This special issue of the

6th International Plant Protection Symposium at University of Debrecen (= 17. TNF)
hold on 17-18 October 2012
and full papers were published originally in volume
„Journal of Agricultural Sciences 2012/50 Supplements”

Editors:

Dr. György J. Kövics
Dr. István Dávid

However this issue is **missing from series of „Acta Agraria Debreceniensis (AAD)”**, this issue has not published in AAD in spite of agreements

Please note that homepage of AAD No 50:

No 50 (2012)

Published December 16, 2012

contains irrelevant papers instead of original.

However, authors of this issue **should refer as „Journal of Agricultural Sciences 2012/50 Supplements”**
as can be found published here and available on **„Archives”** of own homepage:

**https://mek.unideb.hu/hu/bemutatkozas-novenyvedelmi-intezet**

University of Debrecen

# JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES
# 2012/50

## ACTA AGRARIA DEBRECENIENSIS

## 6th International Plant Protection Symposium at University of Debrecen

# SUPPLEMENT

**17-18 October 2012**

**Debrecen**

**Editors:**

Dr. György J. Kövics

Dr. István Dávid

**Lectors:**

Dr. András Bozsik (entomology, biological pest management)

Dr. Antal Nagy (entomology, ecology)

Dr. István Dávid (weed biology, weed management)

Dr. István Szarukán (entomology)

Dr. Gábor Tarcali (integrated pest management, plant pathology)

Gábor Görcsös (integrated pest management, molecular biology)

Dr. György J. Kövics (plant pathology)

Dr. László Irinyi (plant pathology, molecular biology)

Dr. László Radócz (integrated pest management, weed management)

**HU-ISSN 1588-8363**

## Contents

Kövics, G. J.: József Adányi awarded by „Antal Gulyás medallion for crop protection“ in 2012 (laudation) 5

Kövics, G. J.: Prof. István Szepessy awarded by „Antal Gulyás medallion for crop protection“ in 2012 (laudation) 8

Szőnyegi, S.: The Official Plant Health Control System – tasks to avoid getting in and spreading of non-native pests 11

Zsigó, Gy.: Observations of a plant protection expert of the capital 14

Apró, M. – Kelemen, A. – Csáky, J. – Papp, M. – Takács, A. P.: The occurrence of the wheat viruses in South Hungary in 2012 17

Chodorska, M. – Paduch-Cichal, E. – Kalinowska, E.: The detection and identification of *Tobacco ringspot virus* in blueberry bushes growing on plantations in Central Poland 20

Dolińska, T. M. – Schollenberger, M.: *Cladosporium* species as hyperparasites of powdery mildew fungi 24

Dolińska, T. M. – Schollenberger, M.: Parasiting of *Cladosporium* species on *Puccinia arenariae* 29

Jabłońska, E. – Wit, M. – Wakuliński, W.: Identification, occurrence and MAT locus structure of *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg population 33

Kalinowska, E. – Paduch-Cichal, E. – Chodorska, M.: BlScV detection and potential influence of the virus on phenolic profile of berries 37

Asadollahi, M. – Bódi Z. – Peles, F. – Sándor, E.: Antifungal activity of anthocyanins from purple field corn cob against *Botrytis cinerea* and *Fusarium* species 42

Mroczkowska, K. – Paduch-Cichal, E.: Genomic variability of movement protein of *Prune dwarf virus* 45

Szőke, Cs. – Virág, I. – Szalay, D. K. – Bónis, P. – Fenyvesi, L. – Marton, L. Cs. – Neményi, M.: Investigation of *Fusarium* ear rot symptoms on maize (*Zea mays* L.) using a spectroradiometer 50

Tóth, A. – Petróczy, M. – Hegedűs, M. – Nagy, G. – Lovász, Cs. – Ágoston, J. – Palkovics, L.: Development of plant protection technology against sour cherry anthracnose 54

Varga, I. – Baltazár, T. – Apró, M. – Poczai, P. – Hyvönen, J.: Optimizing conditions for sporulation of European mistletoe hyperparasitic fungus (*Phaeobotryosphaeria visci*): effect of light and different media 60

Végh, A. – Horváth, B. – Schwarzinger, I. – Palkovics, L.: Bacteriophages sensitivity of *Erwinia amylovora* isolates 67

Dar, M. A. – Rai, M.: Declining population of chestnut (*Castanea sativa* Mill) trees in Jammu & Kashmir State of India by natural and anthropogenic activities 72

Kovács, Cs. – Pepó, P. – Csajbók, J. – Borbélyné Varga, M. – Szilágyi, Sz. – Sándor, E. – Peles, F.: Mould-, *Fusarium*- and DON toxin contamination of wheat samples from Látókép, Hungary 76

Görcsös, G. – Tarcali, G. – Irinyi, L. – Radócz, L.: Molecular biology characterization of *Cryphonectria parasitica* (MURR.) BARR isolates from different Carpathian-Basin plots 84

Bittsánszky, A. – Rai, V. R. – Oros, G.: Strain dependent response of okra (*Abelmoschus esculentus* Moench) to soil-borne rhizoctonia infection 92

Schollenberger, M. – Felczak, K. – Borowska, K.: The effect of epiphytic bacteria on selected rust fungi 98

Sala-Rejczak, K. – Chodorska, M. – Nowak, P. – Paduch-Cichal, E. – Szyndel, M. S. – Latocha, P.: Occurrence of garlic and actinidia viruses in Poland 101

Tarcali, G. – Kövics G. J.: New data of *Ca*. Phytoplasma prunorum occurence in the Eastern part of the Carpathian-Basin 105

Salamon, P. – Nemes, K. – Salánki, K.: An unusual subgroup II *Cucumber mosaic virus* strain isolated from *Scopolia carniolica* in Hungary 111

Bozsik, A.: Mass occurrence of the citrus flatid planthopper (*Metcalfa pruinosa* (Say, 1830)) (Hemiptera: Flatidae) in an agricultural hedgerow at Gödöllő (Hungary) 115

Nagy, A. – Szarukán, I. – Lovász, E. – Dávid, I.: Study on the most important elaterid pests in Hungary 2012: species distribution and damage risk 119

Bónis, P. – Árendás, T. – Micskei, G. – Szőke, Cs. – Marton, L. Cs.: Effect of post-emergence herbicides on the chlorophyll content of maize inbred lines 127

Konstantinović, B. – Meseldžija, M. – Blagojević, M. – Samardžić, N. – Konstantinović Bo.: Quantitative and qualitative analysis of weed seed bank in row crops on the territory of Vojvodina 132

Dávid, I. – Kovács, E.: Herbicidal control of annual broadleaf weeds in sunflower 137

Kövesd, A. – Schwikker, Zs.- Szeprethy, T. – Börzsöny, T. – Bartosova, M. – Havlicek, J. –Schröder, M.: HERBS – training material of herbs for supporting agricultural SME-s 143

Márton, M. I. – Tarcali, G.: Development of integrated pest management in black elderbarry 145

Oros, G. – Naár, Z. – Magyar, D.: Comparative study of susceptibility of Hungarian wheat varieties to *Rhizoctonia* strains 152

Hafez, Y. M. – Bayoumi, Y. A. – Shalaby, T. A.: Pivotal role of hydrogen peroxide and biokal on seed germination, seedling growth and soil borne disease of cabbage and triploid watermelon 161

# Adányi József a „Gulyás Antal emlékérem a növényvédelemért” kitüntetettje, 2012 (laudáció)

# József Adányi awarded by „Antal Gulyás medallion for crop protection“ in 2012 (laudation)

**Kövics György J.**
Debreceni Egyetem AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet, Debrecen
kovics@agr.unideb.hu

***ÖSSZEFOGLALÁS***

*A Növényvédelem Oktatásának Fejlesztéséért Közhasznú Alapítvány (NOFKA) és a Magyar Növényvédő Mérnöki és Növényorvosi Kamara Hbm-i Területi Szervezete (Kamara) 2011. szeptemberében megalapította a közös Kitüntetési Bizottságot, amely a növényvédelem terén kiemelkedő teljesítményt nyújtó, példaértékű személyiségek erkölcsi megbecsülését kívánja szolgálni a „Gulyás Antal emlékérem” kitüntetés adományozásával „A Növényvédelemért”, melyet kiváló oktatók, kutatók, gyakorlati szakemberek nyerhetnek el.*

*2012-ben a „Gulyás Antal emlékérem a növényvédelemért” kitüntetettje **Adányi József** ny. okl. agrármérnök, növényvédelmi szakmérnök úr, aki **Dr. Szepessy István** professzor úrral (lásd: külön laudáció) egyidőben részesül az elismerésben a „gyakorlati növényvédelemben betöltött kiemelkedő életútjáért”.*

***SUMMARY***

*The Public Utility for Development of Crop Protection Teaching (NOFKA) and The Hajdú-Bihar County Regional Association of Hungarian Chamber of Crop Protection Specialists and Plant Doctors (Chamber) established a joined Award Committee in September of 2011, which intend to serve as moral appreciation to prominent persons with excellent achievements by awarding the „Antal Gulyás medallion for crop protection” which are available for outstanding teachers, researchers, and practical crop protection specialists.*

*In the year of 2012 to be decorated with the „Antal Gulyás medallion for crop protection” are **József Adányi** retired plant protection in engineer for his excellence in practical crop protection and **prof. István Szepessy** (his laudation available in a separate article).*

**Kulcsszavak:** Gulyás Antal emlékérem, kitüntetés, Adányi József életrajz
**Keywords:** Antal Gulyás medallion, award, József Adányi biography

## *BEVEZETÉS*

A kitüntetést **dr. Gulyás Antal** emlékezetének megőrzésére 2011-ben hozták létre, aki a debreceni növényvédelem jeles professzora volt, és több mint harminc éven át az agrárszakemberek oktatásában és a tudományos kutatásban ért el kimagasló eredményeket. A Növényvédelem Oktatásának Fejlesztéséért Közhasznú Alapítvány (NOFKA) és a Magyar Növényvédő Mérnöki és Növényorvosi Kamara Hbm-i Területi Szervezete (Kamara) megalapította a közös Kitüntetési Bizottságot, amely a növényvédelem terén kiemelkedő teljesítményt nyújtó, példaértékű személyiségek erkölcsi megbecsülését kívánja szolgálni a „Gulyás Antal emlékérem” kitüntetés adományozásával „A Növényvédelemért”, melyet kiváló oktatók, kutatók, gyakorlati szakemberek nyerhetnek el.

A Kitüntetési Bizottság 2012-ben úgy határozott, hogy két kitüntetést nyújt át: **Adányi József** ny. okl. agrármérnök növényvédelmi szakmérnök úrnak a „gyakorlati növényvédelemben betöltött kiemelkedő életútjáért”. Vele egyidejűleg **Dr. Szepessy István** professzor úr (lásd: külön laudáció) is részesül a „Gulyás Antal emlékérem a növényvédelemért” elismerésben, aki 2012. augusztusában töltötte be 85. életévét.

## *ADÁNYI JÓZSEF ÉLETRAJZA*

*1. ábra:* **Adányi József portré (2012)**

*Figure 1: Portrait of József Adányi (2012)*

Adányi József okl. agrármérnök, növényvédelmi szakmérnök a Magyar Növényvédő Mérnöki és Növényorvosi Kamara Hajdú-Bihar Megyei Területi Szervezetének tagja 1938. március 14-én született Temesváron, Erdélyben. Gyermekkora egy részét Kolozsváron töltötte, majd 1944-ben – a Román kapituláció után – Budapestre költöztek.

Édesapja, Adányi Mihály a vasútnál szolgált, Hajdúhadház állomásfőnöke volt. Édesanyja, Sisak Erzsébet alkalmazott volt Kolozsváron az Erdélyi Gazdáknál. 1940-ben, amikor a Bécsi döntés értelmében Erdély egy részét visszacsatolták Magyarországhoz, szülei a házukat elcserélték egy kolozsvári házra és repatriáltak. Kolozsváron 4 évig éltek, amikor jött a második világháború. Szülei érezték, hogy ha magyarok akarnak maradni, ott kell hagyni mindent. A visszavonuló német csapatokkal eljöttek, és a háborút Budapesten vészelték át.

Adányi József iskoláit Budapesten a Mária Terézia téri általános iskolában kezdte, de mivel édesapját lehelyezték Hajdúhadházra állomásfőnöknek, az általános iskola 8 osztályát ott fejezte be.

1952-56 között a középiskoláit a Debreceni Fazekas Mihály Gyakorló gimnáziumban járta. Édesapját az akkori rendszer „B"listára tette és állásából elbocsátották.

A gimnázium után, még abban az évben, a debreceni Mezőgazdasági Akadémiára vették fel. 1960-ban szerezte meg az agrármérnöki diplomát. Főleg a növénytermesztés és azon belül is a növényvédelem érdekelte.

A főiskola befejezése után első munkahelye 1960-ban a Szabolcs-Szatmár megyei kállósemjéni Növényvédő Állomás volt, melynek akkori igazgatója dr. Nagy Bálint volt, aki később a minisztérium főosztályvezetője lett. Kezdetben körzeti felügyelő, növényegészségügyi ellenőr, majd laborvezető beosztásokban dolgozott.

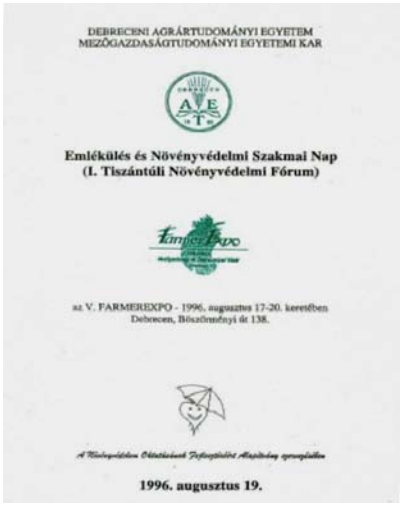
Tanulmányai folytatásaként 1963. február 01-én a Gödöllői Agrártudományi Egyetemen növényvédelmi szakmérnök képzésben részesült, és szerzett növényvédelmi szakmérnök oklevelet. Ehhez még a budapesti KÖJÁL-nál gázmesteri vizsgát is tett.

Ezt követően 1964 és 1973 között a Hajdú-Bihar megyei Növényvédő Állomáson, mint karantén főfelügyelő dolgozott.

1969-ben megnősült, felesége Gyarmati Ilona Klára szintén szakmabeli, aki a Keszthelyi Felsőfokú Technikumban szerzett növényvédelmi felsőfokú oklevelet. A házasságukból egy fiúgyermek született, aki ma urológus szakorvos Nyíregyházán.

1973-ban alakult meg a nádudvari Kukorica és Iparinövény Termelési Együttműködés (KITE), ahová növényvédelmi mérnököt kerestek. Adányi József körzeti felügyelőként kezdett, majd ágazatvezető, főágazatvezető volt 1989-ig. 1989-ben a részvénytársasággá átalakuló KITE-ben megkapta a növényvédelmi üzletág vezetését. Ekkor, a nagyüzemek kialakulásával rohamos fejlődésnek indultak a géprendszerek, a hibrid vetőmagvak, és egyre több új növényvédelmi készítmény jelent meg a gyakorlatban, amit be kellett vezetni, meg kellett ismertetni a termelőkkel. Technológiai leírásokat kellett készíteni a gyakorlat számára. Ez az időszak volt pályafutásának legszebb és kihívásokkal teli időszaka. Egy olyan szervezetben dolgozott, amely magyar érdekeltségű, nincs benne külföldi tulajdon. A fejlett külföldi, főleg az amerikai (USA) tapasztalatokat próbálták idehaza adaptálni, aminek meg is lettek az eredményei. Egyre nagyobb termésátlagok születtek a mezőgazdaságban. Adányi József a KITE Zrt. növényvédőszer és műtrágya üzletágának igazgatójaként ment nyugdíjba 2001-ben, 41 éves munkaviszonnyal, 63 évesen.

*2. ábra*: **Az első Tiszántúli Növényvédelmi Fórum kiadványa, 1996**


DEBRECENI AGRÁRTUDOMÁNYI EGYTEM
MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEMI KAR

Emlékülés és Növényvédelmi Szakmai Nap
(I. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum)

az V. FARMEREXPO - 1996. augusztus 17-20. keretében
Debrecen, Böszörményi út 138.

1996. augusztus 19.

*Figure 2*: *Cover sheet of Proceedings of the First Trans-Tisza Plant Protection Forum, 1996*

Aktív életvitele tovább folytatódik: 1996-tól a STOCK '94 Rt. majd Zrt. elnök-igazgatója, mind a mai napig.

1996-ban, az I. Tiszántúli Növényvédelmi Fórumon, melyet Dohy (Göllner) Jánosra emlékezve rendeztünk, Adányi József is tartott előadást: „A kelet-magyarországi növényvédőszer forgalmazás trendjei"-ről (20. oldal) (2. ábra).

A növényvédő szakmát nem elhagyva, 2002-től a Cseber Kht. Keletmagyarországi megbízottjaként a növényvédő-szer göngyölegek összegyűjtését és megsemmisítését szervezte. Akkoriban ez megoldatlan kérdésként, környezetvédelmi szempontból fontos feladat volt.

2007-ben szerveződött a Növényvédőszer Kereskedők Szakmai Egyesülete, ahol felkérték az Egyesület elnökének, és irányításával szervezték meg az Egyesület érdekérvényesítő, szakmai munkáját. Nem volt könnyű feladat, mivel az Egyesület Budapesti székhelyű volt, éves

feladattervek alapján, munkabizottságok alakításán keresztül érték el céljukat: az Egyesület elismertségének kivívását. Ezt követően, 2010. márciusában adta át a feladatokat utódjának.

Adányi József növényvédő kollégánk szakmai életútját mindig a tenni akarás, a növényvédő szakma igényes művelése, a magas szintű szakismeret és az innovatív magatartás jellemezte. Szerény, de határozott személyisége biztosíték volt arra, hogy az általa vezetett kollégák és dolgozók megvalósítsák a kitűzött célokat, és biztos támpontjai legyenek cégük vezetésének.

A 2000. évi LXXXIV. törvény alapján megalakult Magyar Növényvédő Mérnöki és Növényorvos Kamarának a kezdetektől tagja. Adányi Józsefet kreatív tevékenysége, szemlélete és gondolkodás módja, továbbá 41 éves áldozatos növényvédelmi tevékenysége alapján a Kamara 2008-ban „Az Év Növényvédőse" aranygyűrű kitüntetésben részesítette.

A „Gulyás Antal emlékérem a növényvédelemért" elismerést a „gyakorlati növényvédelemben betöltött kiemelkedő életútjáért" adományozzák 2012-ben Adányi József úrnak. A növényvédős szakmai közösség ezúton is gratulál Adányi Józsefnek a mostani kitüntetéséhez és kíván jó egészséget, a családi életben pedig sok-sok örömet!

# Prof. Szepessy István a „Gulyás Antal emlékérem a növényvédelemért” kitüntetettje, 2012 (laudáció)

# Prof. István Szepessy awarded by „Antal Gulyás medallion for crop protection“ in 2012 (laudation)

**Kövics György J.**
Debreceni Egyetem AGTC MÉK Növényvédelmi Intézet, Debrecen
kovics@agr.unideb.hu

***ÖSSZEFOGLALÁS***

*A Növényvédelem Oktatásának Fejlesztéséért Közhasznú Alapítvány (NOFKA) és a Magyar Növényvédő Mérnöki és Növényorvosi Kamara Hbm-i Területi Szervezete (Kamara) 2011. szeptemberében megalapította a közös Kitüntetési Bizottságot, amely a növényvédelem terén kiemelkedő teljesítményt nyújtó, példaértékű személyiségek erkölcsi megbecsülését kívánja szolgálni a „Gulyás Antal emlékérem” kitüntetés adományozásával „A Növényvédelemért”, melyet kiváló oktatók, kutatók, gyakorlati szakemberek nyerhetnek el.*

*2012-ben a „Gulyás Antal emlékérem a növényvédelemért” kitüntetettje **dr. Szepessy István** professzor úr, aki **Adányi József** ny. növényvédelmi szakmérnök úrral (lásd: külön laudáció) egyidőben részesül az elismerésben a „növényvédelem oktatásában betöltött kiemelkedő életútjáért”.*

***SUMMARY***

*The Public Utility for Development of Crop Protection Teaching (NOFKA) and The Hajdú-Bihar County Regional Association of Hungarian Chamber of Crop Protection Specialists and Plant Doctors (Chamber) established a joined Award Committee in September of 2011, which intend to serve as moral appreciation to prominent persons with excellent achievements by awarding the „Antal Gulyás medallion for crop protection” which are available for outstanding teachers, researchers, and practical crop protection specialists.*

*In the year of 2012 to be decorated with the „Antal Gulyás medallion for crop protection” are **prof. István Szepessy** retired plant pathologist for his excellence in teaching of plant pathology, and **József Adányi** retired plant protection engineer (his laudation available in a separate article).*

**Kulcsszavak:** Gulyás Antal emlékérem, kitüntetés, Szepessy István életrajz
**Keywords:** Antal Gulyás medallion, award, István Szepessy biography

## *BEVEZETÉS*

A „Gulyás Antal emlékérem a növényvédelemért” kitüntetést **dr. Gulyás Antal** emlékezetének megőrzésére 2011-ben hozták létre, aki a debreceni növénykórtan jeles professzora volt, és több mint harminc éven át az agrárszakemberek oktatásában és a tudományos kutatásban ért el kimagasló eredményeket. A Növényvédelem Oktatásának Fejlesztéséért Közhasznú Alapítvány (NOFKA) és a Magyar Növényvédő Mérnöki és Növényorvosi Kamara HBm-i Területi Szervezete (Kamara) megalapította a közös Kitüntetési Bizottságot, amely a növényvédelem terén kiemelkedő teljesítményt nyújtó, példaértékű személyiségek erkölcsi megbecsülését kívánja szolgálni a „Gulyás Antal emlékérem” kitüntetés adományozásával „A Növényvédelemért”, melyet kiváló oktatók, kutatók, gyakorlati szakemberek nyerhetnek el.

A Kitüntetési Bizottság 2012-ben úgy határozott, hogy két kitüntetést nyújt át: **Dr. Szepessy István** professzor úrnak, aki 2012. augusztusában töltötte be 85. életévét, a „növénykórtan oktatásában betöltött kiemelkedő életútjáért”, és vele egyidejűleg (lásd: külön laudáció) **Adányi József** ny. növényvédelmi szakmérnök úr is részesül a „Gulyás Antal emlékérem a növényvédelemért” elismerésben.

## *PROF. DR. SZEPESSY ISTVÁN ÉLETRAJZA*

*1. ábra*: **Szepessy István professzor tablóképe, 1987**

*Figure 1*: *Portrait of István Szepessy from group photograph in 1987*

Dr. Szepessy István, a növénykórtan professzora 1927. augusztus 20-án született a Borsod megyei Prügy községben. Általános- és középiskolai tanulmányai elvégzése után 1946-ban érettségizett Miskolcon, majd az Agrártudományi Egyetem Mezőgazdaságtudományi Karán jeles eredménnyel szerzett diplomát 1950-ben. Az év júliusában kinevezték Gödöllőre a Növényvédelmi Tanszék tanársegédjévé. Még egyetemi hallgató volt, amikor demonstrátorként segítvén az oktatói munkát, gyakorlatokat vezetett dr. Husz Béla és dr. Uzonyi Ferenc professzorok irányításával.

1952-ben az MTA személyzeti osztályának támogatásával a moszkvai Tyimirjazev Mezőgazdasági Akadémia Növénykórtani Tanszékére került, ahol M. Sz. Dunyin professzor vezetésével aspiránsként folytatott tanulmányokat, és végzett magas színvonalú mikológiai és immunológiai kutatásokat. 1956. decemberében Moszkvában megvédte „Immunológiai vizsgálatok a búzaporüszög kórokozójával" című kandidátusi értekezését. 1957. februárjában visszakerült Gödöllőre, mint a Növénykórtani Tanszék frissen kinevezett adjuntusa. 1959. februárjától megbízott tanszékvezető lett, majd még az év júliusában előléptették docenssé és megbízták a Növénykórtani Tanszék és Rovartani Tanszék egyesítésével létrehozandó új, Növényvédelmi Tanszék megszervezésével. 1965-től a Mezőgazdaságtudományi Kar oktatási, 1966-tól tudományos dékánhelyettese volt. 1966-ban kinevezték egyetemi tanárrá és vezette a Növényvédelmi Tanszéket, 1969-ig. A növényvédelmi igazgatás szervezése terén is fontos állami feladatokat látott el minisztériumi tanácsadóként. Kezdeményezésére 1960-ban Gödöllőn elindították az első növényvédő szakmérnöki kurzust, majd 1968-ban graduális oktatás keretein belül is elkezdték a növényvédős képzést. Első felelős szerkesztője volt a „Növényvédelem" című folyóiratnak. 1970-ben a Debreceni Agrártudományi Egyetemre helyezték át, ahol a Növényvédelmi Tanszéket vezette 1988-ban bekövetkezett nyugdíjba vonulásáig (1. ábra).

Szakmai munkássága az általános növénykórtan területén a növényimmunitástan, a járványtan, a prognosztika és a csávázás egyes kérdéseinek kutatására irányult, a részletes növénykórtan tekintetében a búza, a rizs és a cukorrépa betegségeinek tanulmányozásában fejtett ki eredményes munkát.

Szepessy professzor oktatói pályája kiemelkedő. Múlhatatlan érdeme, hogy útjára indította az első növényvédelmi szakmérnök képzést, az első évfolyam hallgatói 1960. februárjában kezdték meg tanulmányaikat. Ez a posztgraduális, nappali tagozatos képzési forma nemcsak a növényvédelem területén volt az első, hanem a mezőgazdaságtudományok területén is. A Szepessy professzor által szervezett növényvédelmi szakmérnök képzés különös értéke, hogy az oktatás színvonala kezdetektől rendkívül magas volt, minden szakterület oktatásában annak legjobb ismerői, kutatói megbízott előadóként vettek részt.

A Debreceni Agrártudományi Egyetemre kerülését (1970) követően bekapcsolódott az 1968-ban elkezdődött posztgraduális növényvédelmi szakmérnökök oktatásába, illetve megszervezte az agrármérnök hallgatók növényvédelmi szakirányú képzését (1972-75), amely éppen 40 esztendeje kezdődött Debrecenben. Amikor Szepessy professzor úr oktatói tevékenységét méltatjuk, különös hangsúllyal kell megemlékeznünk kiváló előadói képességeiről. Előadásai lebilincselőek voltak: szakmai pontosság, élvezetes stílus, izgalmas történetek fűszerei jellemezték azokat. Egyszerűsége, közvetlen barátságos természete bátorította a hallgatóságot, hogy tanítványai bizalommal forduljanak hozzá. Oktatói munkájának elismeréseként 1960-ban Kiváló Dolgozó, 1965-ben az Oktatásügy Kiváló Dolgozója címet kapta.

Az életrajzi adataihoz tartozik szakírói munkássága: több mint 80 szakcikk, egyetemi jegyzet és tankönyv szerzője. Éppen 35 éve, 1977-ben jelent meg *Növénybetegségek* című könyve, amit az agrártudományi egyetemeken tankönyvként engedélyeztek és melyből az általános agrármérnök és szakmérnök jelöltek százai tanultak.

Munkásságának eredményességét az a 8 találmány, szabadalom is jelzi, ami nevéhez fűződik.

Életművéért 1987. októberében a MAE Növényvédelmi Társaságának vezető testülete *Horváth Géza emlékérem*-mel tüntette ki.

*2. ábra*: **Kamarai oklevél és kitűző, 2007**

*Figure 2: Document and badge of Plant Protection Chamber, 2007*

*3. ábra*: **A 80 éves Szepessy István professzor lakásában az oklevél átadásakor, 2007**

*Figure 3: Prof. István Szepessy in his age of 80 getting the decoration in 2007*

Szepessy István professzor 80. születésnapja alkalmából, 2007-ben a Magyar Növényvédő Mérnöki és Növényorvosi Kamara „Növényorvos nemzedékek képzéséért" elismerő oklevelét és az ezzel járó arany kitűzőt kapta meg (2-3. ábra).

Az ünnepelt, aki 2012. augusztus 20-án, Szent István napján a 85. életévét betöltötte, általában is a magány kedvelője, most gyengélkedő egészsége miatt sem lehet közöttünk. Ugyanakkor meglepő a tájékozottsága, szellemi frissessége, amivel a világ dolgait nyomon követi.

A pályatársak és a tanítványok nevében tisztelettel és szeretettel köszöntjük a 85 esztendős dr. Szepessy István professzor urat a „Gulyás Antal emlékérem a növényvédelemért" kitüntetése kapcsán, melyet otthonában nyújtunk át Számára, és valamennyiünk nevében jó egészséget, kiegyensúlyozott, boldog életet kívánunk Neki!

***IRODALOM***

Békési P., Fischl G. (1999): Rendhagyó beszélgetés Szepessy István professzorral. Gyakorlati Agrofórum (8): 44-46.

Kövics Gy. J., Békési P. (2002): A 75 éves Szepessy István professzor köszöntése. in: Kövics Gy.J. (szerk.) 7. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum Debrecen, 2002. október 16-17. A Solanaceae növénycsalád fontosabb fajainak (burgonya, paradicsom, paprika, dohány) időszerű növényvédelmi kérdései. Előadások - Proceedings 94-96.

Kövics Gy. J., Tarcali G. (2007): Beszélgetés a 80 éves Szepessy István professzorral. Növényvédelem 43 (8) 385-388.

Seprős I. (1988): A Horváth Géza-emlékérem új tulajdonosa: Dr. Szepessy István. Növényvédelem 24(6): 285.

Tarcali G., Kövics Gy., Békési P. (2007): Köszöntjük a 80 éves Szepessy István professzort. 9-14. pp. in: Kövics, Gy. J., Dávid I. /szerk./ (2007): 12. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum. Előadások – Proceedings. Plenáris előadás. Debrecen, 2007. október 17-18. Debreceni Egyetem, Debrecen.

Tarcali G., Kövics Gy. J., Kiss L. (2007): Köszöntjük a 80 éves Szepessy István professzort. Agrárunió 8 (10-11): 19.

# A növény-egészségügy hatósági ellenőrzési rendszere – feladatok a nem honos károsítók bekerülésének, terjedésének megakadályozására

# The Official Plant Health Control System – tasks to avoid getting in and spreading of non-native pests

**Szőnyegi Sándor**
Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH) NTAI, Budapest
szonyegis@nebih.gov.hu

***ÖSSZEFOGLALÁS***

*A karantén károsítók olyan nem honos szervezetek, amelyek nagy gazdasági és ökológiai kárt okozhatnak, nincs ellenük hatékony védekezési eljárás, és felszámolásuk nagy ráfordításokat igényel. Az újonnan felbukkanó, bekerüléssel fenyegető, nem honos károsító akkor kerül Magyarországon karantén listára, ha a tudományos igényű elemzés alapján megtelepedési és terjedési valószínűsége nagy. A magyar növényvédelmi szervezet egységes növény-egészségügyi ellenőrzési rendszert működtet az egész ország területére kiterjedően. A kiállított dokumentumok (növényútlevél, növény-egészségügyi bizonyítvány) igazolják, hogy az elvégzett ellenőrzések időpontjában az áru megfelelt a jogszabályi követelményeknek, azonban egyes károsítók rejtett életmódja vagy látens állapotú előfordulása miatt szükség van a forgalmazó- és termőhelyeken végzett utóellenőrzésekre is.*

***SUMMARY***

*The quarantine pests are non-native organisms which capable cause potentially serious damages both economically and ecologically, there are no effective protection methods against them, and their liquidation costs are remarkable. The newly occurring, imminent non-native pests get on the quarantine list when the likelihood of getting acclimatized and spreading is high on the base of scientific analysis. The Hungarian Plant Protection Authority operates a uniform Plant Health Control System throughout the country. The documents viz. Plant Passport and Plant-Health Certificate validate that at the time of control the goods are lawful, however because of hidden or latent life period of pests it seems reasonable to check posterior on distribution and production areas, too.*

**Kulcsszavak:** hatósági ellenőrzési rendszer, nem honos károsítók, karantén károsítók, növényútlevél, növény-egészségügyi bizonyítvány
**Keywords:** Official Plant Protection Control System, non-native pests, quarantine pests, Plant Passport, Plant-Health Certificate

A karantén károsítók olyan nem honos szervezetek, amelyek nagy gazdasági és ökológiai kárt okozhatnak, nincs ellenük hatékony védekezési eljárás, és felszámolásuk – ha egyáltalán lehetséges – nagy ráfordításokat igényel. Például az Egyesült Államokból egy segélyszállítmánnyal Szerbiába bekerült kukoricabogár három év múlva elérte hazánkat, és hatalmas károkat okozott a monokultúrás termesztésben. Ma már egész Európa kukoricatermesztését fenyegeti. Az újonnan felbukkanó, bekerüléssel fenyegető, nem honos károsító akkor kerül Magyarországon karantén listára, ha a tudományos igényű elemzés alapján megtelepedési és terjedési valószínűsége nagy, és rendelkezik a karantén károsítóknál az előzőekben említett tulajdonságokkal (1-2. táblázat). Az elemzési folyamat azonban hosszú időt vesz igénybe, lezárultáig a károsító ellen ideiglenes, szükséghelyzeti intézkedések alkalmazhatók. Ha bebizonyosodik, hogy lehetőség van a károsító elleni védekezésre, a növényvédelmi szervezet feladata az erre vonatkozó technológia kidolgozása a termelők és egyéb gazdasági szereplők számára.

A nagyfokú áru mozgások következtében folyamatosan fennálló növény-egészségügyi kockázat miatt a hazai növényvédelmi szervezet egységes növény-egészségügyi ellenőrzési rendszert működtet az egész ország területére kiterjedően (1. ábra).

*1. táblázat*

**Közelről fenyegető, nem honos károsítók**

| Kórokozó (1) | Betegség (2) | Karantén státusz (3) |
|---|---|---|
| *Ca.* Phytoplasma vitis (syn.: Grapevine Flavescence dorée phytoplasma) | Szőlő aranyszínű sárgaság fitoplazma | zárlati (4) |
| *Ragoletis completa* | Dió buroklégy | zárlati |

*Table 1: Imminent non-native pests in the neighboring countries*
Pathogen (1), Disease in Hungarian (2), Quarantine status (3), Quarantine (4)

*2. táblázat*

**Közeli időszakban fenyegető, nem honos károsítók**

| Károsító (1) | Magyar név (2) | Karantén státusz (3) |
|---|---|---|
| *Anoplophora chinensis* | Ázsiai citruscincér | zárlati (4) |
| *Anoplophora glabripennis* | Ázsiai hőscincér | zárlati |
| *Bursaphelenchus xylophilus* | Fenyőrontó fonálféreg | zárlati |
| *Dryocosmus kuriphilus* | Szelídgesztenye gubacsdarázs | nem zárlati (5) |
| *Epitrix* spp. | Burgonyabolha fajok | nem zárlati |

*Table 2: Imminent non-native pests in the near future*
Pest (1), Pest in Hungarian (2), Quarantine status (3), Quarantine (4), Non-quarantine (5)

*1. ábra*: **Növény-egészségügyi hatósági ellenőrzési rendszer a termelésben és a forgalmazásban**

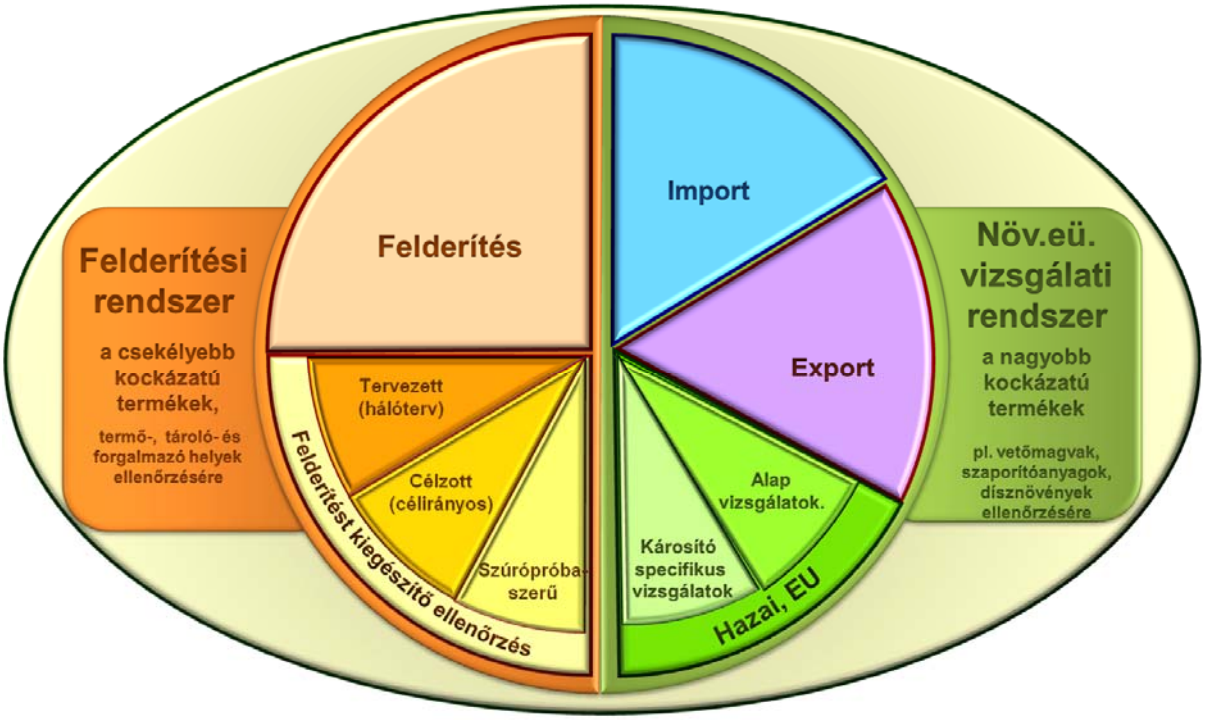



*Figure 1: Official Plant Health Control System in production and distribution*
Fact-finding System at low risk products (1), Fact-finding (2), Export-Import (3), Plant Health Control System at higher risk products (4), Complementary Checking System, planned, target-oriented, randomized (5), National, EU Specific Pest Investigations, Basic Investigations (6)

A csekélyebb kockázatú termékeknél a kiemelt jelentőségű károsítókra történő felderítés mellett hálóterv alapú rendszeres, célzott, továbbá szúrópróba-szerű ellenőrzést végez termőhelyeken, gyűjtőhelyeken, raktárakban. A meglévő erőforrások optimális kihasználása és a magas szakmai színvonal biztosítása érdekében a felderítési tevékenységben közreműködnek a társhatóságok, így a vámhatóság és az erdészeti szolgálat is.
A nagyobb növény-egészségügyi kockázattal járó termékek – főként az ültetési anyagok (vetőmag, vetőburgonya, egyéb szaporítóanyagok, dísznövények) – vizsgálata jogszabályi előírások alapján kötelező. Ez a vizsgálati kötelezettség kiterjed az export és import árukra, valamint a hazai termelési és EU-n belüli forgalmazási folyamatra. Az ellenőrzések szemlékből, valamint – ha szükséges – a látens fertőzések kimutatására alkalmas laboratóriumi és egyéb módszerekkel (pl. bioteszt) végzett vizsgálatokból állnak.

Amennyiben az ellenőrzések eredménye alapján a vizsgálat-köteles termékek megfelelnek az előírásoknak, erről a hatóság igazolást ad: növényútlevelet a tagállamok területén történő szállításhoz, és növény-egészségügyi bizonyítványt az Európai Unión kívüli országokba irányuló exporthoz. Az EU-ba való behozatal esetén szintén

követelmény ezen áruféleségekre a feladó ország által kiadott növény-egészségügyi bizonyítvány megléte. Az EU-n kívüli, ún. „harmadik országból" érkező árut csak a Közösség külső határai, illetve egyes estekben a célország valamely engedélyezett ellenőrzési helyén vizsgálják, abból a szempontból, hogy teljesíti-e az uniós követelményeket. Ha igen, bekerül a belső termelési folyamatba és áruforgalomba, ha nem, az ellenőrzést végző felügyelő feltartóztatja, visszautasíthatja, és akár meg is semmisíttetheti a fertőzött árut.

A kiállított dokumentumok (növényútlevél, növény-egészségügyi bizonyítvány) igazolják, hogy az elvégzett ellenőrzések időpontjában az áru megfelelt a jogszabályi követelményeknek, azonban egyes károsítók rejtett életmódja vagy látens állapotú előfordulása miatt szükség van a forgalmazó- és termőhelyeken végzett utóellenőrzésekre is, melyek módot adnak az esetlegesen bekerült károsítók észlelésére, kimutatására, felszámolására és terjedésének megakadályozására.

