

ZÁRÓJELENTÉS

a

"A nyárákon kéregmegbetegedést előidéző kórokozók és a lombkárosító rozsdagomba fajok hazai feldolgozása, azonosításuk klasszikus és molekuláris genetikai módszerekkel."

című OTKA kutatási témáról

OTKA nyilvántarási szám:
T 37782

Kutatási időszak:
2002-2005.

A kutatás témavezetője:
Dr Szántó Mária
tudományos főmunkatárs

1. BEVEZETÉS

Erdőgazdálkodásunknak mind az állami, mind pedig magán szektorában kiemelkedő a szerepe az ültetvényes fatermesztésnek. Az ültetvényes fatermesztésen belül nyártermesztésünk jelentősége a legnagyobb, mert a tőkemegtérülés viszonylag gyors, hektáronként igen magas fatömeget ad és a jó minőségű faanyagának ipari felhasználása biztosított. A növények bármilyen szintű monokultúrában történő termesztése azonban komoly növény-egészségügyi problémákat vet fel, ezek ismerete és valamilyen szintű kontrollálása nélkül a termesztés nem működhetne. Különösen igazak az előbbiek, ha figyelembe vesszük, hogy a nyáarak esetében igen nagy a jelentősége a nemesítésnek. Napjainkra nagyon sok azon kultivárok, fajták száma, amelyek éppen a minél gyorsabb növekedésre és minél jobb minőségű faanyagra történő nemesítésnek az eredménye. Jelen pályázat munkálatai során célunk az volt, hogy a nemesnyáarak termesztése során felmerülő kórokozó gombafajokról adatokat gyűjtsünk, illetve a monokultúrában történő termesztés növénykórtani problémáira rávilágítsunk, és megoldási javaslattal éljünk.

A nyáarak növény-egészségügyi problémái közül a törzsön megbetegedést okozó fajok a veszélyesebbek, hiszen amíg a lombkárosítók támadásával szemben van esélye a növénye-gyednek, addig a kéreg megbetegedéseket okozó fajokkal szemben gyakran már nincs, és sok esetben a betegség vége a növény pusztulása. A nyáarakon a kéregfekély megbetegedést gombák illetve baktériumok idézhetik elő. Ezek sorában is a legveszélyesebb kórokozó gombafaj a *Dothichiza populea*. Csemetekertekben és anyatelepeken okozza a nagyobb problémát, de állományokban is gyakori, különösen a prediszponált állapotú egyedek fogékonyak a támadásával szemben. Éppen ezért munkánk során elsősorban ennek a kórokozónak az előfordulási adatait gyűjtöttük be és vizsgáltuk terepi és laboratóriumi körülmények között.

Vizsgáltuk továbbá a *Cytospora chrysosperma* (Pers.)Fr. (teleomorf: *Valsa sordida* Nits) illetve a *Cytospora nivea* (Hoffm.)Sacc. (teleomorf: *Leucostoma niveum* (Fr.)Höhn) előfordulását, hiszen eddigi adataink legtöbbször csupán *Cytospora* sp.-re vonatkozóan vannak. A két faj szétválasztása csupán a konídiumok mérete alapján lehetséges és egyes irodalmi adatok arra utalnak, hogy megjelenésük csupán valamely más okból elpusztult, besüppedt kérgen tapasztalható, ezért fontosnak ítéltük a kórokozók pontos határozását és előfordulási adatainak pontosítását.

Munkánk során kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon a gombák mellett más élőlénycsoport képviselői is részt vesznek-e a törzs megbetegítésében. Az irodalomból ismert, hogy baktérium fajok közül a *Xanthomonas populi* szintén okozhat kéregrágot. Hazai adatunk a kórokozó előfordulásáról ez idáig – szerencsére - még nem volt.

A nyárasokban a lombon előforduló kórokozók között jelentős szerep jut a levélrozsdat okozó *Melampsora* fajoknak. A megbetegedés főleg csemetekertekben és anyatelepeken okoz problémát, de erdősítésekben és állományokban is mindenütt előfordul. Legjelentősebb fajtái a *Melampsora larici-populina* és a *Melampsora allii-populina*. A kórokozók kártételükkel gátolják a hajtáscsúcsok beérését és a korai lombhullással növekedés-csökkenést okoznak. Az ismételt erős fertőzések következtében pedig a fajták legyengülnek és utat nyithatnak a jóval veszélyesebb kéregmegbetegedést okozó kórokozóknak. A rozsdagombák prediszpozíciós hatása miatt elsősorban ezen kórokozók mélyreható vizsgálatát terveztük. Volt egy másik oka is a rozsdagombák komolyabb vizsgálatának, nevezetesen hogy az egyes fajták betegségekkel szembeni toleranciájának igen jó tesztelésére van lehetőségünk egy könnyen elvégezhető laboratóriumi módszer segítségével.

A téma kidolgozásához a lehető legalkalmasabb módszereket kerestük, hiszen bármely munka eredményessége szempontjából a módszer jó megválasztása döntő lehet. Témánk

esetében a kórokozó fajok identifikálására a klasszikus morfológiai módszerek mellé egy PCR- technika alkalmazását is terveztük. A még viszonylag újnak minősíthető technika nagy biztonsága predesztinálja a nehezen feldolgozható nemzetségek vizsgálatára.

Munkánk eredményeként a következőket terveztük:

- a kéreg-megbetegedést előidéző fajok legveszélyesebb kórokozója, a *Dothichiza populea* hazai populációjának a minél teljesebb hazai feldolgozása,
- más kórokozó fajok (irodalmi adatok szerint esetleg egy baktérium faj, a *Xanthomonas populi*) esetleges jelenlétének és szerepének első hazai tisztázása a kéregbetegségekben,
- a *Melampsora* nemzetség nyáron károsító fajainak első teljes hazai feldolgozása (amely eredmények nyomán feltételezhető, hogy az eddigi elképzeléseinket a nyárrozsdagombákkal kapcsolatosan revidálni kell),
- a *Melampsora* fajok azonosítása során a klasszikus morfológiai módszer és egy új molekuláris genetikai módszer összevetése elsőként a világon.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. TEREPI FELVÉTELEK ÉS MINTAGYÚJTÁS

Munkánk megkezdésekor a legfontosabb nyártermesztő körzetekben kijelölt parcellákon mintafák kijelölése történt meg és ezen mintafák terepi minősítésével döntöttük el a különböző nyárfajták eltérő fogékonyságát az egyes kórokozókkal kapcsolatosan. A mintaparcellák kijelölésére a Tiszántúlon, a Duna-Tisza közén és a Dunántúlon került sor. A mintaparcellák kijelölésekor fontosnak tartottuk, hogy a terepi felvételek során lehetőleg valamennyi jelentős nyártermesztő körzetből kerüljenek begyűjtésre kórokozók, hogy esetleg az ökológiailag eltérő területek között is tudjunk összehasonlításokat tenni. A felvételek száma legkevesebb két, a legtöbb – tavaszi és őszi időszakban is – nyolc alkalom volt. Az alábbi táblázatban (1.tábl.) felsoroljuk az erdőrészek helyszíneit, a vizsgált nyárfajtákat valamint a vizsgált egyedek számát.

1. táblázat A jelzett területeken a vizsgált egyedek száma (db):

Fajta:	Pannónia	Kopecy	Koltay	Bl	Agathe	I 214	Meggy-levelű	H-328
Erdőrészlet:								
Tyukod 5B		16	23			21	14	
Nyírmihálydi 5C	24	20		25	29	27		
Tiszacsege 1B	21			20	21	20		
Abádszalók 23F	50	33	29	31	50	42		
Komádi 32A	42	36	12	24	42	37		
Gerla 28A	16	28		23		29	65	
Kecskemét 63H	32			24	32	32		32
Mélykút 31E	57	49		42	55	57		40
Lajosmizse 9B						47		51
Kecel 8D	38			18	28			26
Törtel 5F	35	38		32	35	36		
Kapuvár 16E	24	24	24			20		
Tapolca 38C	24	24			32	16		20
Zalavár 8A		37	15					20
Zalavár 4A	20					8		
ÖSSZESEN	383	305	103	239	324	392	79	189

A VIZSGÁLATI METODIKA

A kitűzött területeken megtörtént a vizsgálandó fák egyedi jelölése, és a 16 x 16 km-es nemzeti egészségügyi felvételek elfogadott metodikáját követve elvégeztük a parcellák egészségügyi vizsgálatát elsősorban azzal acéllal, hogy az egyes eltérő fajták, klónok, kultivárok, eltérő termőhelyi adottságok közötti eltérő biotikus és abiotikus toleranciáját megállapítsuk a további vizsgálatokhoz:

ELSZÍNEZŐDÉS: egészséges korona, nincs elszíneződés//elszíneződés van, sárguló, nem egészséges színű korona

LEVÉLVESZTÉS: mértéke /10 %-os becsléssel/

LEVÉLVESZTÉS OKAI: lombrágás, gombakárosítás (fajok), fagy, hőség, aszály, korai lombhullás, szélverés, vadrágás, egyéb, ismeretlen (Fontosnak tartottuk a lehetőségekhez mérten az okok feltárását éppen a bevezetőkből elmondottak miatt, ezért igyekeztünk az egyes károk mértékének regisztrálása mellett azok lehetséges okait is feljegyezni, illetve a kórokozókat begyűjteni. Tettük ezt döntően a tervezett későbbi vizsgálatok - az egyes klónok betegségekkel szembeni egyedi vizsgálata előzetes felmérése okán. Az egyes klónokkal tervezett későbbi provokatív visszafertőzési kísérletek beállításánál ezen előzetes adatokat vettük figyelembe.)

RÜGY- HAJTÁSKÁR: mértéke (20%-os becsléssel)

RÜGY- HAJTÁSKÁR OKAI: vékonyágelhalás, elszáradt vázág, torzulások, gubacsok, xylofág kártevők, abiotikus, csúcsszáradás, fagyöngy, fakín, vadrágás, egyéb, ismeretlen, ápolási károk. (itt is mintavételek!)

TÖRZSKÁROK: törzstaplók (fajok) golyvák, rákos sebek, fekélyek (fajok), kéregtetűk, pajzstetű, xylofág rovarok, fagyléc, fagyrepedés, villám, kéregsebzések, héjaszás, törzstörés, viharkár, széldöntés, honyomott törzs, vadkár-hántás, rágás, vadkár-dörzsölés, vadkár-törés, korhadt ággöcs, bélkorhadás, avartűz okozta kár, villásodás, homokverés. (mintavételek!)

GYÖKFŐ- GYÖKÉRKÁROK bekorhadt tuskó, gyökérkárosító gombafajok, egyéb gomba, avartűz nyomai, közelítési sérülés, pajorkár, vadkárok, xylofág rovarok, golyva, rákos sebek. (mintavételek!)

