

## A szelídgesztenye kéregrákosodását okozó *Cryphonectria parasitica* (Murr. Barr) gomba izolátumainak laboratóriumi diagnosztikája

Radócz László<sup>1</sup> – Irinyi László<sup>1</sup> – Egyed Károly<sup>2</sup>

<sup>1</sup>DE AGTC MÉK Növényvédelmi Tanszék Debrecen

<sup>2</sup>Sarkpont Zrt., Kaposvár

radocz@agr.unideb.hu

### ÖSSZEFOGLALÁS

A *Cryphonectria parasitica* a szelídgesztenye (*Castanea spp.*) egyik legfontosabb kórokozója Európában és Magyarországon. Vizsgálatunk során, öt Magyarországról izolált *Cryphonectria parasitica* törzs ITS régióját vizsgáltuk. Az egyes izolátumok közötti távolságok az ITS szekvenciák alapján nem bizonyultak kellően eltérőnek ahhoz, hogy az eredmények alapján a filogenetikai törzsfát jól megalapozottnak tekinthessük. A különbség tehát izolátumok között nem volt jelentős, ez megkérdőjelezi, vajon a választott ITS-régió elégséges-e az egyes izolátumok (földrajzilag különböző) megalapozott szétválasztásához?

### SUMMARY

*Cryphonectria parasitica*, the casual agent of chestnut blight, is one of the most important fungal pathogens of chestnut (*Castanea spp.*) in Europe and Hungary. In this study, we analyzed the ITS region of five *Cryphonectria parasitica* strains isolated from different location of Hungary. The differences among the *Cryphonectria parasitica* isolates were not insignificant because only two sites were considered as informative for the parsimony analysis. As the differences among geographically different isolates were insignificant, we mean that the evolutionary distance by ITS sequences within Hungarian *Cryphonectria parasitica* isolates is too small to get well based consequences for the phylogenetic relationships.

**Kulcsszavak:** *Cryphonectria parasitica*, szelídgesztenye

**Keywords:** *Cryphonectria parasitica*, chestnut

### BEVEZETÉS

A Bükkfélék (*Fagaceae*) családjába tartozó európai szelídgesztenye (*Castanea sativa*) nagyon kedvelt dísz- és héjas gyümölcsfánk, mely elsősorban a savanyú, jó vízellátottságú, káliumban gazdag talajt kedveli. Hazánkban Dél-Dunántúlon a Mecsekben, az Északi-középhegységben, Alpokalján, a Dunakanyarban és a Zalai dombság területén fordul elő. Magas kálium és keményítő tartalmú termését lekvár, méz, tea készítéséhez is használják, ezenkívül egyes területeken (pl. Olaszország, Svájc hegyvidéki területei) kenyeret is sütnék lisztjéből.

A *Cryphonectria parasitica*, mely a szelídgesztenye egyik legfontosabb kórokozója, a gesztenyén kívül a Bükkfélék családjába tartozó egyéb fajokat is veszélyeztet, így a tölgyeket és a bükköt is. A gomba Kelet Ázsiából, valószínűleg Japánból lett behurcolva a XIX. sz. végén és a XX. század elején az Egyesült Államokon keresztül Európába. Az 1960-as években csökkent virulenciájú (hipovirulens) izolátumokat fedeztek fel, melyek képesek voltak visszazorítani a kórokozót.

### A kórokozó elterjedtsége

A *Cryphonectria parasitica* gombát először a Bronx-i Állatkert idős gesztenyefáin észlelték 1904-ben, mely 1938-ban már Európában is megjelent. A *Cryphonectria parasitica* valószínűleg sokkal korábban elérhette Európát, de akkoriban a tintabetegség (*Phytophthora sp.*) jelentős károkat okozott, így elfedte jelenlétét. Az 1920-as években a tintabetegséggel szemben rezisztens facsemetéket és oltványokat szállítottak be Európába. A gomba ezekkel a növényekkel kerülhetett be Európába. A *Cryphonectria parasitica* az ázsiai fajokat kevésbé képes megbetegíteni, így maradhatott észrevétlen. Észak-Amerikában a század közepére szinte a teljes szelídgesztenye állományt kiirtotta. Az olaszországi 1938-as észlelését követően 1947-ban Franciaországban, 1949-ben Svájcban, 1976-ban Szlovákiában, 1984-ben Romániában jelent meg. Ukrajna kárpátaljai területein is feljegyezték. Hazánkban 1969-ben, Nemeshegy község (Zala megye) határában találták meg először.