A globalizációval járó nagyfokú kereskedelem-bővülés, valamint az éghajlatváltozás és az extrém időjárási viszonyok gyakoribbá válása következtében megnőtt az évről évre bekerülő és megtelepedő károsítók száma. A vizsgálatköteles árukból évente mintegy hatezer tételt tartóztatnak fel a tagállami határkirendeltségeken, egyharmadát károsító jelenléte miatt. Ez indokolja, hogy át kell értékelni a két célt: az EU-n belüli szabad árumozgást elősegítő jogszabály-enyhítések, valamint a károsítók behurcolásának és terjedésének meggátlását szolgáló szigorítások kívánatos arányát. A 27 tagállamra kibővült Európai Unió nem tudja biztosítani az utóbbi cél megvalósulását, ezért is folyik néhány éve az EU növény-egészségügyi rendszerének teljes körű felülvizsgálata.

A rendelkezésre álló erőforrások felhasználásában fokozottabban kell a károsítók jelentette kockázatokat rangsorolni: a károsítók megjelenésére történő eddigi lassú reagálás helyett sokkal inkább a megelőzésre és a gyors válaszra kell helyezni a hangsúlyt.

A hazai növényvédelmi szervezet is fokozott mértékben érvényesíti a termelők és forgalmazók nagyobb felelősségét, a folyamatos önellenőrzések elvégzését a gazdálkodás során.

# Egy fővárosi növényvédős észlelései

# Observations of a plant protection expert of the capital

**Zsigó György**
Magyar Növényvédő Mérnöki és Növényorvosi Kamara, Budapest
zsigogy@gmail.com

***ÖSSZEFOGLALÁS***

*A közterületi növényeken gondot okozó károsítókat és a védekezés lehetőségeit, jelenlegi gyakorlatáról számol be az előadó. Kitér azokra a lakosságot zavaró rovarokra, kórokozókra, gyomokra is, melyek irtását szintén a növényvédős szakembertől várják el. A közterületi növényvédelem további sajátosságai között megemlíti, hogy emberek által folyamatosan látogatott helyszíneken, romló gazdasági környezetben, nehezen betartható jogszabályok mellett kell megfelelnie a lakossági és kertészeti elvárásoknak. Az EU vegyszerellenes közege és a szűkös közterületi szerkínálat tovább nehezíti az optimális munkavégzést. A fentiekből következően javaslatokat fogalmaz meg a hiányosságok kiküszöbölésére.*

***SUMMARY***

*The author refers about the nowadays applied practical plant protection activities against pests occurring on trees, shrubs and turfs of public domains. It is also touched upon those insects, diseases and weeds which are disturbing the local residents and the plant protection engineer expect to manage them. Among the special features of public domains should be mentioned that the rules are difficult to harmonize according to the legal, public health, and horticulture requirements at the same time. The anti-pesticide attitude of EU and the modest range of pesticides which are applicable on public domains make difficulties in optimal management work. The author draws up proposals how to manage the complex plant protection on public domains.*

**Kulcsszavak:** közterületi növényvédelem, levéltetvek, pókhálós molyok (*Hyponomeuta* spp.), vadgesztenyelevél-aknázómoly (*Cameraria ohridella*), platán csipkéspoloska (*Corythuca ciliata*), amerikai lepkekabóca (*Metcalfa pruinosa*), zöld vándorpoloska (*Nezara viridula*), platánbodobács (*Arocatus longiceps*), hársbodobács (*Oxycarenus lavaterae*), liszthármatok, aranka fajok (*Cuscuta* spp.), parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia*)
**Keywords:** plant protection on public domains, aphids, ermine moths (*Hyponomeuta* spp.), horse-chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*), platanus lace bug (*Corythuca ciliata*), citrus flatid planthopper (*Metcalfa pruinosa*), southern green shieldbug (*Nezara viridula*), plane tree bug (*Arocatus longiceps*), ground bugs (*Oxycarenus lavaterae*), powdery mildews, dodders (*Cuscuta* spp.), common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*)

## *BEVEZETÉS*

Kettős feladatnak kell megfelelnie a közterületen dolgozó szakembernek. Egyrészt meg kell védenie a növényeket a károsítók támadásától. A különböző fajokból álló, eltérő fejlettségű és érzékenységű növények védelme speciális tudást és komoly szervezést igényel. Más időpontban dolgozhatunk pl. óvodák vagy vasárnap látogatott templomok, temetők közelében. A változatos faállomány miatt egy munkanapon belül is többször kell módosítani a permetlé összetételét. Sajátos problémát jelentenek a lakosok által kiültetett, de az utca fenntartója által kezelt gyümölcsfák, melyeknél az élelmezés-egészségügyi várakozási időkre is tekintettel kell lenni.
Másrészt meg kell felelnie annak a lakossági elvárásnak, mely allergiát okozó pollenektől, undort keltő rovaroktól és beteg növényi részektől mentes lakóhelyi környezetet szeretne.
Gyakran kell védekezni például olyan kártevők ellen, melyek a növények életében nem okoznak különösebb gondot, de jelenlétük, váladékuk zavarja a lakosokat. Többször kaptunk felkérést vaspondrók, darazsak, kirajzott méhek és hangyák valamint különböző poloskafajok elleni permetezésre. A kerületi kertész kollégáknak és a szakembereknek is feladják ezzel a kérdést. Mit vállalhatunk el a növényvédelem keretein belül?
Remélem, hogy a fővárosban szerzett tapasztalataim átadásával segítek a válaszadásban.

## *A KÖZTERÜLETI NÖVÉNYVÉDELEM SZEMPONTJÁBÓL LEGTÖBB GONDOT OKOZÓ KÁROSÍTÓK*

### A levéltetvek

Tapasztalatom szerint a téli időjárástól függetlenül, tavasszal mindig megjelennek a levéltetvek. Bodzán, juharon, rózsán, majd a hárson, akácon, szivarfán és még sok más tápnövényen is kialakulnak a kolóniák. Ekkor indul az első lakossági panaszhullám is, hiszen mézharmattól ragacsos szélvédők, játszótéri padok sok bosszúságot okoznak. Nyár elejére már a járdák is ragadhatnak. A száraz forró és a hűvös esős nyarak egyaránt meggátolják a felszaporodásukat. Míg 15-20 éve még biztosan számolni kellett egy egész kerületre kiterjedő juhar permetezéssel, addig manapság már inkább csak kisebb facsoportoknál kell beavatkozni.

**Pókhálós molyok**

Budapesten időnként már május elején tarrá rágott *Prunus*ok jelzik az egyik vagy másik pókhálós molyfaj *(Hyponomeuta padi, H. evonymella*) jelenlétét. Szerencsére tápnövényét csak néhány parkban telepítették. Egy nemzedékes, látványos kártételét sokan észreveszik, de gyakran összetévesztik az amerikai fehér medvelepke (*Hyphantria cunea*) hernyófészkeivel.

**Vadgesztenyelevél-aknázómoly**

Városképi szempontból a főváros egyik legmeghatározóbb park- és sor- és szoliter fája a vadgesztenye. Időben és kellően hangosan kongatták meg a vészharangot a három nemzedékes vadgesztenyelevél-aknázómoly *(Cameraria ohridella)* megjelenésekor. A budapestiek, az önkormányzatok és a cégképviseletek is léptek. Kiegészítették a kerületi fakatasztert, anyagilag is segítették a magántulajdonú fák permetezését, több inszekticidet is engedélyeztettek, és kifejlesztették a törzsinjektálás technológiáját. Parazitái a biológiailag szegény városi környezetben még nem tudják „sakkban tartani" a molyokat, április végén – május elején mindenképpen kezelni kell a fákat. A Magyar Növényvédő Mérnöki és Növényorvosi Kamara előrejelző hálózata nagy segítséget nyújt a védekezés időpontjának pontos meghatározásában. A hetente frissülő táblázat mindenki számára elérhető a www.magyarnovenyorvos.hu-n illetve a www.zsigogyorgy.hu-n.

**Platán csipkéspoloska**

Egész nyáron szívogatja, sárgítja a platánokat a platán csipkéspoloska *(Corythuca ciliata*). Meleg, száraz nyarakon különösen kínozza a fákat, akár több száz egyede is megtalálható egyetlen levélen. A levélveszteséget nehezen bírják az idős, különben is rossz várostűrő képességű régebbi fajták. Minden évben védekezni kell a kártevő ellen. A vadgesztenyéhez hasonlóan kombinált kezelést javaslok, gombaölő szerrel és lombtrágyákkal egészítsék ki a permetlevet.

**Amerikai lepkekabóca**

Az amerikai lepkekabócát (*Metcalfa pruinosa*) 2004-ben találták meg az országban, azóta a legjelentősebb közterületi kártevők közé lépett. Fákon, bokrokon, egynyári dísznövényeken, útszéli gyomokon, sőt a parlagfüvön is szívogat. Torzulnak, ragadnak és csillognak váladékától a levelek, mézharmat-tócsák keletkeznek a fák alatt. A lárvatelepekről leperegnek a fehér viaszszálak, szennyezik a környezetet, megtapadnak az arra járók ruháin. A kerttulajdonosok jogosan panaszkodnak, hozzájuk is beköltözik és károsít. Természetesen ez fordítva is előfordulhat. Károsítja a növényeket és zavarja az embereket is. Mivel tápnövényeinek száma nagy, ezért nehéz kerületi szinten egységesen védekezni ellene. Megfelelő hatóanyagú rovarölő szerekkel még jól irthatók.

**(Zöld) vándorpoloska**

Érdemes lenne megvizsgálni, hogy miért csak néhány helyszínen jelennek meg nyár végén a (zöld) vándorpoloska (*Nezara viridula*) egyedei? Néhány éve újra és újra ugyanonnan kapjuk a bejelentéseket. Ezek alapján úgy tűnik, hogy egyes városrészeket előnyben részesítenek telelőre vonulásukkor. Az adott körzetben nyáron is megtalálhatóak, de érzékeny károkat nem okoznak. Jól repülnek. Lehet, hogy beköltöző egyedeik is hozzájárulnak a lakossági panaszáradathoz? Két éve már csak kőrisekkel beültetett utcákból jelezték a vállas, nagy méretű, poloskaszagú, zöld színű imágókat. Ezeken a fákon valóban jól érzik magukat.

A kertekben számos dísznövényen és zöldségfélén is megjelentek. Az eltérő színű és mintázatú lárvákat néha még a gyakorlott szakemberek is más fajnak vélik.

**Platánbodobács**

A platánbodobács *(Arocatus longiceps*) a poloskákhoz hasonlóan imágó alakban telel át a platán kéregpikkelyei alatt, de tömegesen keresi búvóhelyét a lakásokban is. Szétnyomva a poloskafélékre jellemző szagot áraszt, sokan még a felsöprésétől is undorodnak.

**Hársbodobács**

A hárs fatörzsétől akár a vázágak csúcsáig végignyúló telepeket is képezhetnek ősz felé a hársbodobács *(Oxycarenus lavaterae)* példányai. Összebújva vészelik át a telet. Főleg az autótulajdonosokat zavarja, hogy parkoláskor nyakukba hullanak az állatok. A fák melletti házakból nem panaszkodnak, úgy tűnik, hogy ez a faj nem keresi az ember közelségét. Sokan a fákat féltik, az ijesztő mennyiségű poloska láttán kéregkártevőre gondolnak. Őszi-téli lemosó permetezéssel könnyen eltávolíthatóak, nyáron még nem okoztak különösebb problémát.

**Lisztharmat fajok**

A közönséges vadgesztenyén (*Aesculus hippocastanum*) szerencsére eddig csak kisebb károkat okozott, a vadgesztenye lisztharmat (*Erysiphe flexuosa*), a piros virágú vadgesztenyén (*Ae. carnea)* viszont gyakrabban megjelenik. A platánon 2008-ban jelent meg a lisztharmat *(Erysiphe platani*), és egyből súlyos kórokozóvá vált. Dr. Vajna László 2009-2010-ben végzett széleskörű vizsgálatai szerint ez utóbbi betegség rendkívül gyorsan terjedt el az egész országban, 2010-ben sok területen már súlyos fertőzések következtek be. Jó várostűrése miatt

előszeretettel telepítik a díszkörtéket (pl. a kínai díszkörtét, *Pyrus calleryana*). Varasodásra számítottam, de lisztharmattal (*Podosphaera leucotricha)* találkoztam 2007-ben egy kőbányai sétálóutca fasorán. Azóta is makacsul, minden évben megjelenik már a fiatal leveleken is. A deformálódott levelek színükön sárgulva foltosodnak, a fonákjukon kialakuló lisztharmat telepek az egész vegetációban megtalálhatóak. Folyamatos permetezést igényelnének.

**Aranka fajok**

Elsősorban a kerületi kertészekkel kell megküzdeni az arankairtás elfogadtatásáért. Jogos az ellenállásuk. Nem értik, hogy miért kellene a szűkös pénzkeretből egy olyan gyom irtására költeni amely nem zavarja sem a lakosokat, sem a közlekedést. Csak a jogszabályok ismertetésével indokolhatok. Az élelmiszerláncról és hatósági felügyeletéről szóló 2008. évi XLVI. törvény egyik végrehajtási rendelete, a növényvédelmi tevékenységről szóló 43/2010. (IV.23.) FVM rendelet 2. §-a külön kiemeli az aranka fajok *(Cuscuta* spp.) elleni védekezési kötelezettséget. Magja hosszú évekig elfekszik a talajban, tavasztól őszig folyamatosan csírázik, virágzik és érleli a magját. Csak a rendszeresen, kb. hetente elvégzett ellenőrzéssel és a szükség szerinti foltkezeléssel lehet küzdeni ellene. Amennyiben kihagyunk néhány hetet a felderítés-irtás folyamatából, úgy a beérlelt magját ismételten elhullajtja. Kezdődik az egész folyamat előről. Ezzel magyarázhatóak az évről-évre ugyanott megjelenő arankás foltok. Járművekkel, állatokkal, pl. madarakkal könnyen és gyorsan terjed és bejuthat a fertőzésétől féltett szántóföldekre is.

**Parlagfű**

Már nagyon sok híradás jelent meg a parlagfűről (*Ambrosia artemisiifolia*), de még mindig sokan tévesztik a nevét, sőt a növényt sem ismerik fel. Keverik az ürömmel vagy pl. a büdöskével (bársonyvirág, *Tagetes* spp.).

Több szempontból is inkább a mechanikai gyomirtást javaslom. Egyrészt, mert a jó időpontban és kellő gyakorisággal elvégzett kaszáláshoz képest nem érünk el sokkal jobb eredményt a közterületeken bevethető tartamhatás nélküli, perzselő típusú gyomirtó szerekkel. Másrészt, mert a permetezések nyomán sárgán száradó kóró nemcsak ronda, de tűzveszélyes is. Általában a glifozát származékokkal dolgoznak közterületeken. Óvatosan használják, mert a fiatal cserjék, fák kérgén felszívódva azok teljes pusztulását okozhatja!

## *KÖVETKEZTETÉSEK*

Nincsenek könnyű helyzetben a közterületi növényvédősök. Az emberek által folyamatosan látogatott helyszíneken végzünk növényvédelmet. A közterületi munkavégzés sajátosságából adódik, hogy a legfontosabb szempont az emberek egészségének a védelme. Gyerekek, sportoló felnőttek, és a padokon alvó hajléktalanok között kell permeteznünk. Míg a termesztésben az élelmezés-egészségügyi várakozási időkre, főleg a munka-egészségügyi várakozási időkre kell tekintettel lennünk. (Természetesen a bodza és hársvirágot, csipkebogyót, füvet gyűjtő lakosokra is gondolnunk kell.)

A romló gazdasági környezet hatott a parkfenntartási kiadásokra is. Kevesebb jut kaszálásra, gondozásra és növényvédelemre is. Egyre kiáltóbb az ellentét a lehetőségek és az elvégzendő munkák között. Különösen igaz ez, ha arra gondolunk, hogy az emberek zöldfelület iránti igénye nő, miközben új károsítók jelennek meg, és egyre idősebb fák védelmét kell megoldanunk.

Szűkös növényvédő szerkínálatból választhatunk. A 2012. évi „szerjegyzék”-ben tizenhét készítmény szerepel a közterület címszó alatt. Bár a felhasználó eseti engedélyt kérhet bizonyos esetekben, de ez az eljárás mindenképpen hosszadalmas és költséges. A beteg fa előtt álló szakembernek nincs ideje kivárni a hatósági határozatot. Mindenképpen bővíteni kellene a bevethető készítmények körét. Miközben irigykedve nézzük az ökotermesztésben engedélyezett készítmények listáját.

További nehézséget okoz az engedélyokirat előírásainak a betartása:

„A készítmény közterületeken való felhasználása esetén a kezelésről az érdekelt lakosságot tájékoztatni kell. A permetezés kizárólag növényvédelmi szakirányító közvetlen felügyeletével, 22-03 óra közötti időszakban végezhető. A játszóterek 10 méteres körzetében a szer nem használható.” Javaslom, hogy a felsorolt előírásokban hagyatkozzunk a helyismerettel rendelkező növényorvosra, bízzunk meg a döntésében.

Az egy éves időtartamú vállalkozói szerződésekkel nem lehet hosszú távon eredményesen dolgozni. Különösen hosszabb időszak szükséges a terület megismeréséhez azokban a körzetekben, ahol még nincs fakataszter. De az előrejelző eszközök telepítése is csak ott éri meg, ahol több évben gondolkodhat a pályázó.

Hátráltató tényező az is, hogy az EU túlzottan vegyszerellenes közegében kell dolgoznunk. Mindenképpen harcolnunk kell azért, hogy parkfáink, fasoraink egészsége megmaradjon. Hangsúlyoznunk kell az optimális öntözés, tápanyagellátás és az ellenálló fajták jelentőségét. Segítsük a perspektivikus eljárások fejlesztését (pl. injektálás, termésnövelő anyagok növényvédelmi célú felhasználása). Ugyanakkor jelenleg még biztosítani kell a közterületi permetezések lehetőségét is.

# Gabonavírusok előfordulása Dél-Magyarországon 2012-ben

# The occurrence of the wheat viruses in South Hungary in 2012

**Apró Melinda[1] – Kelemen Andrea[1] – Csáky Júlia[1] – Papp Mária[2] – Takács András Péter[1]**

[1] Pannon Egyetem, Georgikon Kar, Növényvédelmi Intézet, 8360 Keszthely Deák F. u. 16., apromelinda24@gmail.com

[2] Gabonakutató Nonprofit Kft, 6726 Szeged Alsó Kikötő sor 9, maria.papp@gabonakutato.hu

***ÖSSZEFOGLALÁS***

*A gabonaféléken a gombabetegségek mellett a vírusbetegségek kártétele is egyre inkább növekvő tendenciát mutat mind Magyarországon, mind a világ más gabonatermő országaiban. Munkánk során célul tűztük ki a dél-magyarországi gabonaültetvények 2012. évi vírusfertőzöttségének vizsgálatát.*

*Vizsgálatainkhoz a Gabonakutató Nonprofit Kft. területén (Kecskés-telepen) 2012 áprilisában és júniusában gyűjtöttünk mintákat. A DAS ELISA vizsgálatokhoz a Loewe Biochemica árpa sárga törpülés vírus (Barley yellow dwarf virus, BYDV), árpa csíkos mozaik (Barley stripe mosaic virus, BSMV), rozsnok levélcsíkosság vírus (Brome streak mosaic virus, BStMV), búza törpülés vírus (Wheat dwarf virus, WDV) és búza csíkos mozaik vírus (Wheat streak mosaic virus, WSMV) antiszérumait használtuk. A színváltozás mértékét Labsystem Multiscan RC ELISA fotométerrel 405 nm hullámhosszon mértük. Az áprilisában gyűjtött mintákban a WDV és a BSMV jelenléte dominált, a júniusban gyűjtött mintákban viszont WSMV volt a legtöbb. A gabonavírusok elleni védekezés alapja a rezisztenciára nemesítés, amelyhez nélkülözhetetlen a gabonavírusok elterjedésének és járványdinamikájának pontos ismerete.*

***SUMMARY***

*The past years cereal diseases, including the virus diseases have been increased in Hungary as well as worldwide. The aim of our work was to survey the virus infection of South Hungarian wheat fields in 2012. Leaf samples were collected in Szeged at the experimental farm of Cereal Research Nonprofit Co., in April and June of 2012. DAS ELISA tests were carried out using Loewe antisera of Barley yellow dwarf virus (BYDV), Barley stripe mosaic virus (BSMV), Brome streak mosaic virus (BStMV), Wheat dwarf virus (WDV), and Wheat streak mosaic virus (WSMV) and measured with Labsystem Multiscan RC Elisa reader at 405nm. In the samples of April the WDV and BSMV were dominated. The appearance of the BSMV was also significant.*

**Kulcsszavak**: gabonavírusok, búza, BMV, BYDV, BSMV, BStMV, WDV, WSMV,
**Keywords**: cereal viruses, winter wheat, BMV, BYDV, BSMV, BStMV, WDV, WSMV

## *BEVEZETÉS*

A gabonafélék közül a búzának van a legnagyobb vetésterülete és jelentősége a Földön. Ennek oka, hogy az ember már a történelem kezdetén felismerte, hogy a búza tápértéke nagyobb az összes többi gabonáénál. A búza fajainak és fajtáinak legkülönbözőbb éghajlati igényei, valamint rendkívül jó alkalmazkodó képessége teszi lehetővé példátlanul széleskörű elterjedését (Antal, 2005).

Vetésterülete, világviszonylatban 245-250 millió hektárra tehető. Magyarországon, évente megközelítőleg 1 millió 250 ezer hektáron termesztenek búzát, amelynek termésátlaga 5 t/ha (Radics, 1994). Az elmúlt években a gombabetegségek mellett a vírusbetegségek kártétele is egyre inkább növekvő tendenciát mutat Magyarországon ugyanúgy, mint a világ más gabonatermesztő országaiban. A rezisztens fajták iránt mutatkozó megnövekedett igények miatt a növénynemesítés jelentősége felértékelődött. A vírusok ellen hatékonyan csak a betegségek megelőzésével védekezhetünk. Ezért, más nemesítési szempontok mellett elengedhetetlenül fontos a gabonatermesztésben a vírusok elleni rezisztenciára nemesítés.

Munkánk során célul tűztük ki a dél-magyarországi gabonaültetvények 2012. évi vírusfertőzöttségének vizsgálatát. Ehhez a Szegedi Gabonakutató Intézet Kecskés telepéről származó minták szolgáltak alapul. Az adott év áprilisában és júniusában gyűjtöttünk mintákat azzal a céllal, hogy megállapítsuk a vírusfertőzöttség mértékét és az egyes kórokozók gyakoriságát az előző évekhez képest.

## *ANYAG ÉS MÓDSZER*

Vizsgálatainkhoz a Gabonakutató Nonprofit Kft. területén (Kecskés-telepen) 2012. áprilisban és júniusban elsősorban vírustüneteket mutató és néhány tünetmentes levélmintát gyűjtöttünk. Vizsgálataink során 120 minta vírusfertőzöttségét határoztuk meg. A mintákat hűtve szállítottuk és a vizsgálatok elvégzéséig polietilén tasakokban, fagyasztva tároltuk.

A vírusok kimutatására DAS ELISA módszert alkalmaztunk, a Loewe Biochemica árpa sárga törpülés vírus (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV), árpa csíkos mozaik vírus (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV), rozsnok csíkos mozaik vírus (*Brome streak mosaic virus*, BStMV), búza törpülés vírus (*Wheat dwarf virus*, WDV) és a búza csíkos mozaik vírus (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV) antiszérumait használva. A színváltozás mértékét

Labsystem Multiscan RC ELISA fotométerrel 405 nm hullámhosszon értékeltük. Pozitívnak tekintettük azokat a mintákat, amelyek mért extinkciós értékei meghaladták a negatív kontroll extinkciós értékének a háromszorosát.

## *EREDMÉNYEK*

Az áprilisban gyűjtött mintákból 4 BYDV, 22 BSMV, 12 BStMV és 23 WDV fertőzést azonosítottunk. A júniusban gyűjtött mintákban 3 BYDV, 1 BSMV, 5 WDV és 8 WSMV fertőzöttet mutattunk ki. A 2012. évi mérések alapján megállapítottuk, hogy a WDV volt a legnagyobb számban jelen az áprilisi mintákban, ezzel ellentétben, a júniusi mintákban a WSMV előfordulása volt a legmagasabb (1. táblázat). A BYDV fertőzés mértéke számottevően nem változott a vizsgált időszakokban. A BSMV, BStMV és WDV előfordulása az áprilisi időszakhoz mérten júniusban jelentős csökkenést mutatott (1. ábra). WSMV fertőzést az áprilisi mintákban nem azonosítottunk, de júniusban ez volt a legszámottevőbb (1. ábra). A vírusok önmagukban és komplexen is előfordultak. Az áprilisi mintákban WDV és BSMV komplex fertőzése 9, a WDV és BStMV fertőzése pedig 4 mintában volt kimutatható. A többi vírus komplex fertőzése nem volt számottevő.

*1. táblázat*

**A vizsgált vírusok előfordulásának gyakorisága 2012-es évben**

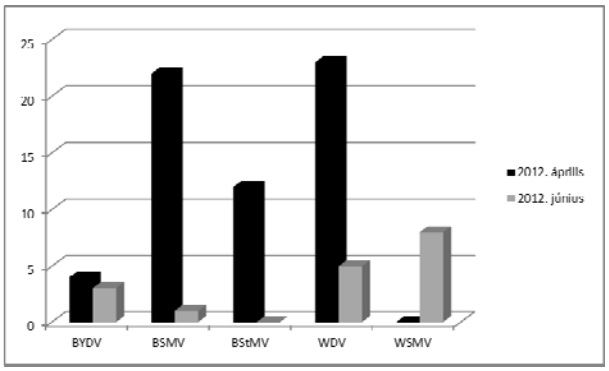
| Vírusok*(1) | 2012. év | |
|---|---|---|
| | áprilisi minták (2) (60 db) | júniusi minták (3) (60 db) |
| BYDV | 4 | 3 |
| BSMV | 22 | 1 |
| BStMV | 12 | 0 |
| WDV | 23 | 5 |
| WSMV | 0 | 8 |

*: BYDV (árpa sárga törpülés vírus), BSMV (árpa csíkos mozaik vírus), BStMV (rozsnok csíkos mozaik vírus), WDV (búza törpülés vírus), WSMV (búza csíkos mozaik vírus)

*Table 1: The incidence of the virus in 2012, Viruses(1), samples of april (2) samples of june (3)*

*: BYDV (*Barley yellow dwarf virus*), BSMV (*Barley stripe mosaic virus*), BStMV (*Brome streak mosaic virus*), WDV (*Wheat dwarf virus*), WSMV (*Wheat streak mosaic virus*)

*1. ábra*: **A vírusfertőzöttség a 2012-es évben**




Megjegyzés: BYDV (árpa sárga törpülés vírus), BSMV (árpa csíkos mozaik vírus), BStMV (rozsnok csíkos mozaik vírus), WDV (búza törpülés vírus), WSMV (búza csíkos mozaik vírus)

*Figure 1: Virus infection of 2012*

Comment: BYDV (*Barley yellow dwarf virus*), BSMV (*Barley stripe mosaic virus*), BStMV (*Brome streak mosaic virus*), WDV (*Wheat dwarf virus*), WSMV (*Wheat streak mosaic virus*)

## *KÖVETKEZTETÉSEK*

Az általunk vizsgált vírusok jelenléte az áprilisi mintákban számottevőbb volt a júniusi eredményekhez képest. Az áprilisi mintákban a WDV és a BSMV fertőzése volt a legszámottevőbb, ezt követte a BStMV, és a BYDV fertőzése. A WSMV nem volt kimutatható az április mintákban, de a júniusi vizsgálatok során a legnagyobb számban fordult elő, míg a többi vírus fertőzöttsége számottevően lecsökkent. A komplex fertőzések szintén az áprilisi mintákban fordultak elő nagyobb számban. A 2012-es évben a vizsgált területen a legjelentősebbnek a WDV fertőzése bizonyult.

A BSMV mechanikailag könnyen átvihető (levélérintkezés, szél és jégkár, rovarkár), azonban a fertőzések szempontjából a meghatározó a maggal és a pollennel terjedő terjedés (Horváth, 1999). A BYDV cirkulatív módon törzs-specifikus levéltetűfajokkal terjed (Kervarrec-Helloco *et al.,* 2002). A BStMV levélatkákkal és mechanikai úton vihető át (Milicic *et al.,* 1982). A WDV a kabócákkal cirkulatív módon terjed (Horváth, 1995). A WSMV mechanikailag, a beteg növény szövetnedvével, továbbá levélatkákkal vihető át (Horváth, 1999).

A rezisztens fajták használatán túlmenően a vírusvektorok biológiájának ismeretében csökkenthető, esetleg megakadályozható a kórokozók terjedése. 2011. év ősze kellően száraz és meleg volt ahhoz, hogy a WDV terjesztő kabócák felszaporodhattak, így az őszi gabonavetésen történő táplálózásukkal hozzájárultak a frissen kikelt búza vírusfertőzéséhez. Mindez megállapítható a vírusvektor levéltetű és atkafajok esetében is. A vetésidő megválasztásával és amennyiben szükséges inszekticides kezelésekkel védekezhetünk a vektorok károsítása ellen. Későbbi vetésidő esetén a kártevők téli nyugalomba vonultak, így csökkenthető illetve elkerülhető a kelő növények károsítása. Eredményeink kiegészítik a korábbi évek során végzett vizsgálatok adatait, amelyek során megbizonyosodtunk az ökológiai tényezők meghatározó szerepéről a gabonavírusok terjedésében (Áy *et al.,* 2008, Gáborjányi *et al.,* 2002, Mesterházy *et al.,* 2002, Papp *et al.,* 1996).

## *KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS*

A szerzők ez úton fejezik ki köszönetüket a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0025 pályázatok támogatásáért. A projekt a Magyar Állam és az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

### *IRODALOM*

Antal J. (2005): Növénytermesztéstan 1. A növénytermesztés alapjai. Gabonafélék. Mezőgazda kiadó, p. 183.

Áy, Z., Kerényi, Z., Takács, A., Papp, M., Petróczi, I., Gáborjányi, R., Silhavy, D., Pauk, J. and Kertész, Z. (2008): Detection of cereal viruses in wheat (Triticum aestivum L.) by serological and molecular methods. Cereal Res. Commun. 36, 215-224.

Gáborjányi R. Pásztor L. Papp M. Szabó J. Mesterházy Á. Németh T. and Kőmíves T. (2002): Use of remote sensing to detect virus infected wheat plants in the field. Cereal Res. Commun. 31, 113-120.

Horváth J. (1995): A szántóföldi növények betegségei. Mezőgazda kiadó, p.18.

Horváth J. (1999): Növényvirológia. Egyetemi jegyzet. Keszthely. p. 179

Kervarrec-Helleco C. Riault, G. and Jacquot E. (2002): Biolistic-mediates inoculation of immature wheat embryos with Barley yellow dwarf virus PAV. J. Virol. Methods, 102, 160-166.

Milicic D. Mamula D. Plazibat M. (1982): Some propertis of brome streak mosaic virus. Acta Bot. Croat., 41, 7-12.

Mesterházy Á. Gáborjányi R. Papp M. and Fónad P. (2002): Multiple virus infections of wheats in South Hungary. Cereal Res. Commun. 30, 329-334.

Papp M. Mesterházy Á. Vasdinyei R. and Gáborjányi, R. (1996): Mixed virus inefction of wheat in South-East Hungary in 1994 and 1995. Cereal Res. Commun. 24, 179-182.

Radics L. (1994): Szántóföldi növénytermesztéstan. Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem, Kertészeti Kar, Budapest. p. 176

# The detection and identification of *Tobacco ringspot virus* in blueberry bushes growing on plantations in Central Poland

**Chodorska M. – Paduch-Cichal E. – Kalinowska E.**
Department of Plant Pathology, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159, 02-776 Warsaw, Poland
maria_chodorska@o2.pl

***SUMMARY***

*Tobacco ringspot virus (TRSV, family Comoviridae, genus Nepovirus) infects blueberry bushes causing the apparent decline in yields. On leaves were observed ring spot disease, chlorosis and necrotic spots. Investigations were carried out into the detection of Tobacco ringspot virus (TRSV) in various organs of highbush blueberry cvs Bluecrop, Darrow and Herbert grown on a production plantation situated in central Poland. The research was conducted from May 2010 to April 2011 using DAS-ELISA. In May 2009 TRSV was found in cvs Bluecrop, Herbert and Darrow. Samples of plant material (bud flower, flower, leaf, bark) were collected individually from each highbush blueberry plant of every cultivar. The material collected for the investigations was tested using DAS-ELISA to detect the pathogen. It was established that the detection of TRSV in each of the investigated cvs Bluecrop, Darrow and Herbert depended on the tested plant materials as well as the period in which the tests were performed. The effectiveness of the viruses detection varied for the investigated cultivars. The presence of the TRSV was confirmed in leaf samples with specific primer pair CoPr3F/R designed in the conserved region of the coat protein gene.*

**Keywords:** blueberry cultivars, TRSV, DAS-ELISA, RT-PCR

## *INTRODUCTION*

*Tobacco ringspot virus* (TRSV) belongs to the pathogens occurring most frequently on highbush blueberry plantations in the USA (Converse and Ramsdell, 1982; Fuchs *et al.*, 2010) and Europe: Poland (Paduch-Cichal *et al.*, 2011).

Due to the character of the diseases, this virus comprise a serious risk and cause significant losses in highbush blueberry cultivation, which amount to even a few million dollars a year (Michigan State, USA) (Urban *et al.*, 1988; Wegener *et al.*, 2006). The most common method of protecting blueberry bushes against viruses is the production of virus-free young plants, which requires testing bushes in mother stock nurseries.

The laboratory assays, including *Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (DAS-ELISA) and *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) are used for the detection of TRSV. ELISA was used in mass testing of blueberry plants for TRSV (Fuchs *et al.*, 2010). Paduch-Cichal *et al.* (2011) found TRSV in leaves and flowers in May. Fuchs *et al.* (2010) detected TRSV in leaf or root samples in September. Since DAS-ELISA results depended on the tissue source and the time of the year in which samples were collected, RT-PCR appeared a more sensitive method for detecting TRSV. The leaf samples collected from blueberry plants that showed symptoms generally proved to be the most suitable organ for RNA isolation, and gave a sufficient level of viral TRSV-RNA for detection by RT-PCR.

However, little is known about whether reliable results can be obtained with ELISA and RT-PCR when different tissues are used and the tests are performed at various times of the year. Highbush blueberry plants are known for high antioxidant activity associated with high antioxidant capacity and being rich in phenolics and anthocyanins (Prior *et al.*, 1998, Wu *et al.*, 2004). Due to the presence of considerable amounts of polyphenols and other virus inhibitors in blueberry plants, nucleic acid extraction is not easy. The amounts of these components vary in particular tissues in different periods of the year. The aim of the present study was to check the possibility of TRSV detection by DAS-ELISA and RT-PCR in various blueberry tissues during the vegetation and leafless period.

## *MATERIALS AND METHODS*

The research was performed at the Department of Plant Pathology (Faculty of Horticulture and Landscape Architecture, Warsaw University of Life Sciences-SGGW) from May 2010 to April 2011.

The investigation material comprised 15 highbush blueberry plants of cv. Bluecrop, 12 plants of cv. Darrow and 38 plants of cv. Herbert grown on a plantation situated in central Poland. Bushes were chosen on the basis of DAS-ELISA results obtained in May 2009. *Tobacco ringspot virus* (TRSV) were found in the bushes of cvs Bluecrop, Herbert and Darrow. Control combination comprised control samples (samples of plant sap with no virus) taken from the diagnostic kit (set for 500 tests) for virus detecting by Agdia Incorporated (USA).

Samples of plant material were collected every four weeks according to the following scheme (Table 1).

*Table 1*

**Scheme of collected samples of plant materials for every cultivar**

| Organ | Terms of taking samples |
|---|---|
| Leaves<br>Flower | May 2010 |
| Leaves | June – October 2010 |
| Bark | November 2010 – April 2011 |
| Flower buds | March - April 2011 |

The samples of plant material were collected individually from each highbush blueberry plant of every cultivar: 8-10 leaves (leaf sample) from randomly chosen shoots, 8-10 flower buds (bud sample) or flowers (flower sample) from randomly chosen shoots, and samples of bark from 2-3 one-year-old and many-year-old shoots.

**Serological detection of TRSV**

TRSV was detected by DAS-ELISA with specific antibodies from Agdia Incorporated (USA) according to the manufacturer's protocol. Extract from the investigated plants was obtained by adding 2.5 ml of GEB buffer (general extract buffer, dilution 1:10) to 0.250 g plant tissue. Substrat hydrolysis was recorded using the Infinite® 200 PRO (Tecan) with the filter of 405 nm wavelength. Samples were considered positive if their optical density readings were at least twice of negative control.

**Statistical analysis of DAS-ELISA results.**

Multifactor analysis of variance was performed with the help of the IBM SPSS Statistics 19 programme for the absorbance values obtained in DAS-ELISA to which were subjected the samples collected in various months from different organs of each of the 15, 12 and 38 highbush blueberry plants of cvs Bluecrop, Darrow and Herbert, respectively. Differences between mean values of absorbance obtained for each of the evaluated virus were determined by the Tukey's range test at the significance level of $\alpha = 0.05$.

**Detection of TRSV using RT-PCR**

To confirm the occurrence of TRSV, blueberry leaf samples were assayed for TRSV by RT-PCR with total RNA and appropriate primers. Total nucleic acids were isolated from the leaf tissue of DAS-ELISA-positive (12 samples) and negative samples (5 samples) using the silica capture (SC) method described originally by Boom *et al.* (1990) and adapted to the diagnosis of plant viruses by Malinowski (1997). For RT-PCR, Titan One Tube RT-PCR System (Roche) was used with the primer pair specific to the fragment of the coat protein gene: 5'-AAGAAGGGTTTGGTAGACTTGG-3' and 5'- ACACTCGCAATGCAACTATGTC-3'.

A primer pair specific to the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase chloroplast (*Rbc1*) gene (Rbc1-F/Rbc1-R 5'-TACTTGAACGCTACTGCAG-3' and 5'-CTGCATGCATTGCACGGTG-3') (Sanchez-Navarro *et al.*, 2005) was used as the internal control to amplify the corresponding mRNA in blueberry leaf tissue by RT-PCR.

Single tube RT-PCR used a 30 min heating step at 50°C and a 2 min heating step at 94°C followed by 35 cycles of 30 sec melting at 94°C, 45 sec annealing at 53°C, and 45 sec elongation at 68°C with a final extension of 7 min at 68°C. The reaction products were resolved by electrophoresis in the buffer TBE in 1.2% agarose gel.

## *RESULTS*

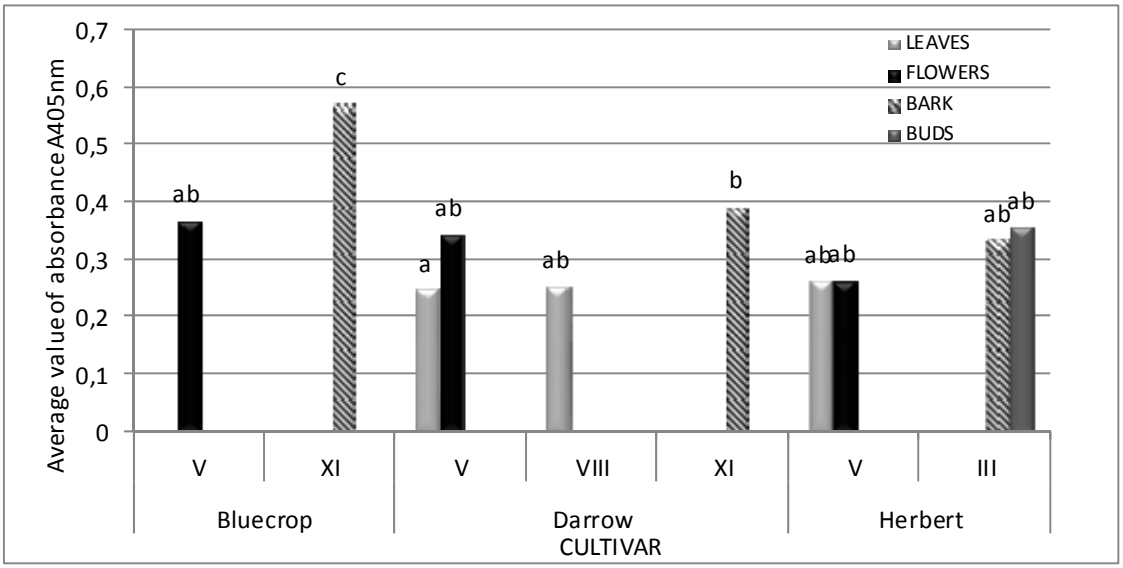
**Serological detection of TRSV**

Results indicated that 39 samples (11 samples of cv. Bluecrop, 14 samples of cv. Darrow and 14 samples of cv. Herbert) were infected with TRSV.

