az európai szelídgesztenyénel is a legjelentősebb kórokozónak számít a kelet-európai régióban (1. ábra).

1. ábra: A *Cryphonectria parasitica*(Murr.) Barr kártétele Bobovyshe (Ukrajna) mellett



Figure 1: The damage of the *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr near Bobovyshe (in Ukraine)
Cryphonectria parasitica (1), damage (2), Ukraine (3),

A gomba megfertőzheti a Bükkfélék családjába tartozó más fafajokat is, többek között a tölgyeket és a bükköt is. Ezt igazolja, hogy 1998-ban a betegséget Zengővárkony térségében megtalálták kocsánytalan tölgyfákon is. A tölgyfajok fogékonysága a kórokozóval szemben az eddigi ismereteinek alapján mérsékeltebbnek mondható az európai szelídgesztenyéhez képest. Fertőzést jelenleg elsősorban fiatal tölgyfákon, és általában fertőzött szelídgesztenyések közvetlen környezetében jelentkezik, de a gomba kártétele a jövőben akár tömegessé és súlyosabbá válhat (Ékes, 2007).

Kristó (1995) is említést tesz arról, hogy a gomba képes a *Fagaceae* családba tartozó más fajok megbetegítésére is. A család legnépesebb nemzetsége a *Quercus* azaz a tölgy nemzetség. Az ide tartozó fajok száma meghaladja a 450-et. Jelentős részük szubtrópusi vagy hegyvidékeken él. Erdőgazdaságilag nagyon jelentős Európában, a kontinens erdeinek közel 38% -át teszi ki.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mintahelyek meghatározása

A kutatáshoz szükséges mintákat Ukrajnából gyűjtöttük be 2011. április 23.-án. A minták helyének GPS koordinátáit rögzítettük így pontosan megrajzolható a minták elhelyezkedése. A mintavételezés helyét a 2. ábra szemlélteti.

Minták begyűjtése

A szabadföldi mintavétel során történik meg a laboratóriumi vizsgálatokhoz szükséges növényi anyagok begyűjtése. A minták többségét a kéregrészekből vesszük. A beteg fák kéregrészeinek szöveteiből mintavevő késsel 1 cm³ nagyságú darabokat metszünk ki. A kimetszett darabokat papírzacskóba helyezük melyre, ráírjuk a minta nevét és a mintavétel pontos idejét. Mintavételnél törekedni kell arra, hogy a még élő, illetve a már elhalt kéregrészek határáról származzon. Egy fáról 4-5 mintát vesszünk és azokat egy mintaként egy papírtasakba, helyezük el. Minden új mintavétel esetén a mintavevő kést 95%-os alkohollal fertőtlenítiük. Az összegyűjtött kéregmintákat a laboratóriumi vizsgálatokig hűtőtáskában tartjuk.

2. ábra: A mintagyűjtés pontos helye



Forrás: Google Earth

Figure 2: The places of the samples collection

Source: Google Earth

Gomba-izolálás a mintákról

A beérkezett kéregmintákat 2 percig alkoholos oldatban tisztítottuk majd 1 percig steril desztillált vízben áztattuk. Ezt követően burgonya-dextróz agar táptalajt tartalmazó Petri csészékbe helyeztük a mintákat. A Petri csészéket, ezt megelőzően felcímkéztük, és feltüntettük rajta a minta nevét, a leoltás pontos dátumát, és a leoltást végző nevét. A minták ezt követően termosztátba kerültek ahol 3 nap múlva már a következő izolálást lehetővé tévő méretűre nőtt a vizsgált gombafaj. A második leoltásra azért van szükség, mert bár az alkohollal történő fertőtlenítés a nemkívánatos szervezetek számát nagymértékben csökkenti még mindig számottevő kórokozó van a táptalajon, és ezek mind hátráltatják a DNS izolálást. A második oltás során is a Petri csészékre kerülnek a minták nevei illetve a leoltás dátuma és a leoltást végző neve.