### A hipovirulencia

Az 1950-es években Biraghi gyógyuló rákos sebeket figyelt meg, a kéreg alatti szövetek életképesek maradtak és a hajtások sem száradtak el. 1964-ben pigmenthiányos (fehér színű telepet képző), mérsékelt virulenciájú, abnormalis morfológiájú ún. hipovirulens gombatörzseket izoláltak, melyek át tudták adni a „vad” törzseknek a hipovirulenciát, melynek okozója egy víruszerű részecske, VLP (Virus-like-Particle). Ezen törzsek citoplazmájában dsRNA-t találtak. A dsRNA ebben az esetben az RNS-függő RNS-polimerázon kívül egy proteáz is kódol, amelynek valószínűleg kulcsszerepe van a gazdaszervezet legyengítésében. Ha a

gombaizolátumok a dsRNA-t elvesztik, akkor újra virulenssé alakulnak át. Ha mesterségesen blokkolják cikloheximiddel a dsRNA-k működését, akkor virulencia növekedés tapasztalható. Ezzel bizonyítható az összefüggés a citoplazmatikusan jelen lévő dsRNA és a hipovirulencia között. A hipovirulens törzsek képesek a nekrozisok gyógyítására, ha hifa-anasztomózisok révén átadják a dsRNA-t. A konídiumok több mint 90%-os valószínűséggel hordozzák a dsRNA-t, míg az askospóráknak nincs szerepe ebben. A hipovirulens törzsek terjedése sokkal lassabb, mint a virulens törzsek esetén, mely az ivaros szaporodás hiányára és a gyenge konídium képzésre vezethető vissza.

### Vegetatív- és szexuális kompatibilitás

Amennyiben az anasztomózis létrejön a két egyed között, a citoplazmák kölcsönös cseréjére lesz lehetőség. Azok a törzsek, melyeknek hifái anasztomózisra képesek, azonos vegetatív kompatibilitási csoportba (VCG-be) tartoznak. A dsRNA átadása csak vegetatív kompatibilis csoportok között valósulhat meg. Nagyon ritkán előfordulhat, hogy különböző VC típusok között jön létre vírus transzmisszió (Liu és Milgroom, 1996). Ha vegetatív inkompatibilis egyedek találkoznak, akkor kétféle reakció zajlik le. Az egyik esetben ún. szegély képződik (barrage), míg a másik esetben a sejtfúziót gyors apoptózis követi. A szegély képződéséért a két egymással szemben növekvő micéliumfront között kialakuló proteolízis a felelős, amelynek következtében az érintkező hifák lizálódnak, a pigmentanyagok áramlanak ki belőlük. A másik esetben a fúzió végbemegy, de mégis történik valamilyen idegen-felismerési reakció, ami gyors sejthalálhoz vezet. A csökkent virulenciájú törzsek kisebb mértékű elváltozást hoznak létre a szelídgesztenye fákon és ezek hegyszövet képzéssel le tudják gyógyítani a kórt. Terjedésük is lassúbb, a fa körül sugárban 6-9 m/év. A *Cryphonectria parasitica*-ban azonosították a vegetatív inkompatibilitásért felelős géneket. Minél nagyobb a genetikai eltérés két törzs között, annál kevesebb esély van az életképes anasztomózisra. A vegetatív kompatibilitást szabályozó gének rekombinálódásával új VCG-k megjelenése várható. A vegetatív inkompatibilitás egy saját-nem saját felismerő rendszer a filamentózus gombákban, ami irányítja a heterokaryon képződését és a citoplazmatikus elemek transzmisszióját a törzsek között. A legtöbb filamentózus gombában az inkompatibilitást allélikus folyamatok irányítják. Két egyed akkor lesz kompatibilis, ha valamennyi vic génjében ugyanazt az allélt hordozza. Európában a *Cryphonectria parasitica*-ban a vegetatív inkompatibilitást 6 nem kapcsolt vic lókuszt irányítja, mindegyik 2-2 alléllal. A gomba szexuális szaporodása keresztezéssel vagy önmegtermékenyítéssel valósulhat meg. Különböző VC típusok közötti keresztezés új VC-típusok megjelenését hozza létre rekombináció révén. Mint minden heterotallikus *Ascomycota* gombában, a *Cryphonectria parasitica*-ban is a szexuális szaporodást a MAT lókuszt szabályozza, mely két allélt tartalmaz, a MAT-1-et és MAT-2-t. Keresztezés csak akkor valósul meg, ha két ellentétes szaporodási (párosodási) típusú gomba törzs egy időben, egy helyen van. A két allél hosszúsága és szekvenciája is eltérő. A MAT-1 1.649 bp, míg a MAT-2 549 bp. Európában több helyen, úgymint Svájcban, Spanyolországban, valamint Macedónia és Görögország területén a *Cryphonectria parasitica* populációkban a MAT-1 szaporodási típus a domináns a MAT-2-vel szemben.