The analysis of the mean absorbance values obtained during material testing showed that the detection of TRSV in plants of cvs Bluecrop, Darrow and Herbert depended on the tested plant parts and the month during which the test was performed.

TRSV was found in flower samples collected in May from the bushes of all the three investigated cultivars. In bark samples, the virus was found in November (cvs Bluecrop and Darrow) and in March (cv. Herbert). TRSV was present in the leaf samples of cv. Darrow in May and August and in leaf samples collected from cv. Herbert in May. Additionally, TRSV was found in bud samples from cv. Herbert in March. Higher mean $A_{405nm}$ values were obtained for bark samples collected from cvs Bluecrop and Darrow in November as compared to mean $A_{405nm}$ values obtained in May for flower and leaf samples, respectively. The obtained results point to the occurrence of statistically significant differences in mean absorbance values found while testing bark samples from cv. Bluecrop and samples from cvs Darrow and Herbert (Figure 1).

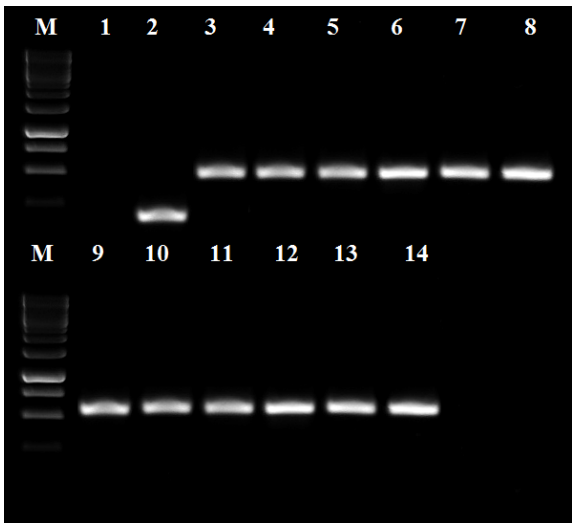
*Figure 1:* **The detection of TRSV in different parts of three highbush blueberry cultivars during various periods of the year**




**Detection of TRSV using RT-PCR**

The presence of TRSV was confirmed by RT-PCR in leaf samples of blueberry bushes (4 cv Bluecrop, 4 cv Darrow and 4 cv Herbert) with amplification of a 530 bp fragment of the coat protein gene. As expected, no product was amplified from total RNA of healthy blueberry leaves while a 183 bp long fragment corresponding to the plant internal control *Rbc1* was obtained (Figure 2).

*Figure 2:* **Agarose gel analysis of TRSV amplicons obtained by RT-PCR assays. Lane M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas); lanes 1-2: healthy highbush blueberry (DAS-ELISA-negative samples); lanes 3-14: samples infected with TRSV (DAS-ELISA-positive samples). The TRSV CP gene amplicons are shown at 530 bp. The Rbc1 amplicon is shown at 183 bp**




## *DISCUSSION*

The results presented in this article concerning the detection of TRSV in the blueberry cultivars tested by ELISA agree with those obtained by other scientists. Paduch-Cichal *et al.* (2011) detected BlScV in flower buds, leaves and flowers. In the presented study TRSV, can be identified in flowers and leaves in May. The best organs for detecting TRSV in cv. Darrow are flowers in May and leaves in May or August.

The authors of this article found that bark samples from cv. Darrow or cv. Herbert are the best material for detecting TRSV in November and in March respectively. Moreover, the virus can be detected in flower buds from cv. Herbert in March. The presence of the viruses in bark or flower bud samples had not been reported earlier.

In our experiments the symptomatic and the asymptomatic blueberry leaves, flower buds and flowers were suitable tissue for TRSV detection by RT-PCR. Previously leaves showed symptoms were reported as the most effective tissue for the viruses detection in blueberry plants (Fuchs et al 2010). Unfortunately, TRSV failed by RT-PCR detection in bark tissue of three tested cultivars.

In the experiment reported here, the bushes of cvs Bluecrop and Herbert in which the presence of TRSV was detected showed symptoms similar to those which had been earlier described in the USA (Fuchs *et al.,* 2010).

From a practical point of view, the assessment of the plants' health based only on their observation is not a sufficient diagnostic method. Symptomless infected plants may comprise a source of infection for the neighbouring healthy plants. As far as Poland is concerned, this insight results from the investigations carried out by Łabanowska (2010) the beet leaf aphid (*Aphis fabae* Scopoli), peach aphid (*Nectarosiphon persicae* Sulzer) and berry aphid (*Amphorophora borsalis*) were observed on highbush blueberries.

The results of the research reported in the present paper show that different parts of the highbush blueberry may be used during the vegetation and leafless periods for the detection of TRSV by DAS-ELISA. Additionaly, TRSV can be detected by RT-PCR during the vegetation. These data are very valuable because they allow to prolong the testing period of highbush blueberry plants to cover the entire year. These data could be helpful in establishing the testing schedule according to which candidate materials for virus-free blueberry plants should be screened for these viruses as part of sanitary certification programmes.

***REFERENCES***

Converse R.H.-Ramsdell D.C. (1982): Occurrence of tomato ringspot viruses and dagger and other nematodes associated with cultivated highbush blueberries in Oregon. Plant Dis. 66, 710-712.

Fuchs M.-Abawi G.S.-Marsella-Herrick P.-Cox R.-Cox K.D.-Carroll J.E.-Martin R.R. (2010): Occurrence of tomato ringspot virus and tobacco ringspot virus in highbush blueberry in new York state. J. Plant Path. 92, 451-459.

Łabanowska B. (2010): Blueberry pests and their control possibilities. National Conference on Science Practice: 'Intensification of berry bushes planted by the implementation of the latest research results'. Growing blueberries, Skiemiewice, 59-63.

Paduch-Cichal E.-Kalinowska E.-Chodorska M.-Sala-Rejczak K.-Nowak B. (2011): Detection and identification of viruses of highbush blueberry and cranberry using serological ELISA test and PCR technique. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus 10, 201-215.

Prior R.L.-Cao G.-Martin A.-Sofic E.-McEwan J.-O'Brien C.-Lischner N.-Ehlenfeldt M.-Kalt W.-Krewer G.-Mainland C.M. (1998): Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety *Vaccinium* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 2686- 2693.

Urban L.A.-Ramsdell D.C.-Klomparens K.L.-Lynch T.-Hancock J.F. (1988): Detection of blueberry shoestring virus in xylem and phloem tissues of highbush blueberry. Phytopathology 79, 488-493.

Wegener L.A.-Martin. R.R.-Bernardy M.G.-MacDonald. L.-Punja. Z.K. (2006): Epidemiology and strain identification of Blueberry scorch virus on highbush blueberry in British Columbia. Can. J. Plant Pathol. 28, 250-262.

Wu X.-Beecher G.R.-Holden J.M.-Haytowitz D.B.-Gebhardt S.E.-Prior R.L. (2004): Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 4026-4037.

# *Cladosporium* species as hyperparasites of powdery mildew fungi

**Tatiana M. Dolińska - Małgorzata Schollenberger**
Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 166 str., 02-787 Warsaw, Poland
tatiana_dolinska@sggw.pl

***SUMMARY***

*Fungi of the order Erysiphales are one of the main pathogens which in optimal conditions occur in epidemic intensity. Powdery mildews are important diseases of crops, ornamentals plants in the urban landscape and young plants in nursery production. Hyperparasites, which draw nutrient from these plant pathogens can be observed in natural environment. An excellent example are mycoparasites of Cladosporium species which infect both rusts and powdery mildews. During the growing season 2009-2011 the relationship between Cladosporium species and fungi of the order Erysiphales was investigated. Samples of hyperaparsites were found in Poland and analysed using traditional and molecular method. Leaves with characteristic white mycelium of powdery mildew were artificially inoculated under laboratory conditions with spore suspension of Cladosporium spp. Observation under a stereomicroscope and light microscope showed that olive-green conidiophores of mycoparasites grew only on the surface of mature chasmothecia, especially covered appendages. Not all tested fungi of the order Erysiphales were infected. The highest degree of infection in all the powdery mildews analysed in the study was observed in the Phyllactinia spp. which attack, for example, common hazel (Corylus avellana) and European ash (Fraxinus excelsior). The scanning microscope studies showed that mycelium of mycoparasites grew only on the surface of chasmothecia.*

**Keywords:** mycoparasites, order Erysiphales, *Cladosporium* spp.

## *INTRODUCTION*

Powdery mildew fungi are very huge group of plant pathogens, comprising more than 500 species (Braun 1987). The hosts of powdery mildew are many important crops which grow in the field and greenhouses (Ostrowska *et al.,* 2008, Karbalaei *et al.,* 2009). Fungi of the order Erysiphales cause diseases which can potentially infect a wide range of ornamental plant, trees or bushes in park and urban landscape (Stompor-Chrzan 2008, Werner and Karolewski 2010). Powdery mildews affect young plant leaves, flower buds and young tissues of shoots so it can also be troublesome in nurseries (Karnataka 2010). Problem with powdery mildews are still increasing in Poland, especially with regard to powdery mildews which attacked *Aesculus* sp., *Syringa* sp., *Clematis* sp., *Rhododendron* sp. and *Lonicera* sp. (Werner i Andrzejak 2008). The main strategy to limit populations of these pathogens is using pesticides, however this method cannot be used in organic farm and in the urban landscape. The other way to inhibit powdery mildews is using some fungi called hyperparasites (Kiss 2003). An excellent example of mycoparasites is *Cladosporium* species which draw nutrients from powdery mildews, rusts and even insects (Abdel-baky *et al.,* 1998, Adamska and Czerniakowska 2010, Dolińska *et al.,* 2011). The mycelium of *Cladosporium* spp. was very often found on dogwood powdery mildew (*Erysiphe pulchra*) or powdery mildew on European hazelnut (*Phyllactinia gutatta*) (Dugan and Glawe 2006, Mmbaga *et al.,* 2008). Kiss (2003) lists *Cladosporium spongiosum* on chasmothecia of *Phyllactinia dalbergiae* and *C. cladosporioides* on the mycelium of *Erysiphae cichoracearum*. Author claimed that interaction between *Cladosporium* spp. and powdery mildews is probably only form of specialized saprophytism. However, earlier Raghavendra Rao (1978) observed that hyphae of *C. oxysporum* infected immature chasmothecia of *P. gutatta* and led to their functionless by dislodgement. The mycoparasite attacked also mature fruiting bodies and caused plasmolysis of asci and degradation of ascospores.

In our investigations we examined the ability of *Cladosporium* spp. to colonized surface of different species of powdery mildews. The interactions between mycoparasites and fungi of the order Erysiphales are shown.

## *MATERIALS AND METHODS*

### Sample of mycoparasites

Samples of *Cladosporium* spp. were isolated from rust sori and chasmothecia of powdery mildews which were found in various parts of Poland during 2009-2012. All hyperparasites of *Cladosporium* spp. were determined by two different method – traditional and molecular. First technique were visual inspection of pure culture growing on potato dextrose agar (PDA DIFCO) and microscopical observation the morphology of mycoparasites conidiophores and conidia (Ellis 1971, Schubert *et al.,* 2007, Bensch *et al.,* 2010). Isolates were also identified using the molecular analysis which based on PCR reaction. Mycelium from pure cultures was crushed in liquid nitrogen and removed to an Eppendorf tube. The Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Symbios) was used to isolate DNA. For amplification the Internal Transcribed Spacer region - ITS1 and ITS4 were used (Batzer *et al.,* 2005, White *et al.,* 1990). The annealing temperature was adjusted to 45$^{o}$C. DNA sequences were determined by Institute of Biochemistry and Biophysics of the Polish Academy of Sciences and compared in Gen Bank. Table 1 presents all tested mycoparasites, hosts

of hyperparasites which were identified according to Majewski (1977, 1979), Sałata (1985) and Glawe (2006) keys and host plant.

*Table 1*

**Samples of mycoparasites isolated from rusts and powdery mildews and host plant of pathogens**

| Symbol of hyperparasite | Hyperparasite | Host (rust or powdery mildew) | Infected plant |
|---|---|---|---|
| *C1* | *Cladosporium cladosporioides* | *Gymnosporangium cornutum* | *Sorbus aucuparia* |
| *C1* | *Cladosporium cladosporioides* | *Puccinia caricina* | *Urtica dioica* |
| *C1* | *Cladosporium cladosporioides* | *Erysiphe necator* | *Vitis amurensis* |
| *C2* | *Cladosporium herbarum* | *Phragmidium violaceum* | *Rubus fruticosus* |
| *C2* | *Cladosporium herbarum* | *Phyllactinia fraxini* | *Fraxinus excelsior* |
| *C2* | *Cladosporium herbarum* | *Gymnosporangium sabinae* | *Pyrus communis* |
| *C3* | *Cladosporium oxysporum* | *Erysiphae* sp. | *Actinidia kolomikta* |
| *C4* | *C. pseudocladosporioides* | *Coleosporium tussilaginis* | *Tussilago farfara* |
| *C5* | *Cladosporium sphaerosphermum* | *Puccinia coronata* | *Frangula alnus* |
| *C6* | *Cladosporium tenuissimum* | *Phyllactinia guttata* | *Coryllus avellana* |
| *C6* | *Cladosporium tenuissimum* | *Phyllactinia guttata* | *Coryllus avellana* |
| *C7* | *Cladosporium uredinicola* | *Phragmidium violaceum* | *Rubus fruticosus* |
| *C7* | *Cladosporium uredinicola* | *Tranzschelia pruni-spinosae* | *Anemone ranunculoides* |
| *C8* | *Cladosporium phyllactinicola* | *Phyllactinia fraxini* | *Fraxinus excelsior* |
| *C9* | *Cladosporium aecicidicola* | *Tranzschelia pruni-spinosae* | *Anemone ranunculoides* |
| *C10* | *Cladosporium spongiosum* | *Podosphaera fuliginea* | *Cucurbita pepo* |

**Interaction between *Cladosporium* spp. and powdery mildew fungi**

In the investigation leaves from 19 different plant species infected by powdery mildews collected in the Mazovia Province in Poland were used. Mycoparasites hosts were identified only by traditional method according to Sałata (1985) and Glawe (2006) keys. To determine relationships between fungi, leaves with not infected mycelium and chasmothecia of powdery mildews were inoculated with spore suspension of *Cladosporium*. Suspension was made from conidia of *Cladosporium* (5 x $10^7$ conidia/ml), sterile distilled water and Tween20 solution. Each leaf was inoculated with 1 ml of spores suspension. Leaves were inoculated with spore suspension and placed in Petri dishes (20cm diameter) on wet, filter paper. As control leaves with powdery mildew were sprayed with sterile water. Ten replicates of Petri dishes were made and kept at 20$^o$C in the laboratory. After 72h, inoculated leaves were examined under a stereomicroscope. The results were presented using own 4-point scale:

0- lack of hyperparasites infection
1- infected chasmotecia
2- infected mycelium of powdery mildew
3- infected both chasmothecia and mycelium of powdery mildew.

In order to provide more details fruiting bodies of powdery mildews were examined by light microscope. In the investigation, a scanning electron microscope was also used. Naturally and artificially infected leaves with powdery mildews and *Cladosporium* sp. were dried and cut to small pieces. Samples were covered by gold and examined using a JEOL 6400 FEI QUANTA 200 scanning electron microscope.

***RESULTS***

Observations under a stereomicroscope showed that powdery mildews were hosts for *Cladosporium* spp. First conidiophores of *Cladosporium* spp. appeared after 24 h. Olivebrown hyphae of mycoparasites grown only on surface of mature chasmothecia (Fig. 1 and 2). Immature chasmothecia and mycelium were not infected at all. After 36 h for incubation 37% of fruiting bodies were completely overgrown. *Cladosporium* spp. were started sporulation after 72 h and then mycoparasites colonies could be found almost on 70% mature chasmothecia. In addition, fruiting bodies became dull and stopped shining. Light microscope was useful for showing conidiophores growing on the surface of chasmothecium (Fig. 3). Hyphae also can be seen around appendages especially on the upper surface of them. In Fig 4 a lot of hyphae growing on fruiting bodies are shown at higher magnification. Scanning electron microscope showed that growth of *Cladosporium* colonies was concentrated on the top of chasmothecium. Mycoparasites produced long hyphae which coiled round appendages. On the surface of powdery mildews fruiting bodies no deformation was observed. The control represented by the leaves with powdery mildews treated with water remained healthy.

No relations between the plant tissue and hyperparasites were observed. Mycoparasitic tests showed that all the 10 isolates infected at least one of seventeen tested powdery mildew fungi (Table 2). Growth of mycelium of *Cladosporium* species such as: *C. tenuissimum, C. phyllactinicola,C. cladosporioides, C. uredinicola* and *C. oxysporum* were abundant on tested chasmothecia. The intensity of infection varied depending on the species of the powdery mildew. The observations showed that *C. pseudocladosporioides* and *C. spongiosum* attacked only two tested powdery mildews and produced less mycelium on the surface of chasmothecia. *Phyllactinia fraxinii* and *P. gutatta* were most often infected by hyperparasites, especially by C. *cladosporioides, C. phyllactinicola* and *C. aecidicola*. Investigation confirmed that *Podosphaera* sp. were less attractive for mycoparasites.

*Table 2*

**Tested powdery mildew, hosts plant and scale of infection by hyperparasites**

| Powdery mildew | Host plant | Point | Symbol of hyperparasite |
|---|---|---|---|
| *Erysiphe alphitoides* | *Quercus robur* | *1* | *C1 C4 C6* |
| *Erysiphe berberidis* | *Berberis vulgaris* | *0* | |
| *Erysiphe cichoracearum f. asteris* | *Aster novae-angliae* | *0* | |
| *Erysiphe convolvuli* | *Convolvulus arvensis* | *1* | *C3 C6 C8* |
| *Erysiphe diffusa* | *Robinia pseudoacacia* | *1* | *C1 C3 C6* |
| *Erysiphe euonymi-japonici* | *Euonymus* sp. | *1* | *C5 C7* |
| *Erysiphe flexuosa* | *Aesculus hippocastanum* | *0* | |
| *Erysiphe necator* | *Vitis amurensis* | *0* | |
| *Erysiphe palczewskii* | *Caragana* sp. | *1* | *C1 C2 C7 C8* |
| *Erysiphe penicillata* | *Syringa vulgaris* | *1* | *C3 C8* |
| *Erysiphe* sp. | *Actinidia kolomicta* | *1* | *C1 C3 C8* |
| *Phyllactinia fraxini* | *Fraxinus excelsior* | *1* | *C1 C6* |
| *Phyllactinia guttata* | *Catalpa bignonioides* | *1* | *C8 C9* |
| *Phyllactinia guttata* | *Corylus avellana* | *1* | *C3 C7 C8 C10* |
| *Phyllactinia guttata* | *Sorbus aucuparia* | *1* | *C1 C8 C9* |
| *Podosphaera fuliginea* | *Cucurbita pepo* | *0/1* | *C2* |
| *Podosphaera fusa* | *Taraxacum officinale* | *0* | |
| *Podosphaera plantaginis* | *Plantago major* | *0* | |
| *Sawadaea bicornis* | *Acer negundo* | *1* | *C6* |

*Fig. 1.* ***C. herbarum on chasmothecia of E. palczewskii***

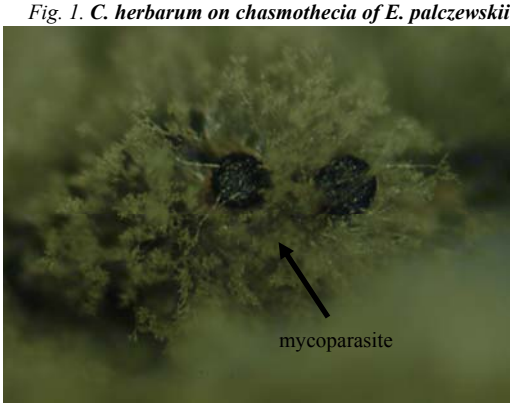



*Fig. 2.* ***C. phyllactinicola on P. guttata***

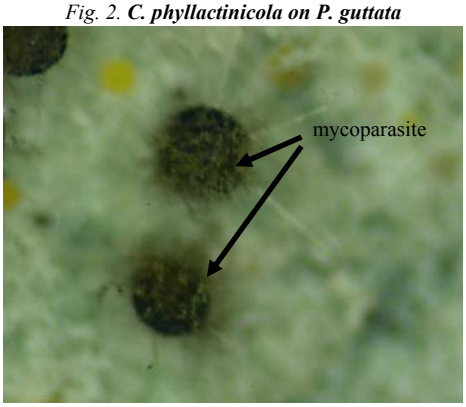



*Fig. 3.* ***Conidiophores of C. tenuissimum on P. fraxinii***

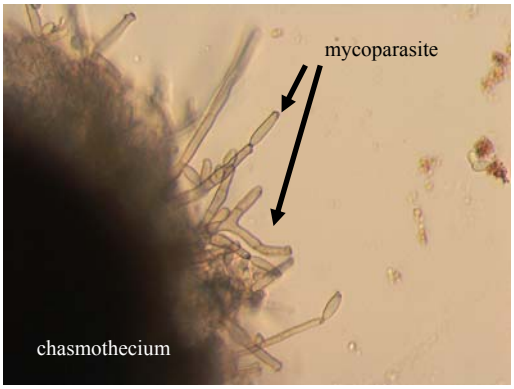
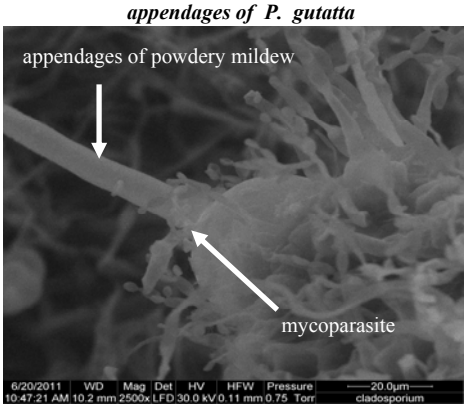



*Fig. 4.* ***Hyphae of C. cladosporioides on the appendages of P. gutatta***




***(Photos: T.M. Dolińska)***

## *DISCUSSION*

The results of this research showed clearly that *Cladosporium* spp. have ability to infect powdery mildew fungi. Kiss (2003) reported that two species - *C. spongiosum* and *C. cladosporioides* could be potential hyperparasites against fungi of order Erysiphales, however new evidence showed that more species of *Cladosporium* may colonize powdery mildews. In our study, mycoparasites were mainly observed on *Phyllactinia* spp. and *Erysiphae* spp. which is similar to Kiss (2003), Dugan and Glawe (2006) and Mmbaga (2008) reports. Moreover, research confirmed that genus *Podosphaera* was not host for *Cladosporium* spp. The one exception was *P. fuliginea* on *Cucurbita pepo* which was infected by *C. tenuissimum*.

We observed that fungi from *Cladosporium* genus parasite only of mature, black chasmothecia, what is contrary to Raghavendra Rao (1987). Immature fruiting bodies and mycelium were not infected by *Cladosporium* hyphae. The results of our investigation in compliance with studies conducted by Dugan and Glawe (2006) and Mmbaga et al (2008) suggest that the fungi from *Cladoporium* genus could be hyperparasites of powdery mildews. However, research determined relationships between *Cladosporium* spp. and powdery mildews should be continued to provide character of this interaction.

## *ACKNOWLEDGEMENTS*

The work was funded by Warsaw University of Life Sciences, research task no. 5051004110032.

### *REFERENCES*

Abdel-baky N.F., Nehal A.S., Abdel-salam A.H. (1998): Three *Cladosporium* spp. as promising biological control candidates for controlling whiteflies (Bemisia spp.) in Egypt. Pak. J. Biol. Sci. 1 (3), 188–195.

Adamska I., Czerniawska B. (2010): Nadpasożyty mączniaków prawdziwych roślin uprawnych i dziko rosnących pojezierza bobolickiego. [Hyperparasites of powdery mildews of cultivated and wild growing plants in Bobolice lake district] Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 50, (2) 869-873.

Batzer J.C., Gleason M.L., Harrington T.C., Tiffany L.H. (2005): Expansion of the sooty blotch and flyspeck complex on apples based on analysis of ribosomal DNA gene sequences and morphology. Mycologia, 97 (6), 1268–1286.

Bensch K., Groenewald J.Z., Dijksterhuis J., Starink-Willemse M., Andersen B., Summerell B.A., Shin H.-D., Dugan F.MSchroers H.-J., Braun U., Crous P.W. (2010): Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales) Studies in Mycology 67, 1–94.

Braun U. (1987): A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). Nova Hedwigia 89, 1–700.

Dolińska T.M., Bartkowska A., Schollenberger M. (2011): Light and scanning microscope observations of *Cladosporium uredinicola* growth on rust fungi Phytopathologia 61, 37-44.

Dugan F.M., Glawe D.A. (2006): *Phyllactinia guttata* is a host for *Cladosporium uredinicola* in Washington State. Pacific Northwest Fungi 1 (1), 1-5.

Ellis M. B. (1971): Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.

Glawe D. A. 2006. Synopsis of genera of Erysiphales (powdery mildew fungi) occurring in the Pacific Norwest.Pacific Northwest Fungi 1(12), 1-27.

Karbalaei Khiavi H., Shikhlinski H., Babaei Ahari A., Heydari A. (2009): Evaluation of different grape varieties for resistance to powdery mildew caused by *Uncinula necator*. Journal of Plant Protection Research 49(4), 434-439.

Karnataka J. (2010): Survey and epidemiology of powdery mildew of *Acacia auriculiformis* (A. Cunn.). Agric. Sci 23 (2) : 400-401.

Kiss L. (2003): A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. Pest Management Science 59: 475-483.

Majewski T. (1977): Flora polska. Rośliny zarodnikowe Polski i ziem ościennych. T. 9. Podstawczaki (Basidiomycetes), Rdzawnikowe (Uredinales I). [Flora of Poland, Spore plants of Poland and adjacent regions, Vol. 9 *Basidiomycetes*] PWN, Warszawa.

Majewski T. (1979): Flora polska. Rośliny zarodnikowe Polski i ziem ościennych. T. 11. Grzyby (Mycota), Podstawczaki (Basidiomycetes), Rdzawnikowe (Uredinales). [Flora of Poland, Spore plants of Poland and adjacent regions, Vol. 11 *Basidiomycetes,* Uredinales] PWN, Warszawa.

Mmbaga M.T., Sauve´ R.J., Mrema F.A. (2008): Identification of microorganisms for biological control of powdery mildew in Cornus florida Biological Control 44, 67–72.

Ostrowska A., Robak J., Dyki B. (2008): Zagrożenie ogórków uprawianych pod osłonami mączniakiem prawdziwym (*Erysiphe cichoracearum, Sphaerotheca fulginea*) i nowoczesne metody ich ochrony. [Increasing threat for cucumbers growing under cover by powdery mildew (Erysiphe cichoracearum, Sphaerotheca fulginea) and new methods their protection] Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 48(2), 487 – 490.

Raghavendra Rao N.N., Pavgi M.S. (1978): Two mycoparasites on powdery mildews. Sydowia 30:145–147.

Sałata B. (1985): Flora Polska - Rośliny Zarodnikowe Polski i Ziem Ościennych Grzyby (Mycota) Workowce (Ascomycetes) Mączniakowe (Erysiphales) Tom XV [Flora of Poland, Spore plants of Poland and adjacent regions, Vol. XV Mycota Ascomycetes Erysiphales] PWN - Warszawa-Kraków.

Schubert K., Groenewald J. Z., Braun U., Dijksterhuis J., Starink M., Hill C.F., Zalar P., de Hoog G.S., Crous P.W. (2007): Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales),with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics Studies in Mycology 58, 105–156.

Stompor-Chrzan E. (2008): Występowanie i szkodliwość chorób grzybowych floksa (Phlox l.) w nasadzeniach rabatowych na terenie Rzeszowa. [The influence of selected biopesticides on the development of leaf spot on phlox (phlox l.)]Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 529, 235–247.

Werner M., Andrzejak R. (2008): Patogeny obniżające wartości dekoracyjne drzew i krzewów terenów zieleni miasta Poznania. [Pathogens devastating trees and shrubs on green areas of the Poznań city]Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 529, 235–247.

Werner M., Karolewski Z. (2010): The occurrence of powdery mildew on deciduous *Rhododendron* in Poland; Phytopathologia 57, 31–38.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990): PCR protocols. In amplification ad direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. EDS MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White pp. 315-322 Academic Press London UK.

# Parasiting of *Cladosporium* species on *Puccinia arenariae*

**Tatiana M. Dolińska - Małgorzata Schollenberger**
Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 166 Str, 02-787 Warsaw, Poland
tatiana_dolinska@sggw.pl

***SUMMARY***

*Puccinia arenariae is autoecious rust which causes disease of Dianthus, Lychnis, Saponaria, Saxifraga and Silene. The symptoms of P. arenariae - small blisters of rust-brown telial sori occur on lower surface of leaves, stems or even flowers. Generally, the main strategy in plant protection to reduce the occurrence of P. arenariae is using chemical pesticides. Biological method, mainly based on hyperparasitism, can be also applied to control this rust. One of the most promising approaches to reduce this disease are Cladosporium spp. These fungi were noticed on Puccinia recondita, P. horiana, P. malvacearum and P. glomerata.*

*The aim of this study was the assessment of interaction between hyperparasites from Cladosporium species and rust Puccinia arenariae which infected carnation (Dianthus barbatus). The isolates of Cladosporium were collected from rusts and powdery mildews found on annual and perennial plants. In laboratory conditions carnation leaves with rust symptoms were inoculated with hyperparasites spores suspension. Leaves were observed by stereomicroscope, scanning and transmission microscope. The relationship between spores of P. arenariae and Cladosporium spp. was also tested. After three days olive-green conidiophores of hyperparasites were noticed on infected telial sori. The observations showed that hyperparasites formed thickening similar to appressorium on the surface of rust spores. Cladosporium spp. led to deformation and degradation of teliospores. The most effective hyperparasites were C. aecicidicola, C. herbarum, C. tenuissimum and C. uredinicola.*

**Keywords:** rust of carnation, *Puccinia arenariae*, hyperparasites, *Cladosporium* spp.

## *INTRODUCTION*

The genus *Cladosporium* Link is a large taxon of Ascomycota. Currently this taxon contains about 770 species, including saprotrophs, endophytes, plant and human parasites (Ellis 1971, Chew *et al.,* 2009). *Cladosporium* spp. are also hyperparasites which absorb nutrients from other organisms like many fungi and insects (Abdel-baky 1998, Kiss 2003). The main hosts of this hyperparasites are rusts - *Puccinia horiana*, *P. malvacearum*, *P. glomerata*, *Cronartium flaccidum* and *Uromyces appendiculatus* (Srivastava *et al.,* 1985; Moricca *et al.,* 2001). *Cladosporium* spp. were also observed on *P. arenariae* (Srivastava *et al.,* 1985) which causes disease on many plant of the family *Caryophyllaceae* (Mułenko and Kozłowska 2010). *Puccinia arenariae* is autoecious rust which products only one type of sori- brown telia with teliospores. Rust forms small blisters of rust-brown telial sori with teliospores on lower sides of leaves, stems and petioles (Majewski 1979). Pathogen affects many ornamental plant species, including *Dianthus*, *Lychnis*, *Saponaria*, *Saxifraga* and *Silene* (Majewski 1979, Farr and Rossman 2010). Currently *P. arenariae* is observed in both Poland (Majewski and Ruszkiewicz-Michalska 2008, Adamska *et al.,* 2010) and worldwide (Farr and Rossman 2010, Bahcecioglu and Kabaktepe 2012).

The purpose of the present paper is to provide the relationship between hyperparasites of *Cladosporium* species and *Puccinia arenariae*.

## *MATERIALS AND METHODS*

### Fungal strains and growth condition

Samples of *Cladosporium* were isolated in 2009-2011 from rusts and powdery mildews natural parasiting on herbs and perennial plants. The 16 isolates of *Cladosporium* spp. were found in area of 5 provinces in Poland (the Mazovia Province, the Silesia Province, the Świętokrzyskie Province, the Pomerania Province, the Podlasie Province). All fungus were grown on potato dextrose agar (PDA, DIFCO) in temperature 20$^{o}$C. Samples of rusts and powdery mildews were identified according to Majewski (1977, 1979) and Sałata (1985). Species of hyperparasites, hosts fungi and province where fungal strains were found are contained in Table 1.

In order to determine fungi of *Cladosporium* species, a traditional and molecular method, based on the PCR reaction were employed. DNA isolation was carried out according to Wizard Genomic Purification Kit protocol (Promega Symbios). In this investigation for dispersing fungal material liquid nitrogen was used. PCR reaction using primers -ITS1 and ITS4 (White 1990) was carried out according to modified Batzer *et al.* method (2005). The PCR reaction products were analyzed by agarose gel electrophoresis and observed using UV transillumination.

*Table 1*

**Species of hyperparasites used in the present study**

| Hyperparasite | Host (rust or powdery mildew) | Province |
|---|---|---|
| *Cladosporium cladosporioides* | *Gymnosporangium cornutum* | the Mazovia Province |
| | *Puccinia caricina* | |
| | *Erysiphe necator* | |
| *Cladosporium herbarum* | *Phragmidium violaceum* | the Mazovia Province |
| | *Phyllactinia fraxini* | the Pomerania Province |
| | *Gymnosporangium sabinae* | the Mazovia Province |
| *Cladosporium oxysporum* | *Erysiphae sp.* | the Mazovia Province |
| *C. pseudocladosporioides* | *Coleosporium tussilaginis* | the Świętokrzyskie Province |
| *Cladosporium sphaerosphermum* | *Puccinia coronata* | the Świętokrzyskie Province |
| *Cladosporium tenuissimum* | *Phyllactinia guttata* | the Mazovia Province |
| | *Phyllactinia guttata* | the Podlasie Province |
| *Cladosporium uredinicola* | *Phragmidium violaceum* | the Pomerania Province |
| | *Tranzschelia pruni-spinosae* | the Mazovia Province |
| *Cladosporium phyllactinicola* | *Phyllactinia fraxini* | the Silesia Province |
| *Cladosporium aecicidicola* | *Tranzschelia pruni-spinosae* | the Mazovia Province |
| *Cladosporium spongiosum* | *Podosphaera fuliginea* | the Mazovia Province |

**Relationship between hyperparasite from *Cladosporium* spp. and *P. arenariae***

Relationships between fungi were determined using leaves with telia of *P. arenariae* which were artificially infected with *Cladosporium* spp. spores suspension. The suspension was prepared from conidia of mycoparasites, sterile de-ionised water and Tween 20 solution (DIFCO). That suspension at the concentration of 1.5 x $10^7$ conidia/ml was sprayed on sterilized leaves of *Dianthus barbatus* with the rust symptoms and put in high humidity chamber. As a control leaves with rust were sprayed only with water. The experiment was repeated three times. Tested leaves of *D. barbatus* with *P. arenariae* were collected from the Mazovia Province area.

The results were observed after 72 h. The surface of the rust sori covering by mycoparasites was estimated using own scale of 0 to 3, where 0 means –"no parasitism or less than 10%" and 3 means – "50–100% of rust sori were overgrown by the parasite" (Dolińska *et al.,* 2011).

Stereomicroscope Olympus SZ11 and scanning electron microscope JEOL 6400 FEI QUANTA 200 (SEM) were used for observations of the rust sori surface. Samples to SEM observations were dried, cut and covered by gold. Light microscope - Olympus BX50(LM) was also used in our research. It was helpful to examine relationship between teliopores of *P. arenariae* and conidia of hyperparasites in the hanging drop. The teliopores were put with spores of each hyperparasites in drop of water on the coverslip. Petri dishes with wetted blotting paper were used to protect slides against the loss of moisture.

Joel JEM-1220 Transmission Electron Microscope (TEM) was used in order to determine interaction between fungi. Plant material with both fungi was cut into thin slices with thickness of the order of 1mm x 1mm, fixed and totally dried. The next step was embedding of samples in epoxy resins and cut them on small pieces in ultramicrotome using diamonds knife. Maximum thickness of test pieces was 100 nm. The cuts were picked up into cooper grids and observed using TEM.

***RESULTS***

An observation under stereomicroscope showed that isolates of *Cladosporium* spp. grew on telia of carnation rust. Infected telia were covered with green conidiophore and conidia of *Cladosporium* spp. (Figure 1). These symptoms were almost observed on every sori on leaves. The hyperparasites infected telia on 1$^{st}$, 2$^{nd}$ and 3$^{th}$ grade according to Dolińska *et al.* scale (2011), which means that mycelium covered over 20% or even 100% of the surface of telia (Table 2). Healthy leaf tissue was never invaded. All tested *Cladosporium* isolates infected *P.arenariae*.

The light microscope observations proved that hyperparasites often formed characteristic thickenings directly on the rust spore surface (Figure 2). *Cladosporium* hyphae encircled the teliospores, leading to their deformation (Fig. 2.). The scanning microscope observations confirmed the close contact between fungi. The hyperparasite hyphae closely adhered to the teliospore surface and produced callosity similar to appresorium (Figure 3).

In many cases more than one hyphae of hyperparasite infected teliospore of *P. arenariae*. Figure 4 showed indentation in the rust wall at the contact site which means that rust cell came in contact with the mycelium

of the hyperparasite. Tested fungi also led to dissolving the host cell wall, probably, by the lytic enzymes production.

*Table 2*

**Abilities of *Cladosporium* sp to infect *P. arenariae* (4 grades scale, according to Dolińska *et al.*, 2011)**

| Hyperparasite | Infection scale | Hyperparasite | Infection scale |
|---|---|---|---|
| *C. oxysporum* | *2* | *C.cladosporioides* | 2 |
| *C. pseudocladosporioides* | *2* | *C.herbarum* | 3 |
| *C. sphaerosphermum* | *2* | *C.tenuissimum* | 3 |
| *C. aecicidicola* | *3* | *C. phyllactinicola* | 1 |
| *C. spongiosum* | *1* | *C. uredinicola* | 3 |

*Figure 1:* **Conidiophore and conidia of *C. herbarum* on telia of *P. arenariae***

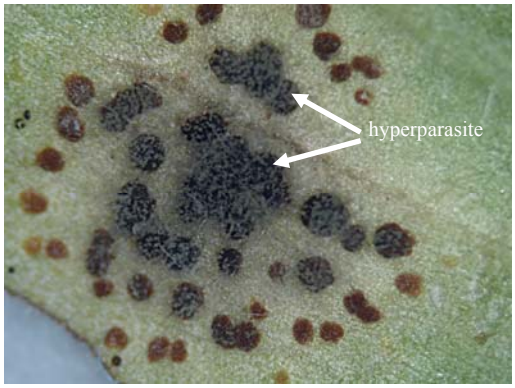



*Figure 2:* **Teliospores with conidiophore of *Cladosporium tenuissimum* (LM)**

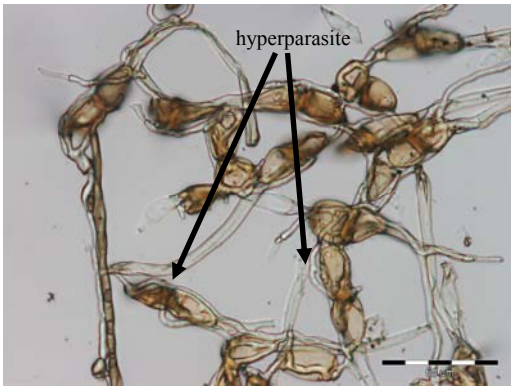



*Figure 3:* **Teliospores of *P. arenariae* infected hyphae of by *C.uredinicola* (SEM)**

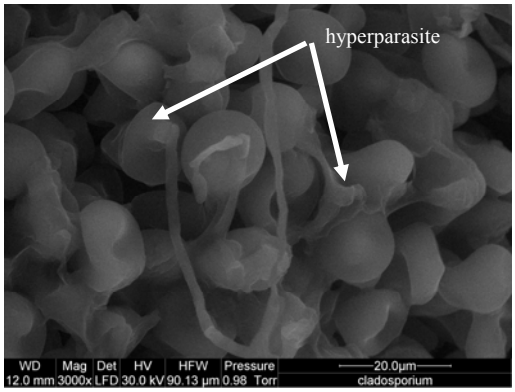
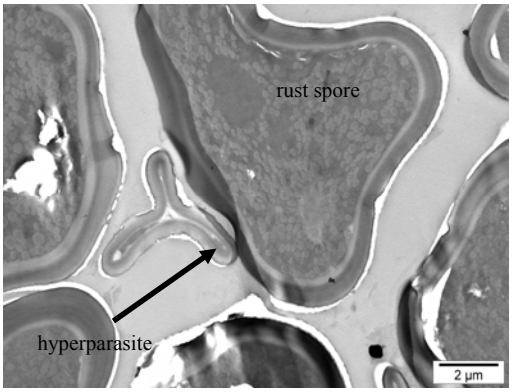



*Figure 4:* **Interaction between rust cell and mycelium of the mycoparasite (TEM)**




*(Photos: T.M. Dolińska)*

## *DISCUSSION*

In the present investigation, it was observed that *Cladosporium* spp. infected telia of *P. arenariae*. Their ability to parasitize this rust, was also corroborated in the experiments of Srivastava *et al.* (1985). However, author reported, on the contrary to our results, that *C. sphaerospermum* penetrated almost 48% surface of rust sori. Our results showed that this mycoparasite has abilities to infect 10% - 20% of telial sori surface. Srivastava *et al.* (1985) noticed that other hyperparasite - *C. uredinicola* colonized 44% of telial sori of *P. arenariae*. In the present research *C. urednicola* infected more than 50% of surface of telia, which was probably resulted of different concentration of hyperparasite spores suspension or various condition of research.

