

Nyugat-Magyarországi Egyetem
Erdőmérnöki Kar

Doktori Értekezés Tézisei

**A szelídgesztenye kéregrákja
[*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr]
a Soproni-hegységben**

Vidóczy Henriett

Sopron
2005

1. A téma jelentősége

Az elmúlt évszázadban több olyan járvány alakult ki erdei ökoszisztémákban, amelyek során a kórokozó nagymértékű patogenitása, és a betegség területi kiterjedése miatt fafajok fennmaradása került veszélybe. Legtöbb esetben a kórokozó behurcolása vagy a gazdanövény átvitele vezetett pandémiák kialakulásához.

Ezek közé tartozott például a szilpusztulás, a simafenyő hólyagrozsdája, vagy a szelídesztenye-kéreggrák. A már dinamikus erősödő járványok megfékezése az erdőterületeken rendkívüli erőfeszítéseket kívánt, és az erdővédelem hagyományos módszereivel általában nem volt lehetséges.

A szelídesztenye kéreggrák-betegségének okozója egy Ázsiából származó, onnan amerikai közvetítéssel Európába behurcolt mikroszkopikus gombafaj, a *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Néhány évtizeddel ezelőtt a Soproni-hegyvidéket is elérte ez a szelídesztenye járványos pusztulását okozó betegség, amellyel mind a környező gesztenye-ültetvények, mind a természet szerű erdőtársulások szelídesztenyéi megfertőződtek és pusztulásnak indultak. A betegség leküzdése és az epidémia megállítása egyetlen hatékony, biológiai módszerrel lehetséges. A módszer alkalmazásának feltétele a kórokozó populációjának felmérése, ennek ismeretében csökkent virulenciájú gombatörzsek mesterséges kijuttatása a beteg fákra és ezáltal a környező területekre. A kezelések eredményeképpen a beteg fák gyógyulásnak indulnak, majd ez a gyógyulási folyamat kiterjed mind az ültetvényekben, mind az erdőtársulásokban jelen lévő szelídesztenyékre is.

2. Tudományos előzmények

Tekintettel a kórokozó jelentőségére, és a múlt század elején kezdődő pandémiára, számos publikáció jelent meg a témára vonatkozóan.

2.1. Külföldi tudományos előzmények

Merkel figyelte meg elsőként a kórokozót 1904-ben, amikor is elkezdődött az amerikai szelídgesztenye szinte teljes pusztulásával járó epidémia az USA-ban. A gombafaj leírása, rendszertani besorolása **Murrill**, **Anderson**, később **Barr** nevéhez fűződik. Az eredetileg a Távols-Keleten endemikus kórokozót 1938-ban Európába is behurcolták, ahol szintén súlyos járványt idézett elő az európai szelídgesztenyén.

Az epidémia megállítása a hagyományosan alkalmazott növényvédelmi eljárásokkal nem volt lehetséges. A betegség leküzdésében az áttörést egy környezetkímélő biológiai védekezés jelentette, amely a kórokozó csökkent virulenciájú törzseinek elterjesztésén alapszik. Ezeknek a csökkent virulenciájú (hipovirulens) törzseknek a citoplazmája kettősszalú RNS-t tartalmaz, amelynek európai típusa a *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1). A CHV-1 mind laboratóriumi, mind természetes körülmények között átadható egy virulens törzsnek, amely ezután maga is hipovirulenssé válik. A hipovirulens törzsek támadását a szelídgesztenyefa képes leküzdni, az általuk okozott hipovirulens rákosodások alatt a kambium és a háncs életképes marad. A CHV-1 transzmisszió viszont csak egymással kompatibilis törzsek között jöhet létre. Ezért egymáshoz való viszonyukat tekintve a kórokozó izolátumait vegetatív kompatibilitási típusokba sorolták: EU-teszter törzseket határoztak meg.