### Kettősszalú RNS (dsRNA) vírus

A hipovirulenciáért felelős dsRNA a *Hypoviridae* családba, azon belül pedig a *Hypovirus* genusba tartozik. Ezek köpenyfehérjét nem képező mikovírusok, melyek lineáris dupla szalú RNS-t tartalmaznak. A genom nem szegmentált. A teljes genom 10.000-13.000 nukleotid hosszúságú. A virális genom nem strukturális fehérjét kódol.

1. ábra: A CHV1 hipovírus



Figure 1. The CHV1 hypovirus

Európában a CHV1-es típus (*Cryphonectria hypovirus* 1), Észak-Amerikában a CHV2, CHV3, CHV4-es típusok fordulnak elő. Ezek felelősek a gazda virulenciájának a csökkentéséért. A vírus soha nem hagyja el a gombát. Európában öt CHV-1 szubtypust írt le Allemann munkatársaival 1999-ben. Olasz szubtypus –CHV1-I, német szubtypus – CHV-1-D, spanyol szubtypus – CHV-1-E, és két francia szubtypus – CHV-1-F1 és a CHV1-F2. Az 1993-ban megkezdett szabadföldi felmérések során begyűjtött hazai hipovirulens törzsek mindegyikében kimutattuk a közel  $6,2 \times 10^6$  molekulatömegű L-ds RNS-t (long ds-RNA), amely az ORF-A és az ORF-B kódoló régiót (open reading frames) is tartalmazza. (Radócz, 1997).

### Hazai vizsgálatok

1992-ben és 1993-ban hipovirulens törzsekkel végzett hazai szabadföldi kezeléseket követően a kezelt fák 50%-a mutatott kezdeti gyógyulási tüneteket, 13,2 %-a elpusztult, míg a kezeletlen fák 56,4%-a pusztult el.

Ekkor a VCG-k száma kettő. A hazai vizsgált fák 60-70%-a fertőződött. Az 1993-as felmérések alapján a legrosszabb állapotban a Zengővárkonyi Ősgesztenyés és a fertőszentmiklósi állomány volt, ahol a fertőzöttség elérte a 90 %-ot, és a megbetegedett fák közel 100%-a elpusztul. Ágfalván és Cák környékén volt a legkisebb a fertőzöttség (39% és 45%). Ekkor két állomány volt mentes a kórokozótól. Egyik a hosszúhetényi állomány, a másik a pilismaróti gesztenyés. Eddigi vizsgálatok során a hazai VCG-k száma 18 (Radócz, 1997).

1998-ban Zengővárkony környékén kocsánytalan tölgyeken is észlelték a betegséget (Radócz, 2002). A kocsánytalan tölgy (*Quercus petraea*) nagyon jelentős fafaj Magyarországon, az erdősitett területek közel 12%-át borítja. A betegség elsősorban a gesztenyével elegyes kocsánytalan tölgy állományokban fordul elő tömegesen Nyugat- és Dél-Dunántúlon. 1998-ig csak szelídgesztenyén (*Castanea sativa*-n) észlelték a *Cryphonectria parasitica* tüneteit. Vizsgálatokat hajtottak végre Dél-Dunántúlon, Szlovákiában, Romániában és Ukrajnában. Magyarországon három területen is találtak fertőzött tölgyeket. Romániában, Nagybányán és Szlovákiában, Duchonka környékén is felfedezték a tölgyön a tüneteket. Ukrajnában a gombát 2000-ben írták le, eddig nem találták meg a kórokozót tölgyeken. Négy patogén törzset azonosítottak kéregmintákból hazai fertőzött tölgyekben, ezek az EU-3, EU-16, EU-9, EU-11. Szlovákiában csak egy patogén törzset írtak le (EU-2), ahogy Romániában is csak egyet (EU-12). A tünetek nem voltak olyan súlyosak, mint a szelídgesztenyén. Nemcsak Európában írták le a tipikus rákos tüneteket számos tölgyön, hanem az USA-ban, Svájcban és Dél-Olaszországban is. Észak- Nyugat Romániában 2004–2006 között Nagybánya mellett öt különböző gesztenye populációban végeztek vizsgálatokat, melyek tölgygel elegyesek voltak. Számos tölgy volt fertőzött. Nyugat-Ukrajnában Ungvár és Munkács mellett végeztek terepi vizsgálatokat hét gesztenye–tölgy elegyes populációban. Ebben az ukrajnai régióban gesztenyén megtaláltuk a kórokozót, míg tölgyön nem. (Radócz és Tarcali, 2009).