In the available literature is a lot of information concerning other hyperparasites of *Cladosporium* species. In Ellis key (1971), *C. tenuissimum*, *C. uredinicola* and *C. aecidicola* were described as mycoparasites of many

rust species. In this work *P. arenariae* was attractive host for all (16) tested *Cladosporium* spp., but especially for *C. aecicidicola*, *C. herbarum*, *C. tenuissimum* and *C. uredinicola*. Moreover, the investigation proved that *C. phyllactinicola* and *C. spongiosum* were less effective than other fungi of *Cladosporium* species.

Light and scanning electron microscopy showed that teliospores were penetrated by *Cladosporium* spp. The hyperparasites grow directly to rust spores and coiled around them. In many cases mycoparasite produced appressoria and led to deformation and destruction of rust spores. Morrica *et al.* (2001), Assante *et al.* (2004) amongst others confirmed this strategies against other rust species e.g. *Uromyces appendiculatus, Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini*. TEM observations proved that in the vicinity of the infection sites, the disruption and dissolution of the host cell wall were noticeable, implying an enzymatic activity (Assante *et al.,* (2004). In summary, our investigation indicated that fungi of *Cladosporium* species possess the abilities to maintain themselves on *P. arenariae* and hold great promise for biological plant protection against this pathogen.

***ACKNOWLEDGEMENT***

Experiments were supported by National Science Centre, Cracow, Poland - Project no. N N310 440038.

***REFERENCES***

Abdel-baky N.F., Nehal A.S., Abdel-salam A.H. (1998): Three *Cladosporium* spp. as promising biological control candidates for controlling whiteflies (Bemisia spp.) in Egypt. Pak. J. Biol. Sci. 1 (3), 188–195.

Adamska I., Czerniawska B. (2010): Nadpasożyty mączniaków prawdziwych roślin uprawnych i dziko rosnących pojezierza bobolickiego. [Hyperparasites of powdery mildews of cultivated and wild growing plants in Bobolice lake district] Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 50, (2) 869-873.

Assante G., Maffi D., Saracchi M., Farina G., Moricca S., Ragazzi A. (2004): Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. Mycol. Res. 108, 2: 170–182.

Bahcecioglu Z., Kabaktepe S. (2012) Checklist of rust fungi in Turkey Mycotaxon 119: 494, 1-81

Batzer J.C., Gleason M.L., Harrington T.C., Tiffany L.H. (2005): Expansion of the sooty blotch and flyspeck complex on apples based on analysis of ribosomal DNA gene sequences and morphology. Mycologia, 97, 6, 1268–1286.

Chew F.L.M., Subrayan V., PeiPei Ch., MengChuan G., KeePeng N. (2009): *Cladosporium cladosporioides* keratomycosis: a case report. Jpn. J. Ophthalmol. 53, 6: 657–659.

Dolińska T.M., Bartkowska A., Schollenberger M. (2011): Light and scanning microscope observations of *Cladosporium uredinicola* growth on rust fungi. Phytopathologia 61, 37-44.

Ellis M. B. (1971): Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.

Farr D. F. and Rossman A. Y. (2010): Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS,USDA. Retrieved June 25, 2010, from http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/.

Glawe D. A. (2006): Synopsis of genera of Erysiphales (powdery mildew fungi) occurring in the Pacific Norwest.Pacific Northwest Fungi 1, 12, 1-27.

Kiss L. (2003): A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. Pest Management Science 59: 475-483.

Majewski T. (1977): Flora polska. Rośliny zarodnikowe Polski i ziem ościennych. T. 9. Podstawczaki (Basidiomycetes), Rdzawnikowe (Uredinales I). [Flora of Poland, Spore plants of Poland and adjacent regions, Vol. 9 *Basidiomycetes*] PWN, Warszawa.

Majewski T. (1979): Flora polska. Rośliny zarodnikowe Polski i ziem ościennych. T. 11. Grzyby (Mycota), Podstawczaki (Basidiomycetes), Rdzawnikowe (Uredinales). [Flora of Poland, Spore plants of Poland and adjacent regions, Vol. 11 *Basidiomycetes,* Uredinales] PWN, Warszawa.

Moricca S., Ragazzi A., Mitchelson K.R., Assante G. (2001): Antagonism of the two-needle pine stem rust fungi *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* in vitro and in planta. Phytopathology 91: 457–468.

Mułenko W., Kozłowska M. (2010): Dynamics of fungi against the background of host plant phenology. Part I. List of microfungi infecting Stellaria holostea. Polish Botanical Journal 55, 2: 417–440

Sałata B. (1985): Flora Polska - Rośliny Zarodnikowe Polski i Ziem Ościennych Grzyby (Mycota) Workowce (Ascomycetes) Mączniakowe (Erysiphales) Tom XV [Flora of Poland, Spore plants of Poland and adjacent regions, Vol. XV Mycota Ascomycetes Erysiphales] PWN - Warszawa-Kraków.

Srivastava A.K., Defago G., Kern H. (1985): Hyperparasitism of *Puccinia horiana* and other microcyclic rusts. Phytopathol. Z. 114: 73–78.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990): PCR protocols. In amplification ad direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. EDS MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White pp. 315-322 Academic Press London UK.

# Identification, occurrence and MAT locus structure of *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg population

**Jabłońska E. – Wit M. – Wakuliński W.**
Department of Plant Pathology Warsaw University of Life Sciences
159 Nowoursynowska St. Warsaw 02-776, Poland
kfit@sggw.pl

***SUMMARY***

*F. verticillioides* is a key causative agent of the ear rot of maize. Forty-six isolates of *F. verticillioides* were collected from infected corn kernels and examined to determine the frequency of MAT1-1 and MAT1-2 functional idiomorphs as well as to describe the MAT locus structure - the important factors for the occurrence of the sexual process in *F. verticillioides* the latter process having a significant impact on the epidemiology of the disease.The results showed that the idiomorphs occurred with frequency 55% for MAT1-1 and 45% for MAT1-2. The analysis of MAT structure revealed the presence of substitutions, most of them being transitions, and deletions occasionally.

**Keywords:** *Fusarium verticillioides*, maize, idiomorphs, mating types, MAT locus

## *INTRODUCTION*

*Fusarium verticillioides* (teleomorph: *Gibberella moniliformis*) (*Figure 1.*) commonly occurs on a wide range of host plants - both monocots and dicots. In particular, this species inhabits maize (*Zea mays*), which belongs to the top cereal with the highest consumption rate estimated for the period 2009 - 2010 to 484 million tons per year (USDA, 2011). *F. verticillioides* is considered to be a key causative agent of the ear rot of maize – the disease which harmfulness is determined by its prevalence and the risk of contamination of the plant material with secondary metabolites – fumonisins B mycotoxins – neurotoxic, hepatotoxic and possibly carcinogenic compounds (IARC, 2002).

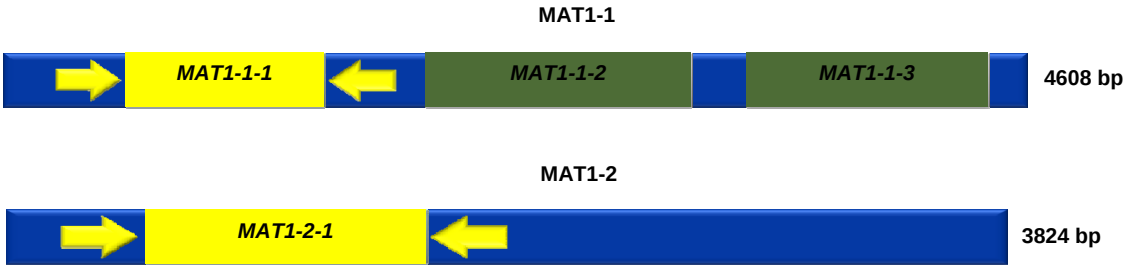
Taking into account high genetic diversity observed in this species and its simultaneous occurrence mainly in conidial stage, occurrence of the so-called cryptic sex is possible. This process, if any, has a significant impact on the epidemiology of the disease caused by *F. verticillioides*.

*Figure 1*: **Mature perithecia of *Gibberella moniliformis* (anamorph: *Fusarium verticillioides*) with ascospore discharge**

In the heterotallic Ascomycota, including *F. verticillioides*, initiation of a sexual process requires the participation of thalli of opposite mating type. Mating type is determined by a single regulatory MAT locus with two functional idiomorphs: MAT1-1 and MAT1-2 (*Figure 2.*). These genes encode transcription factors related

primarily to the expression of proteins involved in the regulation of mating types, but also play a role in controlling the expression of pheromone and their receptor genes.

*Figure 2*: **Scheme of MAT locus structure of heterothallic *Ascomycota***




## *MATERIALS AND METHODS*

As the proportion of the two complementary thalli of opposite mating types is an important factor for the occurrence of the sexual process in *F. verticillioides*, the aim of the study was to determine the frequency of both idiomorphs (MAT1-1 and MAT1-2) and to describe the MAT locus structure of *F. verticillioides*.

For this purpose a total of forty-six *Fusarium* isolates collected from infected corn kernels from three Polish geobotanical lands were examined. Identification of isolates was performed on the basis of classical mycological methods and subsequently verified molecularly using SCAR markers.

PCR detection assays for *F. verticillioides* were carried out using two sets of primer: VER1 and VER2 (*Table 1*). The amplification program was as follows: 1 cycle of 5 min at 95 °C, 35 cycles of 50 s at 94 °C (denaturation), 50 s at 58 °C (annealing), 50 s at 72 °C (extension) and 1 cycle of 7 min at 72 °C for the final extension.

For the mating type identification 4 primers were used for this study: Gfmat1a/Gfmat1b and Gfmat2c/Gfmat2d (*Table 1*). The PCR programming for the detection of mating types markers was: an initial denaturing step of 5 min at 94 °C, 40 cycles consisting each of a denaturing step of 30 s at 94 °C, primer annealing step of 30 s at 52 °C for Gfmat1a/Gfmat1b and at 58 °C for Gfmat2c/Gfmat2d set of primers, and the primer extension step of 30 s at 72 °C. The final step of 7 min at 72 °C was given to polish the ends of the PCR products.

*Table 1*

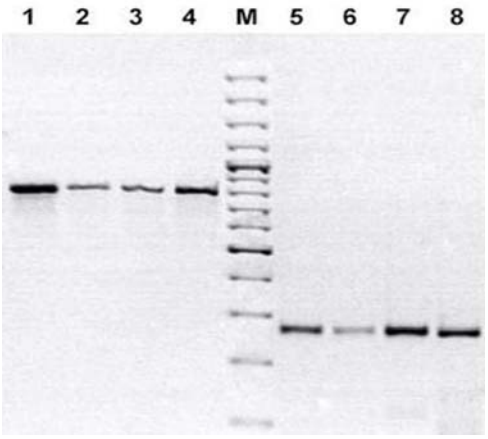
**Sequences of specific primers used in this study**

| Marker | Primer name | Sequence 5′3′ | Amplicon size (bp) | Reference |
|---|---|---|---|---|
| SCAR | VER1 | 5'-CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3' | 578 | Mulè i in., 2004 |
| | VER2 | 5'-AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3' | | |
| Mat-1 | Gfmat1a | 5′-TAAGCGCCCTCTTAACGCCTTC-3' | 335 | Steenkamp i in., 2000 |
| | Gfmat1b | 5′-GTTCATCAAAGGGCAAGCG-3 | | |
| Mat-2 | Gfmat2c | 5′-AGCGTCATTATTCGATCAAG-3′ | 819 | Steenkamp i in., 2000 |
| | Gfmat2d | 5′-CTACGTTGAGAGCTGTACAG-3′ | | |

## *RESULTS AND DISCUSSION*

The study showed that in the obtained *F. verticillioides* population MAT1-1 and MAT1-2 idiomorphs occurred with frequency 55% and 45% respectively (*Figure 3*).

*Figure 3:* **PCR amplification of mating types from *Fusarium verticillioides* isolates**




M: molecular marker GeneRuler™ 100-bp DNA Ladder Plus #SM0323 (Fermentas); lanes1-4: MAT1-2 idiomorph; lanes 5-8: MAT1-1 idiomorph.

The analysis of MAT region structure revealed the presence of substitutions and deletions occasionally. Most substitutions determined during this study were transitions (*Figure 4, Figure 5*).

*Figure 4*: **Mutation occurrence frequency of *F. verticillioides* isolates mating type MAT1-1; (-) indicates the occurrence of gene deletion**

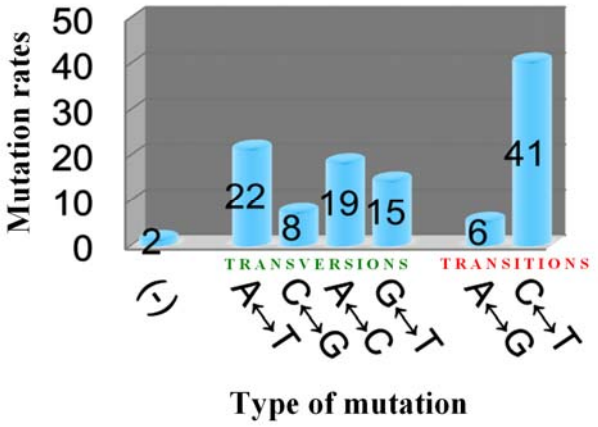
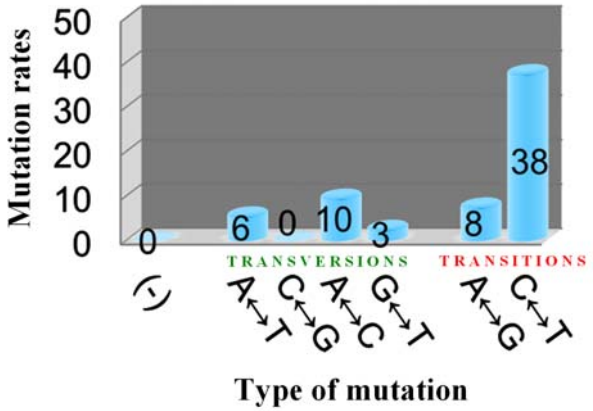



*Figure 5*: **Mutation occurrence frequency of *F. verticillioides* isolates mating type MAT1-2; (-) indicates the occurrence of gene deletion**



***REFERENCES***

IARC, 2002. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 82. IARC Press, Lyon, s. 301-345.

Mulè G., Susca A., Stea G., Moretti A. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for the identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. European Journal of Plant Pathology 110, s. 495-502.

Steenkamp E.T., Wingfield B.D., Coutinho T.A., Zeller K.A., Wingfield M.J., Marasas W.F.O., Leslie, J.F. 2000. PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Applied Environmental Microbiology 66, s. 4378-4382.

USDA, 2011. World Agricultural Outlook Board (WAOB). World Agricultural Supply and Demand Estimates, WASDE-495.

# BlScV detection and potential influence of the virus on phenolic profile of berries

**Elżbieta Kalinowska – Elżbieta Paduch-Cichal – Maria Chodorska**
Department of Plant Pathology, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159, 02-776 Warsaw, Poland
elzbieta_kalinowska@sggw.pl

**SUMMARY**

*Purpose of the project was to evaluate detection of Blueberry scorch virus (BlScV) in various organs of highbush blueberry using DAS-ELISA. It was established that the virus detection of each investigated bushes cvs Bluecrop and Herbert depended on the tested plant materials as well as the period in which the tests were performed. The presence of the BlScV was confirmed with RT-PCR using specific primes which amplify a 430 bp fragment of the 5'- proximal ORF I.*

*Although berries are one of the most nutritional fruits there are no studies regarding influence of the virus infection on content of secondary metabolites which are bound up with antioxidant activity. Preliminary studies concerning phenolic profile in blueberries asymptomatically infected with BlScV revealed that virus infection could influence on total polyphenol content in comparison to healthy plants. These results potentially provided new data concerning harmfulness of BlScV infection.*

**Keywords:** Blueberry scorch virus, BlScV, detection, phenolic profile

## *INTRODUCTION*

*Blueberry scorch virus* (BlScV), a member of *Carlavirus* genus in the *Betaflexiviridae* family (King *et al.*, 2011) is one of the most widespread pathogens of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). The virus exhibits a latent period in plants that may extend to years (Bristow *et al.*, 2000). BlScV is transmitted in a non-persistent fashion by aphids (*Ericaphis fimbriata* Richards and *Myzus persicae* Sultzer) and by grafting using infected cuttings (Bristow *et al.*, 2000; Wegener *et al.*, 2006). Symptoms of BlScV infection depend on the cultivar and viral strain (Cavileer *et al.*, 1994; Bernardy *et al.*, 2005). In severe cases, during early bloom blossoms and leaves are blighting and drying up. In come cultivars, BlScV infection is symptomless or limited to single blossoms and shoots, but all highbush blueberry cultivars are susceptible to virus infection. Highbush blueberries infected with BlScV can also exhibit yellow leaf margins, leaf mottling, overall pale color, and reddish line "oak leaf" patterns. The virus is also known to infect cranberry (*V.macrocarpon;* Wegener et at., 2004; Paduch-Cichal *et al.*, 2011), wild black huckleberry (*V. membraceanum* Douglas ex Torrey; Wegener *et al.*, 2007) without any symptoms. BlScV infection was also stated in rabbiteye blueberry bushes (*V. ashei*; Bristow *et al.*, 2000; Moretti *et al.,* 2011) however, symptom expression in this species is not obvious.

The most common method virus detection and identification is the double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA). It was used in mass-testing of blueberry plants for BlScV (Wegener *et al.*, 2006). The viruses are unevenly distributed in the plant, and their titer can fluctuate throughout the growing season. The highest DAS-ELISA readings were noted in leaf samples collected from bushes infected with BlScV in June-September (Martin and Bristow, 1988) or in June-August (Wegener *et al.*, 2006). Since DAS-ELISA results were depended on the tissue source and the time of year in which samples were collected, RT-PCR appeared a more sensitive method was tried to be used for the detection of BlScV (Wegener *et al.*, 2006), however so far there are no primers specific to all isolates of the virus.

Berries have drawn special attention because of their high antioxidant capacity and high concentration of anthocyanins, and are considered as one of the most nutritious among fresh fruits and vegetables (Prior *et al.*, 1998; Kähkäonen *et al.*, 2003). Besides the anthocyanins, blueberries are also a good source of chlorogenic acid, quercetin, kaempferol, myricetin, procyanidins, catechin, epicatechin, resveratrol, and vitamin C that contribute the antioxidant activity (Giovanelli and Buratti, 2009). Health benefits of anthocyanins in antioxidative and anti-carcinogenic effects have been reported (Hou, 2003), and demonstrated in several cell culture systems including cancer cells of the colon (Seeram *et al.*, 2006), endothelial (Bagchi, *et al.*, 2004), breast (Montales *et al.*, 2012) prostate (Shmidt *et al.*, 2006). It was also reported that bioactive compounds of blueberry fruits have potential in reducing the number of cardiovascular disease events (Basu *et al.*, 2010; Ahmet *et al.*, 2009) as well as therapeutic properties in the fight against diabetes (Nemes-Nagy *et al.*, 2008) and Alzheimer disease (Joseph *et al.*, 2003). Although it is known that the content of phenolic profile in highbush blueberry fruits depends on cultivar (You *et al.*, 2011), environmental conditions, the degree of maturity at harvest and storage conditions (Prior *et al.*, 1998; Castrejón *et al.*, 2008), there is no information whether bioactive compounds capacity is correlated with the virus infection. So far only quantitative yield loss was stated in case of bushes which indicated BlScV infection (Bristow *et al.*, 2000), thus asymptomatic infection was consider as harmless for the crop.

Aim of this project was to evaluate DAS-ELISA efficacy during the year and to develop RT-PCR primers, specific to all strains of the virus. Additional goal of this study was to determinate whether asymptomatic BlScV infection could influence on bioactive compound of blueberry fruits.

## *MATERIALS AND METHODS*

The investigation was performed in Department of Plant Pathology (Faculty of Horticulture and Landscape Architecture, Warsaw University of Life Sciences-SGGW) from May 2010 to April 2011. Plant material comprised of plants infected with BlScV - 15 bushes cv. Bluecrop and 38 bushes cv. Herbert grown on a plantation situated in central Poland. BlScV-infected bushes were tested on the basis of DAS-ELISA performed in May 2009. Samples of plant material were collected every four weeks according to the following scheme (*Table 1*).

*Table 1*

**Scheme of sample collection**

| Organ | Terms of taking samples |
|---|---|
| Leaves<br>Flower | May 2010 |
| Leaves | June – October 2010 |
| Bark | November 2010 – April 2011 |
| Flower buds | March - April 2011 |

**Serological detection of viruses**

BlScV was detected by DAS-ELISA with specific antibodies from Agdia Incorporated (USA) according to the manufacturer's protocol. Extract from the investigated plants was obtained by adding 2.5 ml of GEB buffer (general extract buffer, dilution 1:10) to 0.250 g plant tissue in the case of samples tested for the presence of BSSV or 2.5 ml of GEB3 buffer (general extract buffer 3, dilution 1:10) for samples tested for the presence of BlScV. Substrate hydrolysis was recorded using the Infinite® 200 PRO (Tecan) with the filter of 405 nm wavelength for BlScV. Samples were considered positive if their optical density readings were at least twice of negative control.

**Detection of BlScV using RT-PCR**

To confirm the occurrence of BlScV in blueberry bushes, samples were assayed for BlScV by RT-PCR with total RNA and appropriate primers. Total RNA was extracted from leaf tissue of DAS-ELISA-positive (30 samples) and negative samples (5 samples) using the Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma, USA) according to the manufacturer's protocol. For RT-PCR, Titan One Tube RT-PCR System (Roche) was used with the primer pair specific to the 5'-proximal ORF [5'-ATGGCACTCACATACAGAAGTCC-3' and 5'-TGCCTCTTCAATGCACGATGTTC-3]'. A primer pair specific to the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase chloroplast (*Rbc1*) ribosomal gene [Rbc1-R 5'-CTGCATGCATTGCACGGTG-3' and Rbc1-F 5'-TACTTGAACGCTACTGCAG-3' (Sanchez-Navarro *et al.*, 2005)] was used as internal control to amplify the corresponding mRNA in blueberry leaf tissue by RT-PCR.

Single tube RT-PCR used a 30 min heating step at 50°C and a 2 min heating step at 94°C followed by 35 cycles of 30 sec melting at 94°C, 45 sec annealing at 50°C, and 45 sec elongation at 68°C with a final extension of 7 min at 68°C. The reaction products were resolved by electrophoresis in the buffer TBE in 1.2% agarose gel.

**Determination of total phenol profile of fruits**

Polyphenolic capacity of fruits from infected cultivars Bluecrop and Herbert was conducted according to Peri and Pompei method (1971). Control berries were collected from healthy bushes (cultivars: Bluecrop and Herbert), growing at the same environment conditions.

**Statistical analysis**

ELISA results as well as assessment of total polyphenol content were assayed with multifactor analysis of variance using the SPSS Statistics 19 (IBM, USA). Differences between mean value of absorbance obtained were determined by the Tukey's range test at the significance level of 0.05.

## *RESULTS*

**Disease symptoms**

Very often, infected bushes did not indicate any symptoms. All of BlScV- positive plants did not indicate most common disease symptom – blossom blighting. BlScV infections of cv. Herbert resulted in reduced vigour, shoot defoliation, distorted and crinkled apical leaves and red lesions in the fall. Some of bushes also showed leaf chlorosis. Bluecrop plants did not indicate any symptoms of BlScV infections with exception of few bushes with reddish lesions on apical leaves in late fall (October).

**Virus identification by DAS-ELISA**

ELISA results indicated that 139 samples (32 samples of cv. Bluecrop, 107 samples of cv. Herbert) of 975 tested were infected with BlScV. The analysis of the mean absorbance values revealed that the detection of virus in plants of cvs Bluecrop and Herbert depended on the tested plant parts and the month in which the test was performed. BlScV was found in leaf samples (May, September, October), bark samples (November, January-April) and bud samples (March, April) collected from cv. Bluecrop. As far as cv. Herbert is concerned, BlScV was identified in leaf samples (May, June, August-October), flower samples (May), bark samples (November, January-April) and bud samples (March, April). The mean absorbance values obtained for the bark samples collected from cv. Bluecrop in February were higher compared with the mean absorbance values noted for such samples in the remaining months. The mean $A_{405nm}$ values obtained while testing bark samples in February were also higher than the mean $A_{405nm}$ values obtained for leaf and bud samples collected at various other times. During the testing of bark samples from cv. Herbert, higher mean $A_{405nm}$ values were obtained in November, February and March as compared with the mean $A_{405nm}$ values noted in January and April. No statistically significant differences were noted between the mean absorbance values obtained in the remaining months for samples collected from cv. Herbert. Differences of statistical significance were observed while testing bark samples of two of the investigated cultivars. In November, higher mean absorbance values were obtained for such samples from cv. Herbert as compared to cv. Bluecrop. On the other hand, the mean absorbance values obtained for bark samples from cv. Bluecrop in February were higher compared to the means obtained while testing samples from cv. Herbert in November, January, February, March and April (*Table 2*).

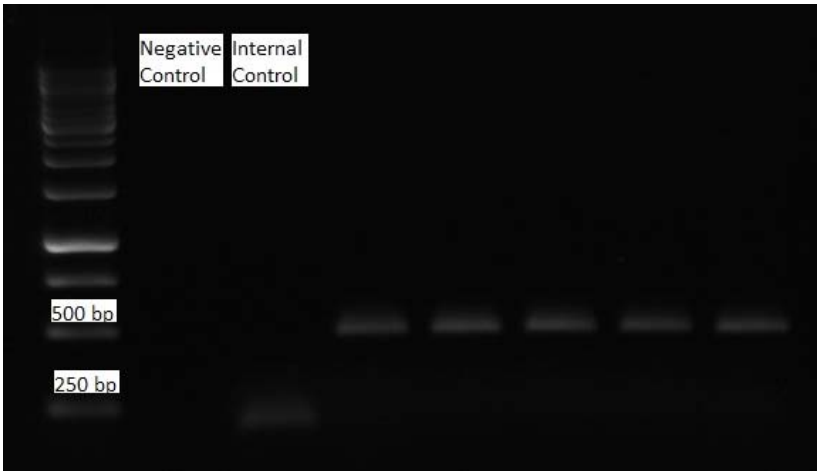
*Table 2*

**The detection of BlScV in different parts of two highbush blueberry cultivars during various periods of the year**

| Cultivar | Month | Average value of absorbance $A_{405\ nm}$ | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | leaves | flowers | bark | buds |
| Bluecrop | May | 0.334 a[a] | | | |
| | September | 0.364 a | | | |
| | October | 0.296 a | | | |
| | November | | | 0.245 a | |
| | January | | | 0.265 a | |
| | February | | | 1.257 d | |
| | March | | | 0.373 ab | 0.441 ab |
| | April | | | 0.234 a | 0.289 a |
| Herbert | May | 0.346 a | 0.504 abc | | |
| | June | 0.253 a | | | |
| | August | 0.414 ab | | | |
| | September | 0.507 abc | | | |
| | October | 0.514 abc | | | |
| | November | | | 0.673 abc | |
| | January | | | 0.286 a | |
| | February | | | 0.791 c | |
| | March | | | 0.518 abc | 0,411 ab |
| | April | | | 0.243 a | 0.256 a |

[a] Means followed by the same letters are not significantly different for α= 0.05

Figure 1: **Agarose gel analysis of BlScV amplicons obtained by RT-PCR**



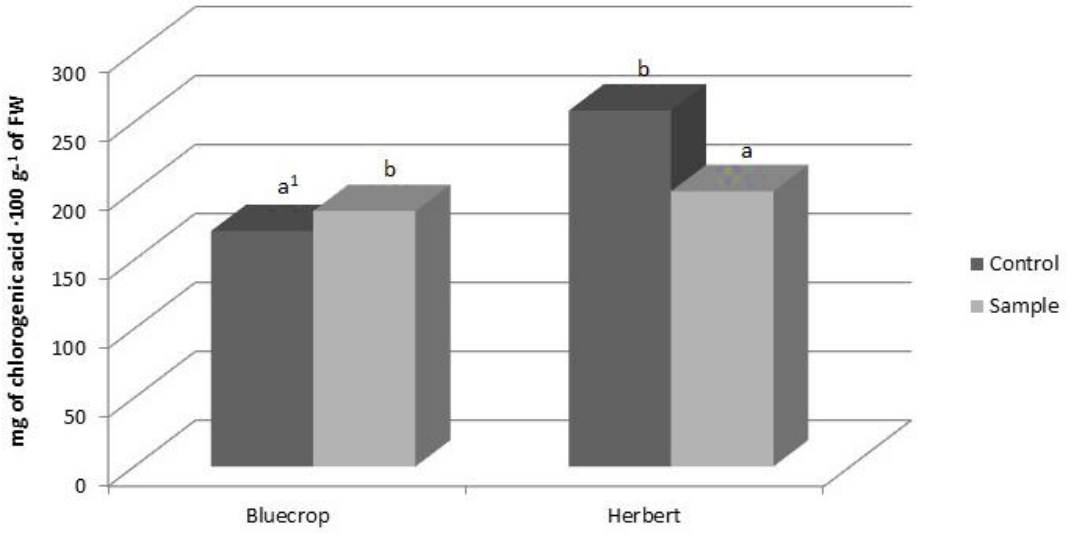
**Detection of BlScV by RT-PCR.**

The presence of BlScV was confirmed by RT-PCR in leaf samples of blueberry bushes (15 cv Bluecrop and 15 cv Herbert) with amplification of a 430 bp fragment. As expected, no product was amplified from total RNA of healthy blueberry leaves except a 183 bp long fragment corresponding to the plant internal control *Rbcl* (*Figure 1*). The amplicons of the 430 bp size were sequenced and the nucleotide sequence of the products showed 98-99% homology with the published BC-2 sequence (GenBank no. AY941199).

**Influence of BlScV infection on polyphenol content of berries.**

Study concerning influence of BlScV on polyphenols content in fruits revealed different results between two cultivars. Total polyphenol content of berries analysed from 'Bluecrop' infected with the virus was slightly higher (10%) than from healthy fruits. However, polyphenol capacity of fruits from BlScV positive 'Herbert' bushes was significantly reduced (20%) in comparison with berries collected from healthy plants (*Figure. 2*).

*Figure 2:* **Influence of BlScV infection on polyphenol content of blueberry fruits.**




[1]Columns with the same letter are not significantly different at a significance level of 0.05

## *DISCUSSION*

Results presented in this article concerning detection of BlScV with ELISA agree with those obtained earlier (Martin and Bristow 1988; Cavileer *et al.*, 1994; Bristow *et al.*, 2000; Wegener *et al.*, 2006 and Paduch-Cichal *et al.*, 2011). The best material for BlScV detection in cv. Herbert is flowers in May and leaves in September/October. The authors of this article found that bark samples from cv. Herbert are the most appropriate for detecting BlScV in February, March and November.

In our experiment the symptomatic and the asymptomatic blueberry leaves, flower buds and flowers were suitable tissue for BlScV detection by RT-PCR. Previously, symptomatic leaves and flowers were reported as the most effective samples for the virus detection in blueberry plants (Ciuffo *et al.*, 2005; Wegener *et al.*, 2006; Moretti *et al.*, 2011).

From the practical point of view, the assessment of the plants' health based only on their observation is not a sufficient diagnostic method. Symptomless infected plants may comprise a source of infection for the neighbouring healthy plants. It is known from the data provided in literature that aphid *Ericaphis fimbriata* (Richards) is BlScV vector which is considered to be one of the most important pests of highbush blueberry in the USA and Canada (Bristow *et al.*, 2000). Since *E. fimbriata* has not been reported in Poland, spreading of BlScV with vector is unknown. However, the possibility that other aphid species is responsible for spreading of the virus should be considered.

The results of the research revealed that different parts of highbush blueberry may be used during the vegetation and the leafless period for BlScV detection by DAS-ELISA. Additionally, BlScV can be detected by RT-PCR during the vegetation, when the virus titter is very low. These data are very valuable since they allow prolonging the testing period of highbush blueberry plants during the entire year. Results of this work can be helpful in establishing the testing schedule of blueberry plant material.

Influence of BlScV infection on polyphenol content of berries seems to be cultivar-dependent. 'Bluecrop' is considered as one of the most tolerant cultivar in case of BlScV infection therefore 10% difference between samples and control berries of polyphenol content is understood. Cultivar Herbert is prone to BlScV, what potentially has effect on 20% loss of total polyphenol capacity in blueberries. As these results are preliminary

assessment, additional studies concerning total polyphenol content in berries are carried on ten other cultivars infected with the virus.

***REFERENCES***


Ahmet I.-Spangler E.-Shukitt-Hale B.-Joseph J. A.-Ingram D. K..-Talan M. (2009): Survival and cardioprotective benefits of long-term blueberry enriched diet in dilated cardiomyopathy following myocardial infarction in rats. PLoS ONE doi:10.1371/journal.pone.0007975.

Basu A.-Du M.-Leyva M. J.-Sanchez K..-Betts N. M.-Wu M.-Aston C. E.-Lyons T. J. (2010): Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome. J Nutr. 140, 1582-1587.

Bagchi D.- Sen C. K.- Bagchi M.- Atalay M. (2004): Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. Biochemistry Mosc. 69, 75-80

Bernardy M. G.-Dubeau C. R.-Braun A.-Harlton C. E.-Bunckle A.-Wegener L. A.-Lowery D. T.-French C. J. (2005): Molecular characterization and phylogenetic analysis of two distinct strains of *Blueberry scorch virus* from western Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 27, 581-591.

Bristow P. R.-Martin R. R.-Windom G. E. (2000): Transmission, orchard spread, cultivar response, and impact on yield in highbush blueberry infected with Blueberry scorch virus. Phytopathology 90, 474–479.

Castrejón A. D. R.- Eichholz I.- Rohn S.- Kroh L. W.- Huyskens-Keil S. (2008): Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. Food Chem.109, 564–572.

Cavileer T. D.-Halpern B. T.-Lawrence D. M.-Podleckis E. V.-Martin R. R.-Hillman B. I. (1994): Nucleotide-sequence of the carlavirus associated with blueberry scorch and similar diseases. J Gen Virol 75, 711–720.

Ciuffo M.-Pettiti D.-Gallo S.-Masenga V.-Turina M. (2005): First report of Blueberry scorch virus in Europe. Plant Pathol 54, 565–565.

Giovanelli G.-Buratti S. (2009): Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. Food Chem 112, 903-908.

Hou D. X. (2003). Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. Curr Molec Med 3, 149–159.

Joseph J. A.-Denisova N. A.-Arendash G.-Gordon M.-Diamond D.-Shukitt-Hale B.-Morgan D. (2003). Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. Nutr Neurosci. 6, 153-162.

Kähkäonen M. P.-Heinämäki J.-Ollilainen V.-Heinonen M. (2003): Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. J. Sci. Food Agric. 83, 1403–1411.

King A. M. Q.-Adams M. J.-Carstens E. B.-Lefkowitz E. J. (2011): Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Martin R. R.-Bristow P. R. (1988): A carlavirus associated with blueberry scorch disease. Phytopathology 78, 1636-1640.

Montales M. T.-Rahal O. M.-Kang J,Rogers T. J.-Prior R.L.-Wu X.-Simmen R. C. (2012): Repression of mammosphere formation of human breast cancer cells by soy isoflavone genistein and blueberry polyphenolic acids suggests diet-mediated targeting of cancer stem-like/progenitor cells. Carcinogenesis. 33, 652-656.

Moretti M.- Ciuffo M.- Gotta P.- Prodorutti D.- Bragagna P.- Turina M. (2011). Molecular characterization of two distinct strains of blueberry scorch virus (BlScV) in northern Italy.

Nemes-Nagy E.-Szocs-Molnár T.-Dunca I.- Balogh-Sămărghiţan V.-Hobai S.-Morar R.-Pusta D. L.-Crăciun EC. (2008): Effect of a dietary supplement containing blueberry and sea buckthorn concentrate on antioxidant capacity in type 1 diabetic children. Acta Physiol Hung. 9, 383-393.

Paduch-Cichal E.- Kalinowska E.- Chodorska M.- Sala-Rejczak K..- Nowak B. (2011): Detection and identification of viruses of highbush blueberry and cranberry using serological ELISA test and PCR technique. Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus 10, 201-215.

Peri C.,-Pompei G. (1971): An assai different phenolic fraction in wines. American Journal of Enology and Viticulture 22, 55-58.

Prior R. L.- Cao G.- Martin A.- Sofic E.- McEwen J.- O'Brien C.- Lischner N.- Ehlenfeldt M.- Kalt W.- Krewer G.- Mainland C. M. (1998): Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of Vaccinium species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 2686–2693.

Sanchez-Navarro J. A.- Aparicio F.- Herranz M. C.- Minafra A.- Myrta A.- Pallas V. (2005): Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one step RT-PCR. European Journal of Plant Pathology 111, 77-84.

Seeram N. P.- Adams L. S.- Zhang Y.- Lee R.- Sand D.- Scheuller H. S.- Heber D. (2006): Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. J Agric Food Chem. 54, 9329-9339.

Schmidt B. M.- Erdman J. W. Jr.- Lila M. A. (2006). Differential effects of blueberry proanthocyanidins on androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines. Cancer Letters 231, 240–246.

Wegener L. A.- Martin R. R.- Bernardy M. G.- MacDonald L.- Punja Z. K. (2006): Epidemiology and identification of strains of Blueberry scorch virus on highbush blueberry in British Columbia, Canada. Can J Plant Pathol 28: 250–262.

Wegener L. A.- Punja Z. K..- Martin R. R. (2007): First report of Blueberry scorch virus in black huckleberry in British Columbia. Plant Dis 91, 328–328.

Wegener L. A.- Punja Z. K..- Martin R. R. (2004): First report of Blueberry scorch virus in cranberry in Canada and the United States. Plant Dis 88, 427–427.

You Q.- Wang B.- Chen F.- Huang Z.- Wang X.- Luo P. G. (2011): Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. Food Chemistry 125, 201-208.

# Antifungal activity of anthocyanins from purple field corn cob against *Botrytis cinerea* and *Fusarium* species

**Mojtaba Asadollahi[1] – Zoltán Bódi[2] – Ferenc Peles[1] – Erzsébet Sándor[1]**
[1]Institute of Food Processing, Quality Assurance and Microbiology, University of Debrecen, Hungary
[2]Taktaszada, Hungary
karaffa@agr.unideb.hu

***SUMMARY***

*Purple corn is a pigmented variety of Zea mays L. The color is a result of anthocyanins in the epidermal cells of the plant. This preliminary study aimed to examine the inhibitory effect of crude anthocyanin extracts from purple field corn cob to growth of plant pathogenic Botrytis cinerea and two Fusarium species. Our results clearly indicated the antifungal effect of purple corn extract toward mycelial growth of tested plant pathogen fungi.*

**Keywords:** anthocianin, purple corn, antifungal activity, *Botrytis cinerea*

## *INTRODUCTION*

Flavonoids are known to be one of the largest classes of naturally-occurring polyphenolic compounds. This class of plant secondary metabolites is largely responsible for the colors of many fruits and flowers. More than 4,000 flavonoid compounds have been characterized and classified according to their chemical structure (Murray, 1996). They have been reported to possess a variety of biological activities including antioxidant, antibacterial, antifungal, and antiviral activities (Bylka *et al.,* 2004; Özçelik *et al.,* 2008). Anthocyanins are a class of flavonoid compounds responsible for the bright attractive orange, red, purple, and blue colors of most fruits and vegetables.