A hipovirulenciára alapozott gyógyítás első lépéseit Európában **Biraghi, Grente** és **Berthelay-Sauret** tették meg, mellettük **Turchetti** vett még részt a gyakorlati alkalmazás fejlesztésében. **Anagnostakis** kidolgozta a vegetatív kompatibilitási vizsgálatok módszereit. **Dodds, Fulbright** a molekuláris biológiai területeken bővítették ismereteinket: kimutatták a csökkent virulenciájú törzsek citoplazmájában a kettősszalú RNS-t, és bebizonyították annak összefüggését a hipovirulenciával.

Az európai kooperáció megteremtésében nagy szerepe volt **Heiniger, Cortesi, Robin, Wilhelm** munkájának.

A kutatáshoz kapcsolódóan a szelídgesztenye mikroszaporításában jelentős eredményeket értek el **Wilhelm, Ballester, A. M. Vieitez** és **F. J. Vieitez**.

2.1. Hazai tudományos előzmények

Hazánkban először 1969-ben **Körtvély Attila** észlelte a kórokozót a Zala megyei Nemeshegyen. A *C. parasitica* elterjedésének felmérése **Eke István** és **Gál Tibor** nevéhez fűződik, emellett a kémiai védekezés lehetőségeit kutatták. A biológiai védekezés hazai alkalmazásával kapcsolatban **Radócz László, Varga Mária, Szabó Ilona, Sótónyi János, Aponyiné Garamvölgyi Ilona** végeztek jelentős munkát. A kórokozó vegetatív kompatibilitási típusait a Kárpát-medence egész területén **Radócz László** vizsgálta.

1996-ban a Soproni-hegységben, Ágfalván **Radócz László, Szabó Ilona** és **Varga Mária** elsők közt kezdték el hazánkban a kuratív kezeléseket, egy **Radócz László** által konvertált, hipovirulens törzs kijuttatásával.

3. Célkitűzések

Ennek a kutatásnak a célkitűzése volt karakterizálni a kórokozó helyi populációját, illetve a betegség és az epidémia leküzdésére máig ismert egyetlen hatásos, biológiai módszert adaptálni a Soproni-hegyvidékre. Ezért az alábbi célokat kellett megvalósítani:

- felmérni a betegség elterjedését a Soproni-hegyvidéken,
- kéregmintákat gyűjteni a fertőzött területekről, a mintákból izolálni és a további laboratóriumi vizsgálatokhoz törzsgyűjteményben fenntartani a kórokozót,
- az izolátumokból meghatározni a kórokozó különböző vegetatív kompatibilitási típusait és megállapítani azok elterjedését a Soproni-hegyvidéken,
- az EU-teszter törzsekkel való kompatibilitási viszonyokat meghatározni, ebből következtetni az epidémia kialakulására,
- továbbá lehetőség szerint helyi hipovirulens törzseket felkutatni,
- ehhez virulencia-teszteket végezni a vélhetően hipovirulens izolátumokkal,
- helyi hipovirulens törzsek hiányában konvertálni a kórokozó virulens törzseit magyarországi hipovirulens törzsek felhasználásával,
- molekuláris biológiai módszerekkel igazolni az ily módon konvertált törzsekben a hipovirulenciát, és a konvertált törzsek genetikai azonosságát,
- a konvertált hipovirulens törzsek tenyésztésével több éven keresztül kuratív célú kezeléseket végezni, azokat értékelni, javaslatokat tenni hatékonyságuk fokozása céljából,
- kísérleteket végezni a szelídgesztenye mikroszaporítására vonatkozóan,
- *in vitro* vizsgálni a kórokozó és a gazdanövény kölcsönhatását,

- kidolgozni egy gyors és megbízható *in vitro* virulenciatestet a hipovirulens törzsek elkülönítése céljából.

4. Anyag és módszer

4.1. Terepi vizsgálatok

A terepi felmérés 1996 őszén zajlott, a hegyvidékhez tartozó három község határt (Sopron, Ágfalva, Harka) ölelte fel, és 4070 hektárt érintett. A fertőzöttség megállapítása az egyes erdőrészekben vonalas mintavétellel történt. A felvételezés során minden erdőrészletben, ahol a betegség megtalálható volt, a laboratóriumi vizsgálatok céljára mintavétel történt.