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### Kéregrákot okozó gomba DNS vizsgálatok

Vizsgálatunk során 5 Nagymarosról izolált *Cryphonectria parasitica* törzs (1. táblázat) ITS régióját vizsgáltuk. A sejtmagban és a mitokondriumban található riboszomális rDNS szekvenciákat kódoló gének (rDNS) közül az ITS régió a leggyakrabban szekvenált, filogenetikai vizsgálatokhoz már hosszú ideje a legszélesebb körben használt konzervatív régió (Moncalvo *et al.*, 2002; Avise, 2004).

Számos taxonómiai tanulmány bizonyítja, hogy az ITS-régiók alkalmasak filogenetikai rokonsági viszonyok megállapítására faji és nemzetség szinten egyaránt (Gardes és Bruns, 1993; Graser *et al.*, 1999; Shinohara *et al.*, 1999; Gottlieb és Lichtwardt, 2001; Nugent és Saville, 2004; Yli-Mattila *et al.*, 2004; Voglmayr és Yule, 2006). Vizsgálatunkhoz az rDNS-régió egy olyan szakaszát választottuk, amely tartalmazza a ITS 1 és 2, valamint az 5,8S rDNS-szekvenciát (2. ábra).

2. ábra: Az ITS-régiók elhelyezkedésének sematikus vázlata, valamint a PCR-ben használt primerek helyzete (White *et al.* nyomán, 1990)

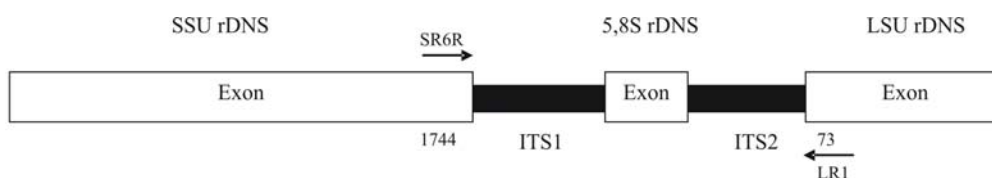


Figure 3: Schematic structure of ITS region and location of primers for phylogenetic analyses

A filogenetikai vizsgálatok során a magyarországi izolátumok mellett génbanki adatbázisban megtalálható (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) *Cryphonectria parasitica* izolátumok ITS régióját is bevontuk az elemzésbe (1. táblázat).

Az ITS-fragmentumok alapján készült filogenetikai törzsfák készítésébe bevont fajok és izolátumok listája, valamint ITS-szekvenciájuk hozzáférési száma

Fajnév (1)	Izolátum kód (2)	GenBank hozzáférési számok (3)
<i>C. parasitica</i>	CRY1507/E5	AF368329
<i>C. parasitica</i>	ATCC 38753	AY141855
<i>C. parasitica</i>	CMW 14547	DQ368749
<i>C. parasitica</i>	CMW 13750	AY697928
<i>C. parasitica</i>	CRY1509	AF452123
<i>C. parasitica</i>	CEP155	EU442647
<i>C. parasitica</i>	C0720	EU442646
<i>C. parasitica</i>	CMW 14548	DQ368750
<i>C. parasitica</i>	CMW 10916	AY697930
<i>C. parasitica</i>	JA75	AY141857
<i>C. parasitica</i>	ES10	AY141858
<i>C. parasitica</i>	ATCC 38755	AY141856
<i>C. parasitica</i>	09154	AY141863
<i>C. parasitica</i>	A475	EF545115
<i>C. parasitica</i>	DY23	AY141873
<i>C. parasitica</i>	CB7	AY141859
<i>C. parasitica</i>	CRY 1507	AF292042

Table 1: Species involved in the phylogenetic analyses and the accession number of their ITS fragments  
Species name (1), isolation code (2), GeneBank accession numbers (3)

#### DNS-izolálás

Az izolátumokat 50 ml malátakivonat-táplódatban 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 PCR-t 50 µl térfogatban végeztük, amely a következő összetevőket tartalmazta: 25 µl 2X PCR Master Mix (Fermentas, K0171), 2 µl genomi DNS (0,5–1 µg), 2–2 µl forward és reverse primer (10 pmol/µl), 19 µl steril, nukleázmentes víz (Fermentas, #R0581). A PCR körülményei az egyes fragmentumok felszaporítása során a következők voltak:

Az ITS-fragmentum felszaporításához a következő primerpárt használtuk: SR6R: 5'-AAG TAG AAG TCG TAA CAA GG-3' (SSU) 23 bp; az LR1: 5'-GGT TGG TTT CTT TTC CT-3' (LSU) 17 bp (White *et al.*, 1990). A reakció körülményeit az alábbiak szerint állítottuk be: első lépésként kezdeti denaturálás történt 95 °C-on, 3 percen át, amit 5 cikluson keresztül további denaturálás követett 95 °C-on, 1 percig, majd az annelláció 50 °C-on, 1 percig és végül a polimerizáció 72 °C-on, 1 percen át. Ezt követte 25 cikluson keresztül a denaturálás 95 °C-on, 1 percig, majd az annelláció 50 °C-on, 1 percig, és végül a polimerizáció 72 °C-on, 1 percen keresztül. Végül egy 15 perces polimerizáció következett 72 °C-on. A PCR-t az MWG Biotech Inc. Primus 25 (Milton Keynes, UK) típusú készülékével végeztük.

#### A PCR-termék tisztítása és koncentrációja

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.

### Filogenetikai analízisek

A különböző elemzéseket egy Intel Pentium 4 CPU 2,4 GHz teljesítményű és 1 GB RAM memóriájú számítógépen végeztük. A szekvenciákat a ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) program felhasználásával rendeztük össze, majd a GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997) program segítségével manuálisan finomítottuk az illesztést, ahol szükséges volt. Ezt követően a filogenetikai analíziseket a Paup\*4.0b (Swofford, 2002) program alkalmazásával végeztük el.

### Parsimony analízis

A Parsimony típusú filogenetikai elemzést a Paup\*4.0b programmal végeztük. A keresés során „branch swapping” típusú heurisztikus, Tree Bisection and Reconnection (TBR) stratégiájú újrendezést (TBR) alkalmaztunk. A TBR az jelenti, hogy a törzsfát két részre bontják, amelyeket majd ismét párosítanak egy újabb elágazáson keresztül. A folyamat az összes lehetséges elágazást számításba veszi, majd kiválasztja közülük a legvalószínűbbet. Az elemzés során minden egyes karaktert azonos súllyal vettünk figyelembe, az összerendezésben szereplő kihagyásokat (gap-eket) pedig hiányzó adatként kezeltünk. A törzsfa stabilitását bootstrap analízissel ellenőriztük 1000 ismétlést alkalmazva. A törzsfák megrajzolásához a TreeView (Page, 1966) programot használtuk.

### EREDMÉNYEK

A DNS-izolálását a NucleoSpin II (Macherey-Nagel, 740770) alkalmazásával végeztük a gyári protokollt követve, melynek eredményeként átlagban 100 ng/μl koncentrációjú DNS-oldat keletkezett.

A genomi DNS izolációját követően a PCR során a primerpárokkal, egy 600 bp hosszúságú ITS-fragmentum szaporodott fel mindegyik izolátum esetében (3. ábra). Az alábbiakban a *Cryphonectria* izolátumok ITS-szekvenciája valamint az egyes szekvenciák összerendezésének egy-egy részlete látható (4. ábra).

3. ábra: A PCR során felszaporított ITS-szakaszok negatív elektroforetikus képe 1%-os agaróz gélben (etidium-bromidos festés)