There are various kinds of corn in the world, and they have various colors such as white, yellow, red, purple, brown, green and blue. The color of purple corn is due to anthocyanin. Purple corn color has been using for coloring beverages, jellies, candies and so on in Japan (Aoki *et al.,* 2002). Recently, anthocyanins have been reported to have various biological activities, such as antioxidant, anti-mutagenic, and anticancer activities (Koide *et al.*, 1997; Gabrielska et al, 1999; Yoshimoto *et al.*, 1999).

This study was designed to examine the preliminary evidence of crude anthocyanin containing extracts from purple field corn cob to inhibit the growth of plant pathogenic *Botrytis cinerea* and two *Fusarium* species (*F. culmorum* and *F. equiseti*).

## *MATERIALS AND METHODS*

Anthocyanin containing purple corncob extract was prepared from 10 g of purple corncob powder added to a 100 ml of aqueous ethanol and stored for 24h at room temperature. The extract was filtered and then concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure. The resulting alcohol free syrup was stored at 4 °C until use in antifungal tests.

*F. equiseti* and *F. culmorum* isolated from the surface of stored grains were selected and cultured on potato dextrose agar (PDA) and incubated at 25 ºC. In the test a 10 mm mycelial plug was taken from the edge of a 3-day-old colony and placed on the center of PDA plates and make several hole around center in which filled with various concentrations of extract.

Mycelial inhibition tests of anthocyanin was performed with two *B. cinerea* strains isolated from infected plants in Hungary and the two *Fusarium* species were inoculated to PDA and incubated at 25 ºC for 3 days. PDA amended with evaporated extract from corncob was used in the inhibition test. For the controls distilled water was added to the medium. A 10 mm mycelial plug was taken from the edge of a 3-day-old fungal colony, and placed on the center of PDA plates amended with 7.5% ethanol free crude extracts and for control plates. Two replicates of each concentration were used for all isolates. Inoculated plates were incubated at 25 ºC for 2 days in dark, and the mycelial growth was recorded.

Inhibition was calculated with the following equation:

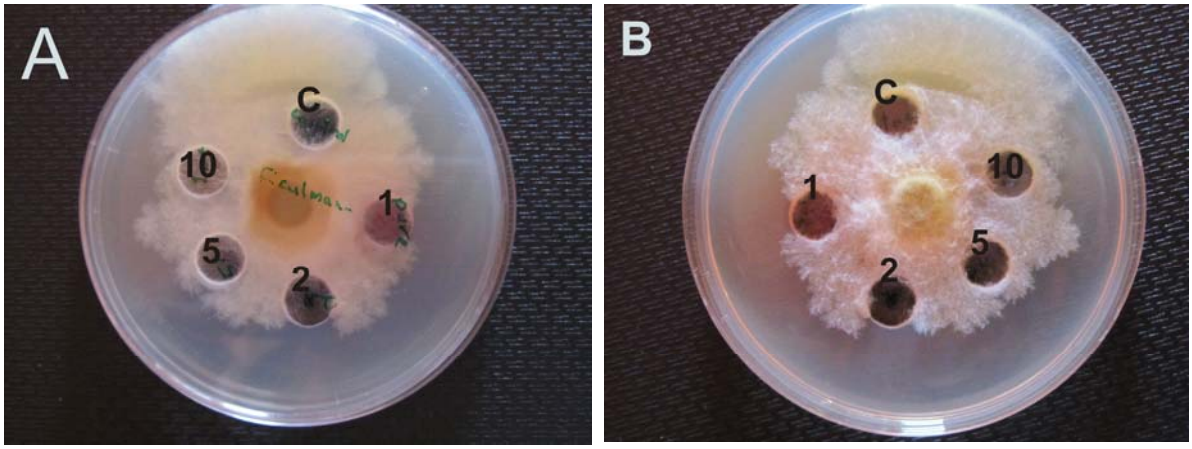
$$inhibition\ (\%) = 100 - \left( \frac{D_a(mm)}{D_c(mm)} \times 100 \right)$$

where $D_{a:}$ is average fungal colony diameter on media with anthocyanins, and $D_{c:}$ is average fungal colony diameter on control media (without anthocyanins).

***RESULTS AND DISCUSSION***

Two *Fusarium* species (*F. equiseti* and *F. culmorum*) were examined in the agar diffusion tests of anthocyanins, where hole in PDA plates were filled with non diluted crude extract, moreover 2, 5 and 10 times diluted extracts and water as control. The result (*Figure 1*) showed that both crude extract of anthocyanins from corncob and diluted ones inhibited the mycelia growth of both *Fusarium* species.

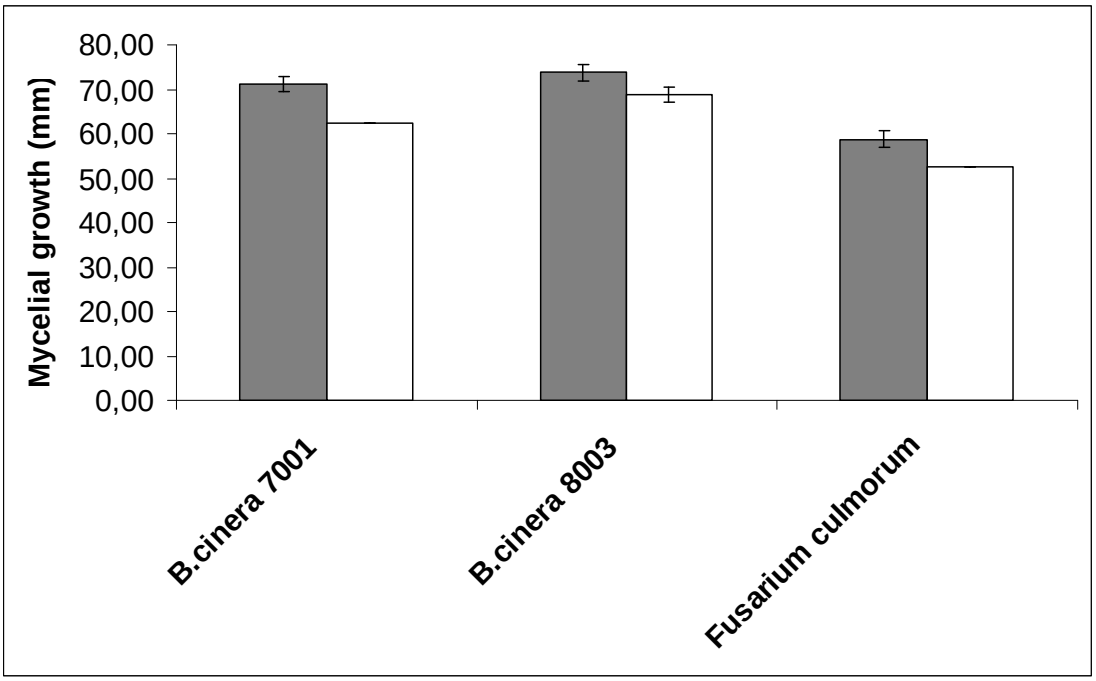
*Figure 1*: **Detection of antifungal activity of purple field corn cob with agar diffusion method**




A: *Fusarium equiseti*, B: *Fusarium culmorum*. C: control, 1: non diluted extract, 2: two times diluted extract, 5: five times diluted extract, 10: ten times diluted extract.

Mycelial growth inhibition of purple corn extract was tested on two *B. cinerea* strains and *F. culmorum*. The growth was detected as mycelia diameter 2 days after inoculation (*Figure 2*). Results clearly indicate the inhibition of anthocyanin containing purple corn extract to mycelial growth in all cases.

*Figure 2*: **Mycelial growth of different plant pathogen fungi in the presence and absence of purple corn extract**




Grey column: control, white column: with purple corn extract. Bars indicate standard deviation.

*Table 1*

**Growth of different fungi on potato dextrose agar in the presence and in the absence (control) of anthocyanin extract of purple corn**

| Fungal strains | Inhibition (%) |
|---|---|
| *Botrytis cinerea* (strain 7001) | 12.3 |
| *Botrytis cinerea* (strain 8003) | 6.8 |
| *Fusarium culmorum* | 10.6 |

Calculating the inhibition of the 7,5% ethanol free crude extracts on the complex medium, a moderate (7% – 12%) inhibition of purple corn extract could be detected for the growth of *Botrytis cinerea* and *Fusarium culmorum*.

## *CONCLUSIONS*

Purple corn is a pigmented variety of *Zea mays* L. In Peru and Bolivia, a traditional drink, to which beneficial effects for health are attributed, is prepared cooking the corn with spices. In the plant, the anthocyanins appear in epidermal cells, where it is believed to have a protective function against UV-B radiation (Escribano-Bailón *et al.*, 2004). Hammerschmidt and Nicholson (1977) showed the importance of anthocyanins in the resistance of the maize to anthrachnose. Our results also supported the antifungal effect of purple corn extract toward different plant pathogen fungi. Further studies are necessary to test the possibilities of application the extract in plant protection.

## *AKNOWLEDGEMENTS*

This work was supported by the NKTH; A2-2006-0017, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 and the TÁMOP-4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007 projects.

### *REFERENCES*

Aoki, H. - Kuze, N. - Kato, Y. (2002): Anthocyanins Isolated from Purple Corn (*Zea mays* L.). Foods & Food Ingred J Jpn, 199:41-45.

Bylka, W. - Matlawska, I. - Pilewski, N.A. (2004): Natural Flavonoids as Antimicrobial Agents. JANA, 7:24-31.

Escribano-Bailón,M.T. - Santos-Buelga, C. - Rivas-Gonzalo J.C. (2004): Anthocyanins in cereals. J. Chromatography A, 1054:129–141.

Gabrielska, J. - Oszmianski, J. - Komorowska, M. - Langner, M. (1999): Anthocyanin extracts with antioxidant and radical scavenging effect. Z. Naturforsch. 54:319-324.

Hammerschmidt, R. and Nicholson R.L. (1977): Resistance of maize to anthracnose: changes in host phenols and pigments. Phytopathology 67:251-258.

Koide,T. - Hashimoto,Y. - Kamei,H. - Kojima,T. - Hasegawa,M. - Terabe,K. (1997): Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. Cancer Biother. Radiopharm. 12:277-280.

Murray, M.T. (1996): *Encyclopedia of Nutritional Supplements.* California: Prima Publishing; 320-331.

Özçelik, B. - Deliorman Orhan, D. - Özgen, S. - Ergun, F. (2008): Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum β-Lactamase (ES_L)-Producing *Klebsiella pneumonia.* Tropical J. of Pharmaceutical Res., 7:1151-1157.

Yoshimoto, M. - Okuno S. - Yoshinaga, M. - Yamakawa, O. - Yamaguchi M. - Yamada, J. (1999): Antimutagenicity of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) roots. Biosci. Biotechnol. Biochem., 63:537-541.

# Genomic variability of Movement Protein of *Prune dwarf virus*

**Karolina Mroczkowska – Elzbieta Paduch-Cichal**
Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159, 02-776 Warsaw, Poland, tel/fax +48 22 5932043,
karolina_mroczkowska@sggw.pl.

***SUMMARY***

*Prune Dwarf virus is a member of the genus Ilarvirus (family Bromoviridae) infect worlwide stone fruit trees. It shows variability in biological, serological and molecular properties. Sequences of the movement protein genes of fourteen cherries and peach isolates of Prune dwarf virus from Poland, Italy, Germany and the USA were determined. MP gene of all sequenced isolates (including three sequences published previously in GenBank, Bachman et al 1994, Malinowski 2010 data unpublished) was 882 nucleotides in length and showed 87-100% identity at a nucleotide level and 90-100% at the amino acid level. The higher degree of conservation was observed in C-terminal half than in N-terminal half of the protein. Phylogenetic tree of seventeen MP aminoacid sequences constructed using Neighbor-Joining method with bootsrap analysis with 1000 replicates reveal the divergence into three groups. The molecular classification according to the MP gene is not correlated with host species or country of origin. In the first group are isolates caused light and mild symptoms on the wild cherries clone F12/1, the second group contains isolates caused strong and mild symptoms, whereas the third group is representing by the isolates caused mild, light or no symptoms.*

**Keywords:** PDV, MP gene, IC-RT-PCR, biological test, *Prunus avium*

## *INTRODUCTION*

*Prune dwarf virus* (PDV), a member of the genus *Ilarvirus* (family *Bromoviridae*) (King et al 2011) is one of the most economically important viruses of the genus *Prunus* (Nemeth 1986). Transmission by graft, pollen and seed contribute to his worldwide distribution (Fulton 1970, Brunt et al 1996). Symptoms of PDV vary greatly depending on climate, virus isolate, host species and cultivar. They range from symptomless infection to considerable fruit yield reduction (Nemeth 1986). Mixed infection with Prunus *necrotic ringspot virus* (PNRSV) and *Apple mosaic virus* (ApMV) frequently occurs. All three ilarviruses share similar biological properties although they are serological unrelated (Uemoto and Scott 1992). PDV has a tripartite positive sense, single stranded RNA genome. Monocistronic RNA1 and RNA2 encode proteins involved in viral replication, while bicistronic RNA3 encodes movement protein (MP) and coat protein (CP). MP is translated directly from RNA3, whereas CP is expressed from subgenomic RNA4 (Bachman et al 1994). Natural variability of viruses can influence their reliable detection by molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR). Designing PCR primers capable of detecting virus variants requires the knowledge of the sequence variability of the variants (Vaskova et al 2000). Analysis of the dendrogram constructed using CP gene sequences from 38 PDV showed correlation between amino acid substitution and host species. The division into 4 groups: 'mixed', 'cherry I', 'cherry II' and 'almond' was proposed (Uluba Serce et al 2008). At present, only eight PDV complete nucleotide sequence of MP gene has been deposited in the GenBank database. This study covers the preliminary phylogenetic analysis of the MP gene sequences of fourteen owned PDV isolates and three sequences from GenBank: L28145 (Bachman *et al.*, 1994), HM015769, HM015770 (Malinowski 2011, unpublished data).

## *MATERIALS AND METHODS*

### Virus source

The samples were collected from *Prunus avium* clone F12/1, inoculated with fourteen PDV isolates from cherry and peach (Table 1). Most of them originated from Poland, three from Italy and one from the USA and Germany. Leaf breaking buds used for testing the presence of PDV and PNRSV by DAS-ELISA, using polyclonal antibodies (Loewe Biochemica GmbH, Germany), according to instructions of the manufacturers.

### IC-RT-PCR

Movement protein gene of PDV variants were amplified using IC-RT-PCR method (immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction) described by Wetzel et. al (1992), Nolasco *et al.* (1993), Candresse *et al.* (1994) and Malinowski (2005). PCR tubes were coated by adding anti-PDV IgG diluted 1:100 in coating buffer ($Na_2CO_3$, $NaHCO_3$, pH 9.6). Approximately 0.25 g of plant materials was macerated with PBS-TPO buffer, pH 7.4 diluted 1:20 in BIOREBA AG (Switzerland) extraction bags by using serological press (BIOREBA, Switzerland). After washing with PBS-Tween buffer, pH 7.4, supernatants were added to previously coated PCR tubes and incubated at 4°C overnight. After incubation the tubes were washed again with PBS-Tween buffer, pH 7.4 and with Tris/HCl, pH 8.0. The same tubes were used in RT-PCR reaction. The reaction was performed in the total volume of 50 µl Titan One Tube RT-PCR System (Roche, Germany) master mix containing Expand High Fidelity enzyme mix, reverse transcriptase and AMV and primers designed basing

on the sequence l28141 (Bachman *et al.*, 1994) upstream primer: 5' TGCGGTTCTCTATAAACCCTC 3' and downstream one: 5' AWCGGGYAGTAGGGYTTTCCA 3'. The reaction was carried out in Applied Biosystems (USA) Veirty 96 Well. Cycling parameters were: reverse transcription step at 50°C for 30 min, denature template at 94 C for 2 min, 10 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 50°C for 30 s and elongation at 68°C for 90 s, then 25 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 50°C for 30 s and elongation at 68°C for 90 s + 5 s for each cycle and a final elongation at 68°C for 7 min. The results were visualized by electrophoresis.

**Electrophoresis and sequencing**

The products of the amplification mixed with 6x DNA Loading Due and GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Burlington, Canada) were applied to 1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide. Electrophoresis was carried out at 100 V. The results were viewed under UV. Rest of the products was purified and sequenced in DNA Sequencing & Oligonucleotide Synthesis Laboratory in Institute of Biochemistry and Biophysics, (Poland).

**Sequence analysis**

Sequence data were analysed using Finch TV. Multiple sequence alignments and sequence identities were determined using CLUSTALW. Phylogenetic tree constructed using Neighbor-Joining method (Sitou and Nei 1987, Tamura and Kumar 2004) and bootstrap analyses with 1000 replicates (Felsenstein 1985) were conducted in MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2007).

## *RESULTS*

The produced MP nucleotide sequences of our fourteen isolates were compared with each other as well as with the sequences deposited in GenBank L28145 (Bachman *et al.*, 1994) HM015769 and HM015770 (Malinowski, unpublished data, 2010). PDV variants showed 87-100% of identity. The alignment of putative translation products 293 amino acids (aa) long showed 90-100% of identity. Up to twenty six differences between the analysed aa sequences were observed. Generally, forty three aa positions varied. The amino (N) terminal half was much more conservative than the carboxy (C) terminal half of the protein

Preliminary phylogenetic analysis of seventeen isolates MP gene (together with primary sequences L28145(1), HM015769 and HM015770 (Malinowski, unpublished data, 2010) and the constructed tree showed the division into three groups of PDV variants (Figure 1.). In the first group there are four polish isolates: three from cherry (PDV-SWRegina, PDV-SO40, 0917) and one from peach (PDV-PE247). The second group contains six cherry isolates from Poland (PDV-SWM1, PDV-PA63, PDV-PA78, PDV-SO20SZ3), Italy (PDV-SOF15P11, PDV-SOF17P17) and one peach isolate from Germany (PDV-PE15-28). In the third group there are four cherry isolates from Poland (PDV-SWI-35, PDV-SO14), Italy (PDV-SW6-1), USA (PDV-SW9-1), one squash isolate from the USA (CH 137) and one plum isolate from Poland (0599). The intra-group homology values for the aa sequences were 95-100% among first and second groups and 93-99% for those within the third group. The molecular classification according to the MP gene was not correlated with host species or country of origin.

The divergence of the PDV isolates into three groups was confirmed by bootstrap value. The two groups first and third are forked with quite high boostrap value while the second group is separated by low value.

Biological test with *Prunus avium* clone F12/1 was carried out. According to the biological properties isolates were divided into the four groups. In the group of isolates caused strong symptoms like chlorotic rings, necrotic spots in a very large numbers as well as the shot hols on leaves of wild cherries are PDV-PA78 and PDV-SWM1 (Figure 2). The group of isolates which cause middle symptoms like chlorotic rings and spots, small necrotic spots sometimes with a green border (Figure 4) in quite large numbers contains PDV-PE15-28, PDV-SO20SZ3, PDV-SOF17P17, PDV-PA63 (Figure 3.), PDV-SW6-1, PDV-SOF15P11 and PDV-PE247. The group of isolates which cause light symptoms like not numerous chlorotic spots and rings, not numerous necrotic spots and small necrotic spots with a green border is represented by PDV-SWRegina, PDV-SWI-35, PDV-SO40 and PDV-SW9-1. Only one isolate PDV-SO14, which caused no symptoms on a wild cherry.

Comparing molecular and biological properties it can be infered that in the first group (from phylogenetic tree) are isolates caused light and mild symptoms on the wild cherries, the second group contains isolates caused strong and mild symptoms, whereas the third group is representing by the isolates caused mild, light or no symptoms.

*Table 1*

**Listing and origin of the isolates used in this study or available at the GenBank.**

| Acc | Isolate | Species of the host plant | Variety of the host plant | Origin | Author of the sequence |
|---|---|---|---|---|---|
| L28145 | ch 137 | Squash | - | USA | Bachamn *et al.*, 1994 |
| HM015769 | 0917 | Wild cherry | - | Poland | Malinowski, 2010, dane niepublikowane |
| HM015770 | 0599 | Plum | unknown | Poland | Malinowski, 2010, dane niepublikowane |
| **HM021229** | PDV-SO14 | Sour cherry | Kormed | Poland | Mroczkowska *et al.*, 2010, dane niepublikowane |
| **HM021230** | PDV-PA63 | Wild cherry | - | Poland | Mroczkowska *et al.*, 2010, dane niepublikowane |
| **HM021231** | PDV-SWRegina | Sweet cherry | Regina | Poland | Mroczkowska *et al.*, 2010, dane niepublikowane |
| **HM021232** | PDV-SW6-1 | | unknown | Italy | Mroczkowska *et al.*, 2010, dane niepublikowane |
| **HM021233** | PDV-SW9-1 | Sweet cherry | unknown | USA | Mroczkowska *et al.*, 2010, dane niepublikowane |
| - | PDV-SOF17P17 | Sour cherry | Big Core | Italy | Mroczkowska *et al.*, 2011, dane niepublikowane |
| - | PDV-SO20SZ3 | Sour cherry | Royal Burgundy | Poland | Mroczkowska *et al.*, 2011, dane niepublikowane |
| - | PDV-PE247 | Peach | Kwiat Majowy | Poland | Mroczkowska *et al.*, 2011, dane niepublikowane |
| - | PDV-PA78 | Wild cherry | - | Poland | Mroczkowska *et al.*, 2011, dane niepublikowane |
| - | PDV-SWM1 | Sweet cherry | Napoleona | Poland | Mroczkowska *et al.*, 2011, dane niepublikowane |
| - | PDV-SO40 | Sour cherry | Korund | Poland | Mroczkowska *et al.*, 2011, dane niepublikowane |
| - | PDV-PE15-28 | Peach | unknown | Germany | Mroczkowska *et al.*, 2011, dane niepublikowane |
| - | PDV-SWI-35 | Sweet cherry | unknown | Poland | Mroczkowska *et al.*, 2011, dane niepublikowane |
| - | PDV-SOF15P11 | Sour cherry | Nomene | Italy | Mroczkowska *et al.*, 2011, dane niepublikowane |

*Figure 1*: **Phylogenetic tree of amino acids sequences of the movement protein of PDV isolates. Phylogenetic analysis was based on Neighbor-Joining method (MEGA 5.05) with bootrap value calculation (1000 replicates).**

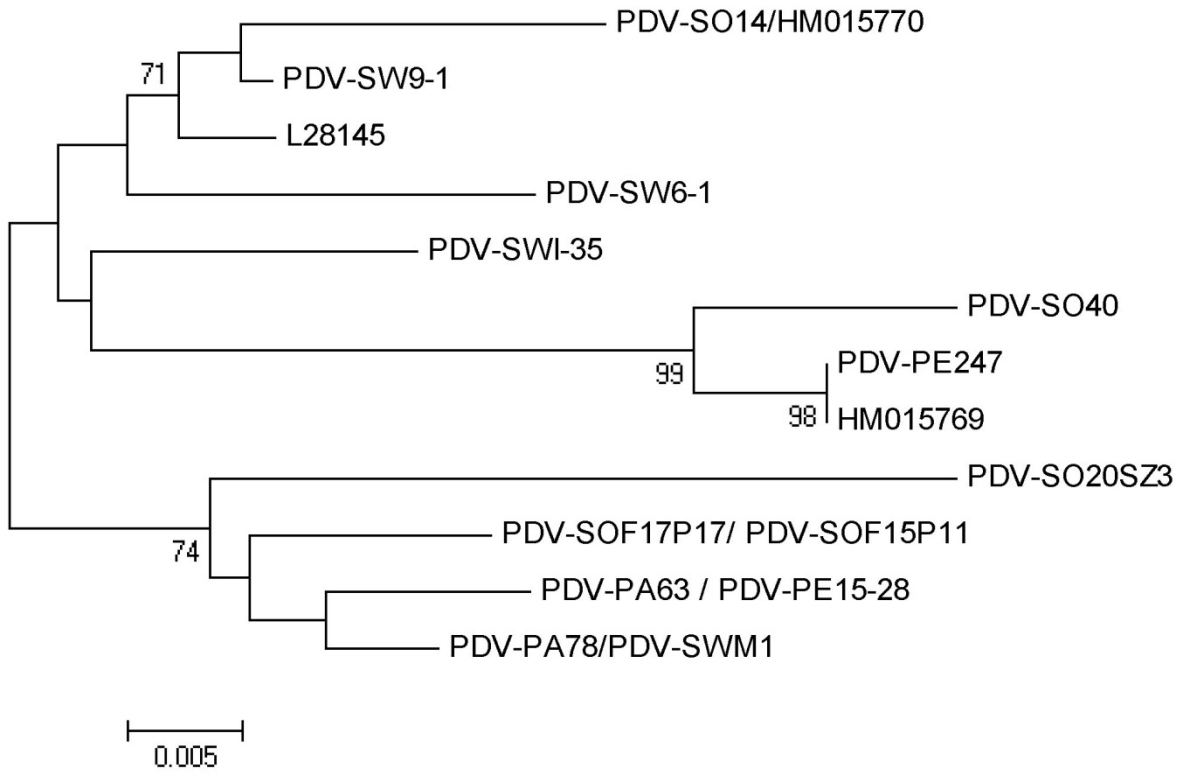


*Figure 2*: **Necrotic spots in a very large numbers on a wild cherry clone F12/1 caused by PDV-SWM1.**

*Figure 3*: **Chlorotic spots and rings, necrotic spots in a quite large numbers on a wild cherry clone F12/1 caused by PDV-PA63.**

*Figure 4*: **Necrotic spots with a green border in a quite large numbers on a wild cherry clone F12/1 caused by PDV-PE247.**

***REFERENCES***


Bachman E. J.- Scott, S. W.- Xin G. - Vance V. B. (1994). The complete nucleotide sequence of Prune dwarf ilarvirus RNA3: implications for coat protein activation of genome replication in ilarviruses, Virology 201, 127-131.

Brunt H. A.- Crabtree K.- Dallawitz M. J.- Gibbs A. J. - Watson L. (1996). Viruses of Plants. Wallingford, Oxon, UK, CAB International.

Candresse, T., Macqaire, G., Lanneau, M., Bousalem M., Wetzel T., Quiot-Doune, L., Quoit, J. B. and Dunez J. (1994). Detection of plum pox potyvirus and analysis of its molecular variability using immunocapture – PCR, Biulletin OEPP/EPPO, 24, 585-594.

Fulton R. W. (1970). Prune dwarf virus. C.M.I./A.A.B. Description of Plant Viruses No. 1

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 39, 783-791.

King A.M.Q.- Adams M.J.- Carstens E.B. -Lefkowitz E.J Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (2011). San Diego: Elsevier Academic Press"

Lanneau M. - Candresse T. (1993). Simplified Immunocapture – PCR protocol. Cost 88. Plum Pox Virus Workshop, Valencia, Spain.

Malinowski T. (2005). Potential problems with the reality of PCR based diagnostic methods related to plant viruses sequence variation, Phytopathol. Pol., 35, 125-139.

Nemeth M. (1986). Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers.

Nicolasco G.- de Blas C.- Torres- V. and Ponz F. (1993) A method combining immunocaptute and PCR amplification in microliter plate fort he routine diagnosis of plant viruses and subviral pathogens, J. Virological Methods, 45, 201-218.

Saitou N. - Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4, 406-425.

Tamura K-Nei M. - Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 101, 11030-11035.

Tamura K.- Dudley J.- Nei M. - Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24,1596-1599.

Ulubas Serce C.- Ertunc F.- Ozturk A. (2009). Identification and Genomic Variability of Prune dwarf virus Variats Infecting Stone Fruit Trees in Turkey. J. Phytopathol., 157, 298-305.

Uyemoto J. K. - Scott S. W. (1992). Important diseases of Prunus cases by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. Plant Dis, 76, 5-11.

Vascova D.- Petrzik K. - Spak J. (2000). Molecular variability of the capsid proteinof the prune dwarf virus. European Journal of Plant Pathology, 106, 573-580.

Wetzel T.- Candresse T.- Maquire G.- Ravelonardo M. - Dunez, J. (1992). A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. J. Virological Methods, 39 (1-2), 27-37.

# Investigation of *Fusarium* ear rot symptoms on maize (*Zea mays* L.) using a spectroradiometer

**C. Szőke[1] - I. Virág[2] - D. K. Szalay[3] - P. Bónis[1] - L. Fenyvesi[3] - L.C. Marton[1] - M. Neményi[2]**

[1]Agricultural Institute, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár

[2]University of West Hungary, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Institute for Biosystem Engineering, Mosonmagyaróvár

[3]Ministry of Rural Development, Institute of Agricultural Engineering, Gödöllő

***SUMMARY***

*Ear samples of two maize genotypes (MV1 and MV2) with different levels of resistance to Fusarium ear rot were collected from artificially inoculated and non-infected plants. The spectral characteristics of the samples were analysed with an ASD Fieldspec 3 MAX™ spectroradiometer in the wavelength range of 350–2500 nm. The spectra of infected and non-infected samples could be clearly distinguished in the 880–910 nm wavelength range. Principal component analysis (PCA) was applied to detect correlations that could be used to select samples showing symptoms of infection. The principal components required for further analysis are now available and can also be used for classification.*

**Keywords:** *Fusarium* ear rot, maize, spectroradiometer

## *INTRODUCTION*

Among the pathogens attacking plants, filamentous fungus species belonging to the *Fusarium* genus cause particularly severe problems due to their excellent adaptability. They are to be found all over the world, and in a continental climate they are responsible for substantial quantitative and qualitative losses in cereals. Maize ears are damaged mainly by *Fusarium graminearum, F. verticillioides* and *F. culmorum* (Dorn *et al.*, 2011, Goertz *et al.*, 2010), but other fungus species may also cause ear rot (Szécsi, 1994). The control of this disease is one of the major challenges facing maize protection experts (Mesterházy *et al.*, 2012).

The methods used to analyse fungal diseases on plants can be divided into two basic groups: destructive and non-destructive. Destructive methods are based on chemical analysis. Liquid and gas chromatography and spectrophotometry are exact, widely used techniques, but analysing large numbers of samples is extremely time-consuming (Draganova *et al.*, 2010). *Aspergillus flavus* and other infectious fungal species have been found to have characteristic spectral traits in the infrared wavelength spectrum, which can be clearly distinguished from the spectral traits of healthy maize grains (Gordon *et al.*, 1997). Williams *et al.* (2010) used principal component analysis to detect significant differences between healthy maize grains and those infected with *Fusarium verticillioides*. It was established by Dowell *et al.* (2002) that analytical models based on reflectance spectra led to a more precise classification of maize grains infected with *F. verticillioides*, in terms of fumonisin content, than calculations based on transmittance spectra. A bench-top hyperspectral imaging system (VNIR-100E) was used by Yao *et al.* (2008) in a two-step experiment, involving five fungal species for laboratory experiments: *Penicillium chrysogenum, Fusarium moniliforme* (=*F. verticillioides*), *Aspergillus parasiticus, Trichoderma viride* and *Aspergillus flavus*. Colonies formed by the five fungi could be distinguished from each other with an accuracy of 97.7%.

## *MATERIALS AND METHODS*

A large number of maize genotypes were sown in a small-plot experiment in the pathological nursery of the Agricultural Research Institute (CAR-HAS) in 2011. The plants were artificially inoculated with isolates of *Fusarium verticillioides, F. culmorum* and *F. graminearum*, respectively, using the toothpick method recommended by Young (1943), on the 10$^{th}$ day after 50% of silking. The main ears of the maize plants were inoculated with two replications. No artificial inoculation was performed on the control plots.

Samples were collected from non-infected and artificially inoculated plants of two maize hybrids with different levels of susceptibility to ear rot disease (MV1 and MV2). The maize ears were dried at 35°C for 24 h to achieve a moisture content of 14%. When the ears were removed from the dryer they were individually labelled and scored for ear rot severity, after which the length and weight were recorded.

In addition to these conventional measurements, the samples were also analysed at a wavelength of 350–2500 nm using an ASD Fieldspec 3 MAX™ hyperspectral device in a special light-isolated cabinet at the Agricultural Engineering Institute of the Ministry of Rural Development. The non-destructive analysis of maize ears and shelled kernels was carried out using a Plant Probe™ (ASD) sensor, which collects spectral data from an area equivalent to a circle 2 cm in diameter. The analysis of maize ears collected from the MV1 genotype will be detailed below. The three most severely infected ears were selected from each treatment on the basis of scoring results and these were used for analysis. Five measurements were first made on the point of infection and the surrounding area, followed by a further five random measurements on parts of the ear exhibiting no visible signs

of infection. In the case of non-infected (control) ears, five measurements were made at randomly selected points. For each measurement point an integrated mean spectrum was recorded, based on the results of twenty readings. The white reference measurement was repeated before each sample was measured. The integration time was set at 17 ms.

## *RESULTS AND DISCUSSION*

The data recorded for maize ears collected from the MV1 genotype in the course of the conventional evaluation are summarized in Table 1. It can be seen from the mean values that the weight of the ears decreased by 19.43% and the length by 7.46% after infection with the *F. culmorum* isolate, with a severity value of 24.58%. Inoculation with the *F. verticillioides* isolate resulted in low severity for this genotype. A severity of less than 5% (one or two kernels in the neighbourhood of the inoculation point) could not be unambiguously detected with the Plant Probe™ sensor, so these ears were regarded as symptomless ears in the analyses.

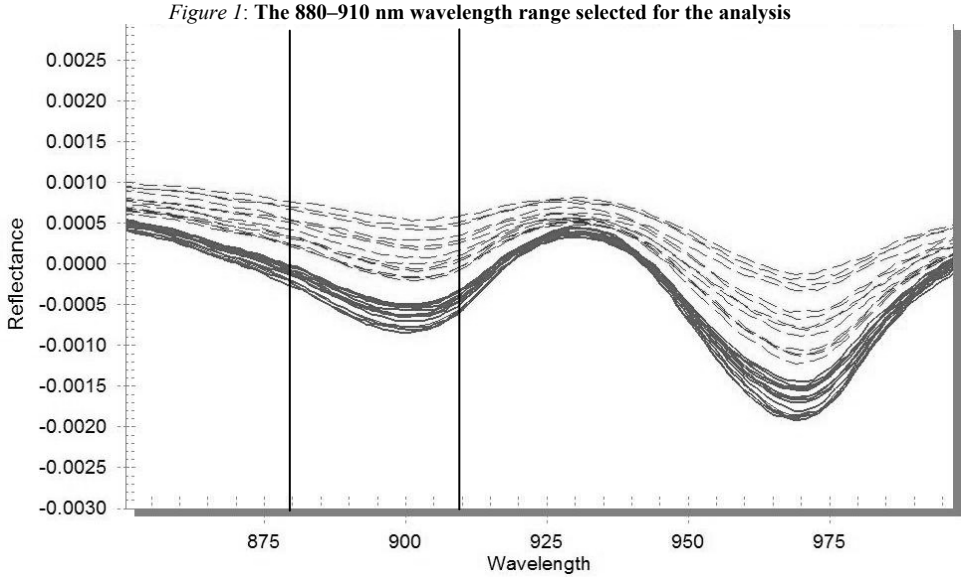
*Table 1*

**Evaluation of maize ears collected from the MV1 genotype**

| Treatment | Weight (g) | Length (cm) | Severity (%) |
|---|---|---|---|
| Control | 99.46 | 16.08 | 0.00 |
| *F. culmorum* | 80.15 | 14.88 | 24.58 |
| *F. graminearum* | 86.42 | 16.30 | 20.00 |
| *F. verticillioides* | 97.10 | 15.50 | 2.00 |

As a first step, the raw data were converted into reflectance spectra in course of the evaluation of the hyperspectral measurements. The five measurements for each maize ear were averaged, after which the first derivatives of the mean spectra were compared. This comparison revealed three narrow wavelength ranges (880-910, 950-980, 1130-1160 nm) where the spectra collected from the surface of samples exhibiting symptoms (dotted line) could be clearly distinguished from the mean spectra of symptomless samples (solid line). The greatest difference was observed in the 880-910 nm range (Figure 1), so further analysis was performed using the reflectance values in this range.

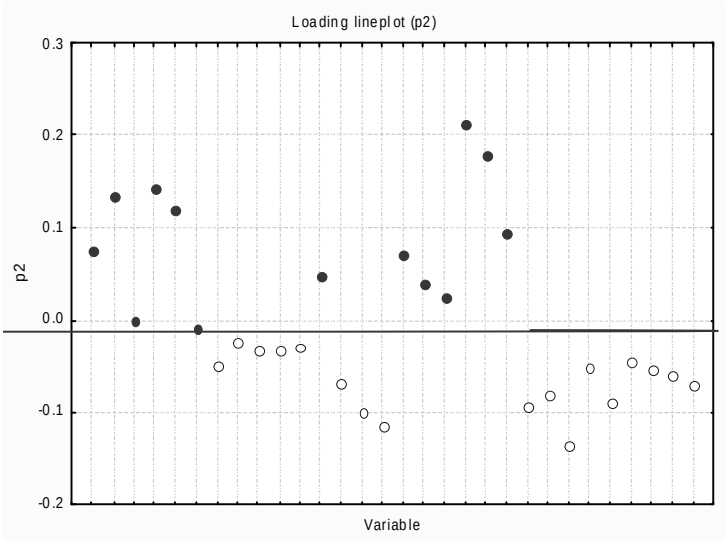
*Figure 1*: **The 880–910 nm wavelength range selected for the analysis**




Principal component analysis was used to provide a statistical confirmation of the differences observed in the selected wavelength range, with the aim of detecting components that could be employed to distinguish between infected and non-infected lots. When entering the data required for the analysis, the mean spectra of every maize ear (comes from five measurements) within the given spectrum range were taken as a variable. The values of the second principal component for the mean spectra are illustrated in Figure 2. The solid black dots represent data from ears exhibiting clearly visible symptoms of infection, while the open dots represent the mean spectrum data

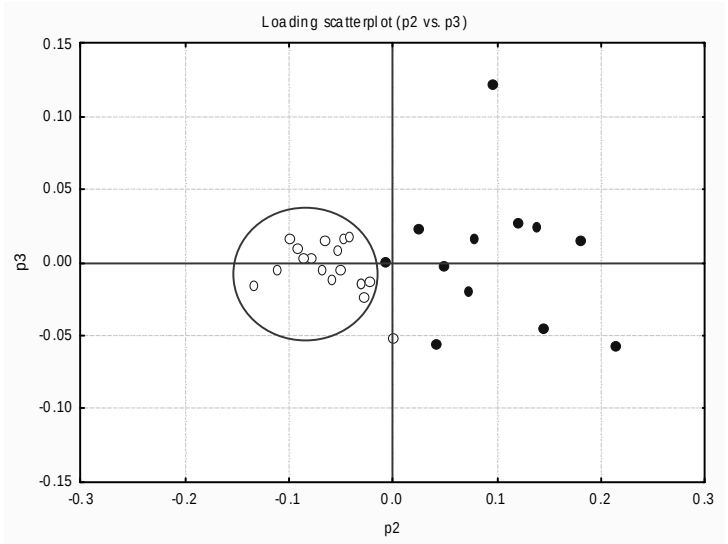
from control ears showing no signs of infection. The two types of dots clearly clustered above and below a value of –0.024 on the 2nd principal component axis.

*Figure 2*: **Values of the mean spectra on the second principal component axis**




The mean spectra of samples with or without symptoms of infection are plotted in Figure 3 in terms of the second and third principal components (p2 vs. p3). The open circles representing the mean spectra of symptomless samples can be seen to cluster together, forming a distinct group, while the mean spectra of samples exhibiting symptoms of infection are scattered over a wider area, at a distance from those of the symptomless samples.

*Figure 3*: **Spectrum values on a 2nd vs. 3rd principal component plot**




Principal component analysis on the available data set thus revealed correlations that could be useful for distinguishing samples exhibiting symptoms of infection. It was found that the spectra collected from the surface of samples with and without symptoms of infection could be clearly distinguished in the 880–910 nm wavelength range, indicating that the measurement method described here was suitable for the separation of infected and healthy maize kernels. The principal components required for further analysis are now available and are suitable for the elaboration of further classification procedures.