A konvertált hipovirulens törzsekkel 1996 ősztől 2000-ig folytak kezelések Ágfalván, egy telepített gesztenyésben. A kezelések során minden egyes nekrózist a megfelelő hipovirulens gombatorzs laboratóriumi tenyészetével körbeoltottam. Az oltások során a seb szélén, de a még élő kéregbe egymástól 4-5 cm-re fűrt lyukakba helyeztem a gombafonalakkal átszőtt táptalaj-darabkák, majd sebkezelővel lezártam a lyukakat. A kezeléssel párhuzamosan eltávolítottam a beteg ágakat. Az eredmények értékelése évente történt. A kezelések 37 beteg fát érintettek.

Néhány esetben a bizonytalan gyógyulást mutató nekrózisok esetén kombinált kezelést végeztem: felváltva helyeztem a lyukakba a két konvertált hipovirulens törzs tenyészetéből. Eltérő jellegű kezelést alkalmaztam súlyosan fertőzött, nagyszámú rákosodástól szenvedő fáknál: nem csak a nekrózisokat oltottam körbe, hanem a törzset is hosszában végigoltottam, a tőtől kezdve az erősebb vázágakon folytatva egészen a koronáig. Több, erősen sporuláló rákosodás esetén a

leváló, fertőzött kérget eltávolítottam, ezzel is csökkentve a további fertőzéseket.

4.2. Laboratóriumi vizsgálatok

4.2.1. Klasszikus vizsgálatok

A klasszikus vizsgálatok keretében első lépésként a kéregmintákból kitenyésztettem a kórokozót. Az összes izolátumot törzstenyészetben fenntartottam, később vegetatív kompatibilitási tesztek végeztem velük. Összesen 51 izolátum kompatibilitását határoztam meg. A meghatározott kompatibilitási típusok és harminc EU-teszter törzs között szintén vegetatív kompatibilitási tesztet végeztem. A kompatibilitási tesztek Radócz módszere alapján végeztem.

A meghatározott kompatibilitási típusokat a lehetőségek szerint magyarországi hipovirulens törzsekkel konvertáltam.

Néhány izolátum a származása vagy tenyészeti jellege alapján hipovirulensnek tűnt, ezeket virulencia teszteknek vettem alá.

4.2.2. Molekuláris biológiai vizsgálatok

A molekuláris biológiai módszerek segítségével a hipovirulencia tényezőjének, a kettősszálú RNS-nek a kimutatásával igazolható a hipovirulencia egy a tenészjellege, vagy csökkent virulenciája miatt hipovirulensnek vélt gombatörzs, illetve a konvertált törzsek esetében. A vizsgálat alá vont törzsek az alábbiak voltak: S11, S18, S18xSa3, S21, S21xR5, S21xIhb2, An-hipovirulens és S23-virulens kontroll. A kettősszálú RNS-ek kivonása és analízise fenolos

extrakcióval történt. A kivonási sorozat mintái 0,8 %-os agaróz-gélben, TBE pufferben 110 V-on elektroforetizáltam, a molekulákat ethidium-bromidos festéssel tettem láthatóvá.

A konvertált gombatörzsek genetikai azonosságának igazolására RAPD analízist használtam. A RAPD amplifikációt Wronski és munkatársai után végeztem. A DNS-t a dsRNS kivonás melléktermékeként keletkező felülülő tartalmazta. Hat tízbázisú oligonukleotid primerrel történt meg a polimeráz láncreakció. A keletkezett fragmentumokat ethidium-bromidos festés után 1 %-os agaróz-gélben, TBE pufferben, 110 V-on választottam el, és UV fény alatt vizsgáltam. Két virulens izolátum (S18, S21) és ezek három, általam konvertált tenyészetet került vizsgálat alá.