A felvételek során minden egyedileg megfestett fa a vizsgálat tárgyát képezte. Ennek során tehát nem csupán a felvételi adatlapok kitöltése történt meg, de mintagyűjtések is történtek. Valamennyi olyan esetben, amikor az illető kárfeleség meghatározása a későbbiekben fontosnak tűnt, mintát vettünk a laboratóriumi vizsgálatok céljára. Az egyedi jelölés lehetővé tette, hogy ezen mintavélet helyekről szükség esetén megismételhessük a minták gyűjtését. Ezeknek a mintáknak a határozási eredményei segítettek jobban feltárni a kár- és kórokozók jelenlétét, egyes hazai szempontból fontosabb (*Dothichiza populea*, *Melampsora* sp.) fajok esetleges életmódváltozásait nyárasainkban.

2.2. KÓROKOZÓK IZOLÁLÁSA, BEGYŰJTÉSE, TENYÉSZETEK KÉSZÍTÉSE, LABORATÓRIUMI TÁROLÁSA

Természetesen minden lehetséges kór- és károkozót szeretnénk volna begyűjteni. A kutatás megkezdésekor azonban fontossági sorrendet kellett felállítanunk annak érdekében, hogy a legveszélyesebb kórokozók vonatkozásában valóban pontos adataink legyenek, ezek alapján a következőket tartottuk a legfontosabbnak begyűjteni:

Nyár kéregfekély:

Cryptodiaporthe populea (Sacc.)Butin imp.: *Dothichiza populea* Sacc. et Briard

A fák törzsén és az ágakon kerek vagy hosszúkas kéreg-besüppedések képződnek ólomszürke elszíneződéssel. A kéreg alatti szöveti részek elbarnulnak, megfeketednek, elhalnak. Az elhalást követően hamarosan megjelennek a gomba ivartalan, 1-2 mm nagyságú fekete piknidiumai. Erős fertőzés főleg csemetekertekben fordul elő és a vesszők pusztulását okozhatja. Idősebb fákban a kéreg enyhe besüppedése, sötétedése jelzi a fertőzést. Tavasszal a növekvő foltok szegélye világos-barna és feketés elpusztult részeket tartalmaz. A kéreg néhány hét alatt felreped. Sűrűn tartott állományokban és fiatal csemetéken az ágak tövén, rügyek környékén a levélripacsokon keresztül történik a fertőzés. A fertőzéshez nagyon lényeges a növények turgorcsökkenése, gyengültsége. A dugványok 20% vízvesztése már kedvező feltételeket teremt a kórokozónak.

Nyárkéregpusztulás:

Cytospora chrysosperma (Pers.)Fr. perf.: *Valsa sordida* Nits

Cytospora nivea (Hoffm.)Sacc. perf.: *Leucostoma niveum* (Fr.)Höhn

A nyárak elhaló kérgén jelennek meg a gombára nagyon jellemző fonalszerű narancssárga konidiospórák. Megjelenésük ott várható, ahol elpusztult, besüppedt kéreg van. Amíg a sárga konidiospórák nem jelennek meg, a kórkép nagyon hasonlít a kéregfekély kórképéhez. A kórokozók elleni megelőző védekezés csak anyatelepeken szükséges.

Táptalajok:

A kórokozók izolálása a Korhonen-féle (malátakivonat 10 g és agar 15 g 1000 ml csapvizben) és a Pagony féle (maláta 30 g, glükóz 20 g, KH₂PO₄ 2 g, agar 16 g 1000 ml csapvizben) táptalajon, a továbbiakban az izolátumok fenntartása a Pagony-féle táptalajon történt.

A határozáshoz használt irodalmak:

Bánhegyi J.; Tóth S.; Ubrizsi G.; Vörös J. (1985): Magyarország mikroszkópikus gombáinak határozókönyve. Akadémiai kiadó Bp.

Butin H. (1996): Krankheiten der Wald-und Parkbaume. G.T.Verlag Stuttgart, New York

Nyárrozsdagombák:

Melampsora larici-populea Kleb.; *Melampsora allii-populea* Kleb.

A levelek színén világoszöld foltosodás, a fonákon pedig narancssárga kolóniák formájában jelennek meg a gomba uredotelepei. A fertőzés időpontja nyár vége. A lehullott leveleken tavasszal jelennek meg a kórokozó teleutotelepei majd a bazidiospórák a köztesgazdanövényeket (*Larix* ill. *Allium* fajok) fertőzik, és nyár végén jelenik meg a gomba uredo alakja a fő gazdanövény levelein. Az ismételt fertőzésnek kitett érzékenyebb klónok legyengülnek, és másodlagos fertőzést szenvedhetnek. A kórokozó elleni megelőző védekezés anyatelepeken szükséges.

A gyűjtemény fenntartása:

Minden esetben uredosporák begyűjtése történt meg, azok gyűjteményben tartása folyamatosan -82 C°-on történik Eppendorf-csővekben. Arra különös gondot fordítottunk, hogy csak egy uredotelep 'termése' kerüljön egy mintába. Ez a tervezett további – a fajok illetve a faj alatti egysége meghatározása - vizsgálatok miatt különösen fontos volt.

A határozáshoz használt irodalmak:

Taris, B. (1968): Contribution a l'étude des rouilles des *Populus* observées en France. Ann. Épiphyties, 1968, 19, (I), pp.: 5-54.

Lanier, L.; Joly, P.; Bonboux, P.; Bellemre, A. (1978): Mycologie et pathologie Forestieres. Masson, Paris, New York, Barcelona, Milan. 1978.

2.3. LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK

Törzskárosítók:

Táptalajok, telepmorfológia, növekedésvizsgálat

Mindhárom törzskárosító vonatkozásában a már jelzett Korhonen és Pagony-féle táptalajokon végeztünk növekedési vizsgálatokat és 14 napig naponta mértük a növekedésüket. Az adatok összegzése növekedési görbéken történt. Az összesen 154 izolátum esetében az eltérő termesztő körzetek izolátumait vetettük először össze, majd a három kórokozó eltérő ökológiai környezetből származó izolátumainak az így kapott 'átlag-növekedésgörbéjét' ábrázoltuk egy grafikonon jelen zárójelentésben. (Mindhárom kórokozó esetében a Tiszántúlról, a Duna-Tisza közéről és a Dunántúlról származó izolátumok együttese képezett egy-egy csoportot.)

Melampsora fajok:

A fajok határozása

A kórokozók meghatározását, a várhatóan két faj szétválasztását egyrészt az uredospórák és a parafízisek morfológiai különbözősége Tavis (1968), valamint azok irodalomból ismert méretek alapján alapján végeztük el.

Morfometria

Ismert, hogy az uredospórák mérete alapján a két faj szétválasztható, azonban ezek a mérési adatok a megfelelő irodalmakban szerzőkként eléggé változó értékeket mutatnak. Ezért fontosnak tartottuk, hogy a gyűjtés során készült preparátumok pontos mérési adatai is feldolgozásra kerüljenek. A mérések során minden minta esetében tíz-tíz uredospóra hossz és keresztmetszet értéke, valamint a kettő aránya szolgált a statisztikai feldolgozás tárgyául.

Levélszűrő módszer

Miután terepi felvételek során megismertük az egyes nyárfajták biotikus és abiotikus stressztoleranciáját kíváncsiak voltunk egyetlen kórokozóval, a *Melampsora* fajokkal szembeni toleranciájukra. A vizsgálat során a levélszűrő módszert alkalmaztuk Singh és Heather (1981) munkája nyomán. Ennek során a levelekből kivágott azonos méretű levélszűrők speciális tenyésztő edénybe kerültek, ahol a steril közegben desztillált víz felületén úsztak, így biztosítottuk az uredospórák számára a megfelelő körülményt a kicsírázáshoz. A provokatív fertőzés során az azonos koncentrációt mikroszkóp és Bürker kamra segítségével biztosítottuk. A spórák kijuttatása steril desztillált vízben szuszpendálva történt. Az elvégzett provokatív visszafertőzést követően a tenyésztő edények termosztált helyiségbe kerültek - szabályozott fény-, hőmérséklet- és páratartalom közé. A kiértékelés során az első uredotelepek megjelenése dátumától minden nap leszámolásra kerültek a kicsírázott spórákból kialakult telepek. A vizsgálatot addig folytattuk, amíg az uredotelepek száma már nem növekedett tovább. A vizsgálat időtartama átlagosan a fertőzéstől számítva 20-30 napig tartott.

2.4. MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATOK

Nemesnyárfajták eltérő fogékonysága kapcsán a növények molekuláris vizsgálata

A fenotípusos vizsgálatokat egyrészt tehát terepi felvételek valamint a laboratóriumi levélszűrő módszerrel is elvégeztük. Az így megvizsgált fajtából kerültek kiválasztásra a molekuláris vizsgálatra szánt eltérő toleranciájú fajták (nagyon fogékonny, közepesen fogékonny és toleráns). A molekuláris vizsgálatok céljára 12 mintát hoztunk létre, valamennyi

klón önállóan képezett egy-egy mintát és a három fogékonysági csoportból is készítettünk három összetett mintát (poolt). Ennek a 12 mintának a vizsgálatát végeztük el molekulárisan. Azt feltételeztük, hogy a fenotípusosan jól leírható különbözőségeket a genotípus molekuláris vizsgálata során is igazolni tudjuk. Ennek érdekében a klónokat illetve a három jól elkülöníthető fogékonysági csoportot jellemeztük molekulárisan RAPD módszerrel.

DNS izolálás

Az izolálás a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) használatával történt. A DNS minőségét és mennyiségét agaróz gélen ellenőriztük és miután megfelelőnek ítéltük, ezt használtuk templát DNS-ként a RAPD analízis során.

RAPD analízis

A RAPD reakciókat BioRad i Cycler készülékben végeztük. A 0,2 ml-es PCR csövekben a következő komponenseket mértük össze: 10-20 ng templát DNS, 6 pM primer, 1x-es koncentrációjú PCR puffer, 2 mM MgCl₂, 0,75 μM dNTP és 1,2 egység Taq polimeráz (Promega). Végterfogat 10 μl. A következő reakció-lépéseket állítottuk be: 2 perc 94 °C majd 40 x ismétlődően: 10 s 94°C, 30 s 36°C, 1 perc 72 °C végül 2 perc 72 °C Az alkalmazott primerek a következők voltak: OPU08, OPX11, OPZ14, OPK01, OPD05, OPA04, OPG10, OPG18, UBC354.

Futtatás, festés, értékelés

Az amplifikáció eredményét horizontális, 1,2 %-os (FMC) agaróz gélelektroforézissel elemeztük etidium-bromidos festést alkalmazva. Az értékelés során a mintázatok közül csak a fő sávokat vettük figyelembe. A kiértékeléshez és a dendrogrammok elkészítéséhez statisztikai szoftvercsomagot használtunk.