The method needs to be refined by carrying out further measurements in all the wavelength ranges selected for analysis, both individually and in combinations. The two genotypes will also be subjected to further analysis, separately and together, and a larger number of maize genotypes will be tested with this method in order to make the method more widely applicable. Future work will also involve the use of imaging systems, allowing the symptoms caused by infection to be examined even on a single kernel.

***ACKNOWLEDGEMENTS***

The research was financed in the framework of the TÁMOP - 4.2.2. B –- 10/1 - 2010 - 0018 project entitled "Talentum – Improvements in the conditions available for encouraging talented students at the University of West Hungary" with funds from the European Union and the European Social Fund.

***REFERENCES***

Dorn B.-Forrer H. R.-Jenny E.-Wettstein F. E.-Bucheli T. D.-Vogelgsang S. (2011) *Fusarium* species complex and mycotoxins in grain maize from maize hybrid trials and from grower's fields. J. Appl. Microbiol. 111, 693-706.

Dowell F. E.-Pearson T. E.-Maghirang E. B.-Xie F.-Wicklow D. T. (2002): Reflectance and transmittance spectroscopy applied to detecting fumonisin in single corn kernels infected with *Fusarium verticillioides*. Cereal Chem. 79, 222-226.

Draganova T.-Daskalov P.-Tsonev R. (2010): An approach for identifying of *Fusarium* infected maize grains by spectral analysis in the visible and near infrared region, SIMCA models, parametric and neural classifiers. Int. J. Bioautomat. 14, 119-128.

Goertz A.-Zuehlke S.-Spiteller M.-Steiner U.-Dehne H.W.-Waalwijk C.-de Vries I.-Oerke E. (2010): *Fusarium* species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. Eur. J. Plant Pathol. 128, 101-111.

Gordon S. H.-Schudy R. B.-Wheeler B. C.-Wicklow D. T.-Greene R. V. (1997): Identification of Fourier transform infrared photoacoustic spectral features for detection of *Aspergillus flavus* infection in corn. Int. J. Food Microbiol. 35, 179-186.

Mesterházy Á.-Lemmens M.-Reid L. M. (2012): Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize - a review. Plant Breeding 131, 1-19.

Szécsi Á. (1994): A *Liseola* szekcióba tartozó fuzáriumok elõfordulása hazai kukoricakultúrákban 1991 és 1992. évben. (Occurrence of *Fusarium* species in the section *Liseola* isolated from Hungarial maize samples in 1991 and 1992.) *Növényvédelem* 30, 313-318.

Williams P.-Manley M.-Fox G.-Geladi P. (2010): Indirect detection of *Fusarium verticillioides* in maize (*Zea mays* L.) kernels by NIR hyperspectral imaging. J. Near Infrared Spec. 18, 49-58.

Yao, H.-Hruska Z.-Kincaid R.-Brown R. L.-Cleveland T. E. (2008): Differentiation of toxigenic fungi using hyperspectral imagery. Sens. & Instrumen. Food Qual. 2, 215-224.

Young, H. C. (1943): The toothpick method of inoculating corn for ear and stalk rots. (Abstr.) Phytopath. 33, 16.

# Development of plant protection technology against sour cherry anthracnose

**Annamária Tóth [1] – Marietta Petróczy [1] – Mária Hegedűs [1] – Géza Nagy [1] – Csaba Lovász [2] – János Ágoston[3] – László Palkovics [1]**

[1]Corvinus Univesity of Budapest, Department of Plant Pathology, Budapest

[2] Bayer CropScience, Budapest

[3] Government Office of Bács-Kiskun County Directorate of Plant and Soil Protection, Kecskemét

annamaria.toth2@uni-corvinus.hu

***SUMMARY***

Colletotrichum acutatum*, a causal agent of anthracnose of sour cherry, caused unexpected losses for fruit growers in the past few years. Symptoms of the disease appear during ripening, but can come up during transportation or storage as well. Various fungicides were assessed for their ability to control this disease, under laboratory and field conditions. The most effective agents were mancozeb, difenoconazole, penconazole, tebuconazole, trifloxistrobin + tebuconazole, boscalid + piraclostrobin and prochloraz, showing complete inhibition of mycelial growth and conidial germination. In field experiments the frequency of infection was remained below 0.05% in case of all tested technologies.*

**Keywords:** anthracnose of sour cherry, *Colletotrichum acutatum*, fungicides, plant protection

## *INTRODUCTION*

Pathogen of sour cherry anthracnose was firstly described by János Lehoczky (1957) in Hungary as *Glomerella cingulata* (anamorph: *Colletotrichum gloeosporioides*). In the past decades the fungus did not cause severe infection, but since 2006 epidemics have been occurred in the orchards of some areas in Hungary. The pathogen caused unexpected losses of fruit production, because, in many instances, the chemical control proved to be unsuccessful.

Anthracnose (bitter rot) on sweet and sour cherry fruits was supposedly caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Holb and Veisz, 2005; Kajati *et al.*, 2002; Stensvand *et al.*, 2003). Since *Colletotrichum acutatum* (teleomorph: *Glomerella acutata*) was separated from C. *gloeosporioides* (Simmonds, 1965), new investigations have revealed that *C. acutatum* occurs on several fruit crops (Sutton, 1992). Based on morphological descriptions, many diseases reported before 1965 to be caused by *C. gloeosporioides* (or one of its synonyms) could had been caused by *C. acutatum* (Walker *et al.*, 1991). In Norway all isolates of the pathogen from sweet and sour cherry showing symptoms of anthracnose have been confirmed as *C. acutatum* and not *C. gloeosporioides* by PCR analysis (Børve and Stensvand, 2006a).

In Hungary it has been proven that *C. acutatum* is responsible for the epidemics (Tóth *et al.*, 2012).

The fungus attacks the ripening fruits, causing mat, enlarging brownish spots, finally the fruits rot, and under dry conditions mummies are formed (Lehoczky, 1957). Acervuli and orange conidial mass develop on the infected tissues. Symptoms appear suddenly and can come up during transportation or storage as well.

The biology of the pathogen is not fully known, further studies should be carried out. Formerly infected fruits and fruit peduncles still attached to the trees from the previous year are the most important sources of inoculums. Bud scales of sweet cherry can be a possible source of infection in spring in case of *C. acutatum* as well. Generative buds have a higher incidence of infections than vegetative buds (Børve and Stensvand, 2006b). Foreign literatures mention that the pathogen proliferates symptomless on leaves and green fruits. Asymptomatic infections of *C. acutatum* on leaves have been reported to occur on citrus (Zulfiqar *et al.*, 1996), strawberry (Leandro *et al*., 2001; Mertely and Legard, 2004), mulberry (Yoshida and Shirata, 1999) and apple (Crusius *et al*., 2002), but the relative importance of such infections in yearly epidemics in those crops was not determined. On apple trees in Brazil more inoculums of *C. acutatum* were found on mummified fruit than on leaves (Crusius *et al*., 2002).

In Czech Republic in the past years, the cultivar Úfehértói fürtös was most affected by the disease. Efficacy of tebuconazole (Horizon 250 EW) was evaluated during field tests. Results of experiments established in commercial orchards showed that the fungicide was effective in controlling the disease. The best results were obtained with double applications of the fungicide: 14 and 7 days before the harvest (Kloutvorová *et al*., 2004). Captan and mancozeb active substances can be applied in plant protection technology Glits (2000).

In Hungary till 2011 Teldor 500SC containing fenhexamid, was the only licensed fungicide against anthracnose. Recently, in 2012 Flint max (trifoxystrobin + tebuconazole) has been authorized as well (Anonymus, 2012). Trifloxystrobin + tebuconazole is a new fungicide combination that is registered for use on both pome fruits and stone fruits against brown rot, anthracnose, cherry leaf spot and several other diseases. To limit resistance development, it should not be applied for more than two consecutive applications (Anonymus, 2011).

Paredes and Munoz (2002) evaluated various fungicides for the control of *C. acutatum* in their study. The effective dose causing 50% inhibition of mycelial growth was 0.5, 1 and 2 ppm for the fungicides propiconazole, bitertanole, imazalil and hexaconazole, respectively. Prochloraz is also effective in controlling this species (Freeman *et al*., 1997).

Børve and Stensvand (2006a) optimized fungicide application against anthracnose in sweet and sour cherry orchards. Two applications with dithianon during the green fruit stage greatly reduced anthracnose at harvest. Three applications on green fruit did not reduce disease more than two applications.

## *MATERIALS AND METHODS*

### Fungal isolates

*In vitro* tests were conducted using four field isolates of *C. acutatum*. They were isolated from naturally infected sour cherries in 2010-2011 (*Table 1*). Pure cultures were established, and maintained on potato dextrose agar (PDA) medium. Identification of *C. acutatum* isolates was firstly performed by standard tests, based on the morphology of conidia and colonies and then sustained by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of internal transcribed spacer ITS region with the primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (White *et al*., 1990).

*Table 1*

**List of *Colletotrichum acutatum* isolates used in experiments**

| Name of isolate | Year of isolation | Origin | Host cultivar |
|---|---|---|---|
| A1 | 2010 | Hajdúdorog | Újfehértói fürtös |
| A2 | 2010 | Sóskút | Újfehértói fürtös |
| A5 | 2011 | Lajosmizse | Újfehértói fürtös |
| A6 | 2011 | Kiskunmajsa | Kántorjánosi |

### Fungicides

Thirty-five fungicides were used in the *in vitro* experiments in practical dose and in 10x dilution (*Table 2*).

### *In vitro* pathogenicity tests

Sour cherry (cv. Újfehértói fürtös) fruits were applied for the pathogenicity tests. Fruits were first disinfected by soaking in 0.5% NaOCl for 1 min., than in 70% ethanol for 1 min., after they were rinsed with sterile distilled water and dried at room temperature on a sterile filter paper under laminar airflow. Mycelial discs of the pathogen (5 mm in diameter) removed from the margins of pure cultures were placed on the surface of fruits. Fruits were placed in sterile glass vessels, under high humidity. Untreated control was included for comparison with sterile PDA plugs. Development stages and disease severity were recorded after 10 days, as described above.

### Assay on mycelial growth

The antifungal activity *in vitro* was compared by agar dilution technique. Mycelial discs of the pathogen (5 mm in diameter) removed from the margins of a 7 days old culture were transferred to PDA media amended with the fungicides at tested concentrations. Four replicates were used per treatment. For each active ingredient and concentration, inhibition of radial growth compared with the untreated control was calculated after the mycelia on control plates reached the edges of the Petri dishes. Plates were incubated at 24°C, in the dark.

### Assay on conidial germination

The effects of fungicides upon the spore germination of *Colletotrichum acutatum* isolates were tested as follows. Spore suspensions ($10^5$ spores/ml) were prepared in distilled sterile water from 20 days old cultures. Then, 10 µl aliquots of the spore suspensions were spread on the surface of poisoned PDA plates. Fungicides were tested in practical dose and 10x dilution. After incubation for 48-72 h at 24°C, in the dark, germinated spores were counted in case of each treatment. Inhibition of conidial germination was compared with the untreated control and inhibition rate was calculated. In case of fungicides caused total inhibition, plates were maintained under the conditions mentioned above. Plates were re-evaluated 7 and 14 days later.

*Table 2*

**List of fungicides, ingredients used in experiments**

| Fungicide | Active ingredients | Field dose | Manufacturer/ Dealer |
|---|---|---|---|
| Amistar | azoxystrobin | 0.75-1 l/ha | Syngenta |
| Antracol 70WG | propineb | 1.5-2.25 kg/ha | Bayer |
| Bordóilé FW | tribasic copper sulphate | 5 l/ha | VET-Pharma Kft. |
| Bravo 500SC | chlorothalonil | 2.5-3 l/ha | Syngenta |
| Captan 50WP | captan | 2-3.2 kg/ha | Arysta |
| Catane | paraffinic oil | 1-2.5 % | Total Fluides |
| Chorus 50WG | cyprodinil | 0.35-0.4 kg/ha | Syngenta |
| Cupertine M | copper + mancozeb | 10 kg/ha | Indrustrias Quimicas |
| Cuproxat FW | tribasic copper sulphate | 4-5l/ha | NuFarm |
| Delan 700WG | dithianon | 0.75kg/ha | BASF Agro |
| Dithane M-45 | mancozeb | 0.2% | Dow AgroSciences |
| Efuzin 500FW | dodine | 0.8-1l/ha | Agriphar S.A. |
| Flint-max | tebuconazole + trifloxystrobin | 0.4kg/ha | Bayer |
| Funguran-OH 50WP | copper hydroxide | 2-3kg/ha | Spiess-Urania |
| Kasumin 2L | kasugamycin | 4l/ha | Chemark Kft. |
| Mirage 45EC | prochloraz | 0.3-0.5l/ha | Makhteshim |
| Montaflow | copper oxychloride | 2-2.5l/ha | Montanwerke Brixlegg |
| Necator 80WG | sulphur | 3-7.5kg/ha | AgroStulln GmbH |
| Nordox 75WG | copper(I)-oxide | 0.2-0.3kg/ha | Nordox |
| Orius 20EW | tebuconazole | 0.75-0.9l/ha | Makhteshim |
| Pluto 50WP | copper oxychloride | 2-3kg/ha | Agri-Estrella |
| Quadris | azoxystrobin | 0.75-1l/ha | Syngenta |
| Rovral aquaflow | iprodione | 1l/ha | BASF |
| Score 250EC | difenoconazole | 0.2l/ha | Syngenta |
| Signum WG | boscalid + pyraclostrobin | 0.75-1kg/ha | BASF |
| Switch 62,5WG | fludioxonil + cyprodinil | 0.8kg/ha | Syngenta |
| Systhane duplo | myclobutanil | 0.13l/ha | Dow AgroSciences |
| Teldor 500SC | fenhexamid | 1l/ha | Bayer |
| Tiuram granuflow | TMTD | 2-3kg/ha | Taminco |
| Topas 100 EC | penconazole | 0.3-0.5kg/ha | Syngenta |
| Topsin-M 70WP | thiophanate-methyl | 0.65-1kg/ha | Nippon Soda |
| Vegesol-eReS | copper hydroxide + sulphur + sunflower oil | 5l/ha | BVN Növényvédő Kft. |
| Vegesol R | copper hydroxide + sunflower oil | 2-3l/ha | BÉVÉEM Kft. |
| Vitra rézhidroxid | copper hydroxide | 2-3kg/ha | Industrias Quimicas |
| Zato 50WG | trifloxystrobin | 0.1-0.15kg/ha | Bayer |

Source: Ocskó *et al.* (2012)

*Table 3*

**List of technologies applied in field tests**

| TECHNOLOGY | FUNGICIDES | DATE OF TREATMENT | LOCALE OF TREATMENT |
|---|---|---|---|
| plant protection technology of Bayer | Antracol 70WG + Silwet Star | 2012.05.10. | Sóskút ’Újfehértói fürtös’ 3,5x5 m spacing |
| | Folicur Solo + Silwet Star | 2012.05.23. | |
| | Flint max + Silwet Star | 2012.06.07. | |
| standard plant protection technology of the orchard | Manzate75DF + Silwet Star | 2012.05.10. | Sóskút ’Újfehértói fürtös’ 7x5 m spacing |
| | Manzate75DF + Silwet Star | 2012.05.23. | |
| | Topas 100EC+ Silwet Star | 2012.06.07. | |
| plant protection technology of Bayer | Antracol 70WG + Spur | 2012.05.21. | Kiskunmajsa ’Kántorjánosi’ |
| | Folicur Solo + Spur | 2012.06.04. | |
| | Flint max + Spur | 2012.06.17. | |
| standard plant protection technology of the orchard | Topsin M WG + Tiuram Granuflow + Spur | 2012.05.21. | Kiskunmajsa ’Kántorjánosi’ |
| | Folicur Solo + Tiuram Granuflow + Spur | 2012.06.04. | |
| | Switch 62,5 WG | 2012.06.17. | |

**Field trials**

During the 2012 growing season, field trials were performed at Sóskút and Kiskunmajsa (Hungary), respectively. The tests were carried out in sour cherry orchards, using the varieties 'Újfehértói fürtös' and 'Kántorjánosi'. In the experimental year, three treatments were designed against anthracnose, after the treatments against blossom and twig blight caused by brown rot fungi (*Table 3*). Evaluation was carried out by examination of 4 x 100 fruits directly before harvest. Percentage of infected fruits (frequency of infection) was determined.

## *RESULTS AND DISCUSSION*

**Identification of the isolates and pathogenicity tests**

All the four isolates proved to be *Colletotrichum acutatum* based on conidial and colony morphology and sequence analysis of the ITS region. Ten days after inoculation, all of the isolates caused typical symptoms of anthracnose on the fruits, while control fruits remained healthy till the day of evaluation.

***In vitro* fungicide assay on mycelial growth**

Significant difference was not detected among the isolates of different origin considering efficacy of fungicides. Among the tested agents mancozeb, difenoconazole, penconazole, tebuconazole, trifloxystrobin + tebuconazole, boscalid + pyraclostrobin and prochloraz were the most effective, showing complete or strong inhibition, at practical dose and at lower dosage as well (*Figure 1*). **Paredes and Munoz (2002)** found the azole fungicides the most effective in reducing *in vitro* growth of *C. acutatum.* Some copper compounds (Cuproxat FW, Bordóilé FW, Pluto 50WP) caused total inhibition in case of field dose, but this inhibition lasted only for 6-8 days, than mycelia started to grow on poisoned agar plates.

***In vitro* fungicide assay on conidial germination**

Propineb, chlorothalonil, captan, copper + mancozeb, dithianon, mancozeb, tebuconazole + trifloxystrobin, prochloraz, tebuconazole difenoconazole, penconazole, fludioxonil + cyprodinil and TMTD were the most effective against conidial germination in both dilutions (*Figure 2*). In practical dose even tribasic copper sulphate, dodine, copper(I)-oxide, myclobutanil, thiophanate-methyl and copper hydroxide + sulphur + sunflower oil caused complete inhibition (*Figure 2*).

**Efficacy of different plant protection technologies in the field**

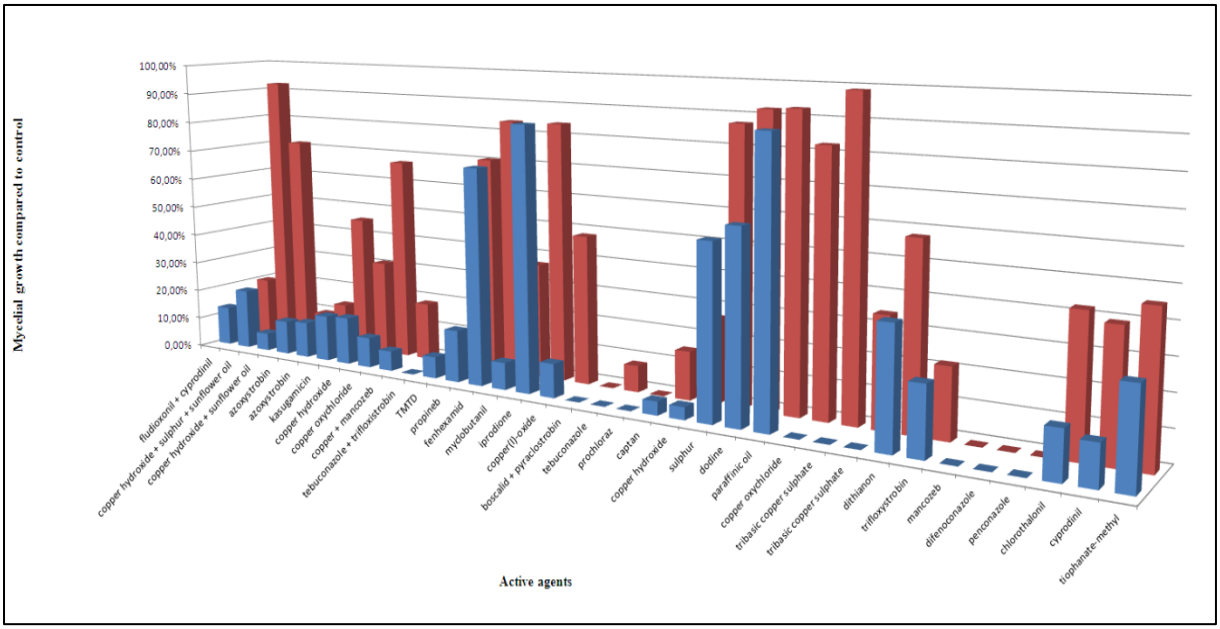
Frequency of infection remained below 0.005% in case of all the technologies, due to chemical plant protection and low precipitation during fruit development (*Table 4*). For more accurate results of the efficacy of fungicides and for the optimization of plant protection technology, further field trials are needed in the following years.

*Table 4*

**Frequency of infection in case of applied technologies**

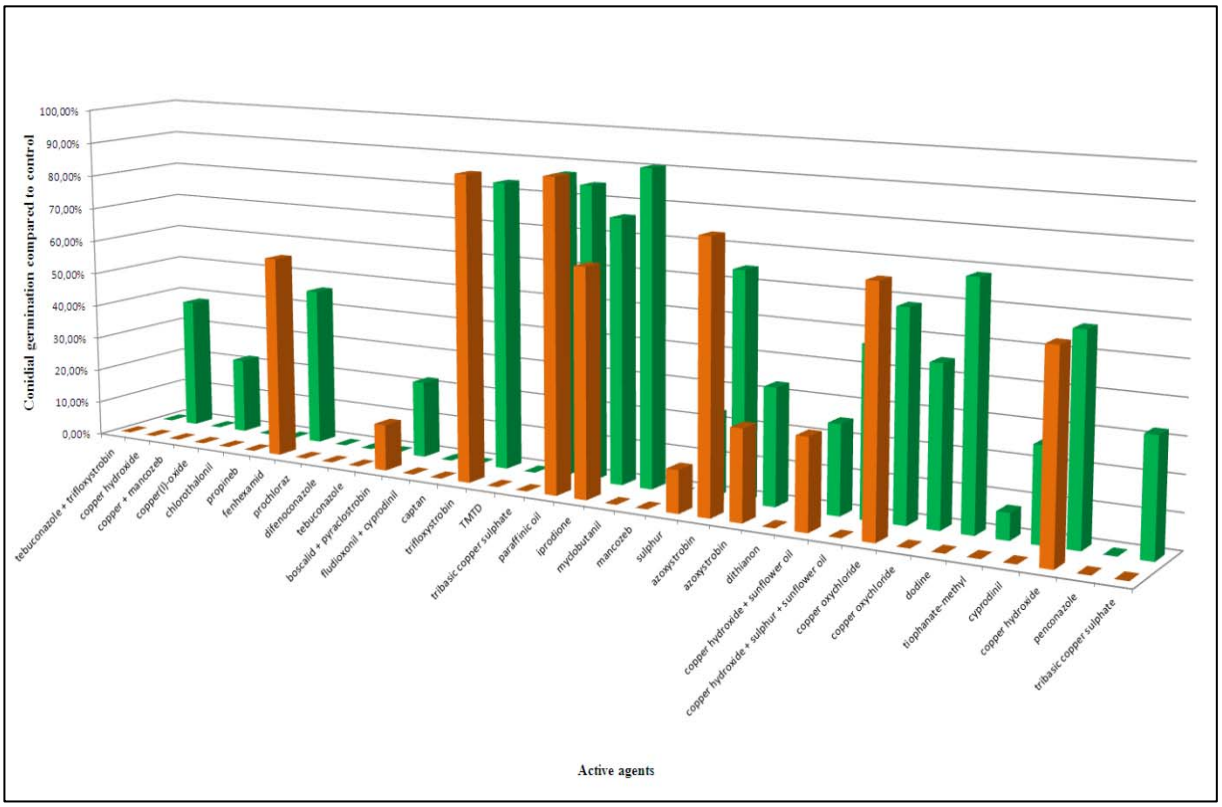
| ORCHARD / TECHNOLOGY | Sóskút | Kiskunmajsa |
|---|---|---|
| plant protection technology of Bayer | 0.010% | 0.047% |
| standard plant protection technology of the orchard | 0.045% | 0.0475% |

*Figure 1:* **Efficacy of fungicides on mycelial growth of *Colletotrichum acutatum***




Blue columns sign practical dose, red columns sign 10X dilution of active agents

*Figure 2:* **Efficacy of fungicides on conidial germination of *Colletotrichum acutatum***




Orange columns sign practical dose, green columns sign 10X dilution of active agents

***ACKNOWLEDGEMENTS***

The project was funded by OTKA-PD100425, TÁMOP- 4.2.1./B-09/1-KMR-2010-0005 and TÁMOP-4.2.2./B-10/1-2010-0023 grants.

***REFERENCES***

Anonymus (2011) General pest management consideration-Apples, New England tree management guide, University of Connecticut, 48.

Anonymus (2012): Flint max forgalomba hozatali és felhasználási engedélyokirat, Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal, Budapest, 1-6.

Børve J.-Stensvand A. (2006a). Timing of fungicide applications against anthracnose in sweet and sour cherry production in Norway. Crop Protection 25: 781–787.

Børve J.-Stensvand A. (2006b). *Colletotrichum acutatum* overwinters on sweet cherry buds. Plant Disease 90: 1452–1456.

Crusius L.U.-Forcelini C.A.-Sanhueza R.M.V.-Fernandes J.M.C. (2002): Epidemiology of apple leaf spot. Fitopatologia brasileira 27: 65–70.

Freeman, S.-Nizani, Y.-Dotan, S.-Even, S.-Sando, T. (1997): Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse and field conditions. Plant Disease 81, 749–752.

Glits M. (2000): Meggy. 201-210 In: Glits M. és Folk Gy. (szerk.): Kertészeti Növénykórtan. Budapest: Mezőgazda Kiadó.

Holb I.-Veisz J. (2005): Important diseases of sour and sweet cherries. In: Holb I. (Editor) Organic Plant Protection of Fruits and Grape. Mezőgazda Press, Budapest 162–165 (in Hungarian)

Kajati I.-Sallai P.-Véghelyi K. (2002): Diseases of sour cherry. In: F. Inántsy (Editor) Sour Cherry Production with Integrated Methods. Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Kht., Újfehértó 52–63. (in Hungarian).

Kloutvorová, J.-Lánska M.-Egert, P. (2004): New possibilities for protecting stone fruit with the fungicide Horizon 250 EW. Bayer Crop Science, Online Courier, http://www.agrocourier.com/bcsweb/cscms_de.nsf/id/_Hor_Agro/$file/horizon_czech_stone_fruit.pdf

Leandro L.F.S.-Gleason M.L.-Nutter F.W.-Wegulo S.N. -Dixon P.M. (2001): Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. Phytopathology 91: 659–664.

Lehoczky J. (1957): A meggy glöosporiózisának hazai előfordulása. A Kertészeti és Szőlészeti Főiskola Évkönyve. Vol. XIX. Fasc. 2., 1–15. Mezőgazdasági Kiadó.

Mertely J.C.-Legard D.E. (2004): Detection, isolation, and pathogenicity of *Colletotrichum spp*. from strawberry petioles. Plant Disease 88: 407–412.

Ocskó Z.-Erdős Gy.-Molnár J.-Eke I. (2012): Növényvédő szerek, termésnövelő anyagok, Budapest, Agrinex Bt.

Paredes B.S.G.-Muñoz F. R. (2002): Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plants Crop Protection 21 11–15

Simmonds J.H. (1965): A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. Queensland Journal of Agricultural Science 22: 437–459.

Stensvand A.-Børve J.-Talgø V. (2003): Production of conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* from some plant parts in sour cherry. (Abstract) 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand, 2–6 February.

Sutton B.C. (1992): The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: J.A. Bailey and M.J. Jeger (Editors) *Colletotrichum*, Biology, Pathology and Control, CAB International, Wallingford, UK 1–26.

Tóth A.-Salamon P.-Petróczy M.-Hegedűs M.-Ádám A.-Nagygyörgy E.-Palkovics L. (2012): *Colletotrichum acutatum* izolátumok morfológiai és molekuláris jellemzése. 58. Növényvédelmi Tudományos Napok. Budapest, február 21-22.

Walker J.-Nikandrow A.-Millar G.D. (1991): Species of *Colletotrichum* on *Xanthium* (*Asteraceae*) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in *Colletotrichum*. Mycological Research 95: 1175–1193.

White T.J.-Bruns T. -Lee S.-Taylor J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A.-Gelfand D.H.-Sninsky J.J.-White T.J. editors. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, CA: Academic Press ; 315–322.

Yoshida S.-Shirata A. (1999): The mulberry anthracnose fungus, *Colletotrichum acutatum*, overwinters on a mulberry tree. Annals of the Phytopathological Society of Japan 65: 274–280.

Zulfiqar M.-Brlansky R. H.-Timmer L. W. (1996): Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. Mycologia 88: 121-128.

# Optimizing conditions for sporulation of European mistletoe hyperparasitic fungus (*Phaeobotryosphaeria visci*): effect of light and different media

**Ildikó Varga [1,2], – Tivadar Baltazár [3] – Melinda Apró [1] – Peter Poczai [2] – Jaakko Hyvönen [2]**

[1]Institute of Plant Protection, Georgikon Faculty, University of Pannonia. H-8360 Keszthely, Deák str. 57, Hungary.

[2] Department of Biosciences (Plant Biology), University of Helsinki. PO Pox 65, FIN-00014, Helsinki, Finland.

[3] Department of Planting Design and Maintenance, Faculty of Horticulture in Lednice, Mendel University in Brno. Valtická 337, 691 44 Lednice na Moravě, Czech Republic.

ildikovarga@hotmail.hu

***SUMMARY***

*European mistletoe (*Viscum album*), the hemiparasitic shrub, infects a wide range of woody species. It adversely affects the height and diameter growth and it is associated with increased mortality of its hosts. Currently there are no effective control methods against it. Therefor, we started to study a specific hyperparasitic fungus (*Phaeobotryosphaeria visci*), which can completely destroy European mistletoe by infecting its branches, leaves and berries. An important aspect of the initial phase of mycopesticide candidate is culturing of the organism on artificial or non-synthetic media, followed by the optimization of spore production. We focused to determinate the growth media and light conditions needed for sporulation of* P. visci*. We also tested the viability and pathogenecy of the spores, because these are important features for further processing and applications. The cultures were grown on seven different media (potato dextrose agar, sugar free potato dextrose agar, cellophane covered potato dextrose agar, oatmeal agar, V8 Juice agar, S medium and SNA medium) under constant dark, constant light (400-750 nm) and 12 h of alternating dark and light illumination. The best primary agar media were oatmeal and sugar free potato dextrose agar under permanent illumination, while constant dark inhibited the conidial production. The viability and virulence of harvested conidia were normal, and the symptoms of the disease appeared 7-14 days after the inoculation on mistletoe leaves. We will continue our experiments studying the effect of near UV (280–400 nm) light. Use of variable photoperiods supplemented with near UV and different media could help us to optimize the spore production and create a fast and cheap mass production technique.*

**Keywords:** photoperiod, oatmeal agar, biological control, bioherbicide, mass production

## *INTRODUCTION*

European or White berry mistletoe (*Viscum album* L.) of Santalaceae is an evergreen, perennial, epiphytic, hemiparasitic shrub (Zuber 2004), which is able to infect more than 450 woody species (Barney *et al.,* 1998). This hemiparasite is widely distributed in Europe and it was introduced to North America and Canada at the beginning of the 20th century (Hawksworth *et al.,* 1991). In addition to the detrimental effects caused by the global warming, air pollution and other abiotic stress factors mistletoe causes increasing damages in many forests and orchards. It adversely affects the quality and quantity of the wood, reduces fruiting, and predisposes their hosts to be attacked by other agents, such as insects or different fungi (Hawksworth 1983). Successful control methods of mistletoe could be the pruning of infected branches, but this technique causes disband of canopy and huge stress to the host.

We started to look for an effective control method by studying *Phaeobotryosphaeria visci* (Kalchbr.) A.J.L. Phillips & Crous [Syn.: *Botryosphaeria visci* (Kalchbr.) Arx & E. Müll.; anamorph: *Sphaeropsis visci* (Fr.) Sacc.]. Many species of Botriosphaeriaceae are common plant pathogens and saprobes found on variety of mainly woody hosts. The species *Phaeobotrioshaeria* form brown aseptate ascospores with small apiculus at either end. The anamorph pycnidia are more common with oval and aseptate conidia, which are greenish, while the older cells are brown (Phillips *et al.,* 2008). This plant pathogen causes leaf spot disease of the European mistletoe and it seems to have potential as a tool of biological control against European mistletoe (Varga *et al.,* Karadžić 2004, Fischl 1996). Three to six weeks after the inoculation the fungal infection spreads to all over the whole leaves, branches and berries; a few months later the whole shrub becomes dark yellow and necrotic (Stojanovic 1989).

The idea of biological control against mistletoe was conceived in the early 1970s but the detailed research began only in 2008 at the University of Pannonia. Laboratory studies with *Phaeobotrioshaeria visci* suggest that it is a promising biological control candidate. An important aspect of the initial phase of studies of this mycopesticide is culturing of the organism on artificial or non-synthetic media, followed by optimization of spore production. Mass production on agar can provide sufficient inoculum for laboratory and field tests, but more importantly, these studies provide valuable knowledge for subsequent optimization of mass production (Masangkay *et al*., 2000).

The most often and commonly used techniques for spore induction is the application of different light and photoperiods (Leach 1962, 1971) as well special media (Booth 1971). Kim *et al.* (2005) reached successful pycnidial and conidial production for a *Sphaeropsis* species using oatmeal agar, fluorescent lamp (near UV) and different photoperiods (12h light/12 h dark), while Palmer *et al.* (1987) applied effectively continuous visible light on *Sphaeropsis sapinea* growing on potato dextrose agar.

The specific culturing conditions needed for conidial production for *Phaeobotrioshaeria visci* are currently unknown. Rapid and intense mycelial growth was achieved on potato dextrose agar (PDA), oatmeal agar (OA), ¼ PDA+V8 Juice agar but no spore formation was detected on these media under dark condition (Varga *et al*., 2012b). First, we tested the application of different media and photoperiods, which were used earlier efficiently on other species of the genus *Sphaerosis*. After the spore induction experiments we tested the viability and pathogenecy of the spores as these are important features for further processing and applications.

## *MATERIALS AND METHODS*

### Fungal isolates and culture maintenance

Diseased European mistletoe leaves were collected in Ajka, Hungary in August 2010 from silver maple (*Acer saccharinum* L.). Monospore culture was prepared as detailed in Varga et al (2012a). The analysed strain was maintained on potato dextrose agar (4 g potato extract, 20 g glucose, 15 g agar) at 20°C and was replaced once a month. Plates were inoculated with a 5 mm diameter core of mycelium and agar excised from the growing edge of 7-day-old monoconidial stock culture.

### Effect of agar media and light conditions on conidial production

The spore inducing effects of media were tested on seven different types of agar. These media were:

(1) Potato dextrose agar (20 g glucose, 4 g potato extract, 20 g agar $L^{-1}$);

(3) Cellophane covered potato dextrose agar (20 g glucose, 4 g potato extract, 20 g agar $L^{-1}$ covered with a semi-permeable plastic membrane);

(2) Sugar free potato dextrose agar (4 g potato extract, 20 g agar $L^{-1}$);

(4) Oatmeal agar (100 g steamed oatmeal, 20 g agar $L^{-1}$);

(5) ¼ PDA+V8 Juice agar (1 g potato extract, 5 g glucose, 150 ml V8 vegetable juice (Campbell South Co.), 3 g $CaCO_3$, 20 g agar $L^{-1}$);

(6) S medium (20 g sucrose, 30 g $CaCO_3$, 20 g agar $L^{-1}$) and

(7) SNA medium ($KH_2PO_4$ 1g, $KNO_3$ 1g, $MgSO_4$ x 7 $H_2O$ 0.26 g, KCl 0.5 g, glucose 0.2 g, sucrose 0.5 g, agar 20 g $L^{-1}$).

Plastic Petri-dishes (90 mm diameter) contained 20 ml from these media in six repeat per photoperiod treatment. Potato dextrose agar (PDA), sugar free potato dextrose agar (SF PDA), cellophane covered potato dextrose agar (CC PDA), oatmeal agar (OA) and ¼ PDA+V8 Juice agar (V8) plates were inoculated directly with a 5 mm diameter core of mycelium and agar excised from the growing edge of 7-day-old monoconidial stock culture. Dishes were sealed with parafilm and incubated in dark thermostat on 25°C for 7 days. S and SNA medium were inoculated with 7-days-old agar free mycelia discs which were initially grown on cellophane covered PDA in dark thermostat on 25°C prior the inoculation. The seven days old isolates were placed in a thermostat (Binder ATM line$^{TM}$ KBV) under constant dark or under constant light and under 12 h dark/12 h light photoperiod for 14 days at 20°C. A standard 865 daylight coloured (400-750 nm, 6400 K) light tube was used for the illumination.

Pycnidia were harvested 21 days after the inoculation with 5 ml of sterile deionized water and the surface of the colonies were scraped with a sterile rubber spatula. Conidia were extracted with braying of pycnidia and counted with the aid of haematocytometer under a light microscope (× 100). Sporulation was expressed in two ways: the number of conidia per $cm^2$ of colony and the number of conidia per colony. The morphology of cultures and the zonation of sporulation were evaluated visually.

All plates were evaluated and averaged. One treatment contained six Petri-dishes where the number of conidia was counted on four plates while remaining plates were evaluated visually (pycnidia and conidia germination).

### Pathogenicity test

The harvested conidia were used for a pathogenicity tests. Healthy mistletoe leaves were inoculated with 2 × 50 µl of spore suspension ($2.5 \times 10^4$ db $ml^{-1}$) 4x. Pathogenicity test was made following Varga *et al.* (2012b). The results were evaluated visually.

### Data analysis

The data processing was carried out in Microsoft Office Excel 2010 and all statistical analyses were performed using the statistical program R, version 2.15.1. (R Development Core Team 2012), for editing R scripts the Tinn-R code editor was used (Faria 2011) while graph plotting was carried out with the package "sciplot" (Morales 2011).

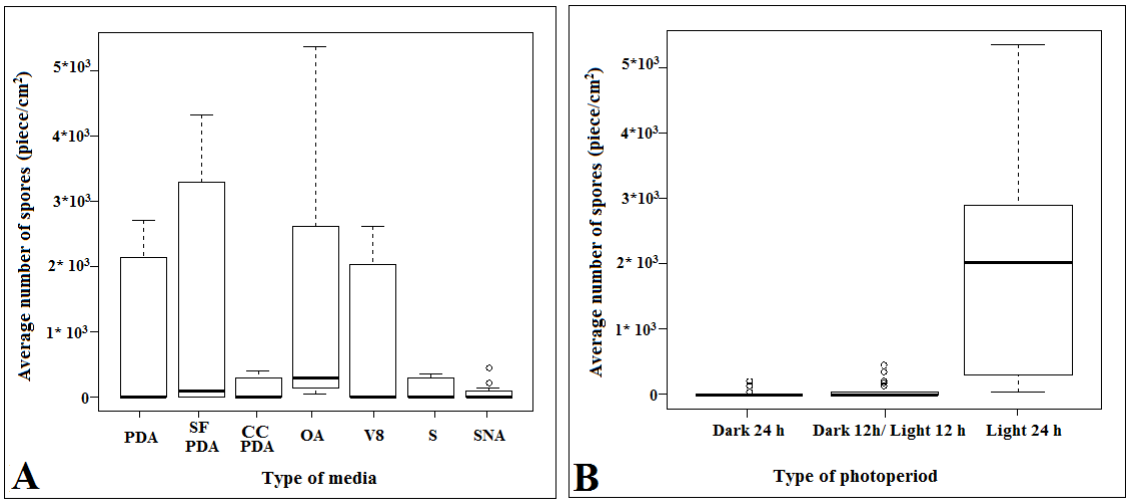
For characterization of relationships a two-way analysis of variance (ANOVA) type I (sequential) sum of squares was used. In this case the first factor was the "light condition" and the second factor was the "type of media". To determine the difference between factor levels a Dunnett-Tukey-Kramer pairwise multiple comparison test was performed. To estimate the factor level treatment contrast was used. After the analysis all accepted statistical models were checked pre-eminently with help of diagnostics plots.

## *RESULTS*

### Effect of different media

The Dunnett-Tukey-Kramer pairwise multiple comparison tests confirmed that the spore production was significantly higher on oatmeal agar (OA) and sugar free potato dextrose agar (SF PDA); there was no statistical difference among these media ($p<0.001$). The number of spore formed on cellophane covered potato dextrose agar (CC PDA) was extremely low, as well on S and SNA media. Sporulation on potato dextrose agar (PDA) and ¼ PDA+V8 Juice agar (V8) was lower than on sugar free potato dextrose agar (SF PDA), but this difference is statistically significant only at 0.05 significance level (*Figure 1 [A]*).