4.2.3. Kórélettani vizsgálatok

A kórokozónak a növényre, illetve a növénynek a kórokozóra való élettani hatása a növényben lejátszódó, főleg biokémiai változásokkal jellemezhető folyamat. Az alábbiakban ismertetett kísérletekben a kórokozó anyagcseretermékeinek növényre kifejtett hatását, és a gazdaparazita *in vitro* kölcsönhatását vizsgáltam.

A kísérletekhez az *in vitro* kultúrában tartott szelídgesztenye hajtástenyészeteket az alábbi multiplikációs eljárással nyertem. A szaporításhoz saját preparálású P24 táptalajt használtam kiegészítve 0,2 mg/l benzil-aminopurinnal. A továbbiakban multiplikációhoz explantátumként felhasznált növényi részeket elkülönítve neveltem tovább, hogy megállapítsam, mely résznek a legnagyobb a multiplikációs rátája. Explantátumként 8 mm-es szárrész, apikális rész, teljes kis hajtás és kallusz szolgált. Négy hét inkubálási idő elteltével meghatároztam a kialakítható szegmensek számát, és a multiplikációs koefficienst

Az *in vitro* virulencia tesztekhez négy hetes, 0,2 mg/l benzil-amino-purinnal kiegészített P24 táptalajon szaporított szelídgesztenye hajtásokat használtam. A hajtások szárát fertőztem meg az alábbi *C. parasitica* törzsek tenyészetével: S21 – virulens, S21 x R5 – konvertált hipovirulens, R5 – hipovirulens, kontroll - csak sebzés történt. A fertőzéshez szikével 2 mm-es, U alakú sebet ejtettem a száron, majd ebbe helyeztem az aktívan növekedő kb. 2 mm³-es micélium-darabkát. Egy-egy sorozatban 14 hajtástenyészetet fertőztem meg. A tenyészeteket szobahőmérsékleten, 16 órás megvilágításban tartottam, az eredményeket harminc nap elteltével értékeltem.

5. Az eredmények összefoglalása

Ennek a kutatásnak elsődleges célja volt karakterizálni a szelídgesztenye-kéregrákot okozó *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr populációját a Soproni-hegységben, illetve szabadföldi kísérletek során vizsgálni az ellene alkalmazott hipovirulens kezelések hatékonyságát.

1.) A terepi felmérés során megállapítottam, hogy a Soproni-hegységben a fertőzöttség a városhoz közeli erdőterületeken általános, és mértéke meghaladja a 30 %-ot, a távolabbi területeken előfordulása gócszerű.

2.) A terepi felméréssel párhuzamosan gyűjtött kéregmintákból, és a gesztenyésekből és a kertvárosból származó mintákból izoláltam a kórokozó különböző törzseit. Az izolátumokból a későbbi vizsgálatokhoz törzsgyűjteményt állítottam össze.

3.) Megállapítottam, hogy a hegységben a *C. parasitica* hat vegetatív kompatibilitási típusba tartozó törzsei károsítanak. A vegetatív kompatibilitási típusok közül

háromnak jelentős az elterjedése (SI, SII, SIII), másik három (SIV, SV, SVII) gyakorlatilag csak néhány izolátummal szerepel. A hegységhez közel, egy fertőszentmiklósi telepített gesztenyésben egy hetedik (SVI) típust is azonosítottam.

4.) A vegetatív kompatibilitási vizsgálatok után a kapott hat típust harminc EU-teszter törzssel hasonlítottam össze. A kapott eredményeket összevetve a hazai és a nemzetközi szakirodalommal, következtettem a járvány kialakulására és további terjedésére. Megállapítottam, hogy a járvány első hulláma a Kőszegi-hegységből érkezett a Soproni-hegyvidékre. A későbbiekben a távolabbi, délnyugat-dunántúli termőtájából vélhetően antropogén hatásra az epidémia második hulláma érte el a hegységet. Ezután a határ menti erdőterületeken megjelent egy Ausztriában domináns vegetatív kompatibilitási típusba tartozó törzs, amely egyelőre lokális kiterjedésű, de fertőzőképessége nagy. Megállapítottam továbbá, hogy a városkörnyéki gesztenyésekben a kórokozó ivaros szaporodási folyamatai elkezdődtek.