Morfológiai vizsgálat

A tiszta tenyészeteket burgonya-dextróz agar táptalajt tartalmazó Petri csészékbe helyeztük és 10 napig a termosztátban tartottuk az edényeket. Ezt követően sor kerülhetett a tenyészetek mikroszkopikus vizsgálatára.

DNS-izolálás

Az izolátumokat 50 ml malátakivonat-táptalajban tenyésztettük 48 órán keresztül, 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban, sötétben, rázatva (125 rpm). A sejteket dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben fagyasztva tártuk fel, majd genomi DNS-t izoláltunk. A DNS-izolálását a NucleoSpin II (Macherey-Nagel, 740770) alkalmazásával végeztük a gyári protokollt követve.

Polimeráz-lánreakción (PCR) alapuló vizsgálat

A ITS fragment felszaporításához az SR6R és LR1 primer párt (White *et al.*, 1990) használtuk. A reakció körülményeit az alábbiak szerint állítottuk be: első lépésként kezdeti denaturálás történt 95 °C-on 3 percen át, amit 5 cikluson keresztül követett denaturálás 95 °C-on 1 percig, majd az annelláció 50 °C-on 1 percig, és végül a polimerizáció 72 °C-on 1 percen át, ezután 25 cikluson keresztül denaturálás 95 °C-on 1 percig, majd az annelláció 50 °C-on 1 percig, és végül a polimerizáció 72 °C-on 1 percen keresztül, legvégül egy 15 percen keresztül 72 °C-on zajló végső polimerizáció következett.

A PCR-termék tisztítása és koncentrálása

A PCR termékek tisztítását a Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9281) termékkel végeztük.

DNS-szekvenálás

A felszaporított és tisztított PCR-termékek szekvenálását az MWG Biotech, Germany cég végezte térítéses megbízással. Az általuk alkalmazott szekvenálás a Sanger-féle módszeren alapszik (Sanger *et al.*, 1977), és az ABI cég által fejlesztett gépekkel végzik. A szekvenálás megbízhatóságát az ISO nemzetközi minőségbiztosítási szabvány (DIN EN ISO 9001:2000) garantálja.

EREDMÉNYEK

A tölgyfákról történő mintavétel során már szembetűnő jelek mutatkoztak arra, hogy a *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr gomba lehet felelős a látott károsításokért. Ezt fénykép segítségével sikerült rögzíteni (3. ábra).

3. ábra: A betegség tünetei a tölgy kérgén



Figure 3: The symptoms of the disease on the oak bark

Ezt követően a két begyűjtött tölgyfa kéreg mintából sikerült izolálni a gombát ennek eredményét az alábbi képen lehet látni (4. ábra).

4. ábra: A mintákból izolált *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr telepei PDA táptalajon

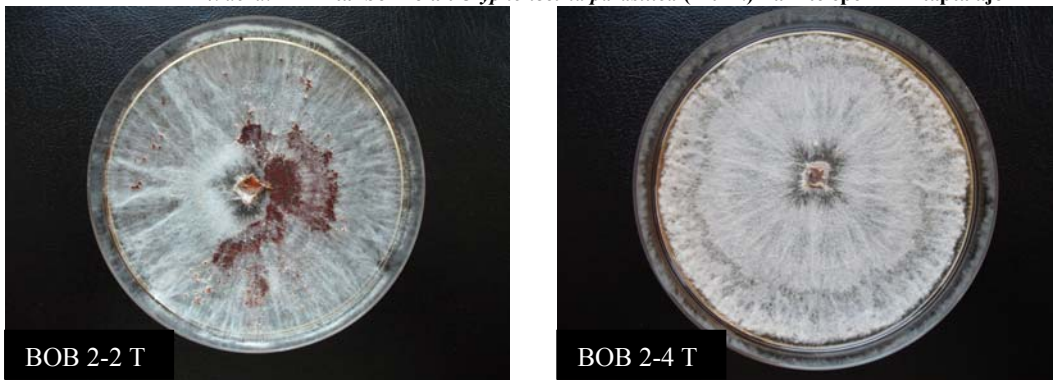
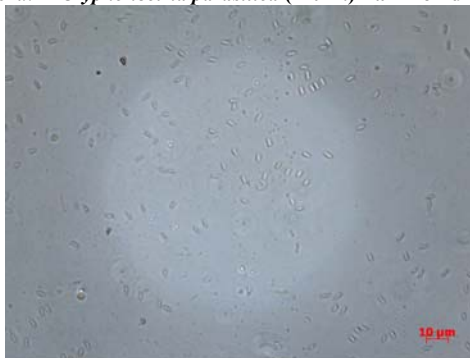