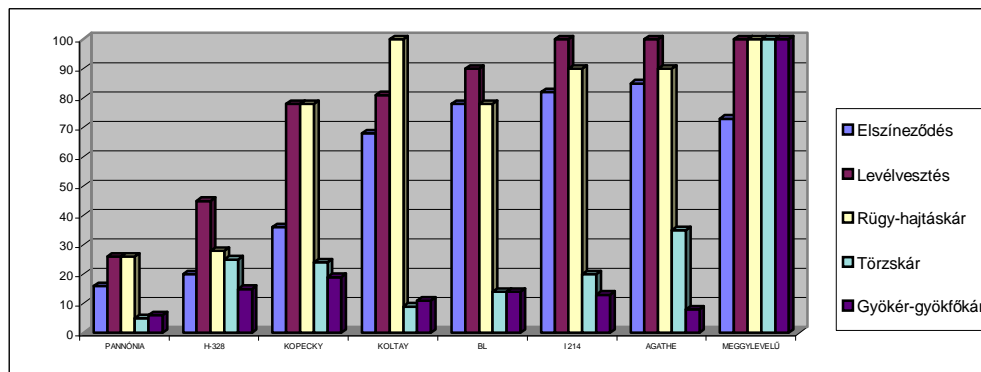
A Melampsora fajok molekuláris vizsgálata

Munkánk során nagy jelentőséget tulajdonítottunk a fajok azonosításának nemcsak a klasszikus módszerek, de molekuláris módszerek alkalmazásával is. Tervezett munkánknek elsődleges oka az a feltételezésünk volt, hogy a *M. larici-populina* Nyugat-Európából már ismert eltérő patogenitású rasszai hazánkban is jelen lehetnek. Feltételezésünket előzetes terepi felvételezések illetve laboratóriumi levélkorongos módszer vizsgálati eredményeinkre alapoztuk. A vizsgálat első lépése a DNS izolálás komoly nehézségekbe ütközött. Az uredospórákból próbáltunk megfelelő mennyiségű DNS-t kivonni, erre azonban az irodalomban nagyon kevés adat volt, illetve a talált módszerek nem voltak alkalmasak. Először a növényanyag vizsgálatánál már bevált DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)-et használtuk, sikertelenül. Majd megpróbálkoztunk az irodalomban talált módszerekkel (Pei, 1977, 2000,). A legtöbb esetben azonban sikertelenül. Valójában a legtöbb recept 10 mg uredospórából indult és ez nem volt egészen világos. Zavarunk tárgya a következő volt. Amennyiben nagy biztonsággal akarunk egy fajt meghatározni, azt egyetlen uredotelep 'termésének' a vizsgálatával tehetjük csak és megítélésünk szerint akár 1 mm távolságban kicsírázott másik uredospóra telepe már lehet egy másik faj telepe. Egyetlen uredotelep 'termése' pedig a legritkább esetben éri el a 10 mg-os mennyiséget. Maximum 100-200 db uredospórát lehet egyetlen telepről begyűjteni. Úgy tűnt azonban, hogy ez nagyon kis mennyiség a DNS izolálásához. Végül Tian et al. (2004) munkája nyomán leírt módszer előkészítési szakaszát módosítottuk és így sikerült a DNS izolálás. A módosítás lényege, hogy a uredospórákat nem üveglapok között próbáltuk összetörni, hanem különböző méretű üvegyöngyökkel végeztük a sejtfal feltörését.

3. EREDMÉNYEK

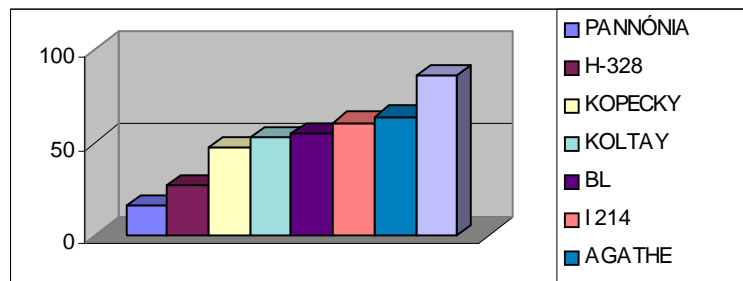
3.1. TEREPI FELVÉTELEK ÉS MINTAGYŰJTÉS

A terepi vizsgálatok eredményeinek összegzése során a célunk az volt, hogy a nemesnyárfajták biotikus toleranciáját megállapítsuk. Nem tartottuk fontosnak jelen vizsgálat során az egyes eltérő termőhelyi adottságú területek adatainak összehasonlítását, számunkra a legfontosabb az volt, hogy az egyes fajták között fogékonysági csoportokat tudjunk kialakítani. A kapott eredmények segítettek kiválasztani azokat a fajtákat, változatokat, amelyek a legfogékonyabbnak mutatkoztak a biotikus stresszhatásokkal szemben. Természetesen az adatok ilyen jellegű összegzése csupán tendenciájában igaz, ám jelen céljaink elérése érdekében ez elegendőnek mutatkozott.



1. ábra. Nemesnyár fajták eltérő biotikus stressztoleranciája különböző károkkal szemben.

A különböző fajták felvételi adatainak összegzése alapján jól érzékelhető a lényeges különbség az egyes nyárfajták fogékonysága között (1.ábra). Ha az összes terepi felvételek során összegyűjtött adatot összegezzük, az alábbi ábrát készíthetjük el (2. ábra).



2. ábra. Nemesnyár fajták eltérő biotikus stressztoleranciája.

Az ábra alapján már jól kiválasztható a nyárfajtáknak az a három fő csoportja, amely a nagyon fogékony, közepesen fogékony és toleráns jelzőkkel illelhető. Ezzel tulajdonképpen az általános biotikus stresszel szembeni fogékonyságot illetve toleranciát jellemeztük és a későbbi molekuláris vizsgálatokhoz előzetes eredményekkel rendelkezünk a vizsgált fajták vonatkozásában.

3.2. IZOLÁLÁS, GYŰJTEMÉNY, A TENYÉSZETEK LISTÁJA

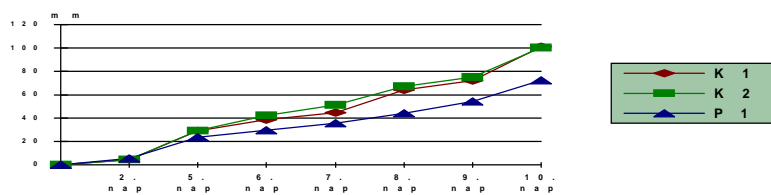
A kórokozók begyűjtése után csak azok a törzsek kerültek gyűjteménybe – természetesen – amelyek pontos határozása megtörtént. Az alábbi táblázat (2. táblázat) fajonként, nyártermesztő körzetenként tartalmazza a jelen kutatási periódus alatt összegyűjtött és gyűjteménybe került izolátumok számát.

2. táblázat. A kutatási periódus alatt gyűjteménybe került izolátumok.

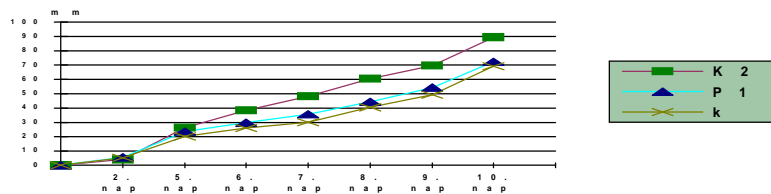
Kórokozó faj:	Származási hely:	Minta illetve izolátum (db):	Összes izolátum (db)
<i>Dothichiza populea</i>	Tiszántúl	32 (<i>Dot1.-Dot32.</i>)	84
<i>Dothichiza populea</i>	Duna-Tisza köze	22 (<i>Dot1.-Dot22.</i>)	
<i>Dothichiza populea</i>	Dunántúl	30 (<i>Dot1.-Dot30.</i>)	
<i>Cytospora nivea</i>	Tiszántúl	14 (<i>Cytniv1.-Cytniv14.</i>)	36
<i>Cytospora nivea</i>	Duna-Tisza köze	10 (<i>Cytniv1.-Cytniv10.</i>)	
<i>Cytospora nivea</i>	Dunántúl	12 (<i>Cytniv1.-Cytniv12.</i>)	
<i>Cytospora chrysosperma</i>	Tiszántúl	13 (<i>Cytcry1.-Cytcry13.</i>)	38
<i>Cytospora chrysosperma</i>	Duna-Tisza köze	11 (<i>Cytcry1.-Cytcry11.</i>)	
<i>Cytospora chrysosperma</i>	Dunántúl	14 (<i>Cytcry1.-Cytcry14.</i>)	
<i>Melampsora larici-populea</i>	Tiszántúl	62	215
<i>Melampsora larici-populea</i>	Duna-Tisza köze	24	
<i>Melampsora larici-populea</i>	Dunántúl	129	
<i>Melampsora allii-populea</i>	Tiszántúl	44	131
<i>Melampsora allii-populea</i>	Duna-Tisza köze	21	
<i>Melampsora allii-populea</i>	Dunántúl	66	

3.3. LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK

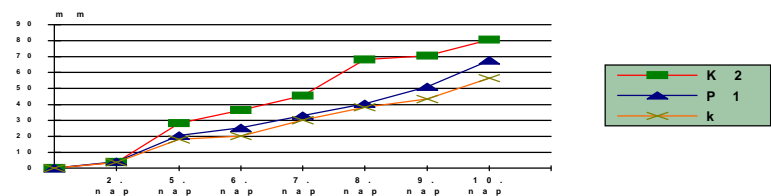
Törzskárosítók növekedésgörbéi:



A begyűjtött *Dothichiza populea* törzsek növekedési görbéi eltérő ökológiai és termőhelyi környezetben. Jelmagyarázat: K1= Tiszántúl; K2=Duna-Tisza köze; P1=Dunántúl



A begyűjtött *Cytospora chrysosperma* törzsek növekedési görbéi eltérő ökológiai és termőhelyi környezetben. Jelmagyarázat: K2= Tiszántúl; P1=Duna-Tisza köze; k=Dunántúl



A begyűjtött *Cytospora nivea* törzsek növekedési görbéi eltérő ökológiai és termőhelyi környezetben. Jelmagyarázat: K1= Tiszántúl; K2=Duna-Tisza köze; P1=Dunántúl

Melampsora fajok:

A fajok határozása, a két faj szétválasztása mikromorfológia alapján

A két *Melampsora* faj meghatározása nyomán minden eddigi hazai adattól eltérően azt az eredményt kaptuk, hogy lényegében két faj okozza szinte azonos arányban a megbetegedéseket, kissé eltérő ökológiai igényüknek megfelelően szinte felosztották egymás között az országot a következőképpen:

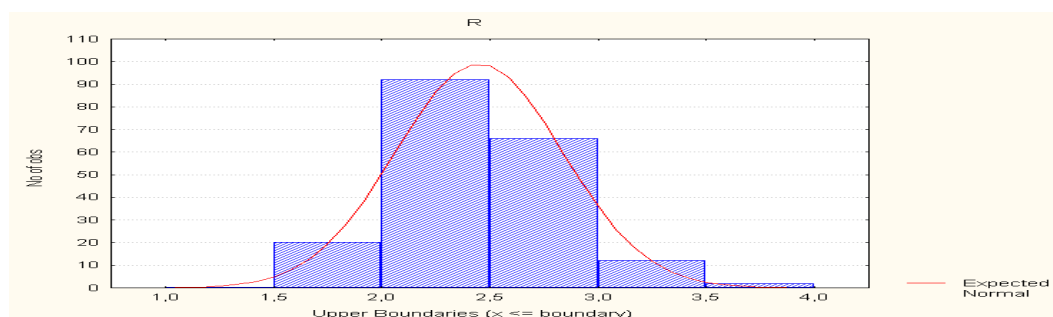
	<i>Melampsora</i>	<i>allii-populina</i>	<i>M. larici-populina</i>
Tiszántúl a 106 mintából:	44 db	62 db	
	42%	58%	
Duna-Tisza köze, a 45 mintából:	21 db	24 db	
	45%	55%	
Dunántúl, a 195 mintából:	66 db	129 db	
	34%	66%	
ÖSSZESEN 346 mintából:	131 db	215 db	
	38%	62%	

Ha ezekből az adatokból kivesszük a két nagy csemetekert adatát és csupán az állományok illetve kísérleti parcellák adatait összegezzük, akkor a következőt kapjuk:

	<i>Melampsora</i>	<i>allii-populina</i>	<i>M. larici-populina</i>
A Dunától keletre:	58%	42%	
A Dunától nyugatra:	45%	55%	

Morfometia

A 346 db mintából kiválasztott 100 db minta preparátumának a vizsgálata történt meg. Ennek során minden preparátum esetében 10-10 spóra mérését végeztük el és ennek eredményét láthatjuk a következő grafikonon:



3. ábra A morfometriai adatok feldolgozásának eredménye

Levéلكorong módszer

A levéلكorongos módszerrel a rosdagombákkal szembeni laboratóriumi fenotípusos vizsgálatokat a következő fajtákon végeztük el és az alábbi eredményt kaptuk (3. táblázat):

3. táblázat Nemesnyárfajták eltérő fogékonyságú csoportjai

TOLERÁNS	KÖZEPESEN FOGÉKONY	NAGYON FOGÉKONY
Hoogvorst	Beaupre	74 006
I273	Blanc de P.	Agathe
Koltay	Ghoy	Bl
Kopeczky	I214	Raspalje
Meggylevelű	I-45/51	Robusta
Pannónia	Kornik	Sudár
S-299-3	Parvifol	Unal
	S 298-8	
	Triplo	

3.4. MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATOK

A fajták és eltérő fogékonyságú pooljaik molekuláris vizsgálata:

A molekuláris vizsgálatra szánt fajták kiválasztása során a rozsdagombákkal szembeni fogékonyság mellett további szempontokat is figyelembe vettünk, így a hazai köztermesztésben elfoglalt helyük, ismert fontos egyéb tulajdonságaik, jellemzőik illetve a saját terepi felvételek során összegyűjtött adatok. A 4. sz. táblázatban az előbbieken jelzettek, továbbá saját vizsgálati adataimat illetve az irodalmi adatokat összegeztem. A táblázatban szereplő értékek bizonyos adatok vonatkozásában elsősorban gyakorlati tapasztalatokra támaszkodik és a jobb átláthatóság kedvéért csupán három kategóriát alkalmaztunk. Ennek ellenére igen szemléletesen mutatja, hogy határozottan elválasztható az egyes fajták betegségekkel szembeni ellenálló képessége, illetve az egyéb, számunkra fontos tulajdonsága. Ha ezt a táblázatot nézzük, azt mondhatjuk, hogy teljesen indokoltnak látszik a 'Pannónia' térhódítása, hiszen minden tekintetben a legkiválóbbnak tűnik a hazai adatok alapján. Az adatok hasonlóképpen alátámasztják a 'Kopeczky' jelentős helyét a köztermesztésben. Ezen adatok alapján nem feltétlenül alátámasztott a másik két jelentős fajta köztermesztésben elfoglalt helye, mindenesetre gyakorlati jelentőségük miatt esett rájuk a választás.

4. táblázat. Nemesnyár fajták biotikus és abiotikus stressztoleranciája

A köztermesztésben elfoglalt területaránya:		I.	II.	III.	IV.	V.
'Pannonia'	49%	1	1	1	1	1
'Agathe-F'	13%	3	3	3	2	1
'I- 214'	9%	3	2	3	2 (3)	2
'Kopeczky'	8%	1	1	1(2)	1(2)	2 (1)

I. : a rozsdagombákkal szembeni fogékonysága (1.= nem érzékeny; 2.= közepesen érzékeny és 3.= fogékony a betegséggel szemben)

II. : a törzskárosítókkal szembeni fogékonysága (1.= nem érzékeny; 2.= közepesen érzékeny és 3.= fogékony a betegségekkel szemben)

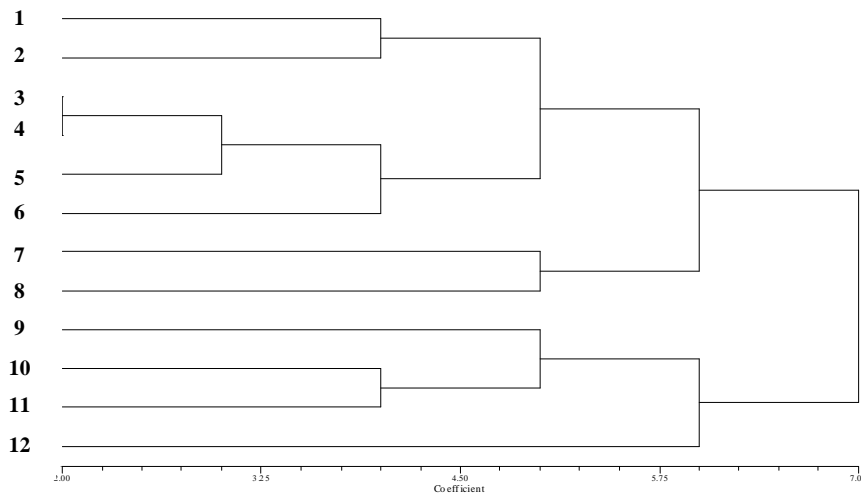
III.: fagyérzékenysége (1.= nem fagyérzékeny; 2.= közepesen fagyérzékeny és 3.= fagyérzékeny)

IV.: termőhellyel szembeni igénye (1. = széleskörűen alkalmazható; 2. = viszonylag jól alkalmazkodik a számára kedvezőtlenebb termőhelyi körülményekhez is és 3. = jó fatermés csak a számára kedvező termőhelyi körülmények között várható el tőle)

V.: fatermés, faminőség (1. = kiváló; 2. = jó és 3.= csak a fajta számára megfelelő körülmények között képes a jó fatermésre)

A köztermesztésben nem szereplő fajtákat elsősorban az irodalomból ismert rozsdafogékonyságuk miatt választottuk ki (Frey, Pinon 1997; Pinon et al. 1987; Pinon 1992; Steenackers 1982; Szántó 2000). Ezek alapján a genotípusos vizsgálatra a következő fajtákat választottuk, illetve poolokat alakítottuk ki:

Toleráns:	Közepesen fogékony:	Nagyon fogékony:
Pannonia (1)	I 214(11)	Agathe(4)
Kopeczky(9)	Ghoy(3)	Raspalje(8)
Hoogvorst(10)	76 004(7)	Robusta(5)
Toleráns pool(2)	Közepes pool(12)	Fogékony pool(6)



4. ábra A fajták és fogékonysági pooljaik mintáinak UPGMA dendrogramja a Nei (1978) féle genetikai távolság formula alapján:

A fajták rövid jellemzése saját tapasztalataink és irodalmi adatok szerint:

1. 'Pannónia' (*P. deltoides* x *P. nigra*)

A *Melampsora* fajok okozta levélrozsdára nem érzékeny, a *Marssonina* okozta levélfoltosodásra enyhén érzékeny, a kéregfekély megbetegedésre, továbbá a fagykárosodásra nem érzékeny. Szinte minden szempontból egyike a legjobbnak ítélt fajtának, a legnagyobb területet foglalja el a nyártermesztésben.

2. 'Kopeczky' (*P. deltoides* x *P. nigra*)

A *Melampsora* fajok okozta levélrozsdára nem érzékeny, kifejezetten ellenálló; a *Marssonina* okozta levélfoltosodásra közepesen érzékeny, a kéregfekély megbetegedésre nem érzékeny, továbbá a fagykárosodással szemben sem nagyon érzékeny. A köztermesztésben kedvelt, igen jónak ítélt fajta.

3. 'Hoogvorsth' (*P. trichocarpa* x *P. deltoides*)

A *Melampsora* fajokkal szembeni igen magas toleranciája közismert. Az irodalmi adatok alapján egyike azon klónoknak, amely a kórokozó immár egyre agresszívebb rasszainak – nevezetesen a csupán néhány éve megjelent **E6.** számúnak – a támadását is képes tolerálni. A

kórokozó rasszainak elválasztásánál igen fontos szerepe van a laboratóriumi vizsgálatok során.

4. 'I-214' (*P.deltoides* x *P.nigra*)

A *Melampsora* fajok okozta levélrozsdával szemben közepesen érzékeny – inkább csak csemetekertben, a kéregfekély megbetegedésre szintén közepesen fogékony – de inkább csak kedvezőtlenebb termőhelyi és környezeti viszonyok esetén. A korai és késői fagyokra érzékeny.

5. 'Ghoy' (*P. deltooides* x *P. nigra* /*P.x euramericana*/ x *P. nigra*)

A levélkórokozókkal szemben közepesen fogékony, törzskárosítókkal szemben ellenállóan ismert fajta. Termesztési adataink nincsenek, irodalmi adatok alapján azonban ismert, hogy éppen a *Melampsora* fajokkal szemben speciális fogékonysággal rendelkezik – csupán az **E4.** számú rasszal szemben fogékony.

6. '76004' (*P.trichocarpa* x *P.deltoides* /='Beauprè'/ x *P.deltoides*)

A levélrozsdával szemben közepesen fogékony, törzskárosítókkal szemben ellenállóan ismert fajta. Termesztési adataink nincsenek, irodalmi adatok alapján azonban ismert, hogy éppen a *Melampsora* fajokkal szemben speciális fogékonysággal rendelkezik – csupán az **E3.** számú rasszal szemben fogékony.