5.) A hipovirulenciára alapozott biológiai védekezés alkalmazásához lehetőleg helyi hipovirulens törzsek szükségesek. Ezek hiányában – mint a Soproni-hegyvidéken is – a helyi virulens törzsek konverziója szükséges. Három sikeres konverziót végeztem Zala és Somogy megyékből származó hipovirulens törzsekkel, az átalakításokat molekuláris biológiai módszerekkel igazoltam: az átalakított törzsekben kimutattam a hipovirulencia tényezőjét a 12,7 kb nagyságú kettőszálú RNS-t. Megállapítottam, hogy a hegyvidéken endogén hipovirulens törzs nem alakult ki. Az átalakított gombatörzsek genetikai azonosságát RAPD analízissel igazoltam.

6.) Az így nyert hipovirulens törzsek gyógyításban való alkalmazhatóságát szabadföldi kísérletek során értékeltem. Az ágfalvi kísérleti területen és a környező gesztenyésekben az általam konvertált, illetve a Radócz László által az Erdő- és Faanyagvédelmi Intézet rendelkezésére

bocsátott hipovirulens törzsekkel 1996-tól 2000-ig rendszeresen kuratív jellegű kezeléseket végeztem. A kezelésekkel nyolc év alatt a fák 90 %-os gyógyulását értem el. Megállapítottam, hogy egy területen több kompatibilitási típus előfordulása esetén kombinált oltási módszer is eredményesen alkalmazható, amelynek lényege, hogy a konvertált hipovirulens törzsek mindegyikét felhasználom egy-egy nekrozis körbeoltásához.

7.) Megállapítottam, hogy a súlyosan fertőzött, és nagy fertőzési nyomás alatt lévő fák is eredményesen gyógyíthatók a törzs és a főágak hosszirányú oltásával, mivel így egy védelmi zónát hozunk létre, amelyet a virulens kórokozó nem képes áttörni, ezáltal a fa fennmaradásához szükséges víz- és tápanyagszállítás biztosított.

8.) A kezeléseik során megállapítottam, hogy évről évre újabb vegetatív kompatibilitási típusok megjelenésére kell számítani, ezért a biológiai védekezés hatékony alkalmazása folyamatos populáció-struktúra vizsgálatokat igényel. A kezeléseik eredményeként elkezdődik hipovirulencia terjedése, ami évente közel két métert jelent. A gombapopuláció struktúrájának ismeretében lehetővé vált az 1996-ban elkezdett ágfalvi kísérletek kiterjesztése, a gyakorlatban is alkalmazott biológiai védekezési program elindítása a Sopron környéki gesztenyésekben.

9.) A hipovirulenciára alapozott biológiai védekezésben fontos lépés a helyben izolált törzsek virulenciájának meghatározása, az esetleges hipovirulencia minél egyszerűbb megállapítása. Megállapítottam, hogy a szelidgesztenye és a kórokozó *in vitro* kölcsönhatásának vizsgálata a gyakorlatban gyorsan és megbízhatóan alkalmazható a hipovirulens törzsek identifikálására.

10.) Ehhez a vizsgálathoz szükségem volt mikroszaporítással előállított és steril kultúrában tartott szelidgesztenye-hajtásokra. P24 táptalaj kiegészítve 0,2 mg/l benzil-amino-purinnal magas (MC=4,68) multiplikációs

koefficienst értem el. Megállapítottam, hogy a teljes hajtásnak és a kallusznak mint explantátumnak kétszer olyan jó a multiplikációs képessége, mint a nodális vagy apikális szegmenseknek.

11.) Megállapítottam, hogy *in vitro* fertőzve a fenti protokoll szerint előállított szelídesztenye-hajtástenyészeteket *C. parasitica*-val, megbízhatóan elkülöníthetők egymástól a kórokozó hipovirulens és virulens izolátumai.