Figure 4: *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr isolates on PDA medium

A következő bizonyítékot, arra hogy a kérdéses kórokozó a *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr a mikroszkópos vizsgálat szolgáltatta (5. ábra).

A nukleotid BLAST eredmény alapján a minta ITS szekvencia a *Cryphonectria parasitica* fajnak az ITS szekvenciájával mutatott homológiát, (6. ábra) melynek mértéke 100%. A molekuláris biológiai vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a minták *Cryphonectria parasitica* gomba által fertőzöttek.

5. ábra: A *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr konidiumai

 Figure 5: Conidia of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr

6. ábra: Az ITS szekvencia alapján végzett nukleotid BLAST összehasonlítás adatbázis táblázata

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY309482.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	1055	1055	100%	0.0	99%	
EF545115.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> strain A475 internal transcribed spacer 1, 5	1037	1037	100%	0.0	99%	
AY141855.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> strain ATCC 38753 internal transcribed spac	1033	1033	97%	0.0	100%	
AY141859.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> strain CB7 internal transcribed spacer 1, 5.8	1027	1027	97%	0.0	99%	
AY141858.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> strain ES10 internal transcribed spacer 1, 5	1027	1027	97%	0.0	99%	
AY141856.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> strain ATCC 38755 internal transcribed spac	1027	1027	97%	0.0	99%	
AY141857.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> strain JA75 internal transcribed spacer 1, 5.	1020	1020	97%	0.0	99%	
AY141873.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> strain DY23 internal transcribed spacer 1, 5	1014	1014	95%	0.0	100%	
AY141861.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> strain 09269 internal transcribed spacer 1, 1	1005	1005	97%	0.0	99%	
GU993820.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> strain 1155-2 18S ribosomal RNA gene, part	998	998	94%	0.0	99%	
AY141862.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> strain 09546 internal transcribed spacer 1, 1	996	996	96%	0.0	98%	
AY141863.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> strain 09154 internal transcribed spacer 1, 1	994	994	95%	0.0	99%	
AY141860.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> strain 09509 internal transcribed spacer 1, 1	989	989	97%	0.0	98%	
DQ368749.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate CMW 14547 internal transcribed spa	972	972	91%	0.0	100%	
AY697931.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate CMW 8436 internal transcribed spac	972	972	91%	0.0	100%	
AY697930.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate CMW 10916 internal transcribed spac	972	972	91%	0.0	100%	
AY697929.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate CMW 13751 internal transcribed spa	972	972	91%	0.0	100%	
AY697928.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate CMW 13750 internal transcribed spa	972	972	91%	0.0	100%	
AY697927.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate CMW 13749 internal transcribed spac	972	972	91%	0.0	100%	
AF452123.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate CRY1509 internal transcribed spacer	972	972	91%	0.0	100%	
AF452122.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate CRY1512 internal transcribed spacer	972	972	91%	0.0	100%	
AF452121.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate CRY1558 internal transcribed spacer	972	972	91%	0.0	100%	
AF292043.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate CRY-1511 internal transcribed space	972	972	91%	0.0	100%	
AF292042.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate CRY-1507 internal transcribed space	972	972	91%	0.0	100%	
AF368330.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> CRY1511/E9 internal transcribed spacer 1, ¶	972	972	91%	0.0	100%	
AF368329.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> CRY1507/E5 internal transcribed spacer 1, ¶	972	972	91%	0.0	100%	
EU442645.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate C0721 internal transcribed spacer 1,	970	970	91%	0.0	100%	
EU442646.1	<i>Cryphonectria parasitica</i> isolate C0720 internal transcribed spacer 1,	970	970	91%	0.0	100%	