7. 'Agathe' (*P.deltoides* x *P.nigra*)

A *Melampsora* fajok okozta levélrozsdával szemben igen érzékeny, mindenképp a csemetekertekben, de a kiültetést követően 1-3. évben az erdősítésekben is (mindenütt, ahol a környezeti adottságok vagy sűrű ültetés folytán a talajközeli, 3-4 m-nyi légréteg erősen párás, szellőtlen). A károsítás súlyos következménye lehet, hogy a kellően be nem fásodott hajtások *Dothichiza* megbetegedésre és fagykárosodásra erősen érzékennyé válnak. Fagytűrő képessége egyébként megfelelő lenne.

8. 'Raspalje' (*P.trichocarpa* x *P.deltoides*)

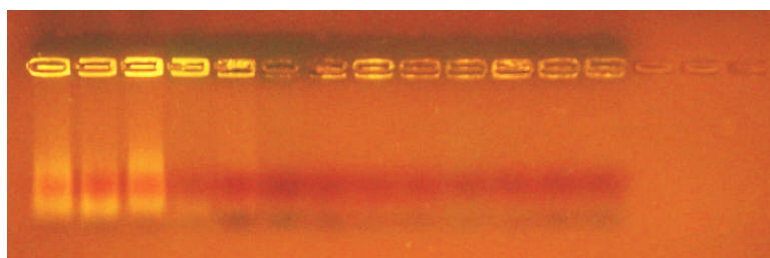
A *Melampsora* fajok okozta levélrozsdára és a *Marssonina* okozta levélfoltosodásra enyhén érzékeny, a kéregfekély megbetegedésre, továbbá a fagykárosodásra érzékeny. A köztermesztésbe elsősorban betegségekkel szembeni fogékonysága miatt nem tudott elterjedni.

9. 'Robusta' (*P.deltoides* x *P.nigra*)

A hazai köztermesztésben a 20-as években nagy területet foglalt el, de betegségekkel szembeni fogékonysága hamar kiderült. Teljesen kiszorult a termesztésből. Teszt fajtának tekinthetjük mind a szabadföldi, mind pedig a laboratóriumi vizsgálatok során. A *Melampsora* fajok valamennyi rasszával szemben igen magas fogékonyságot mutat.

Az uredospórák molekuláris vizsgálata:

Az irodalomban talált (Tian et al., 2004) módszer előkészítési szakaszának az átdolgozására volt szükség. Az uredospórák sejtfalának a feltörését extraháló oldat mellett két üveglap közötti összetöréssel is kiegészítették a szerzők. Ebben az esetben azonban szinte mindig elvesztettük a minták jó részét. Mivel mi csupán 100-200 db uredospórát használtunk egy mintának, lényeges volt, hogy minden spóra továbbkerüljön. Az üveglapos törés helyett kétféle méretű üvegyöngyöt (0,3 és 0,5 mmØ) használtunk a mechanikai töréshez az extraháló oldattal együtt. Az üvegyönggyel együtt történt a Wortexes keverés a 37C° –os és a 96C°-os inkubálás alatt is. Ezzel a módosítással a DNS izolálás sikeresen megtörtént. Ennek eredményéről agaróz gélen győződünk meg, a gél képén jól látható, hogy elegendő DNS-t sikerült izolálnunk a későbbi vizsgálatokhoz.



5. ábra. A DNS izolálás eredménye agaróz gélen

4. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE, KÖVETKEZTETÉSEK

4.1. A NEMESNYÁR FAJTÁK FENOTÍPUSOS VIZSGÁLATA, TEREPI FELVÉTELEK ÉS LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK

A terepi felvételek során nyert adatokkal célunk az volt, hogy a nemesnyárfajták későbbi molekuláris vizsgálatához eltérő fogékonyságú csoportokat tudjunk kialakítani (ld. 1. táblázat). Az első szembetűnő eredmény a klónok határozott szétválása érzékeny, kevésbé érzékeny és egyáltalán nem érzékeny csoportokra; függetlenül attól, hogy a vizsgálat az országnak mely pontján, csemetekertben vagy állományban történt (1. ábra). A legkevésbé érzékeny klónok - Koltay, Kopeczky, Pannónia, S 299-3 és az I 273 - annyira nem voltak fogékonyak a betegségre, hogy például a három magyar nemesítésű klónról további vizsgálatokra csak nagyon nehezen sikerült mintát begyűjteni az egyes kórokozók közül (2. ábra). A biotikus és az abiotikus stressztolerancia vizsgálata során a köztermesztésben elfoglalt helyükkel szinte teljesen paralell eredményt kaptunk. Hiszen a szinte egyeduralkodó Pannónia foglalja el a nyárterületek legnagyobb százalékát a köztermesztésben és a többi magyar nemesítésű fajta is ilyen területet foglal el. Az Agathe-F térfoglalása azonban megkérdőjelezhető. Különösen ha figyelembe vesszük azt az ismert tényt, hogy ennél a klónnál már voltak problémák a törzskárosító kórokozók vonatkozásában is. Egyértelműnek tűnik az összefüggés e klón hazai körülmények közötti fogékonysága a rozsdagombák, és más kórokozók fertőzésével szembeni. A fajták rozsdafogékonyságával kapcsolatosan érdemes kiemelni azt, hogy minden vizsgált klón azonos mértékben volt fogékony például mind a derecskei mind pedig a bajti csemetekertben. Ez azt látszik igazolni, hogy a rozsdagomba fertőzésével szemben nem elsősorban a termőhely a meghatározó, hanem az egyes klónok egyéni fogékonysága. Igazolva látszik tehát az a tény, hogy a betegséggel szembeni rezisztencia kérdése elsősorban genetikai adottság. Természetesen igen fontos kérdés a termőhely a kórokozó fertőzőképessége szempontjából, hiszen az eltérő környezeti tényezők befolyásolhatják kedvezően és kedvezőtlenül az illető faj fejlődését, így fertőzőképességét. Mégis ebben a vizsgálati sorozatban egyértelműnek látszik, hogy az eltérő termőhelyi adottságok között az egyes klónok szinte teljesen azonosan válaszoltak valamely *Melampsora* faj támadásával szemben. Mindenesetre a vizsgálat eredményeként egyrészt sikerült kiválasztani 9 klont a további molekuláris vizsgálatához, továbbá nagyszámú laboratóriumi izolátum-gyűjteményt sikerült létrehozni egyes kórokozók közül (2. táblázat)

A laboratóriumi vizsgálatok sorában elsőként indítottuk el a törzskárosító fajok tenyésztésének növekedésvizsgálatát. Ennek eredményei nyomán arra a következtetésre jutottunk, hogy nincs lényeges különbség a begyűjtött izolátumok növekedésgörbéi között. Mind a morfológiai, mind pedig a növekedési vizsgálatok eredménye arra enged következtetni, hogy a hazai *Dothichiza populea*, a *Cytospora chrysosperma* és a *Cytospora*

nivea populáció viszonylag egységes. A fajok patogenitása között nem látszik különbség. Külön öröm volt, hogy a nagyon veszélyes – karantén károsító – baktériumos kéregrák okozóját a *Xathomonas populi*-t jelen kutatási periódus alatt még csemetekertekből sem tudtuk izolálni (2.táblázat).

Kutatási munkánk során elsődleges célunk az volt, hogy a nemesítést segítő új információkat, a gyakorlatban is jól használható módszert mutathassunk fel a fajták biotikus toleranciájával kapcsolatosan. Megítélésünk szerint ezt az eredményt a *Melampsora* fajok vizsgálata során értük el. A fajták fenotípusos vizsgálata során nyert tapasztalatunk arra enged következtetni, hogy a rozsdagombákkal szembeni fogékonyság igen szorosan korrelál más biotikus kórokozóval szembeni toleranciával, fogékonysággal. Ugyanakkor a rozsdagombákkal szembeni fogékonyság vizsgálatára egy igen egyszerű laboratóriumi módszer áll a rendelkezésünkre. Eddigi vizsgálati eredményeink alapján nyugodtan mondhatjuk, hogy amennyiben a nemesítés eredményeként kapott fajtajelölt közepesen, vagy ennél jobban fogékony a *Melampsora* fajokkal szemben, akkor nem érdemes vele tovább foglalkozni, mert nagy a valószínűséggel a jóval veszélyesebb törzskárosítókkal szemben is hasonló módon fog viselkedni.

A nemesnyárfajták ellenálló képességének fenotípusos vizsgálatát követően a *Melampsora* fajok pontos azonosítását ítéltük a legfontosabbnak. A fajok határozása során valamennyi minta esetében (egy minta jelen esetben egy nyárklónról begyűjtött fertőzött levelet jelent) 10-10db, egyetlen önálló uredotelepből készült preparátum vizsgálata volt a célunk. A határozás során a klasszikus morfológiai módszerek mellett alkalmaztunk egy morfometriai módszert is (3.ábra). Az volt a célunk, hogy az irodalomból ismert méretadatokat is pontosítsuk. Ennek eredményeként egyértelműnek látszik, hogy valóban csak két nagy csoportra volt osztható a hazai *Melampsora* populáció. A mikromorfológiai különbségek (az uredospórák alakja és a parafízisek morfológiája) alapján végzett fajhatározás eredménye alapján megállapíthatjuk, hogy a hazai fertőzéseket két faj okozza. Az is bizonyosnak látszik, hogy a “vezető” szerep a *Melampsora larici-populina* -é. Fontos új információ, hogy a másik rozsdagombafaj, a *Melampsora allii-populina* is igen jelentősen okolható a megbetegedések okozásáért. Ez az információ különösen érdekes, hiszen eddig azt gondoltuk, hogy csupán egy rozsdagombafaj okozza a betegséget és a szakirodalomból már mindkét fajnak ismertek eltérő patogenitású törzsei, rasszai. Ha pedig ezen irodalmi ismeretek nyomán feltételezzük, hogy a *Melampsora larici-populina* több rassza fertőz hazánkban a faj által elfoglalt régióban, akkor kézenfekvőnek látszik egy másik feltételezés is, nevezetesen hogy azokon a területeken, amelyeken a *M. allii-populina* a gyakoribb faj jelen lehet ennek a fajnak is az irodalomból ismert több faj alatti egysége. Mindenesetre sok kérdés merült fel vizsgálatok eredményei nyomán és éppen az eltérő rasszok jelenlétére utaló kérdések, ezért nagyon fontosnak ítéltük, hogy mielőbb tisztázzuk a hazai rozsdafertőzés kórokozójának pontos meghatározása kérdését. Ezért kezdtük meg a *Melampsora* fajok molekuláris vizsgálatát is.