12.) Megállapítottam továbbá, hogy a *C. parasitica* kultúra-szűrletének hatása hátrányosan befolyásolja a szelídesztenye-hajtások növekedését, gyakoribbá teszi az apikális nektrózsok előfordulását.

13.) Mivel a *C. parasitica* a kocsánytalan tölgyön is képes nektrózisokat, sőt pusztulást okozni, és a Soproni-hegységben szelídesztenyével elegyes tölgyesekben is előfordul a betegség, további kutatásokat igényel a kórokozó és a hipovirulencia tölgy fajokon való terjedése.

6. A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk jegyzéke

6.1. Folyóiratban megjelent cikkek

VIDÓCZI H., VARGA M., SZABÓ I., RADÓCZ L. (2000): A szelídgesztenye-kéreggrák elleni biológiai védekezés lehetőségei a Soproni-hegyvidéken. *Növényvédelem* 36: 53-59.

VIDÓCZI H., VARGA M., SZABÓ I. (2005): A szelídgesztenye-kéreggrák elleni biológiai védekezés tapasztalatai a Soproni-hegységben. *Növényvédelem*. Nyomtatás alatt

6.2. Poszterek

VIDÓCZI, H., VARGA, M., SZABÓ, I. (2001): Chestnut blight and its biological control in Western Hungary. COST G4 Multidisciplinary Chestnut Research, Ascona, Ticino, Switzerland. May 23-27, 2001: 91.

6.3. Előadások

VIDÓCZI H. (1999): A szelídgesztenye-kéreggrák elleni biológiai védekezés lehetőségei Sopron környékén. 45. Növényvédelmi Tudományos Napok. MTA, Budapest. 1999. február 23-24: 133.

SZABÓ, I., VARGA, M., RADÓCZ, L., VIDÓCZI, H. (1999): Chestnut stands and biological control in Ágfalva. COST G4 Multidisciplinary Chestnut Research, Sopron, Hungary, 5-9 May, 1999: 62.

VIDÓCZI, H., VARGA, M., SZABÓ, I. (1999): VC-type diversity of *Cryphonectria parasitica* in forests and plantations of Sopron, Hungary. COST G4 Multidisciplinary Chestnut Research, Sopron, Hungary, 5-9 May, 1999: 53.

VARGA, M., VIDÓCZI, H., RADÓCZ, L., SZABÓ, I. (1999): Results of the field inoculations of chestnut with converted hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica* in the surroundings of Sopron. COST G4 Multidisciplinary Chestnut Research, Sopron, Hungary, 5-9 May, 1999,: 51.

VIDÓCZI, H. (1999). Effect of *Cryphonectria parasitica* culture-filtrate on the growing of micropropagated chestnut. COST G4 Multidisciplinary Chestnut Research, Sopron, Hungary, 5-9 May, 1999,: 30.

SZABÓ I., VIDÓCZI H., JUHASOVA G. (2002): A kéregrák (*Cryphonectria parasitica*) gyógyítási lehetőségei. MTA-VEAB „Héjas gyümölcsök (dió, gesztenye, mandula, mogyoró) növényvédelmi problémái” tudományos ülés, Lengyeltóti, 2002. szeptember 26.

VIDÓCZI H. (1998): A szelídgesztenye-kéregrák Sopron környékén. Haracsi Lajos Emlékülés, Sopron, 1998. december 2.

VIDÓCZI H., Szabó I. (2000): A szelídgesztenye pusztulása és az ellene alkalmazott biológiai védekezés, „Biológiai védekezés a gesztenyepusztulás megállítására” című PHARE CBC Projekt rendezvénye, Sopron, 2000. szeptember 29.

VIDÓCZI H. (2003): A szelídgesztenye kéregbetegsége és az ellene való biológiai védekezés, „Gesztenye-napok” rendezvénye, Iharosberény, 2003. október 11.