*Figure 1:* **Effects of different media (A) and photoperiods (B) on spore production of *Phaeobotrioshaeria visci***




PDA= potato dextrose agar, SF PDA= sugar free potato dextrose agar, CC PDA= cellophane covered potato dextrose agar, OA= oatmeal agar, V8= ¼ PDA+V8 Juice agar, S= S medium, SNA= SNA medium

### Effect of different photoperiod

The two-way ANOVA showed significant difference between the number of spores and light conditions ($F_{2,63} = 260.63$; $p<0.001$), but there was no statistical difference ($p<0.001$) in spore production between continuous dark (24 h) and alternating light/dark (12h–12 h) treatments. Spore production was very low, or there was absolutely no sporulation on most of the plates under these photoperiods. While these treatments did not induce higher spore number, the continuous illumination stimulated significantly higher ($p<0.001$) spore production. There was different extent of sporulation on all media influenced by continuous light (*Figure 1 [B]*).

### Interactions among media and photoperiods

The quantity of formed spores can be seen on *Table 1* and *Figure 2*.

*Table 1*

**Influence of agar medium and light conditions on conidial production of *Phaeobotrioshaeria visci* after incubation for 21 days**

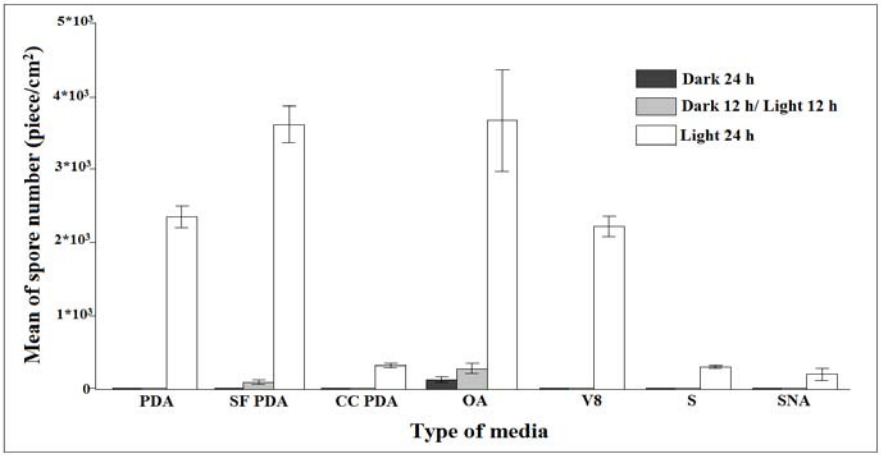
| Medium | Number of conidia (piece/plate and piece/cm²) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Light conditions | | | | | |
| | Dark 24h | | Dark12h/ light12h | | Light 24h | |
| PDA | 0 | 0 | 0 | 0 | $14.9 \times 10^4$ | 2347.5 |
| SF PDA | 0 | 0 | $0.62 \times 10^4$ | 97.7 | $22.9 \times 10^4$ | 3604.00 |
| CC PDA | 0 | 0 | 0 | 0 | $2.1 \times 10^4$ | 327.25 |
| OA | $0.8 \times 10^4$ | 130.7 | $1.8 \times 10^4$ | 283.5 | $23.2 \times 10^4$ | 3659.25 |
| V8 | 0 | 0 | 0 | 0 | $14.1 \times 10^4$ | 2216.75 |
| S | 0 | 0 | 0 | 0 | $1.9 \times 10^4$ | 305.25 |
| SNA | 0 | 0 | 0 | 0 | $1.3 \times 10^4$ | 207.00 |

PDA= potato dextrose agar, SF PDA= sugar free potato dextrose agar, CC PDA= cellophane covered potato dextrose agar, OA= oatmeal agar, V8= ¼ PDA+V8 Juice agar, S= S medium, SNA= SNA medium

The significantly highest ($p<0.001$) conidial density after 21 days of incubation was formed on oatmeal agar (OA) and sugar free potato dextrose agar (SF PDA), when colonies were exposed to constant illumination

resulting in number of spores 22–23 × $10^4$ piece/plate. Spores formed only on oatmeal agar in all illumination conditions, while they appeared on sugar free potato dextrose agar after alternating illumination and continuous light too. Conidial production was low due to these combinations (0.6–1.8 × $10^4$ piece/plate); the number of conidia was almost 30 times higher on oatmeal agar after permanent illumination, than after imperfective dark.

*Figure 2:* **Average value of spore number with SEM (standard error of mean)**




PDA= potato dextrose agar, SF PDA= sugar free potato dextrose agar, CC PDA= cellophane covered potato dextrose agar, OA= oatmeal agar, V8= ¼ PDA+V8 Juice agar, S= S medium, SNA= SNA medium

In case of the interaction of constant light and media there was no statistically significant difference between the number of spores on potato dextrose agar (PDA) and ¼ PDA+V8 Juice agar (V8). Although the quantity of spores formed was significantly lower ($p<0.001$) than formed on oatmeal agar (OA), the amount of spores was relatively high (14–14 × $10^4$ piece/plate).

The other combinations resulted in low spore production without significant difference ($p<0.001$), the average value of spores was 1–2 × $10^4$ piece/plate. The lowest level of sporulation were noticed on S and SNA media in continuous light. Moreover, there was no sporulation on these media in permanent dark.

**Morphological differences and pathogenicity tests**

Morphological and sporulation differences of 21-days-old *Phaeobotrioshaeria visci* cultures affected by different photoperiods and media can be seen on *Fig. 3* and *Fig. 4.*

*Figure 3:* **Impact of the interaction among photoperiods and different media (PDA= potato dextrose agar, SF PDA= sugar free potato dextrose agar, OA= oatmeal agar, V8= ¼ PDA+V8 Juice agar) to sporulation of *Phaeobotrioshaeria visci***

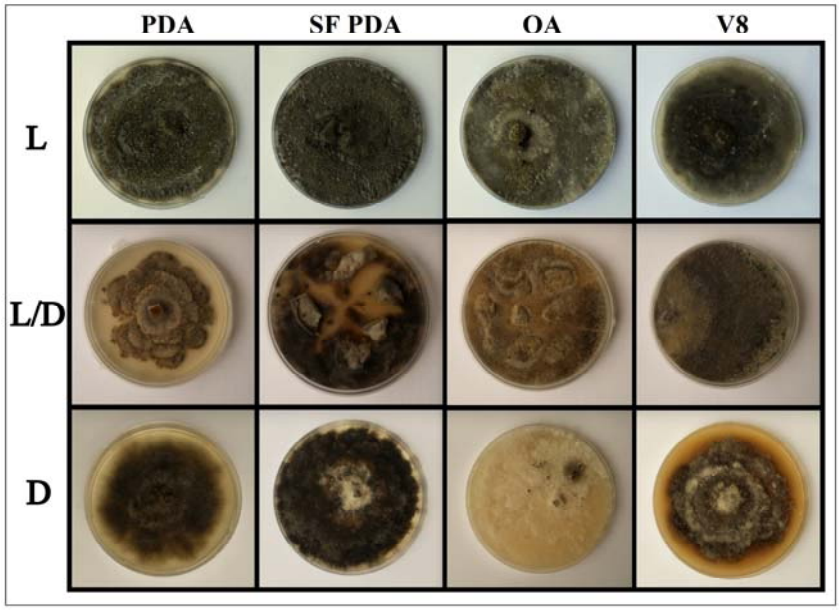
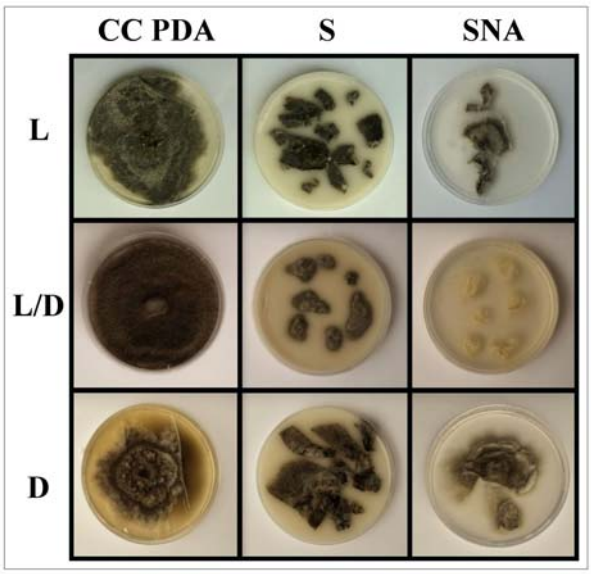


*Figure 4:* **Impact of the interaction among photoperiods and different media (CC PDA= cellophane covered potato dextrose agar, S= S medium, SNA= SNA medium) to sporulation of *Phaeobotrioshaeria visci***




Each media influenced the macromorphology of the cultures. The zonation, or the rosette-like appearance was not so typical in old cultures than in younger (7–14-days-old) ones, but this was observed only with some media (cellophane covered potato dextrose agar, ¼ PDA+V8 Juice agar). The filamentous habit was typical on oatmeal agar, where the colour of mycelia remains white for a longer period and becomes darker later, than on other media. Contrary to this the mycelia become dirty gray or black after 2-4 days of inoculation on S medium, and the cultures cease to grow any further. The situation is similar on SNA medium, but the mycelia remain always lighter than on S media.

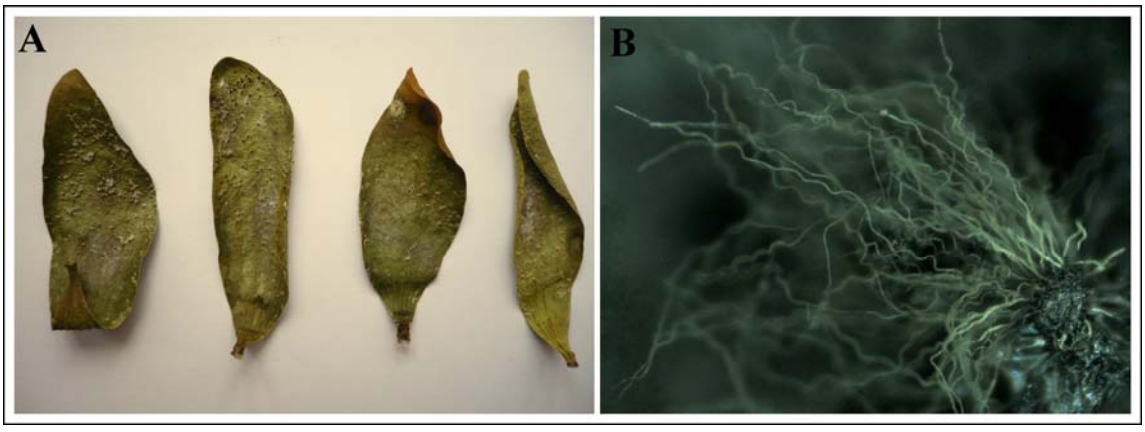
Regarding the illumination, the zonation of mycelial growth was not as pronounced, as in cultures of some other fungal species affected by the alternation of light and dark. Mycelia were mostly lighter under permanent dark and alternating illumination. The colonies always become dark and the pigmentation increased under continuous light.

The zonation of sporulation was not noticed under any photoperiod. The first pycnidia appeared beside the inoculation point, then they covered sporadically the surface of plates. Sporulation was observed in all cases on older plates, while none of the media induced earlier sporulation.

The pathogenicity test of harvested conidia was successful (*Figure 5 [A]*). One week after the inoculation the infected leaves became chlorotic and pycnidia formed after 10–14 days. Conidiogenesis started few days after the appearance of newly formed pycnidia.

The visual examination of pycnidia was carried out on 28 days old cultures on all media. The conidia started to germinate on all media by this time. The hymenium of the mature pycnidia was breached by germinating conidia, while the surface of the pycnidia was covered with fresh hyphae. Germination of harvested conidia began right after harvesting, when spores came to water and spore suspension for pathogenicity test was made. The proportion of the germinating spores was approximately 10% in the one day old spore suspension, which rose very fast.

*Figure 5:* **Viability and pathogenicity tests of formed spore: symptoms of *Phaeobotrioshaeria visci* on mistletoe 2 weeks after inoculation (A) and visually evaluation of conidia germination (× 45) of 28-days-old pure cultures (B)**



## *DISCUSSION*

Only few previous studies have addressed the sporulation and mycelial growth of *Phaeobotrioshaeria visci* under *in vitro* laboratory conditions. Stojanovic (1989) observed sporulation on potato dextrose agar under permanent dark that we did not notice under similar conditions. Furthermore, he observed sporulation on prune extract agar (prune 30 g, sucrose 20 g, 15 g agar $L^{-1}$), that was also missing in our experiments.

The most appropriate medium and light condition for spore production of *Phaeobotrioshaeria visci* were oatmeal agar and sugar free potato dextrose agar under constant illumination with daylight tube at 20°C for 14 days. The maximal number of conidia (22–23 × $10^4$ piece/plate) was produced in these conditions. Sporulation was inhibited by constant dark, but minimal spore production was observed on oatmeal agar (0.8 × $10^4$ piece/plate). The alternating dark and light illumination did not result in considerable rise of spore number; however, the sporulation was also low on sugar free potato dextrose agar (1.8 × $10^4$ piece/plate) in similar conditions. For species of *Sphaeropsis* the use of oatmeal agar gave the fastest mycelial growth and the highest number of conidia under 12 dark/12 h light conditions, while no sporulation was observed under permanent dark (Kim *et al.*, 2005, Xiao 2006). Based on these and our results oatmeal agar seems the most suitable to induce sporulation.

On the glucose free potato dextrose agar the high number of conidia was most probably due to low sugar concentration of the medium. In certain fungal species sporulations is stimulated *in vitro* by the depletion of the medium with nutrients. Such an association is well known in fungi that sporulate poorly on sugar-rich media. Sporulation of some facultative parasites on necrotic tissue is apparently associated with low sugar content in these tissues (Rotem *et al.,* 1978, Hawker 1966). Presumably the process of sporulation takes place in the same way in *Phaeobotrioshaeria visci,* thus sugar free potato dextrose agar can also be used efficiently. With cellophane covered potato dextrose agar we wanted to model circumstances analogues to sugar free conditions. Previously this method was successfully used with a species of *Microdochium* by Browne and Cook (2004). In our case the quantity of formed spores was only 2 × $10^4$ piece/plate, much lower than in *Microdochium*, indicating the inappropriateness of this method for *P. visci.*

The other media did not proved to be as efficient as expected. The V8 Vegetable Juice is one of the most common media used effectively for spore induction in species of *Drechslera* (Raymond and Bockus 1982, Babadoost and Johnston 1998). This media (and constant light), similarly as with potato dextrose agar, induced only moderately high spore number (14 × $10^4$ piece/plate), and this was equivalent with the number of spores produced in species of *Dreshlera* on this media. Furthermore S media, which is widely used for sporulation of species of *Alternaria* (Shahin and Shepard 1978, Masangkay *et al.,* 2000) also proved to be inproper to induce sporulation in *Phaeobotrioshaeria visci.* Compared to *Alternaria* – which formed large number of conidia on S medium – *P. visci* produced only 1.9 × $10^4$ spores on a Petri–dish. Similarly with this medium, the quantity of conidia was also low on SNA medium. The use of these media which are suitable to induce sporulation in species of *Fusarium* (Paparu *et al.*, 2006) are not recommended for *P. vsci*.

Exposure to permanent dark inhibited conidial production, while 12 h of alternating light and dark did not result in significantly higher spore number. The positive effect of constant illumination was noticed on all agar media as this treatment enhanced dramatically the conidia production. Besides using daylight tubes, one of the most popular and successful methods is the use of near UV tubes (Rotem *et al.,* 1978, Booth 1971). Using different photoperiods of daylight, dark and near UV (280–400 nm) could be more effective, than using continuous light. Therefore, in order to optimize the spore production and to create a fast and cheap mass production system, we will continue experiments with different combinations of photoperiods and agar media.

## *ACKNOWLEDGEMENT*

This study was supported by the CIMO Fellowship Grant, Finland.

### *REFERENCES*

Babadoost, M. and Johnston, M. R. (1998): Sporulation of *Drechslera graminea* on barley straw extract agar. Mycologia, 90 (1): 63–68.

Booth, C. (1971): Fungal culture media. : Booth, C. (ed). Methods of Microbiology. London, Academic Press, 49–94.

Faria, J.C. (2011): Resources of Tinn-R GUI/Editor for R Environment.UESC, Ilheus, Brasil.

Fischl, G. (1996): A fagyöngy (*Viscum album* L.) levélfoltossága. Növényvédelem, 32 (4): 181–183.

Hawker, L. E. (1966): Environmental influences on reproduction. In: Ainsworth, G. C. and Sussman A. S. (eds.) The Fungi. Academic Press, New York. 2: 435–469.

Hawksworth, F. G. (1983): Mistletoes as forest parasites. In: Calder, M. and Bernhardt, P. (eds.) The biology of mistletoes. Academic Press, Sydney. 317–333.

Hawksworth, F. G., Scharpf, R. F. and Marosy, M. (1991): European mistletoe continues to spread in Sonoma County. Calif. Agric., 45: 39–40.

Karadžić, D., Lazarev, V. and Milenković, M. (2004) The most significant parasitic and saprophytic fungi on common mistletoe (*Viscum album* L.) and their potential application in biocontrol. Bulletin Faculty of Forestry, Univ. of Bajna Luka, Serbia, 89: 115–126.

Kim, Y. K., Xiao, C. L. and Rogers, J. D. (2005): Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Sphaeropsis pyriputrescens*. Mycologia, 97 (1): 25–32.

Leach, C.M. (1962): Sporulation of diverse species of fungi under near ultraviolet radiation. Can. J. Bot., 40: 151–161.

Leach, C.M. (1971): A practical guide to the effects of visible and ultraviolet light on fungi. In: Booth, C. (ed). Methods of Microbiology. Academic Press, London. 609–644.

Masangkay, R. F., Paulitz, T. C., Hallett, S. G. and Watson, A. K. (2000): Characterization of Sporulation of *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae*. Biocontrol. Sci. Techn., 10 (4): 385–397.

Morales, M. (2011): Sciplot: scientific graphing functions for factorial designs. R package version 1.0–9.

Palmer, M. A., Stewart, E. L. and Wingfield, M. J. (1987): Variation among isolates of *Sphaeropsis sapinea* in the north central United States. Phytopath., 77: 944–948.

Paparu, P., Dubois, T., Gold, C. S., Niere, B., Adipala, E. and Coyne, D. (2006): Colonisation pattern of nonpathogenic *Fusarium oxysporum,* a potential biological control agent, in roots and rhizomes of tissue cultured *Musa* plantlets. Ann. Appl. Biol., 149: 1–8.

Phillips, A. J. L., Alves, A. , Pennycook, S .R., Johnston, P. R., Ramaley, A., Akulov, A. and Crous, P. W. (2008): Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. Persoonia, 21: 29–55.

R Development Core Team (2012): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, http://www.R-project.org/.

Raymond, P. J. and Bockus, W. W. (1985): An *in vitro* technique for profuse sporulation of *Drechslera tritici-repentis*. Phytopath., 72: 934.

Rotem, J., Cohen, Y., and Bashi, E. (1978): Host and environmental influences on sporulation in vivo. Annu. Rev. Phytopathol., 16: 83–101.

Shanin, E. A. and Shepard, J. F. (1978): An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. Phytopath., 69: 618–620.

Stojanovic, S. (1989): The investigation of *Sphaeropsis visci* (Salm.) Sacc. and *Colletotrichum gloeosporoides* (Sacc.) Penz., parasite on European mistletoe (*Viscum album* ssp. *typicum* Beck). Zastita Bilja, 40: 493–503.

Varga, I., Taller, J., Baltazár, T., Hyvönen, J. and Poczai, P. (2012a): Leaf-spot disease on European mistletoe (*Viscum album*) caused by *Phaeobotryosphaeria visci*: potential candidate for biological control. Biotechnol. Lett., 34 (6): 1059–1065.

Varga, I., Baltazár, T. and Pejchal, M. (2012b): Optimisation of crowing conditions of European mistletoe hyperparasitic fungus (*Phaeobotryosphaeria visci*): Effect of different media and antibiotics. VII. Medzinárodná Vedecká Konferencia, *in press*.

Xiao, C. L. (2006): Postharvest Fruit Rots in d'Anjou Pears caused by *Botrytis cinerea*, *Potebniamyces pyri*, and *Sphaeropsis pyriputrescens*. Plant Health Progress (online), doi:10.1094/PHP-2006-0905-01-DG.

Zuber, D. (2004): Biological flora of Central Europe: *Viscum album* L., Flora, 199 (3): 181–203.

# Bacteriophages sensitivity of *Erwinia amylovora* isolates

**Anita Végh[1] – Boglárka Horváth[1] – Ildikó Schwarzinger[2] – László Palkovics[1]**
[1] Corvinus University of Budapest, Faculty of Horticultural Science, Department of Plant Pathology
[2]Plant Protection Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest
anita.vegh@uni-corvinus.hu

*SUMMARY*

*Erwinia amylovora (Burr.) Winslow et al. is the agent of fire blight, a bacterial disease that affects mainly apple and pear, and other rosaceous plants, including other fruit trees and ornamentals (van der Zwet and Keil, 1979). Since the appearance of fire blight in Hungary (Hevesi, 1996) E. amylovora isolates were collected in different years, from different host plants and areas for establishing a gene bank for future epidemiological studies.*

*Bacterial plant diseases cause important crop losses worldwide, and control is based on copper compounds and antibiotics depending on the specific regulations of each country. Control of fire blight disease of pome fruit is difficult. However, antibiotic use is restricted in several countries and resistance has been reported that compromise efficiency of treatments for disease control. Also, copper treatments are often not effective or it may be phytotoxic for some fruit tree cultivars and in phenological stages. The bacteriophage could be a great importance to the protection against the E. amylovora.*

*In this project, we investigate the potential of use of bacteriophage for biological control of fire blight. In our experiment the relationship between bacteria and phages were determined. Thirty-one Erwinia amylovora isolates and 4 bacteriophage were tested which originate from different years, hosts and areas.*

*The evaluations of results after 24 hours incubation on medium, plaques were described. Bacterial isolates were grouped by the characteristics of plaque morphology: clear plaque, less transparent and no plaque. Phages lysed all of the E. amylovora isolates; on most of them it formed clear plaque. The H5A phage was the most effective from the phages. Only the isolate Ea67 didn't show sensitivity against two phages (phage H4B and phage H8). There was only one isolate of 31 which was lysed by all four phages (Ea96). The bacteria strains shown variant sensitivity against the phages isolated. The same group (plaque-type) of each isolates belonging to the same lysotype group. Phage isolates were able to reduce bacterial populations. The ability of each phages to infect E. amylovora was confirmed. In our study the phages isolated can be useful for biological control of E. amylovora.*

**Keywords:** fire blight, *Erwinia amylovora*, biological control, bacteriophages

## *INTRODUCTION*

*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* (1920) is a gram-negative bacterium which causes the devastating disease called fire blight in some rosaceous plants like apple, pear, quince, raspberry, plum, cotoneaster and pyracantha (*Fig. 1*) (van der Zwet and Keil, 1979; Momol and Aldwinckle, 2000). This necrotic disease is sporadic but it can be very destructive for some very susceptible genotypes of *Maloideae*. *E. amylovora* can infect leaves, shoots, rootstocks and fruits as well. Symptoms first appear on young succulent shoots, which turn black and may show droplets of ooze.

Epidemic spread of fire blight results in a continual expansion of this disease. It has been reported throughout the main apple and pear producing regions in North and Central America, in Europe, in New Zealand, in Egypt and in Western Asia (Bonn and van der Zwet, 2000). In the last 25 years this pathogen became widespread all over the world. It is considered a quarantine bacterium in the European Union (EU). Fire blight was first detected on apples in 1996 in Hungary (Hevesi, 1996), and later in pear orchards. Since the appearance of fire blight in Hungary *E. amylovora* isolates were collected in different years, from different host plants and areas, for establishing a gene bank for future epidemiological studies.

The control of fire blight is difficult and almost impossible since the most effective method, using antibiotic streptomycin have not permitted and also is no longer effective because of the antibiotic resistance. The disease can be just partially controlled by using of copper compounds. The integrated pest control is recommended against the economical and agricultural losses. The biological control is a very important and useful part of these methods.

The bacteriophage may be a great importance to the protection against the *E. amylovora*. Erskine (1973) recognized the relevance of bacteriophage for biological control. The adaptation of bacteriophage and *E. amylovora* strains have been reported several publication against the fire blight (Schnabel *et al.*, 1998, 1999; Gill *et al.*, 2003; Svircev *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2010; Schwarzinger *et al.*, 2011; Kolozsvári Nagy *et al.*, 2012). It was found the bacteriophage could be used effectively in biological control as part of integrated disease management strategies and it is need further field experiment.

*Figure 1:* **Symptoms caused by the bacterium *Erwinia amylovora* on different plant species *(Photo: Végh Anita)***

*Pyrus* sp. *(1)*

*Pyracantha* sp.*(2)*

## *MATERIALS AND METHODS*

### Bacterial strains and growth conditions

A collection of 31 *Erwinia amylovora* isolates (*Table 1*) from different plant species and different regions isolated from 1996 to 2011. Preliminary tests the virulence of different isolates of the pathogenic bacterium was scored. Cultures were stored in 15 % glycerol at -18°C and -70°C or were conserved by lyophilization.

*Table 1*

**Origin of *Erwinia amylovora* isolates**

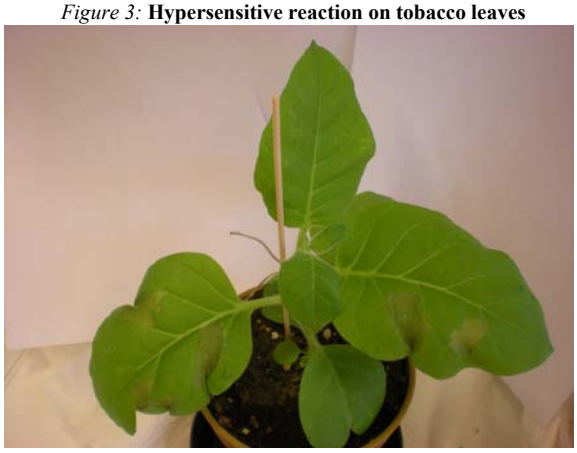
| ***Erwinia amylovora* isolates** | **Host plant** | **Origin** | **Date of isolation** |
|---|---|---|---|
| Ea1 | *Malus domestica* | Nyárlőrinc | 1996 |
| Ea6 | *Malus domestica* | Sarkad | 1997 |
| Ea10 | *Pyrus communis* | Sarkad | 1997 |
| Ea12 | *Cotoneaster horizontalis* | Sarkad | 1997 |
| Ea15 | *Cotoneaster dammeri* | Békéscsaba | 1997 |
| Ea16 | *Cotoneaster salicifolius* | Pécs | 1997 |
| Ea19 | *Cydonia oblonga* | Pomáz | 1997 |
| Ea22 | *Crataegus* sp. | Pécs | 1998 |
| Ea26 | *Pyrus communis* | Zala | 1998 |
| Ea29 | *Cotoneaster* sp. | Budapest | 1998 |
| Ea31 | *Pyracantha* sp. | Budapest | 1998 |
| Ea50 | *Pyrus x communis* 'Dr. Guyot Gyula' | Zala | 1999 |
| Ea60 | *Malus domestica* | Érd | 2000 |
| Ea67 | *Malus domestica* | Monostorpályi | 2000 |
| Ea70 | *Cydonia oblonga* | Monostorpályi | 2000 |
| Ea80 | *Pyrus communis* | Zala | 2001 |
| Ea88 | *Malus x domestica* 'Idared' | Újfehértó | 2002 |
| Ea95 | *Cydonia oblonga* | Rákoskert | 2003 |
| Ea47 | *Malus x domestica* 'Idared' | USA, Michigan | 1999 |
| Ea96 | *Cydonia oblonga* | Ukrajna, Ungvár | 2003 |
| Ea329/98 | *Malus domestica* | Ausztria, Vorarlberg | 1998 |
| Eam1 | *Malus domestica* | Románia, Székelyudvarhely | 2009 |
| Eam2 | *Malus x adstringens* 'Helen' | Budapest | 2010 |
| Eam4 | *Crataegus* sp. | Vecsés | 2010 |
| Eam5 | *Crataegus* sp. | Budapest | 2010 |
| Eam6 | *Crataegus* sp. | Debrecen | 2010 |
| Eam7 | *Prunus* sp. | Budaörs | 2011 |
| Eam8 | *Cydonia oblonga* | Budapest | 2011 |
| Eam9 | *Cydonia oblonga* | Szerbia | 2011 |
| Eam10 | *Pyrus communis* | Szerbia | 2011 |
| Ea-PlumBo1 | *Prunus x domestica* D 'Agen' | Budaörs | 2011 |

Virulence was confirmed on unripe pear fruits showing typical water-soaked tissue lesions with bacterial exudates (*Fig. 2*) and on tobacco leaves *(Nicotiana tabacum L.* cv. White Burley*)* producing hypersensitive

reaction (Klement, 1963) (*Fig. 3*). For cultivation King-B agar medium (King *et al.*, 1954) was adjusted to pH 6.8 and used in standard incubation temperature at 24°C. For inoculation the concentrations of bacteria in the inoculum suspension were adjusted to $5x10^8$cfu/ml.

*Figure 2:* **Virulence was confirmed on unripe pear fruits**

*Figure 3:* **Hypersensitive reaction on tobacco leaves**



**Bacteriophages sensitivity examined**

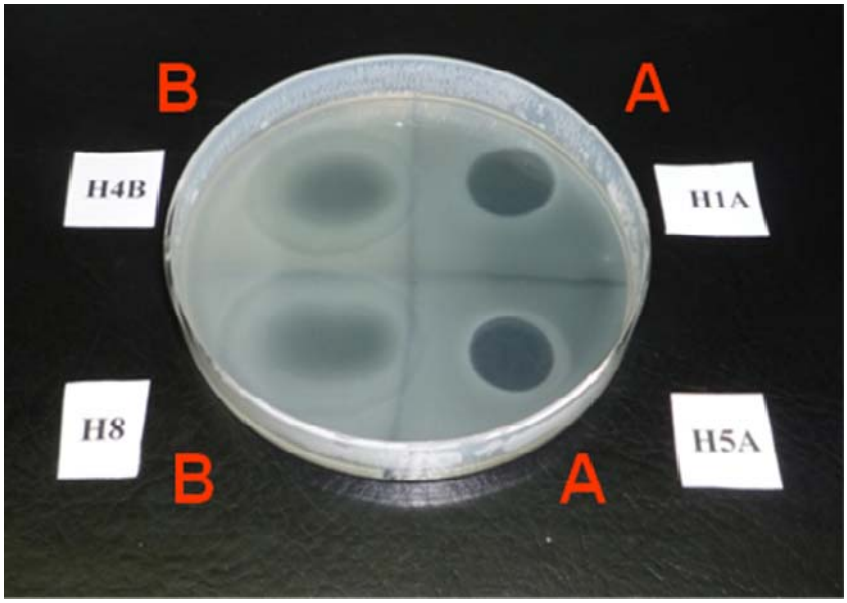
For the characterization of the bacterial isolates 4 bacteriophages (H1A, H4B, H5A, H8) were used (*Table 2*). Bacteriophages were isolated with Crosse-Hingorani method (1958) from several infected host plants (apple, pear, and quince) and from several regions of Hungary. Phages were isolated with double agar layer technique described by Adams (1959). Bacteriophages were purified by repeated single plaque isolation procedure. The isolated phages were characterized by plaque morphology.

*Table 2*

**Origin of bacteriophages (I. Schwarczinger)**

| Phages | Host plant | Origin | Date of isolation |
|---|---|---|---|
| **H1A** | *Cydonia oblonga* | Siófok | 2007 |
| **H4B** | *Cydonia oblonga* | Békéscsaba | 2006 |
| **H5A** | *Cydonia oblonga* | Békéscsaba | 2006 |
| **H8** | *Malus domestica* | Siófok | 2007 |

*Figure 4:* **Bacteriophage sensitivity of Ea 85 (plaque type A – clear zone, B- less transparent)**




Ten ml King-B agar is poured in Petri-dishes. It was prepared suspension in distilled water from 24 hours old culture of *Erwinia amylovora* isolates. It was mixed the bacterial suspension to King-B agar in ratio 3:1, after the agar of 1% King-B is heated up to 45ºC. The soft agar was poured on the top of the solid agar and after the

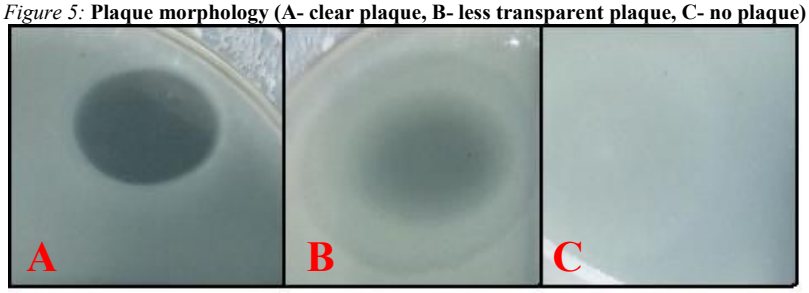
solidification various kinds of phages ($10^6$ PFU/ml) was dropped on the surface of the medium. The Petri-dishes incubation temperature was at 26 °C for 24 h (*Fig. 4*).

**Plaque morphology**

The evaluation of phage effects were studied with plaque morphology (*Fig. 5*):

A- clear plaque,
B- less transparent plaque,
C- no plaque.

*Figure 5:* **Plaque morphology (A- clear plaque, B- less transparent plaque, C- no plaque)**




***RESULTS AND DISCUSSION***

The relationship between bacteria and phages were determined. According our results all phages formed spots on the surface of the double agar layer. Bacterial isolates were grouped by the characteristics of plaque morphology: clear plaque, less transparent and no plaque.

The bacteriophage H1A were lysed clear plaque with the follows isolates of *E. amylovora*: Ea10, Ea12, Ea15, Ea16, Ea22, Ea67, Ea70, Ea80, Ea95, Eam6, Eam8, Eam10; and were lysed little less isolates of EaPlumBo1, Ea1, Ea6, Ea19, Ea26, Ea29, Ea31, Ea47, Ea50, Ea60, Ea88, Ea329/98, Eam1, Eam2, Eam4, Eam5, Eam7, Eam9.

The phage H4B were lysed of Ea15, Ea26, Ea31, Ea60, Ea70, Ea96, Eam2 , Eam4 isolates, however the bacteriophage formed less transparent type of plaques most of the isolates (Ea1, Ea6, Ea10, Ea12, Ea16, Ea19, Ea22, Ea29, Ea47, Ea50, Ea80, Ea88, Ea95, Ea329/98, Eam1, Eam5, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9, Eam10, EamPlumBo1). We did not detect any changes in the isolates Ea67.

The phage H5A was able to lyse the most of the isolates (Ea10, Ea15, Ea16, Ea19, Ea22, Ea47, Ea50, Ea67, Ea80, Ea88, Ea95, Ea96, Eam6, Eam8, Eam10), furthermore the phage formed less transparent plaques Ea1, Ea6, Ea12, Ea26, Ea29, Ea31, Ea60, Ea70, Ea329/98, Eam1, Eam2, Eam4, Eam5, Eam7, Eam9, isolates of EamPlumBo1.

The bacteriophage H8 were lysed the least isolates: Ea29, Ea31, Ea50, Ea60, Ea70, Ea88, Ea96, although there were among these isolates which only the bacteriophage H8 was able to lyse (Ea29), and the phages H8 formed less transparent types of plaques Ea1, Ea6, Ea10, Ea12, Ea16, Ea19, Ea22, Ea29, Ea47, Ea50, Ea80, Ea88, Ea95, Ea329/98, Eam1, Eam5, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9, Eam10 isolates of EamPlumBo1.

There was only one isolate of 31 which was lysed by all four phages (Ea96). Two isolates formed clear plaque by three phages (isolate Ea15- H1A, H4B, H5A phages; isolate Ea70 - H1A, H4B, H8 phages). Six isolates also formed less transparent plaque by three phages (Eam2, Eam4, Ea26, Ea29, Ea12, Ea47). The great majority of cases (13 isolates: Ea10, Ea16, Ea22, Ea31, Ea50, Ea60, Ea67, Ea80, Ea88, Ea95, Eam6, Eam8, Eam10) the isolates showed sensitivity by two phages and formed clear plaque. All four bacteriophage formed less transparent plaque for 8 samples (Ea1, Ea6, Ea329/98, Eam1, Eam5, Eam7, Eam9, EaPlumBo1). Only the isolate Ea67 didn't show sensitivity against two phages (phage H4B and phage H8). The H5A phage was the most effective from the phages. It could lyse all of the *E. amylovora* isolates; on most of them it formed clear plaque.

The isolates showed different sensitivity with phages, which depend on the phages formed clear or less transparent types of phage, or plaques were not formed. The same group (plaque-type) of each isolates belonging to the same lysotype group. On the basis of the results we observed less transparent plaque majority of the cases as clear plaque. Considering all isolates, we didn't draw universal inference in connection with the phages can be lyse the various isolate to the same extent, because it was formed different extent of clear or less transparent plaques. Phage isolates were able to reduce bacterial populations. The ability of each phage to infect *E. amylovora* was confirmed. The phages isolated in our study can be useful for biological control of *E. amylovora*. The bacteria strains shown variant sensitivity against the phages isolated. The mixture of different phages in different combinations can be the most effective against the bacteria. Use of phages for control of bacterial plant disease in field experiment has been successful although the treatment is circumstantial. The phages are UV-sensitive as a disadvantage of phage therapy. But the phage therapy has many numerous advantages. One of them is a reduction in the usage of chemical methods and also provided a more effective treatment than the other permitted plant protects methods.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The project was funded by TÁMOP – 4.2.1./B-09/1-KMR-2010-0005 and TÁMOP- 4.2.2./B-10/1-2010-0023.

### *REFERENCES*

Adams, M. H. (1959): Bacteriophages. Interscience Publishers, New York. 592 p.

Bonn W. G. - van der Zwet T. (2000): Distribution and economic importance of fire blight. In: Vanneste J. L. (ed.): Fire blight. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing 37- 54 p.

Crosse, J. E.- M. K. Hingorani (1958): A method for isolating *Pseudomonas mors-prunorum* phages from soil. Nature (Lond.) 181:60-61.

Erskine J. M. (1973): Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in epidemiology of fire blight. *Canadian Journal of Microbiology* 19 (7): 837-845. p.

Gill J. J. - Svircev A. M. - Smith R. - Castle A. J. (2003): Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2133–2138 p.

Hevesi M. (1996): Az Erwinia amylovora (Burill) Winslow *et al.* hazai megjelenése almán. Növényvédelem 32 (5): 225- 228.

Holt- Harris- Teague (1916): J. Infect. Dis. 18: 596.

King, E. O. - Ward, M. K. - Raney, D. E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. lab. Clin. Med., 44: 301- 307.

Klement, Z. (1963): Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. Nature, Lond, 199- 300.

Kolozsvári Nagy J., Király L. and Schwarczinger I. (2012): Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Central European Journal of Biology* 7 (1): 1-12 p.

Momol, M. T.- Aldwickle, H. S. (2000): Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. In: Fire Blight : The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora.* (ed. J.L. Vanneste). *CAB International.*

Müller I. - Jelkmann W. - Geider K. - Lurz R. (2010): Properties of *Erwinia amylovora* Phages from North America and Germany and Their Possible Use to Control Fire Blight. *Acta Horticulturae* 896: 417-419 p.

Schnabel E. L. - Fernando W. G. D. - Meyer M. P. - Jones A. L. - Jackson L. E. (1999): Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol. *Acta Hortic*ulturae 489: 649–654 p.

Schnabel E. L. - Fernando W. G. D. - Meyer M. P. - Jones A. L. - Jackson L. E. (1998): Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol. *Abstracts of 8th International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 135.

Schwarzinger I.- Tóth M. - Hevesi M. (2011): Control of Fire Blight by Bacteriophages on Apple Flowers. *Acta Horticulturae* 896: 457-462. p.

Svircev A. M. - Lehman S. M. - Kim W. S. - Barszcz E. - Schneider K. E. - Castle A. J. (2005): Control of the fire blight pathogen with bacteriophages. *1st Symposium Biocontrol of Bacterial Plant Diseases* 259-261. p.

van der Zwet - Keil, H.L. (1979): Fire Blight. A bacterial disease of rosaceous plants. U. S. Dep. Agric. Handb. Pp. 510.