4.2. A NEMESNYÁR FAJTÁK GENOTÍPUSÁNAK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA

A fajták molekuláris vizsgálatával az volt a célunk, hogy a RAPD módszer alkalmazása során különböző irodalomból ismert primerek használatával találjunk olyat, amelyik polimorf mintázatot eredményez és amelynek a segítségével a *Melampsora* fajokkal szembeni fogékonyságot illetve toleranciát molekulárisan jellemezhetjük, illetve hogy lehetőség szerint találjunk olyan primert, amely azután markerként lesz alkalmazható a *Melampsora* fajokkal szembeni tolerancia jellemzésére a különböző nemesnyár fajták esetében. A fenotípusos vizsgálatok eredményeként kiválasztott 9 nemesnyár fajta és a *Melampsora* fajok okozta levélrozsdával szembeni fogékonyság alapján kialakított 3 pool, azaz összesen 12 minta vonatkozásában (3.táblázat) arra voltunk kíváncsiak, hogy vajon a véletlenszerűen kiválasztott

RAPD primerek segíthetnek-e a kórokozó elleni tolerancia genetikai markerezésében. A kapott géleken megjelenő fragmentumok értékelése során az egy-egy primer esetében talált azonos fragmentum mintázatokat csoportosítottuk és az így kapott adatsort egy mátrixba foglaltuk. A továbbiakban azt a gondolatmenetet követtük, hogy ha megpróbáljuk megállapítani ezen csoportok rokonsági fokát, valójában arra keressük a választ, hogy a fenotípusosan kialakított fogékonysági csoportok genotípusosan is igazolhatók-e. Ha ugyanis az elkészített mátrix alapján kialakult dendrogramon a különböző fogékonysági csoportok jól elkülöníthetők, genotípusosan is igazoltnak tekinthetjük a fenotípusosan kialakított fogékonysági csoportokat. Munkánk elején természetesen annak a lehetőségét sem vetettük el, hogy a véletlen primerek használata során találunk olyat, amely alkalmas lesz a *Melampsora* fajokkal szembeni tolerancia markerének. A futtatások eredményei alapján azonban már látszott, hogy erre kicsi az esélyünk. A továbbiakban tehát a fogékonysági csoportokat szerettük volna genotípusosan is igazolni, ezért a mátrix alapján a Nei (1978) féle genetikai távolság formula, UPGMA dendrogram szerkesztési eljárás populáció genetikai analízist alkalmaztuk. Az első futtatások eredménye nyomán úgy ítéltük meg, hogy két primer vonatkozásában – OPA04 és OPG18 – viszonylag kis polimorfizmust találtunk még a többi primerhez képest is, ezért a két jelzett primert kihagytuk és csak a maradék négy adatait felhasználva készítettünk egy újabb mátrixot és ez alapján újabb dendrogramot. A vizsgálat eredményeként kapott ábrán (4.ábra) két fő klaszter csoportot és a klasztereken belül további alcsoportokat különíthetünk el. Az egyik fő klaszterbe a 'Kopecky', a 'Hoogvorst', az 'I-214' és a közepesen fogékony pool mintája tartozik. A másik fő klaszterbe tartozik a többi vizsgált minta. Amit itt rögtön tapasztalhatunk, hogy valamennyi nagyon fogékony minta ebben a klaszterben található. Összességében elmondható, hogy az eredmények értékelése nem könnyű, az alkalmazott primerek nem adtak egyértelmű választ feltett kérdésünkre. Munkánk során kapott eredmények alapján csak azt állíthatjuk biztosan, hogy a módszer alkalmas lehet megfelelő számú primer használata esetén arra, hogy bizonyos tulajdonságok esetében markereket találjunk. A téma kidolgozásakor azért választottuk a RAPD analízis módszert, mert viszonylag kis mennyiségű templát DNS-t, kis műszerezettséget igényelnek és a szükséges technika sem túl nehéz. Továbbá az is közrejátszott döntésünkbe, hogy az irodalmi adatok biztatóak voltak ebben a témában. Castiglione et al. (1993) három *Populus* szekcióba (Aigeiros, Tacamahaca és Leuce) tartozó 10 fajt (32 klónt) vizsgált RAPD módszerrel. Lin et al. (1997) 55 nyár klón (8 nyárfaj és hibrid) vizsgálatakor szintén a RAPD analízist alkalmazta és hasonló eredményeket kapott. A vizsgált 17 primer közül 4 tette lehetővé a különböző fajok és hibridek megkülönböztetését. Törjék et al. (2000-2001) kísérletei bizonyították, hogy a RAPD módszer sikeresen alkalmazható a *Populus* klónok közötti különbségek meghatározására. Ezen eredmények hatására próbálkoztunk meg azzal, hogy a RAPD módszer segítségével egy tulajdonságot, egy bizonyos kórokozóval szembeni biotikus stressz toleranciát vizsgáljunk. Az eredmény azt valószínűsíti, hogy a módszer alkalmas lehet arra, hogy markert találjunk. Ám az is igazoltnak látszik, hogy jóval több primert kellene megpróbálnunk. A vizsgálati sorozatban alkalmazott 10 primer közül egy sem bizonyult alkalmasnak arra, hogy markerként alkalmazhassuk a *Melampsora* fajokkal szembeni fogékonyság kimutatására.

Természetesen fel lehetne sorolni a RAPD módszer korlátait, hiányosságait – az amplifikáció eredményeként kapott sávmintázat viszonylag rossz reprodukálhatósága, vagy az, hogy a feltárható polimorfizmus viszonylag kis mértékű és a markerek az esetek túlnyomó részében domináns jellegűek. Mégis, a kapott eredményeket biztatónak ítélnéljük és véleményünk szerint további primerek bevonásával meg van az esélye annak, hogy markereket találjunk e módszer segítségével. A RAPD analízis mellett fontosnak tartanánk további módszerek kipróbálását is. A fejlettebb PCR alapú technikákra a rövid random primerek és „relaxált” amplifikációs paraméterek helyett specifikus primerek és szigorú

amplifikációs paraméterek alkalmazása a jellemző. Ezek közül az AFLP technika több marker azonosítását teszi lehetővé, de a módszer nagyobb technikai felszereltséget és anyagi ráfordítást igényel. A nyár klónok elkülönítésében talán a lókuszt-specifikus és multialléles SSR primerek lehetnek a leghatékonyabbak. Egyelőre azonban még csak kevés ilyen marker áll rendelkezésünkre (Dayanandan et al. 1998).

4.3. A MELAMPSORA FAJOK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA

A fenotípusos vizsgálatok eredményei, a laboratóriumi levélkorongos visszafertőző kísérletek, irodalmi ismereteink alapján egyre biztosabbnak tűnt, hogy hazánkban is jelen vannak a *Melampsora* faj (fajok?) eltérő patogenitású rasszai. A következőkben csak néhány saját tapasztalatot:

- Az Ogy-n és a Rap-on találtunk *Melampsora larici-populina*-t, ez azt kellene, hogy jelentse, hogy itt az E2-es rasszról lehet szó, hiszen az eddigi ismeretek szerint ezek a klónok az E2-es rasszal szemben fogékonyak.
- Az S 9-2-es klónról begyűjtött *M. larici-populina* esetében az feltételezhető, hogy ez a kórokozónak az E4-es rassza, hiszen ez a klón csupán erre a rasszra fogékony.
- Ugyanezt látszik alátámasztani az is, hogy a Gibecq-ről is izoláltunk *M. larici-populina*-t és ebben az esetben is igaz, hogy csak az E4-es rasszra fogékony a fajta.
- A Gaver-ről izolált minták valamennyi *M. alli-populina*-nak bizonyult. Itt megint egy olyan klónról van szó, amely csak a *M. larici-populina* E4-es rasszával szemben fogékony, mivel azonban itt a másik fajt izoláltuk a levelekről, az is feltételezhető, hogy már ennek a fajnak is vannak eltérő patogenitású rasszai.
- A levélkorongos módszer laboratóriumi alkalmazása során az ország különböző részén gyűjtött *M. larici-populina* mintákkal végeztünk visszafertőző kísérleteket. Ennek során egyes rozsda minták esetében komoly fertőzéseket sikerült provokálni a rozsdafertőzésre egyáltalán nem fogékony Pannónia fajtán. Ennek az eredménynek is lehet magyarázata az, hogy ezekben az esetekben a kórokozó jóval patogénebb rasszával fertőztünk.

Mindezen felmerült kérdések tették fontossá, hogy megkezdjük az uredospórák molekuláris vizsgálatát is. Az irodalomban talált módszerek közül többet kipróbáltunk, sikertelenül. Végül egy irodalomból leírt módszert saját tapasztalatok nyomán módosítottunk és ennek az alkalmazásával sikerült megfelelő mennyiségű DNS-t izolálnunk

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A nemesnyárasok fenotípusos vizsgálatát végeztük el terepi felvételek során nyert adatok összegyűjtésével, amely adatok feldolgozásával célunk az volt, hogy a nemesnyár fajták későbbi molekuláris vizsgálatához eltérő biotikus stresszel szembeni fogékonyságú csoportokat tudjunk kialakítani. Munkánk nyomán azt tapasztaltuk, hogy a különböző klónok határozottan szétválaszthatók voltak érzékeny, kevésbé érzékeny és egyáltalán nem érzékeny csoportokra függetlenül attól, hogy a vizsgálat az országnak mely pontján, csemetekertben vagy állományban történt.

A nemesnyárasokban megbetegedéseket okozó törzs- és lombkárosító fajokból nagyszámú törzsgyűjteményt állítottunk fel, amelynek laboratóriumi vizsgálata történt meg. Ennek nyomán az látszik igazoltnak, hogy a törzskárosító *Dothichiza populea* törzsek populációja egységes képet mutat természetű körzettől függetlenül, azaz nem valószínű, hogy hazánkban az irodalomból ismert eltérő patogenitású rasszai kialakultak volna a kórokozónak. Körülbelül ugyanez mondható el *Cytospora chrysosperma* és a *Cytospora nivea* populációra. Azt is elmondhatjuk, hogy nyárasainkban nem igazán a törzskárosítók okozzák a fő problémát. Ez

nagy valószínűséggel összefügg azzal a ténnyel, hogy a termesztők nagy gondossággal választják ki az illető termőhelyre legalkalmasabb fajtát.

Nemesnyárasokban előforduló kórokozók között jelentős szerep jut a levélrozsdat okozó *Melampsora* fajoknak. Az erdősítésekben és állományokban is mindenütt előforduló levélkórokozók hazánkban károsító fajtái a *Melampsora larici-populina* és a *Melampsora allii-populina*. A nemesített fajták eltérő toleranciával rendelkeznek a kórokozókkal szemben és nagyon fontos ismernünk a köztermesztésben szereplő fajták fogékonyságát. Munkánk során megállapítottuk a legjelentősebb köztermesztésben szereplő fajták fogékonyságát a *Melampsora* fajok károsításával szemben. Kialakítottunk eltérő fogékonyságú csoportokat és azon csoportokat molekulárisan vizsgáltuk. Célunk volt, hogy a RAPD módszer alkalmazása során különböző irodalomból ismert primerek használatával találjunk olyat, amelyik polimorf mintázatot eredményez, és amelynek a segítségével a *Melampsora* fajokkal szembeni fogékonyságot illetve toleranciát molekulárisan jellemezhetjük.