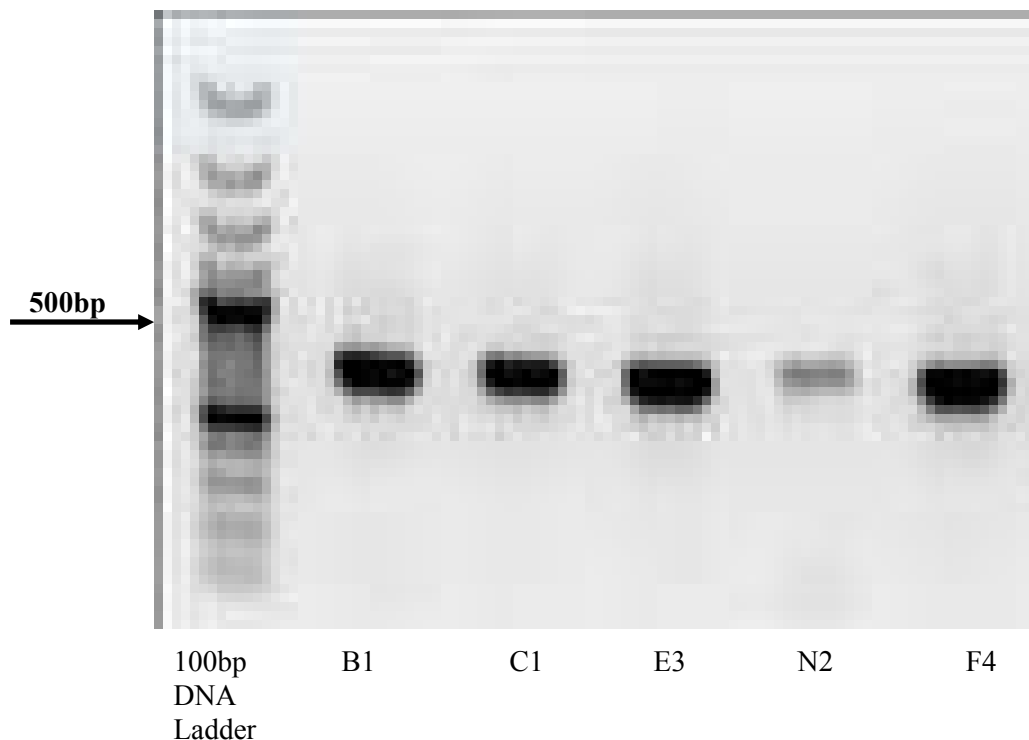


Figure 3: ITS fragments amplified by PCR in 1 % agarose gel stained with ethidium bromide (EtBr)

4. ábra: Az ITS-szekvenciák rendezésének egy részlete

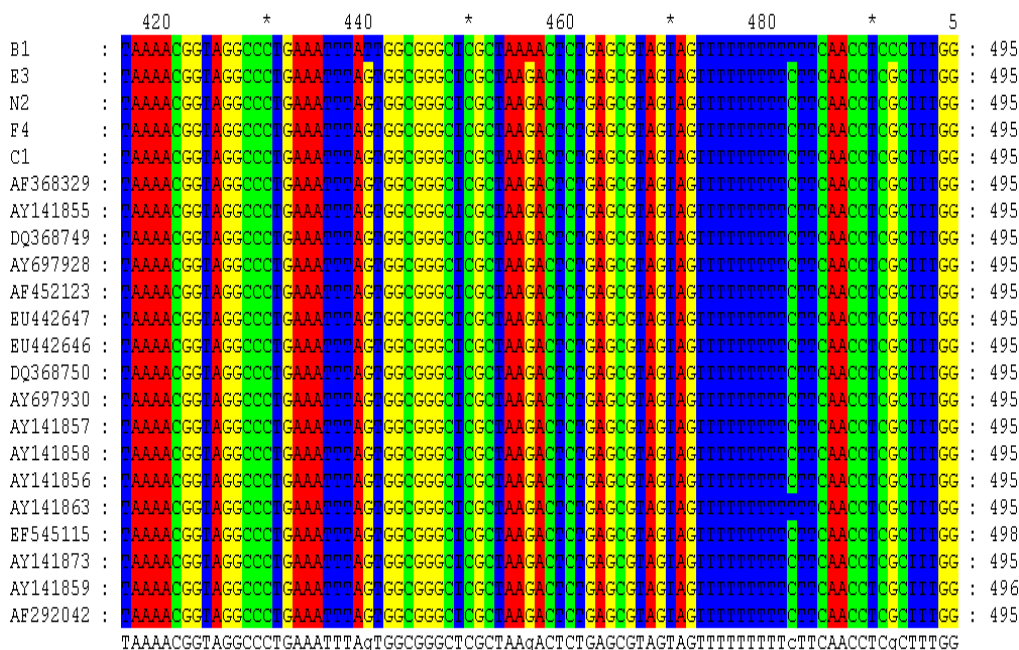


Figure 4: a part of the alignment of ITS sequences

**Filogenetikai törzsfá**

A Parsimony elemzés során kapott filogenetikai törzsfá az 5. ábrán látható. Az elemzés során a program 547 karaktert (bázist) vett figyelembe, melyből 539 karaktert konstansnak, 6 karaktert nem-informatívnak tekintett, és csak 2 karaktert becsült informatívnak. A bootstrap analízis során kapott magas bootstrap értékek megerősítették az egyes elágazások helyének a valószínűségét, ezzel alátámasztva a felrajzolt filogenetikai törzsfá helyességét.

**KÖVETKEZTETÉSEK**

A *Cryphonectria parasitica* (syn: *Endothia parasitica*), (anamorf: *Endothiella parasitica*) 1969-es magyarországi megjelenése óta nemcsak a szelídgesztenye állományokat fertőzte meg, hanem a tölgyeseket is. Súlyos károkat okozott, melyre többféle védekezési módszert kipróbáltak. A leghatásosabbnak eddig a gomba csökkent virulenciájú, hipovirulens törzseinek alkalmazása látszik. Magyarországon természetesen is előfordulnak hipovirulens törzsek.