 Forrás: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Figure 6: Nucleotide BLAST result based on ITS sequences

 Source: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

KÖVETKEZTETÉSEK

2011. április 23-án az Ukrajnai Bobovshche, Serednje és Rostovjatica környékéről gyűjtöttünk kéregmintákat. Egy korábbi 2009-es állapotfelméréshez képes a betegséggel fertőzött fáknál a pusztulási arány meghaladta a 90%-ot. Bobovshche környékén, a pusztuló szelídgesztenye fák mellett kocsánytalan tölgyön is észrevettük a kórokozó kártételét. Ezért a szelídgesztenye fákról nyert kéregminták mellé a tölgyekről is vettünk mintát. A minták morfológiai és molekuláris biológiai vizsgálata után egyértelműen megállapítható hogy *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr egyik törzsét találtuk meg kocsánytalan tölgyön. Mivel a vizsgálati területen lévő szelídgesztenyék 100%-a fertőzött volt a betegséggel, ezért valószínűsíthető hogy a beteg gesztenyefák fertőzték meg a tölgyeket. A korábbi irodalmak is említést tesznek róla, hogy a tölgy esetében a betegség lefolyása eltér a gesztenyén tapasztalhatóaktól. A megtámadott tölgyek fiatal fák voltak, és nem volt képes a gomba olyan látványos pusztítást véghezvinni, mint azt már a gesztenyék esetében megszokhattuk. Megfigyelhető volt továbbá az is, hogy sok helyen gyógyulás nyomai látszóttak a fiatal ágakon. Az irodalmakat áttanulmányozva megállapítható hogy először sikerült Ukrajna területén kocsánytalan tölgyön izolálni és meghatározni a szelídgesztenye kéregrák kórokozóját a *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr-t.

IRODALOM

- Anagnostakis, S. I. (1987): Chestnut blight: The classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia*, 79 : 23-37.
- Barr, M. E. (1978): The *Diaporthales* in North-America. *Mycologia Memoir*. 7. ed: J. Cramer, Lehne, Germany. 232 pp.
- Ékes M. (2003): A *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr tölgyön előforduló, hazai populációjának vizsgálata. Diplomamunka. Debrecen. 36 pp.
- Kristó L. (1995): Erdőműveléstan I. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó. Budapest. 175 pp.
- Radócz L. (1995): Adatok a szelídgesztenye kéregrákosodást előidéző *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr gombakórokozó magyarországi populációjáról. V. Növényvédelmi fórum Összefoglaló. PATE, Keszthely. 36.
- Radócz L. (2002): A héjasok növényvédelme. Szaktudás Kiadó Ház. Budapest. 256 pp.
- Radócz L. (2010): A nagymarosi szelídgesztenyések története, ápolása, védelme. Nagymaros. 151 pp.
- Sanger F.-Micklen S.-Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing and chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74: 5463-5467.
- Soó R. (1962): Növényföldrajz. Tankönyvkiadó. Budapest. 157 pp.
- Tarcali G. (2007): A *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr Kárpát-medencei szubpopulációinak vizsgálata. Doktori értekezés. Debrecen. 150 pp.
- White, T. J.-Bruns, T.-Lee, S.-Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In: PCR protocols. A guide to methods and applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.) Academic Press, Inc., New York.

INTERNETES FORRÁSOK:

Internet 1: http://www.agrarkamara.hu/LinkClick.aspx?fileticket=KkG11_G-y2l%3D&tabid=78