A *Melampsora* fajok meghatározása után fontosnak tartottuk a hazánkban előforduló taxonok molekuláris vizsgálatának az elvégzését. Feltételeztük ugyanis, hogy mindkét faj vonatkozásában már az itthoni állományokban is előfordulhat a kórokozónak az irodalomból már jól ismert eltérő patogenitású rasszai, amelyek jóval nagyobb patogenitással rendelkeznek. A munka során saját módszer kidolgozásával sikerült DNS- izolálnunk a kórokozó uredospóráiból (5.ábra).

A kutatási priódus alatt tehát az alábbi eredményeket értük el:

- nagyszámú terepi felvétel során általános biotikus stressz-tolerancia vizsgálatot végeztünk az ország különböző nyártermesztő körzetében különböző nyárfajták bevonásával,
- megállapítottuk egyes nemesnyár fajták eltérő fenotípusos toleranciáját a kórokozók okozta megbetegedéssel szemben,
- nagyszámú mintagyűjtés eredményeként laboratóriumi izolátum gyűjteményt hoztunk létre a nyárak törzskárosítóiból, így *Dothichiza populea*, a *Cytospora chrysosperma* és a *Cytospora nivea* fajokból további laboratóriumi vizsgálatok céljára
- laboratóriumi növekedésvizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy a jelzett kórokozók hazai populációja egységes, nem alakultak ki a fajoknak eltérő patogenitású rasszai
- jelen vizsgálati periódus alatt nem sikerült izolálni a nagyon veszélyes – karantén károsító – baktériumos kéregrák kórokozóját a *Xathomonas populi*-t,
- minősítettünk egyes nemesnyárfajták rozsdagomba fertőzéssel szembeni toleranciáját szabadföldi vizsgálatok és laboratóriumi provokatív visszafertőzési kísérletek (a levélkorong módszer alkalmazásával) során,
- az eredmények alapján jellemeztük és kiválasztottuk azokat a klónokat, amelyek a *Melampsora* fajokkal szembeni fogékonyság alapján három különböző csoportba voltak sorolhatók
- a fenotípusos vizsgálatok eredményeként kiválasztott nemesnyár fajtákból DNS-t izoláltunk, majd a RAPD analízis alkalmazásával a három fogékonysági csoportot molekulárisan jellemeztük
- az uredospórák és a parafizisek morfológiája alapján megállapítottuk, hogy hazánkban két *Melampsora* faj, a *M. larici-populina* és a *M. allii-populina* tehető felelőssé a rozsdagomba-fertőzésekért nemesnyárasainkban
- morfometriai módszerrel vizsgáltuk a begyűjtött *Melampsora* populációt, az uredospórák méretei és arányszámai alapján megállapítottuk, hogy a két faj

morfológiai határozásával azonosan csak két csoport volt elkülöníthető a nemzetségen belül

- megkezdjük a *Melampsora* fajok molekuláris vizsgálatát, új módszer kidolgozásával sikeresen izoláltunk DNS-t az uredospórákból

6. A KUTATÁS TOVÁBBI IRÁNYA

A nemesnyár fajták betegségekkel szembeni toleranciájának ismerete a nemesítői munka legfontosabb része. Az ilyen irányú kutatásoknak elsődleges feladata olyan módszerek kidolgozása, amellyel a nemesítők munkáját segíti. A módszereknek pedig a fajtajelöltek, új fajták minősítésében kell segíteniük. A rozsdagombákkal szembeni tolerancia vizsgálati módszere egy ilyen módszer. Egyrészt maga a rozsdagombával szembeni növényi tolerancia, vagy fogékonyság már az egyéb biotikus kórokozókkal szembeni toleranciára is rámutat, másrészt maga a levélkorongos módszer olcsó, könnyű és gyorsan kivitelezhető exakt laboratóriumi módszer. Természetesen napjaink molekuláris technikái között meg van a lehetősége annak, hogy egy molekuláris módszert dolgozzunk ki ennek a vizsgálatára is. Mindezek mellett igen nagy a jelentősége annak, hogy tudjuk milyen kórokozóval állunk szemben. Nem elegendő tehát csak nemzetség szintig ismerni a kórokozót, biztosan tudnunk kell, mely fajjal, esetleg annak melyik nagy patogenitású rasszával szemben kell védekeznünk. A kutatási periódus alatt szerzett tapasztalataink alapján tehát a kutatás további céljai a következők:

- nemesítési alapanyagok folyamatos vizsgálata a levélkorong-módszer segítségével, a módszer gyakorlati bevezetése a nemesítői gyakorlatba;
- genetikai marker keresése a nemesnyárfajták illetve nemesítési alapanyagok rozsdagombákkal szembeni toleranciája molekuláris jellemzésére;
- a hazai *Melampsora* populáció molekuláris feldolgozása, elsősorban annak eldöntése érdekében, hogy vajon valóban csak két fajjal, vagy a fajok eltérő patogenitású rasszaival állunk szemben.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- ÁESZ (2002): Magyarország erdőállományai 2001. Állami Erdészeti Szolgálat kiadványa. Budapest, 2002.
- Bagaméry G. (1997): A nyárok és fűzek növényvédelme. Budapest, 1997. OMMI kiadvány.
- Bánhegyi J.; Tóth S.; Ubrizsi G.; Vörös J. (1985): Magyarország mikroszkópikus gombáinak határozókönyve 2.köt. Akadémiai kiadó Bp.
- Barrett, J.W., Rajora, O.P., Yeh, F.C.H., Danick, B.P., Strobeck, C. (1993): Mitochondrial DNA variation and genetic relationships of *Populus* species. *Genome*, 36:87-93.
- Boccone, A. (1975) Differenze chemiotassonomiche tra specie e cloni di pioppo a livello del contenuto in flavoni. *Cellulosa e Carta*, 27:89-46.
- Borovics A. – Gergác J.- Bordács S.-Bach I. . (2001): A fekete nyár (*Populus nigra* L) faji identitásának és genetikai változatosságának vizsgálata. VII. Növénynevelési Tudományos Napok. 2001. január 23-24. Magyar Tudományos Akadémia, Bp. p:47.
- Bradshaw, H.D., Villar, J.R., Watson, M., Watson, B.D., Otto, K.G., Stewart, S., Stettler, R.F. (1994): Molecular Genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of hybrid poplar composed of RFLP, STS and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 89:167-178.

- Castiglione, S., Wang, G., Damiani, G., Bandi, C., Bisoffi, S., Sala, F. (1993): Identification of elite poplar (*Populus* ssp.) clones using RAPD fingerprints. *Theor. Appl. Genet.*, 87:54-59.
- Cellerino, G.P. (1966) Prove di lotta contro la Marssonina brunnea del pioppo. *Cellulosa a Carta*. Róma, 4: 1-16.
- Cervera, M.T., Villar, M., Faivre-Rampant, P., Goué, M.C., Montagu, M.V., Boerjan, W. (1997): Application of molecular marker technologies in *Populus* breeding. In: Klopfenstein, N.B., Chun, Y.W., Kim, M.S., Ahuja, M.R. (Eds.), *Micropropagation, Genetic Engineering, and Molecular Biology of Populus*. Gen Tech Rep RM-GTR-297:101-115.
- Cheliak, W.M., Dancik, B.P. (1982): Genetic diversity of natural populations of a clone-forming tree, *Populus tremuloides*. *Can. J. Genet. Cyt.*, 24:611-616.
- Dayanandan, S., Rajora, O.P., Bawa, K.S. (1998): Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Theor. Appl. Genet.*, 96:950-956.
- Dinus, R.J., Tuskan, G.A. (1997): Integration of molecular and classical genetics: A synergistic approach to tree improvement. In: Klopfenstein, N.B., Chun, Y.W., Kim, M.S., Ahuja, M.R. (Eds.) *Micropropagation, Genetic Engineering, and Molecular Biology of Populus*. Gen Tech Rep RM-GTR-297:220-235.
- Fladung, M. (1998): Die Bedeutung bio- und gentechnologischer Verfahren für die Forstpflanzenzüchtung. In: *Vorträge für Pflanzenzüchtung 43, Biotechnologie in der Pflanzenzüchtung – Potentielle und aktuelle Nutzung – 4. GPZ-Tagung, 3.-5. März 1998 Giessen*. p. 124-133.
- Frey, P.; Pinon, J. (1997): Variability in pathogenicity of *Melampsora allii-populina* expressed on poplar cultivars. *E.J.For.Path.* 27 (1997)397-407.
- Gergác J. – Simon M. – Tóth B. (1986): A rezisztencia a használati érték növelésére, a hazai termőhelyi lehetőség gazdaságosabb kihasználására alkalmas új nemesnyár-fajtajelöltek, javaslat a fajtasortiment bővítésére. *Erdészeti Kutatások Bp.* 78:3548.
- Gergác J. (1967): *Marssonina* károsítás nyárákon. *Erdő*. Budapest, 16. 7:304-308.
- Gergác J. (1975): Az Aigeros szekcióba tartozó nyárak levél és kéreg-megbetegedései és az ellenük való védekezés. *Kandidátusi disszertáció*. 1975.
- Gergác J. (1995): Nyár génállományunk bővítése, különös tekintettel a betegség-ellenállóságra és a termésbiztonságra. 1390 sz. OTKA zárójelentés.
- Gergác, J. (1975): Nyár anyatelepek és csemeték védelme levélkárosító gombákkal szemben. *Növényvédelem*, XI.évf. (1975)2, 75-80.
- Greenway, W., Jobling, J., Seaysbrook, T. (1989): Composition of bud exudates of *Populus x interamericana* clones as a guide to clonal identification. *Silvae Genet.*, 38:29-32.
- Hajósné Novák Márta (szerk.) (1999): *Genetikai variabilitás a növénynemesítés-ben*. Mg. kiadó Bp.
- Haracsi, L. (1969): *Erdészeti növénykórtan* Akadémiai Kiadó Bp.
- Heinze B. (1997): A PCR marker for a *Populus deltoides* allele and its use in studying introgression with native European *Populus nigra*. *Belgian Journal of Botany* 129: 123-130.
- Hyun, O.J., Rajora, O.P., Zsuffa, L. (1987): Genetic variation in trembling aspen in Ontario based on isoenzyme studies. *Can. J. Genet. Cyt.*, 17:1134-1138.
- Kalandra, A. (1962): Skodlivy vyskyt korni spály na topolech v ceskych krajich v CSSR. *Práce VULHM, Praha*, 24: 275-303.
- Keim, P., Paige, K.N., Whitham, T.G., Lark, K.G. (1989): Genetic analysis of an interspecific hybrid swarm of *Populus*: occurrence of unidirectional introgression. *Genetics*, 123:557-565.
- Keresztes B. (szerk.) (1978): *A nyárak és a fűzek termesztése*. Mg. Kiadó Bp. 1978.
- Kiss, J. (1999): *Biotechnológiai módszerek fejlesztése és alkalmazása a hazai nyárfanemesítésben*. Doktori értekezés. Szent István Egyetem Gödöllő.
- Kiss, J., Kondrák, M., Törjék, O., Kiss, E., Gyulai, G., Mázik-Tőkei, K., Heszky, L.E. (2000): Morphological and RAPD analysis of poplar trees of anther culture origin. *Euphytica*, 118:213-221.