A Nagymarosról begyűjtött mintákkal végzett vizsgálatok eredményei:

- A szabadföldről nyert kéregminták segítségével párosítási teszteket végeztünk annak megállapítására, hogy a minták egymással kompatibilisek-e: minden minta kompatibilis volt egymással, tehát azonos vegetatív kompatibilitási csoportba (VCG-be) tartoznak
- EU-teszter törzsek segítségével meghatároztuk a VC-típust, mely EU-12 volt
- Molekuláris biológiai módszerek segítségével kimutattuk a dsRNA jelenlétét a nagymarosi hipovirulens törzsek citoplazmájában

A szabadföldi kezelések során sokkal hatásosabb megoldás lehet a konvertált törzsek használata, szemben a más termőhelyről származó hipovirulens törzseket alkalmazásával. Így ezzel megakadályozható, hogy a kísérleti területekre a kórokozó más genotípusát behurcolják. Magyarországon eddig 18féle VC típust azonosítottunk, de fontos a szexuális rekombinálódás során kialakuló új kompatibilis csoportok megjelenésének megakadályozása a sikeres szabadföldi védekezés érdekében.

Az egyes izolátumok közötti távolságok (bázisok közötti különbség, elágazások hossza) az ITS szekvenciák alapján nem bizonyultak kellően eltérőnek ahhoz, hogy az eredmények alapján a filogenetikai törzsfát jól megalapozottnak tekinthessük. A különbség tehát izolátumok között nem volt jelentős, ez megkérdőjelezi, vajon a választott ITS-régió elégséges-e az egyes izolátumok (földrajzilag különböző) megalapozott szétválasztásához?

5. ábra: Az ITS-szekvenciák Parsimony elemzése alapján készített filogenetikai törzsfá. A vonalakra írt számok az elágazás valószínűségét jelölik, százalékban, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis alapján kaptunk. Az adtbázisból származó izolátumok fekete, a saját izolátumok piros színnel jelöltek.