- Kopecky, F. (1958): Korszerű nyárfatermesztés. Országos Erdészeti Főigazgatóság
- Lanier, L., Joly, P., Bonboux, P., Bellemère, A. (1978): Mycologie et pathologie Forestières. Masson, Paris, New York, Barcelona, Milan. 1978.
- Lin, D.C., Hubbes, M., Zuffa, L. (1997): Differentiation of poplar clones using random amplified polymorphic DNA fingerprinting. In: Klopfenstein, N.B., Chun, Y.W., Kim, M.S., Ahuja, M.R. (Eds.), Micropropagation, Genetic Engineering, and Molecular Biology of *Populus*. Gen Tech Rep RM-GTR-297:116-123.
- Liu, Z., Furnier, G.R. (1993): Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. Theor. Appl. Genet., 87:97-105.
- Lund, S.T., Furnier, G.R., Mohn, C.A. (1992): Isoenzyme variation in quaking aspen in Minnesota. Can. J. Forest Res., 22:521-524.
- Magnani, G. (1965): Indagini sulla eventuale specializzazione fisiologica in *Melampsora allii-populina* Kleb. Cent.Sper.Agric.For. 8, 128-133.
- Magnani, G. (1965): Indagini sulla eventuale specializzazione fisiologica in *Melampsora allii-populina* Kleb. Cent.Sper.Agric.For. 8, 128-133.
- Marinkovic, P. (1968): Epifitocia *Marssonina brunnea* u rasadnicima Euramerickih topola u 1967. Godini. Topola Beograd. 12. 67-68.: 14-18.
- Marinkovic, P. (1968): Epifitocia *Marssonina brunnea* u rasadnicima Euramerickih topola u 1967. Godini. Topola Beograd. 12. 67-68.: 14-18.
- Mátyás Cs. (1986): Nemesített erdészeti szaporítóanyag-ellátás. AK. Bp.
- Mátyás Cs. (szerk.) (2002): Erdészeti – természetvédelmi genetika. Mezőgazda Kiadó Bp.
- Mejnartowicz, M. (1991): Inheritance of chloroplast DNA in *Populus*. Theor. Appl. Genet., 82:477-480.
- Nemky E. (1968): Erdészeti Nemesítés. MK. Bp.
- Pagony H., Gergác J. (1972): Diseases of poplars caused by fungi in Hungary. Erd. Kut. Bp. 68. 93-99.
- Pagony, H. (szerk.)(1993): Erdei károsítók. Képes határozó. Erdőrendezési Szolgálat
- Pei, M.H.; Whelan, M.J.; Halford, N.J. and Royle, D.J.(1997): Distinction between stem- and leaf-infecting forms of *Melampsora* rust on *Salix viminalis* using RAPD markers. Mycol.Res. 101(1):7-10.
- Pei, M.H. and Ruiz, C. (2000): AFLP evidence of the distinctive patterns of life-cycle in two forms of *Melampsora* rust on *Salix viminalis*. Mycol.Res. 104(8):937-942.
- Pinon, J. (1992): Variability in the genus *Populus* in sensitivity to *Melampsora* rusts. Silvae Genet. 41, 25-34.
- Pinon, J.; Peulon, V. (1988): Mise en évidence d'une troisième race physiologique de *Melampsora larici-populina* en Europe. FAO-CIP Réunion du groupe de travail des maladies (Beijing, Chine, septembre 1988) 9 p.
- Pinon, J.; Van Dam, B.C.; Genetet, I.; De Kam, M. (1987): Two pathogenic races of *Melampsora larici-populina* in north-western Europe. E.J.For.Path.17(1987) 47-53.
- Pinon, J.(1973): Les rouilles du Peuplier en France. Eur.Jour.For.Path. 3(4): 221-228.
- Radetzky, R. (1990): Analysis of mitochondrial DNA and its inheritance in *Populus*. Current Genetics, 18:429-434.
- Rajora, O.P. (1989): Characterization of 43 *Populus nigra* L. clones representing selections, cultivars and botanical varieties based on their allozyme genotypes. Euphytica, 43:197-206.
- Rajora, O.P., Danick, B.P. (1995): Chloroplast DNA variation in *Populus*. I, II. Interspecific restriction fragment diversity within *Populus deltoides*, *P. nigra*, *P. maximowiczii* and *P. x canadensis*. Theor. Appl. Genet., 90:317-330.
- Rajora, O.P., Zuffa, L. (1989): Multilocus genetic structure, characterization and relationship of *Populus x canadensis* cultivars. Genome, 32:99-108.
- Rani, I., Parida, A., Raina, S.N. (1995): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. Plant Cell Reports, 14:459-462.

- Ride, M., Ride, S., Steenackers, M. and Steenackers, V. (1986): Artificial infection of different poplar clones with different geographical isolates of *Xanthomonas populi*. Med. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent, 51,(3b):1331-1345.
- Sharma, J.K.; Heather, W.A. (1976): Physiological specialisation in poplar leaf rusts *Melampsora medusae* Thum. and *M. larici-populina* Kleb. in Australia. FAO-CIP, Bordeaux, 6p.
- Singh, S.J. és Heather, W.A. (1981): An improved method for detached leaf culture of *Melampsora* leaf rusts of *Populus* species. Trans.Br.Soc. 77. (2),436-437. 1981.
- Solymos R., Mátyás Cs., Mészáros K., Faragó S., Holdampf Gy., Csóka P., Gémesi J., Telegdi P. (2001): Az erdőtelepítés helyzete és lehetőségei. A Nemzeti Erdőstratégia megalapozó tanulmánya. Sopron.
- Steenackers, M. (1988): Breeding poplars for rust resistance. Recent advances. Med. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent, 53,(2A):417-422.
- Steenackers, M. (1989): Study of the genetic diversity of the *Xanthomonas populi* (Ride) Ride and Ride population in Belgium. Mee.Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 54/2b: 611-617.
- Steenackers, M. (1991): The phytosanitary state of poplars in Belgium in 1991. Parasitica, 1991, 47,(2-3): 129-136.
- Steenackers, V. (1982): Nouvelle race physiologique de *Melampsora larici-populina* en Belgique (communication provisoire). FAO/CIP, 22^e réunion du Groupe de travail des maladies, Casale-Monferrato, 6-10 septembre 1982, 6 pp.
- Steenackers, V. (1982): Nouvelle race physiologique de *Melampsora larici-populina* en Belgique (communication provisoire). FAO/CIP, 22^e réunion du Groupe de travail des maladies, Casale-Monferrato, 6-10 septembre 1982, 6 pp.
- Steimel, J.; Chen, W. and Harrington, T.C. (2005): Development and characterization of microsatellite markers for the poplar rust fungi *Melampsora medusae* and *Melampsora larici-populina*. Molecular Ecology Notes (Primer Note)
- Stettler, R.F., Bradshaw, H.D., Heilman, P.E., Hinckley, T.M. (1996): Biology of *Populus* and its implications for management and conservation. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, Ont.
- Szántó M. (2000): A nemesnyárákon megbetegedést okozó *Melampsora* fajok. Szakdolgozat. Sopron Erdészeti Növényvédelmi Szakmérnöki Szak.
- Szántó M., Steenackers, M. (1998): Előzetes adatok a nyárák levélrozsdáját okozó *Melampsora* fajok hazai előfordulásáról Erdészeti Kutatások Vol.88. p. 119-130.
- Szontágh P. (1990): A nyárák és a fűzek növényvédelme. Bp. 1990.
- Taris, B. (1968): Contribution a l'étude des rouilles des *Populus* observées en France. Ann. Épiphyties, 1968, 19, (I), pp.: 5-54.
- Taris, B. (1968): Contribution a l'étude des rouilles des *Populus* observées en France. Ann. Épiphyties, 1968, 19, (I), pp.: 5-54.
- Tian, C.M.; Shang, Y.Z.; Zhuang, J.Y.; Wang, Q. and Kakishima, M. (2004): morphological and molecular phylogenetic analyses of *Melampsora* species on poplars in China. Mycoscience (2004) 45:56-66.
- Tompa K. – Sziklai O. (1981): Erdészeti Növénynevelés. MK. Bp.
- Tóth B. (1996): Poplar growing in Hungary Budapest, ERTI
- Tóth B., Erdős L. (1988): Nyár fajtaismertető. Az Állami Gazdaságok Országos Egyesülése Erdőgazdálkodási és ffeldolgozási Szakbizottsága kiadványa.
- Törjék O., Kiss E., Kiss J., Bucherna N., Kondrák M., Gergác J., Heszky L. (2001): Magyarországon elismert nyár klónok molekuláris jellemzése. Erdészeti Kutatások Vol. 90. pp.:177-190.
- Ubrizsi G. /szerk./ (1965): Növénykórtan. II.köt. Akadémiai kiadó Bp.
- Ubrizsi G.; Vörös J. (1968): Mezőgazdasági Mikológia Akadémiai Kiadó, Bp.

- Vajna L. /szerk./ (1987): Növénypatogén gombák. Mg. Kiadó Bp.
- Van Vloten, H. (1949) Hybridization experiments with races of *Melampsora larici-populina* Kleb. Tijdschr. Pl. ziekten 55, 196-209.
- Villar, M., Lefevre, F., Bradshaw, H.D., Teissier du Cros, E. (1996): Molecular genetics of rust resistance in poplars (*Melampsora larici-populina* Kleb. / *Populus* sp.) by bulked segregant analysis in a 2 x 2 factorial mating design. Genetics, 143:531-536.
- Virtudazo, E.V.; Nakamura, H. and Kakishima, M (2001): Phylogenetic analysis of sugarcane rusts based on sequences of ITS, 5.8 S rDNA and D1/D2 regions of LSU rDNA. J. of Gen.Plant Pathol. 67:28-36 (2001)
- Virtudazo, E.V.; Nakamura, H. and Kakishima, M (2001): Ribosomal DNA-ITS sequence polymorphism in the sugarcane rust, *Puccinia kuehnii*. Mycoscience 42: 447-453.
- Wu, R.L., Han, Y.F., Hu, J.J., Fang, J.J., Li, L., Li, M.L., Zeng, Z.B. (2000): An integrated genetic map of *Populus deltoides* based on amplified fragment length polymorphisms. Theor. Appl. Genet., 100:1249-1256.