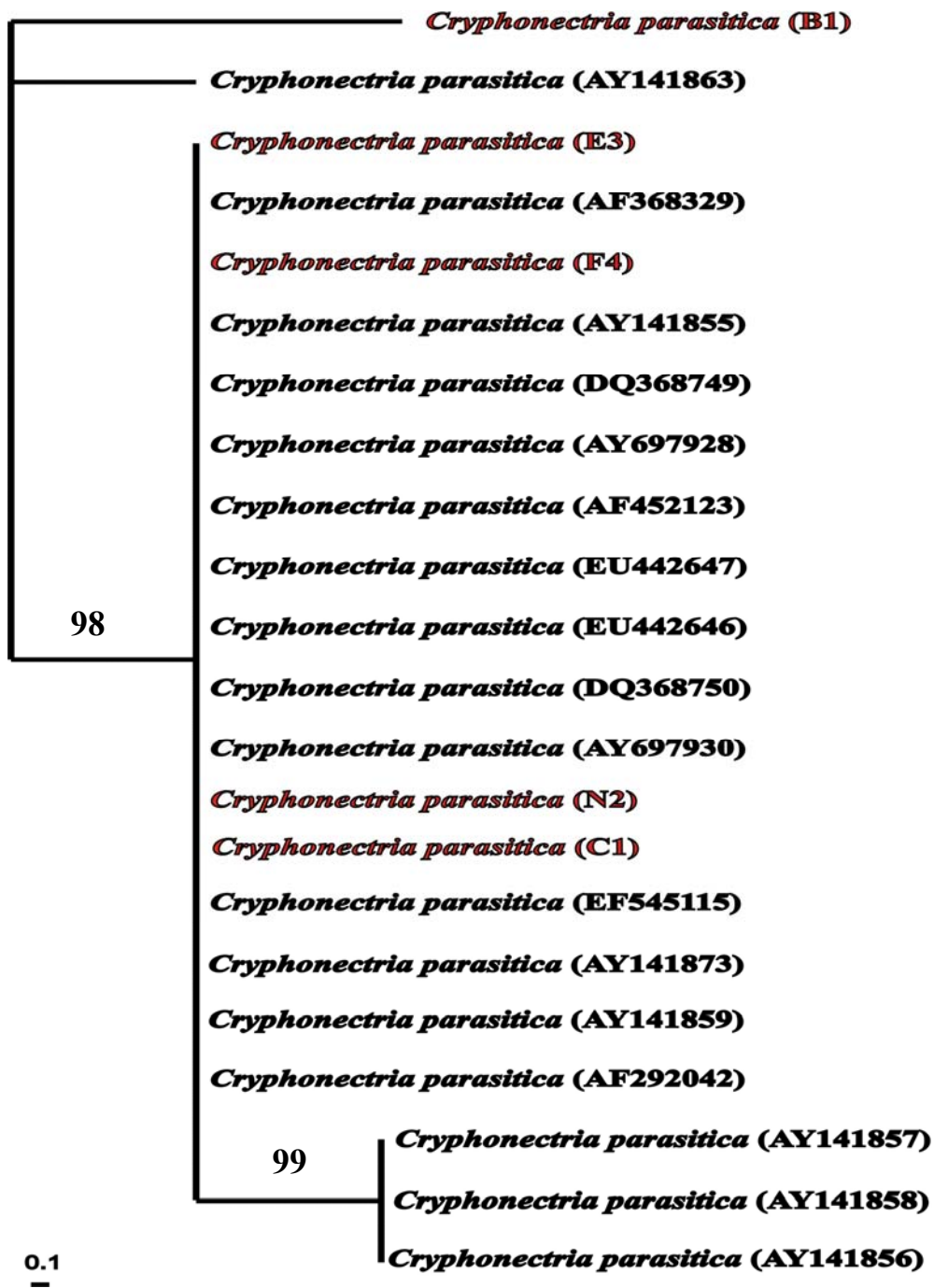


Figure 3: Phylogenetic relationships of *Cryphonectria parasitica* isolates inferred by Parsimony analysis of ITS sequences. The numbers above the lines represent the bootstrap (bootstrap=1000) values. Our isolates are indicated with red colour.



IRODALOM

- Allemann C. - Hoegger P. - Heiniger U. - Rigling D. (1999): Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using RFLP markers. *Molecular Ecology* 8, 843-854.
- Avice J.C. (2004): *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Gardes M. - Bruns T.D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycete-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118.
- Gottlieb A.M. - Lichtwardt R.W. (2001): Molecular variation within and among species of Harpellales. *Mycologia* 93(1), 66-81.
- Graser Y. - El Fari M. - Vilgalys R. - Kujipers A.F.A. - De Hoog G.S. - Presber W. - Tietz H.J. (1999): Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region *Medical Mycology* 37, 105-114.
- Liu Y.C. - Milgroom M. G. (1996): Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (*vic*) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* 86, 79-86.
- Moncalvo J.M. - Lutzoni F.M. - Rehner S.A. - Johnson J. - Vilgalys, R. (2002): Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* 49, 278-305.
- Nicholas K.B. - Nicholas H.B.Jr. - Deerfield D.W. II. (1997): GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *Embnew News* 4, 14.
- Nugent K.G. - Saville B.J. (2004): Forensic analysis of hallucinogenic fungi: a DNA-based approach. *Forensic Science International* 140, 147-157.
- Page R.D.M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12, 357-358.
- Radócz L. - Szabó I. - Varga M. (1997): A szelídgesztenyekór (*Cryphonectria parasitica* [Murr.] Barr) elleni biológiai védekezés kutatásának hazai eredményei. *Növényvédelem* 33(1), 3-10.
- Radócz L. - Tarcali G. - Juhasová G. (2009): Characterization of the *Cryphonectria parasitica* subpopulation in the central-European region. *Acta Horticulture* 844. IV International Chestnut Symposium 439-443.
- Radócz L. (2002): A szelídgesztenyekór. A héjasok növényvédelme. szerkesztette: Radócz L. Szaktudás Kiadó Ház, Budapest. 95-106.
- 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.
- Shinohara M.L. - LoBuglio K. - Rogers S. (1999): Comparison of ribosomal DNA ITS regions among geographic isolates of *Cenococcum geophilum*, *Current Genetics* 35, 527-535.
- Swofford D.L. (2002): PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson J.D. - Gibson T.J. - Plewniak F. - Jeanmougin F. - Higgins D.G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24, 4876-4882.
- Voglmayr H. - Yule C.M. (2006): *Polyancora globosa* ge. sp. nov., an aeroaquatic fungus from Malaysian peat swamp forests. *Mycological Research* 110, 1242-1252.
- 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.
- Yli-Mattila T. - Mach R.L. - Alekhina I.A. - Bula S.A. - Koskinen S. - Kullnig-Gradinger C.M. - Kubicek C.P. - Klemsdal S.S. (2004): Phylogenetic relationships of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS,  $\beta$ -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. *International Journal of Food Microbiology* 95, 267-285.