Winslow C. E. A. - Broadhurst J. - Buchanan R. E. - Krumwiede Jr. C. - Rogers L. A. - Smith G. H. (1920): The families and genera of the bacteria. Final report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *Journal of Bacteriology* 5: 191-229 p.

# Declining population of chestnut (*Castanea sativa* Mill) trees in Jammu & Kashmir State of India by natural and anthropogenic activities

**Mudasir A. Dar – Mahendra Rai**
Department of Biotechnology, Sant Gadge Baba Amravati University, Amravati,
Maharashtra– 444602. India
*E-mail: mkrai123@rediffmail.com*

***SUMMARY***

*Chestnut (Castanae sativa) is a commercially important plant of Jammu and Kashmir states of India. This vegetation is under continuous threat of both natural (fungi, bacteria and insects) and anthropogenic activities. Every year the population of chestnut trees is declining either by cutting for the purpose wood used for furniture and construction, etc. or by the attacks of fungal pathogens and insects. About 82% of the Chestnut population is infected by fungi, in which 40% is highly damaged (60-80% damaged) or dead and rest is 42% infected (upto50% damaged). This damage is by the fungi only. Apart from this, insects are also responsible for the declining population of these chestnut trees in Jammu and Kashmir. The present study is focused on isolation of fungal pathogens from cankers of chestnut trees, severity of disease and the reasons behind the vanishing population of chestnut trees.*

**Keywords:** Chestnut, fungal pathogens, threatened species, diversity damage

## *INTRODUCTION*

Chestnut (*Castanea* sp.) trees are commercially very important for the temperate world. It is also known as chinkapin or chinquapin. It is a genus of eight or nine species of deciduous trees and shrubs in the beech family Fagaceae, native to temperate regions of the Northern Hemisphere. The name also refers to the edible nuts they produce (Hardin and Johnson, 1988; Li, 1999). These chestnuts have been cultivated for nuts and wood for thousands of years. The genus *Castanea* is believed to have been originated from Asia, in Tertiary period. Its eastward migration gave rise to the American chestnut *C. dentate* (Marsch.) Borkh, while westward migration resulted in the European chestnut *C. sativa* (Zohary and Hopf, 1988). In India, during British colonial rule in the mid-1700s to 1947, the Sweet Chestnut *(Castanea sativa)* was widely introduced in the temperate parts of the Indian Subcontinent, mainly in the lower-to-middle Himalayas like Kashmir province of Jammu and Kashmir State. Chestnuts are grown for their edible nuts in the orchards throughout the Himalayas up to Assam and Meghalaya at altitudes of 2,000 to 3,000 m. The trees have naturalized in India and are doing well throughout the foothills of the Himalayas, but are concentrated in the Jammu and Kashmir, Kullu, Kangra, and Shimla valleys and in the north-western parts of Uttar Pradesh (Anonymous, 1992; Pandit *et al*., 2011).

The chestnut tree population is continuously attacked by fungi, bacteria, insects and the common man. Fungi are the main culprit behind the declining population of these trees. The most important fungal pathogen is *Cryphonectria parasitica*, which causes complete destruction of chestnut trees. It was seen between 1904 to 1950 (Anagnostakis ,1987; Aksoy and Serdar, 2004) *C. parasitica* ravaged 3.6 million hectare of chestnut forests in Eastern North America and reduced American chestnut to a minor under story shrub (Griffin *et al.*, 1993). *C. parasitica* also affected other countries of the world like Europe (U.K, Italy), China (Tarcali and Radocz, 2009), and Hungary (Tarcali *et al*., 2012), etc. Apart from the *C. parasitica* other fungi also infect the chestnut trees like *Gnomoniopsis* sp. (Dar and Rai, 2012), *Phytopthora* sp. (Day, 1938; Biçici and Cinar, 1990).

During a suvey of fungal pathogens associated with the cankers of Chestnut trees in Jammu and Kashmir State of India, we found that almost all chestnut population was destroyed in some places due to anthropogenic activities, for the purpose of furniture, construction and firewood etc. and more than 80% damage is caused by the fungi in the chestnut population of the Jammu and Kashmir state.

## *MATERIALS AND METHODS*

A survey was made for the isolation of *Cryphonectria* and related fungi from the cankers of chestnut trees in Jammu and Kashmir. Moreover, at almost all places, the chest nut trees were cut down by the man himself for purpose of furniture, construction, firewood etc.

The survey for diseases of chest-nut trees were conducted in Kashmir valley region, which included Baramulla, Kupwara, Sopore, Pattan, Tangmarg Srinager, Budgam, Anantnag, Kulgam and Bandipora (*Figure 1*).

At every place standing chestnut trees were counted including the trees cut down by people. All the standing tree population at every place was examined and the calculations were made on the basis of the total number of trees, trees cut down, trees infected showing blight symptoms, severity of the disease and also age of the trees (*Table 1-2*). The severity of disease (*Table 2*) was categorized into four stages (A, B, C, D), Healthy, Less infected, Heavily infected and Dead, respectively.

Field examinations and the bark samples of infected chestnut trees were collected from these different places of Jammu and Kashmir state, India. Samples were collected from infected and cankered chestnut trees. Fruiting structures were cut from the bark specimens and examined using the methods outlined in Gryzenhout *et al*., (2004). Samples of fruiting structures about 6mm (discs) were taken from the bark of the infected chestnut stems. Individual samples were surface sterilized with 90% alcohol for 60 seconds. These surface sterilized bark pieces were placed on to Potato Dextrose Agar (PDA) in petri plates (Downes and Ito, 2001). The inoculated plates of PDA were incubated for 7 days at room temperature $25^0 \pm 2^0$C. The colonies of the fungus were obtained within 8 days after inoculation. Then one mycelial plug from each sample was transferred to fresh PDA. The isolates were used for cultural morphology and further investigation. Structures were examined with illuminated light microscope (Carl Zees™). The cultures were deposited in Department of Biotechnology, SGB Amravati University, Maharashtra, India.

*Figure 1:* **Map of India with highlighted Jammu and Kashmir State and the part of the state where the chestnut trees are present**

## *RESULTS*

Our survey is the first report about the present status of the chestnut trees in Jammu and Kashmir, India (*Figure 1*). This study was carried out in all parts of Jammu and Kashmir State where these chestnut trees are growing. Almost all the places were visited for the examination of chestnut trees. In our study, we found more than 90% of the chestnut vegetation had been vanished from the Jammu and Kashmir State (*Table 1*) of India. There are two factors responsible for destruction of chest nut population: plant pathogens and anthropogenic activities. Consequently, there is decline of the chestnut population to such a level, where we can consider chestnut trees as threatened species of the State and the country.

At every place of study, minimum 10% and maximum 70% of the trees were cut down by Man (*Table1*). The age of these trees were 50 years and above. At every place we found the standing trees were raised from the lateral branches arising from the crown of these chopped chestnut trees. Rest chestnut tree population was heavily infected by the fungal pathogens (*Table 2*).

The standing chestnut trees were further examined for infection caused by microorganisms and insects and also the intensity of the disease caused by these organisms. The organisms responsible for these diseases were fungi and insects. In fungi we report the bark inhabiting fungi all belonging to Ascomycetes. They include species of *Cryphonectria, Gnomoniopsis, Diplodia, Fimetariella* and *Plurophoma*. In insects' majority are wasps (Gall wasp *Ectoedemia* sp.) and beetles (*Magdalis, Meracantha*). The severity of diseases by these organisms were categorized into A. healthy (without any disease symptom and infection), B. less infected (disease symptoms less than 50%), C. heavily infected (disease symptoms 50% and above), D. dead (100% dead) (*Table 2*). The results were totally severe showing healthy population just 18% and infected to dead were 82% in which A=18.80%, B=43.27%, C=27.73% and D=10.50%. It means only 18% of the chestnut trees are remaining.

*Table 1*

**District places of Jammu and Kashmir State in India with number of the chestnut tree examined**

| *Place* | *Age Group* | *Total No. of Trees* | *Infected Trees* | *Cut Downed Trees* | *Healthy Trees* |
|---|---|---|---|---|---|
| Baramulla | 40 and Above | 69±4 | 30±3 | 19±2 | 08±1 |
| Kupwara | 60 and Above | 38±3 | 16±2 | 15±1 | 07±1 |
| Bandipora | 60 and Above | 20±2 | 10±1 | 08±1 | 02±1 |
| Ganderbal | - | - | - | - | - |
| Srinager | 20 and Above | 136±6 | 92±5 | 22±3 | 22±3 |
| Anantnag | - | - | - | - | - |
| Sopore | 40 and Above | 25±3 | 16±2 | 05±1 | 04±1 |
| Pattan and Tangmarg | 80 and Above | 14±2 | 08±1 | 05±2 | 01±0 |
| Shopian | - | - | - | - | - |
| Pulwama | - | - | - | - | - |
| Kulgam | 80 and Above | 07±1 | 3±1 | 2±0 | 2±0 |
| Budgam | 100 and Above | 11±2 | 4±1 | 6±1 | 1±0 |

± = Standard Deviation

*Table 2*

**Severity of the disease caused by the fungal pathogens. The severity of diseases by fungi were categorized into A. healthy (without any disease symptom and infection), B. less infected (disease symptoms less than 50%), C. heavily infected (disease symptoms 50% and above), D. dead (100% dead)**

| *Place* | *Severity of disease caused by fungal pathogens* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *A* | *B* | *C* | *D* |
| Baramulla | 08±2 | 14±3 | 10±2 | 06±2 |
| Kupwara | 07±1 | 20±5 | 13±3 | 05±1 |
| Bandipora | 02±0 | 04±1 | 04±1 | 02±0 |
| Srinager | 22±2 | 58±6 | 30±4 | 04±1 |
| Sopore | 04±1 | 05±1 | 06±1 | 06±1 |
| Pattan and Tangmarg | 01±0 | 02±0 | 03±0 | 02±0 |
| Kulgam | - | 2±0 | 1±0 | - |
| Budgam | 4±0 | - | - | - |

± = Standard Deviation

## *DISCUSSION*

Jammu and Kashmir produces not only vast varieties of some fruits like apples, peaches, plum and cherries, but also producing the finest variety of chestnuts (Pandit, *et al.,* 2009). Now, the chestnut population has been reduced to such a level that more than 60% of the residents of these places do not know about the chestnut trees and fruits. It is because of the vanished vegetation of chestnut trees in last two decades, lack of awareness among common man, and non-seriousness shown by researchers and related agencies.

Dar and Rai (2012) reported the *Gnomoniopsis* sp. from the cankers of chestnut from this part of the country and it was the first report of the disease from India. This study provided an edge for examining the chestnut vegetation in India. Our analyses and results furnished an alarming output for dealing with systematics and diversity loss. Data provides evidence that 82% of the chestnut vegetation of Jammu and Kashmir State is either highly damaged or fully destroyed by the fungal pathogens along with insects. The healthy remaining vegetation is only 18%, while the number of chestnut trees in the region is already low countable on fingers. This 18% vegetation will be not more than 1% of total diversity of fruiting trees in the state. At the present scenario, we can conclude from our results that chestnut (*Castanea sativa*) trees are now the threatened species of the region and country too and if not managed properly chest nut may be endangered in near future.

### *REFERENCES*

Aksoy M.H. - Serdar U. (2004): A research on chemical control against chestnut blight, *Plant Pathology Journal* 3(1): 44-47.

Anagnostakis S. L. (1987): Chestnut blight: The classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia.* 79, 23–37.

Anonymous. (1992): The wealth of India. Raw materials, Vol. II, p. 374–375. CSIR, New Delhi.

Biçici M. - Cinar, A. (1990): A review of Phytophthora diseases of different Mediterranean crops in Turkey. Bulletin Oepp. 20, 101–105.

Dar M. A. - Rai M. K. (2012): Biological and Phylogenetic Analyses, Evidencing the presence of *Gnomoniopsis sp.* in India, causing Canker of Chestnut Trees: A New Report. Indian Forester. In press.

Day W.R. (1938): Root-rot of sweet chestnut and beech caused by species of *Phytophthora.* I. Cause and symptoms of disease: its relation to soil conditions. Forestry. 12, 101–116.

Downes F. P. - Ito K. (2001): Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Gryzenhout M. - Myburg H. - Van der Merwe - N. A. Wingfield B. D. - Wingfield M. J. (2004): Chrysoporthe, a new genus to accommodate *Cryphonectria cubensis*. Studies in Mycology. 50, 119-142

Hardin J. W. - Johnson G. P. (1985): Atlas of foliar surface features in woody plants, VIII. *Fagus* and *Castanea* (Fagaceae) of eastern North America. Bull. Torrey Bot. Club. 112, 11-20.

Li S. (1999): *Castanea* Miller, Gard. Dict., Abr. ed. 4, 1: [278]. 1754. Flora of China. 4, 315-317

Pandit A.H. - Kour A. - Wani M. S. - Mir M. A. (2009):. Genetic resources of chestnut in Kashmir Valley. Proc. Intl. Workshop on Chestnut Management in Mediterranean Countries. Acta Hort. 815, 51–56.

Pandit A.H. - Mir M. A. - Kour A. - Bhat K. M. (2011): Selection of Chestnuts (Castanea sativa) in Srinagar District of the Kashmir Valley, India. International Journal of Fruit Science. 11, 111-118

Tarcali G. - Radocz L. (2009): Experiences of a study trip in China on the research of chestnut blight fungus and gall wasp. Proceedings of International Symposia Risk Factors for Environment and Food Safety & Natural Resources and Sustainable Development, Oradea, Italy, 6-7 November, 2009, p.474-485.

Tarcali G. - Radocz L. - Görcsös G. (2012): „Chestnut blight" disease in the Middle-European countries. Poster presentation. International Conference on Mycology and Plant Pathology: Biotechnological Approaches, Banaras Hindu University, Varanasi, India, 27-29 February, 2012. Abstract: p. 21.

Zohary D. - Hopf M. (1988): Domestication of plants in the old world: The origin and spread of cultivated plants in west Asia, Europe, and the Nile Valley. Clarendon Press (Oxford, OX and New York). p. 223-242.

# Látóképi kísérletekből származó búzaminták penészgomba-, *Fusarium*- és DON toxin szennyezettségének alakulása

# Mould-, *Fusarium*- and DON toxin contamination of wheat samples from Látókép, Hungary

**Kovács Csilla[1] – Pepó Péter[2] – Csajbók József[2] – Borbélyné Varga Mária[3] – Szilágyi Szilárd[3] – Sándor Erzsébet[1] – Peles Ferenc[1]**

[1]Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar (DE AGTC MÉK), Élelmiszertudományi, Minőségbiztosítási és Mikrobiológiai Intézet

[2]DE AGTC MÉK, Növénytudományi Intézet

[3]DE AGTC MÉK, Agrárműszer Központ

pelesf@agr.unideb.hu

***ÖSSZEFOGLALÁS***

*A gabonafélék alapvető élelmiszerforrásnak számítanak már az ősidők óta. A búza a második legnagyobb területen termesztett haszonnövény Magyarországon. A gabonafélék összetételüknél fogva kiváló tápanyagforrást jelentenek a gombáknak. A gabonaféléken elszaporodó penészgombák jelentős károkat okozhatnak. Egyrészt rontják az élvezeti és tápértékét a belőle készült terméknek, másrészt egészségre káros mikotoxinokat is termelhetnek. A lakosság nagy mennyiségű gabona alapú termékeket fogyaszt, ezért szükséges a penészgombák számának a meghatározása, illetve az általuk termelt mikotoxinok kimutatása. Hazánkban a gabonafélék esetén az egyik leggyakrabban előforduló toxin a Fusarium fajok által termelt deoxinivalenol (DON) toxin.*

*Kutatómunkánk során azt vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés az eltérő vetésforgó, növényvédelmi kezelés, nitrogén műtrágya adag, valamint a búzaminták penészgombaszáma, Fusarium fertőzöttsége és DON toxin tartalma között.*

*A vetésforgó, növényvédelem és nitrogén műtrágya adag és a búza Fusarium fertőzöttsége közötti összefüggést vizsgálva csak az eltérő növényvédelmi kezelések esetén tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Az intenzív (háromszori fungicides) kezelés esetén ugyanis szignifikánsan alacsonyabb fertőzöttségi értéket kaptunk.*

*A búzaminták DON toxin tartalma, valamint a Fusarium fertőzöttsége között nem tapasztaltunk egyértelmű egyenes arányos összefüggést.*

***SUMMARY***

*Grains are basic food sources since ancient times. Wheat is cultivated on the second largest areas in Hungary. Cereals are excellent nutrient sources for fungi due to their composition. Moulds which are proliferating on the cereals can cause significant damages. On the one hand they deteriorate the sensory and the nutritional value of the products, and on the other hand they can also produce mycotoxins which are harmful to health. The population consumes large amounts of cereal-based products; therefore it is necessary to determine the number of moulds, and the detection of mycotoxins produced by them. Deoxynivalenol (DON) toxin, produced by Fusarium species, are one of the most frequently occurring mycotoxins in cereals, in Hungary.*

*During this study, we investigated whether there was any correlation between the different crop rotation, plant protection, nitrogen fertilizer dose and the mould count, Fusarium infection and DON toxin content of wheat sample.*

*During the examination of relationship between the crop rotation, plant protection, nitrogen fertilizer dose and the Fusarium infection of wheat, we found significant difference only in case of different plant protection treatments. In case of intensive (three times fungicide) treatment significantly lower infection values were obtained.*

*We did not observed clearly linear proportional relationship between the DON toxin content and the Fusarium contamination of wheat samples.*

**Kulcsszavak:** búza, penészgombaszám, *Fusarium*, DON toxin, vetésforgó, növényvédelem, nitrogén műtrágya
**Keywords:** wheat, mould count, *Fusarium*, DON toxin, crop rotation, plant protection, nitrogen fertilizer

## *BEVEZETÉS*

A gabonafélék alapvető élelmiszerforrásnak számítanak már az ősidők óta. A búza vetésterületét tekintve a kukorica után második legnagyobb területen termesztett haszonnövényünk. A gabonafélék összetételüknél fogva kiváló tápanyagforrást jelentenek a gombáknak. A gabonaféléken elszaporodó penészgombák jelentős károkat okozhatnak, mivel egyrészt rontják a belőle készült termék élvezeti és tápértékét, másrészt egészségre káros mikotoxinokat is termelhetnek. A mikotoxinok a penészgombák által termelt extracellulárisan kiválasztódó másodlagos anyagcseretermékek. Szeitzné et al. (2009) szerint a penészgombák jelenléte csökkenti a terméshozamot és az értékesíthető mennyiséget.

A potenciálisan toxintermelő gombák jelen lehetnek a termőföldön, a silókban, valamint a raktárakban egyaránt. Ezek a mikroszkopikus élőlények rontják a búza minőségét, a magvakon megfigyelhető elváltozásokat és csírázóképesség csökkenést eredményeznek.

A toxintermelő penészek közül a *Fusarium* nemzetségbe tartozó fajok okozzák a legtöbb problémát a mezőgazdasági termesztésben. Ez az egyik legjelentősebb és legfajgazdagabb genus. Kifejezetten polifágok. Rendszerezésük nem egyszerű feladat, mely a nagyfokú heterogenitásuknak, morfológiai és fiziológiai változékonyságuknak köszönhető. Rendszertanilag a gombák teleomorf alakját sorolják be, mely a *Fusarium* esetén a *Gibberella* nemzetség. A *Gibberella* nemzetség a *Fungi* országba, *Dicarya* alországba, *Ascomycota* törzsbe, *Pezizomycotina* altörzsbe, *Sordariomycetes* osztályba, *Hypocreales* rendbe, *Nectriaceae* családba tartozik (Internet1). Párás, meleg időben telepednek meg a gabonanövényen. A *Fusarium* fajok szinte mindenhol megtalálhatók, azonban zömmel talajlakók, de szaprotrófok is lehetnek, azaz elhalt növényi maradványokon élhetnek, továbbá primer parazitaként is jelen lehetnek. Laza szerkezetű felületi micélium szövedéket képeznek, amelyek fejlődésük során szennyes fehér, sárga, rózsaszínű (piros) pigmenteket tartalmaznak. Ezen fajok jelentik a legnagyobb élelmiszerbiztonsági- és takarmánybiztonsági kockázatot. Sohár (2007) szerint a jenlétükkel rontják a búza tápértékét, eltarthatóságát, és az érzékszervi tulajdonságokat is megváltoztatják. A gombák számára a magvak szubsztrátként szolgálnak, hiszen tartalmazzák a növekedésükhöz szükséges tápanyagokat.

Az élő penészek izolálására és számolására évekig a lemezöntéses módszert, illetve a mikroszkópos vizsgálatot alkalmazták szelektív vagy nem szelektív táptalajon (Kiskó, 1999). Szükség van azonban újabb gyors módszerek fejlesztésére és alkalmazására ilyen például a kémiai módszerek közül a kitintartalom meghatározása vagy az ergoszterin mérése (Kiskó, 1999).

A fuzáriózis napjainkban nagyon elterjedt, a gabonaféléket megbetegítő betegség. Országos felmérések már az 1970-es évek elejétől rendelkezésre állnak. Évről-évre vizsgálják a fertőzöttség alakulását. Halász és Tóth (2011) cikkében a 2010-ben végzett vizsgálat során megyénként 16-77 darab búzamintát vizsgáltak meg. A *Fusarium* fertőzöttség 22,5 és 100% között alakult, a megyei átlag 73,7%, az országos átlag 24,6% volt. A többi megyéhez viszonyítva itt a volt a szennyezettség mértéke a legmagasabb. Halász és Valovics (2012) 62 db mintát vizsgáltak meg *Fusarium* szennyezettség megállapítása céljából. Eredményeik alapján 2011-ben Hajdú-Bihar megyében 2,0 és 63,5% között alakult a szennyezettség mértéke. A megyei átlag 14,50% volt, míg országos szinten 9,22% volt az átlag. Megfigyelhető, hogy 2011-ben alacsonyabb volt a fertőzöttség mértéke.

A *Fusarium* fajok mindig jelen vannak a környezetben. Kedvezőtlen hatásuk csupán attól függ, hogy az adott évben milyen időjárási viszonyok uralkodnak, illetve mennyire valósulnak meg a fertőzés mértékét csökkentő megfelelő agrotechnikai lehetőségek (vetésforgó, rezisztens fajta/hibrid választás, talaj adottság, tápanyagellátás, növényvédelem, öntözés).

Tóth (2009) és Halász és Valovics (2012) tanulmányuk szerint a *Fusarium* fertőzöttség a búzán nem egyenesen arányos a toxintartalommal. Sohár (2007) és Scudamore (1993) hasonló megállapításra jutott. Előfordulhat, hogy alacsonyabb fertőzöttség esetén ellentétes hatás következik be, vagyis a toxin mennyisége magasabb. Kedvezőtlen körülmények esetén a gombák elpusztulhatnak, azonban az általuk termelt mikotoxinok továbbra is jelen lesznek.

Szeitzné et al. (2009) vizsgálataik szerint a kalászfuzáriózis az őszi búza leggyakoribb és egyben legsúlyosabb betegsége is, melynek élelmiszerbiztonsági szempontból számottevő jelentősége van az egész világon. Mesterházy (2007) vizsgálata szerint hazánkban túlnyomó részt a *Fusarium graminearum* és a *Fusarium culmorum* okozzák a gabonák fuzáriumos megbetegedését. 15 faj vizsgálata alapján jutott arra a megállapításra, hogy az említett két faj a legfertőzőképesebb és a járványok többségét is ezen fajok okozzák, de Halász és Tóth (2011) szerint jelen lehet a *F. avenaceum*, *F. nivale*, *F. sporotrichoides*, *F. poae* is. A *Fusarium* fajok főként betakarítás előtt, virágzáskor támadják meg a gabonaféléket, mely során a magház és a termés fertőződik meg, ezt elsődleges fertőzésnek nevezzük. A csapadékos időjárás, valamint a magas páratartalom pedig másodlagos fertőzés kialakulásához vezethet. A *F. graminearum* a DON, zearalenon és a nivalenol toxinokat termel. Ez a legelterjedtebb toxintermelő faj, mely 24-26 °C között képes növekedni (Sweeney és Dobson, 1998). A kalászfertőzés az alacsonyabb búzákon jelentősebb, mivel a levélszintek közelebb vannak egymáshoz, mint a kalásztartó szártaggal rendelkező búzák, melyek kevésbé fertőződnek (Kovács, 1998).

A penészgomba fajok nemcsak a gabonaszemeken belül, illetve a külső felületén találhatók meg, hanem a száron, a talajban és a talaj felületén is. A legnagyobb fertőzőforrást azonban a termőföldön maradó növényi maradványok jelentik. Az előbbiekben már említett sok csapadék (tavasz és nyár eleji csapadékmennyiség) hatására a gabona szára megdőlhet, így érintkezik a talajjal, mely lehetőséget teremt a talajban élő, illetve a növényi maradványokon lévő gombák elszaporodására. a gombák klamidospóráik segítségével ivartalan módon szaporodva évről-évre újabb járványok kialakulását biztosítják. A szennyezettség mértékét növeli, ha a fertőzött szemek bekerülnek a talajba. A fertőzött magból kikelő növény szárán függőleges irányban sötét elváltozások láthatók. A fertőzés gyors terjedését elősegíti a konídiumok szétszóródása is, mely során tipikus tünetként megjelenik a kalász kivilágosodása. A kalászon szembetűnő jelenség a fehéres-vöröses árnyalat megjelenése, mely a gombák micéliumainak jelenlétéről árulkodik.

A kalászfuzáriózis megjelenését, valamint a mikotoxin szennyezettség mértékét az uralkodó időjárási viszonyok mellett számottevően befolyásolja az alkalmazott agrotechnikai eljárás is. A vetésváltás során az elővetemény betakarítása után történő talajműveléssel (a növényi maradványok talajba dolgozásával) csökkenthető a fuzáriumos fertőzés mértéke. Edwards (2007) szerint a búza után termesztett kukorica minimális talajművelése (minimum tillage) esetén ötször nagyobb volt a DON toxin mennyisége. A megfelelő fajta/hibrid kiválasztása lényeges a fuzariózissal szembeni védekezésben. Olyan fajtákat érdemes vetni, melyek a hazai éghajlati viszonyokhoz alkalmazkodnak és ellenállóak. Mesterházy (2007) szerint elsősorban a fajták és a

hibridek nagymértékű fogékonysága okozza a hazai és a külföldi gabonák *Fusarium* szennyezettségének kialakulását. Véleménye szerint a hazai búzafajták érzékenysége a járványok során megállapított mértéket jóval túllépi. A rezisztens fajták esetén számottevő fertőződés nem következik be még a mikotoxin termelésnek kedvező körülmények esetén sem, azonban a nagyon, vagy kiemelten fogékony fajták jelentős fertőzöttséget mutathatnak. A harmonikus tápanyagellátás, vagyis a helyes NPK-arány megvalósítása is lényeges (Pepó, 2003, 2004). Nem megfelelő arány esetén egyrészt a fertőzés kialakulására nagyobb az esély, másrészt a túlzott nitrogén mennyiség terméscsökkenést okoz (Racskó, 2005).
Az optimális időben történő betakarítás előnye, hogy a minőségromlás mértéke is csökken (Kovács, 1998). *Talaj* esetében, olyan területre érdemes vetni, mely nem szikes, illetve jó vízellátottságú. Az *öntözés* során fontos, hogy virágzás előtt egyenletesen történjen, a vegetációs időszak alatt, mert virágzáskor kedvező körülmények lesznek a penészgombák elszaporodására. A fajtaspecifikus *növényvédelem* megvalósításával a fertőzöttség mértéke is csökken, illetve ez az eljárás költséghatékonynak is minősül. A gabonatábla folyamatos figyelemmel kísérése során ellenőrizni kell, hogy az adott fertőzöttségi küszöböt elérte a fertőzés. Mesterházy et al. (2003) kutatásaik során bebizonyították, hogy a fungicidekkel kezelt táblákon a kezeletlen táblákkal összevetve alacsonyabb volt a szennyezettség mértéke.
Mesterházy (2007) a *Fusarium* fajok által okozott szennyezettség csökkentése érdekében a minél gyorsabb rezisztencia nemesítést, a hatékony növényvédelmi lehetőségek felkutatását, a kalászfuzáriózis mértékének mérését szolgáló felügyelő rendszer kiépítését, valamint az előbb említett rendszer kibővítését szorgalmazza a mikotoxintartalom vizsgálatára.

A mikotoxinok a penészgombák anyagcseretermékeként képződött szekunder metabolitok. Táplálékláncbeli előfordulása nagyon gyakori. Teljes számuk nem ismert, azonban több mint 300-at azonosítottak már. Az általuk kiváltott betegség a mikotoxikózis. Tized mg/kg-nyi mennyiségben is képes súlyos betegségeket kiváltani, mely a fogyasztó egészségét károsítja, ezért nagyon fontos a vizsgálatuk (Ácsné et al., 2007). Ezek a természetes úton képződött legveszélyesebb méreganyagok a szervezetbe növényi és állati eredetű élelmiszerekkel kerülnek be, ahol akut vagy krónikus hatásokat válthatnak ki. Mérgező hatásukat az emésztőrendszerben fejtik ki (Érsek és Gáborjányi, 1998).

A gabonaféléket megtámadó mikotoxin termelő *Fusarium* fajok közül a DON toxint termelők a jellemzőbbek. A DON toxin trichotecén vázas vegyület. Kémiailag a legváltozatosabb mikotoxinok (Sweeney és Dobson, 1998). A DON toxin 3-acetil és 15 acetil-deoxinivalenol formában fordul elő. Biológiai hatásukként ismert, hogy idegrendszer, immunrendszer károsítók, fehérjeszintézist, bőrt is károsítja (bőrön megjelenő piros foltok), lovak esetében megfigyelték a toxin takarmányelutasító hatását is. Ezen toxikus hatásokat Sweeney és Dobson (1998) is leírták. A takarmányban egyidejűleg több trichotecén toxin is lehet, melyek szinergens hatást fejthetnek ki, vagyis egymás hatását erősítik. Mesterházy (2007) szerint a mikotoxinok közül a dezoxinivalenolnak búzák esetén már az aratáskor jelentős koncentrációja lehet. Sohár (2007) szerint a *Fusarium*ok számára kedvező időjárási feltételek esetén a DON mennyisége 10 mg/kg-os nagyságrendet is elérheti. A toxin vízben oldódik, raktározás és őrlés alatt nagyon stabil, viszonylag hőtűrő.
A DON leggyakoribb neve a vomitoxin, mivel hányást vált ki, de emellett hasmenést, vérképzési panaszokat, immunrendszeri megbetegedéseket végül pedig halált is okozhat mind emberi és állati szervezetben egyaránt, mely már kis koncentráció esetén is bekövetkezik (Internet2). Az akut mérgezés tünetei az étkezést követően 30 percen belül jelentkeznek (Sohár, 2007).

Kimutatásukra többféle módszer is alkalmas. Ismert módszerek az ELISA /**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**s**orbent **A**ssay/ immunológiai módszer, ahol antitest és antigén kapcsolódik egymáshoz kovalensen, másik közismert módszer a nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia (HPLC). Ismeretes még a vékonyréteg (TLC), túlnyomásos rétegkromatográfia (OPLC) és a gázkromatográfia segítségével megvalósított mikotoxin-tartalom mérés is (Ácsnéet al., 2007). A toxinok már kis koncentrációban is jelentős károkat okoznak, ezért szükséges, hogy minél nagyobb érzékenységű módszereket alkalmazzunk kimutatásukra (Internet2).
A mikotoxin kontamináció meghatározásához olyan méréstechnikai eszközöket használnak, melyek ppb (µg/kg) nagyságrendben pontos mérést tesz lehetővé (Ácsnéet al., 2007).

## *ANYAG ÉS MÓDSZER*

### Kísérleti beállítások

Kutatómunkánk során azt vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés az eltérő vetésforgó, növényvédelmi kezelés, nitrogén műtrágya dózis illetve a vizsgált búzaminták penészgomba-, *Fusarium*-, valamint DON toxin szennyezettsége között. A kísérleteket a Debreceni Egyetem AGTC MÉK Növénytudományi Intézet munkatársai állították be a Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centrumának Látóképi Növénytermesztési Kísérleti Telepén, mészlepedékes csernozjom talajtípuson. A kísérleti beállítások az *1. táblázat*ban találhatóak. Az intenzív növényvédelmi kezelés esetén három alkalommal, az átlagos esetén egy alkalommal, az extenzív esetén pedig nem történt fungicides kezelés.

### Mikrobiológiai vizsgálatok

A mikrobiológiai vizsgálatokat az Élelmiszertudományi, Minőségbiztosítási és Mikrobiológiai Intézet Mikrobiológiai laboratóriumában végeztük el.

**Penészgombaszám meghatározása**

A búza minták penészgombaszámának a meghatározásához az érvényben levő MSZ ISO 7954:1999 szabványnak megfelelően élesztőkivonat-glükóz-chloramphenicol-agar táptalajt használtunk. Az inkubálás 25°C-on 5 napon keresztül történt aerob körülmények között. Kísérleti beállításonként 5 párhuzamos vizsgálatot végeztünk.

**Búzaszemek Fusarium fertőzöttségének vizsgálata**

A búzaszemek belső fertőzöttségének a vizsgálatához a Szécsi és Mesterházy (1998) által alkalmazott módszert használtuk, mely során mintánként 2 × 100 db búzaszem (kísérleti beállításonként két párhuzamos vizsgálat) felületét 1%-os neomagnolos oldatban történő 10 percig tartó áztatás segítségével fertőtlenítettük. Ezt követően kétszer steril desztillált vízzel átmostuk, majd a 2 × 100 db búzaszemet Papavizas-féle szelektív táptalajra (Booth, 1971) helyeztük. Az inkubálás 25 °C-on 10-12 napig tartott, mely során folyamatosan néztük a *Fusarium* megjelenését. A kiértékelés során külön-külön megszámoltuk a fehér és a piros pigmentet termelő *Fusarium*ok számát.

*1. táblázat*

**Kísérleti beállítások**

| Beállítás sorszáma(1) | Vetésforgó(2) | Növényvédelem(3) | Nitrogén műtrágya adag (kg/ha)(4) |
|---|---|---|---|
| **1** | bikultúra(5) | intenzív(7) | 0 |
| **2** | bikultúra | intenzív | 50 |
| **3** | bikultúra | intenzív | 150 |
| **4** | bikultúra | átlagos(8) | 0 |
| **5** | bikultúra | átlagos | 50 |
| **6** | bikultúra | átlagos | 150 |
| **7** | bikultúra | extenzív(9) | 0 |
| **8** | bikultúra | extenzív | 50 |
| **9** | bikultúra | extenzív | 150 |
| **10** | trikultúra(6) | intenzív | 0 |
| **11** | trikultúra | intenzív | 50 |
| **12** | trikultúra | intenzív | 150 |
| **13** | trikultúra | átlagos | 0 |
| **14** | trikultúra | átlagos | 50 |
| **15** | trikultúra | átlagos | 150 |
| **16** | trikultúra | extenzív | 0 |
| **17** | trikultúra | extenzív | 50 |
| **18** | trikultúra | extenzív | 150 |

*Table 1*: *Experimental settings*

Number of setting(1), crop rotation(2), plant protection(3), nitrogen fertilizer dose(kg $ha^{-1}$)(4), bicultre(5), tricultre(6), intensive(7), average(8), extensive(9)

**Őszi búza minták DON toxin szennyezettségének vizsgálata**

A DON toxin mennyiségének meghatározásához RIDA®QUICK DON tesztet és RIDA®QUICK SCAN készüléket használtunk.

A vizsgálat során először megőröltük a búzamintákat, majd 1 g-ot jól zárható műanyag centrifugacsőbe mértünk. Ezt követően 15 ml extrakciós folyadékot hozzámértünk, majd 3 percig intenzíven ráztuk. Az oldatot 3-5 percig hagytuk ülepedni. A 3-5 perc letelte után a teszt applikációs területére az oldat tisztájából 100 µl-t pipettáztunk. 5 perc elteltével szabad szemmel is látható volt, hogy pozitív vagy negatív a teszt eredménye. Ezt követően 5 csepp (100 µl) stop oldatot tettünk a reakciós felület membránjára a reakció leállítására. Végül a tesztet a készülékbe helyeztük és leolvastuk a pontos értéket. A kimutatási határ hígítástól függően (15 vagy 40 ml extrakciós folyadék) 500 vagy 1250 µg/kg.

**Kiértékeléshez használt statisztikai módszerek és programok**

A statisztikai számítások elvégezhetősége érdekében az értékeket átalakítottuk tízes alapú logaritmus értékekké. A vizsgálati adatokból átlagértéket és szórást számoltunk, továbbá meghatároztuk a szélső értékeket. A mikrobiológiai paraméterek és az egyes tényezők közötti összefüggés statisztikai vizsgálatához két változó esetén t-próbát és nem paraméteres Mann-Whitney próbát, három vagy annál több változó esetén pedig varianciaanalízist és Tukey-tesztet, illetve nem paraméteres Kruskal-Wallis próbát és Dunn-féle összehasonlító tesztet alkalmaztunk. 5%-os P-érték alatt tekintettük a próbákat szignifikánsnak.

Az eredmények kiértékeléséhez Microsoft Excel programot, valamint SPSS v.13.0 és GraphPad Prism 3.02 (Motulsky, 1999) statisztikai programokat használtunk.

## *EREDMÉNYEK*

### Penészgombaszám alakulása

A 18 kísérleti beállítás során az átlag penészgombaszám 1,1 × $10^3$ és 9,4 × $10^3$ (3,0 és 4,0 $\log_{10}$) TKE/g között változott (*1. ábra*). A statisztikai értékelés során azt tapasztaltuk, hogy a 6., 7., 8., 9., 14., 15., 17. és 18. kísérleti beállítások esetén szignifikánsan nagyobb (P<0,05), míg az 1., 2. és 5. beállítások esetén szignifikánsan kisebb (P<0,05) átlagértékeket tapasztaltunk.

*1. ábra*: **Búzaminták penészgombaszámának alakulása**

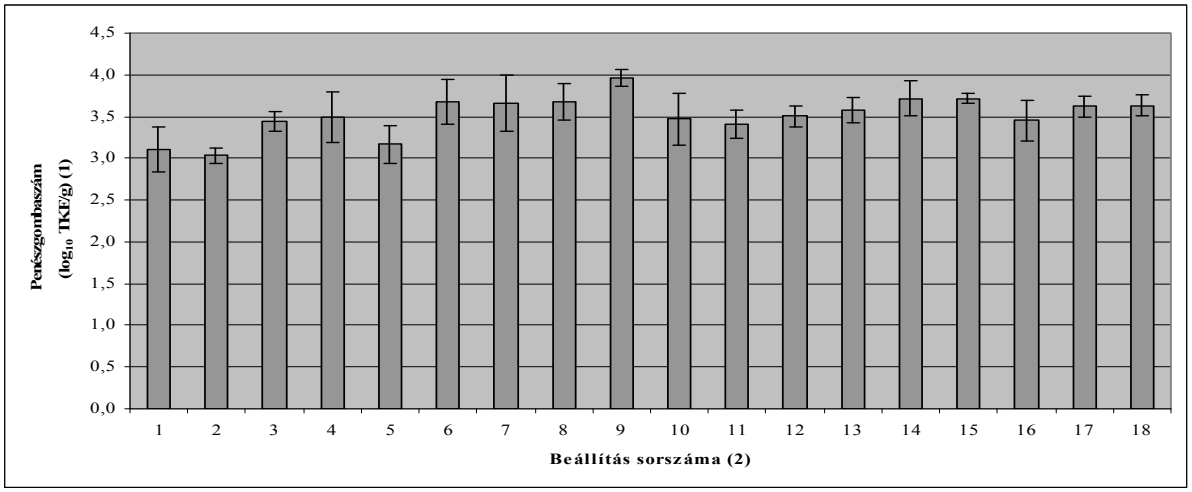



*Figure 1: Mould plate count of wheat samples*
Mould plate count ($\log_{10}$ CFU $g^{-1}$)(1), number of setting(2)

### Búzaszemek belső Fusarium fertőzöttségének alakulása

A 18 kísérleti beállítás során a búzaminták belső *Fusarium* fertőzöttsége 80 és 100% között ingadozott (*2. ábra*). A legkisebb értékeket a 2., 10. és 12. kísérleti beállításoknál tapasztaltuk. Az összes *Fusarium*on belül a fehér micélium telepet képző *Fusarium*ok előfordulása 48 és 83% között, míg a piros pigmentet termelő *Fusarium*ok előfordulása 14 és 48% között változott.

*2. ábra*: **Búza minták belső *Fusarium* fertőzöttsége**

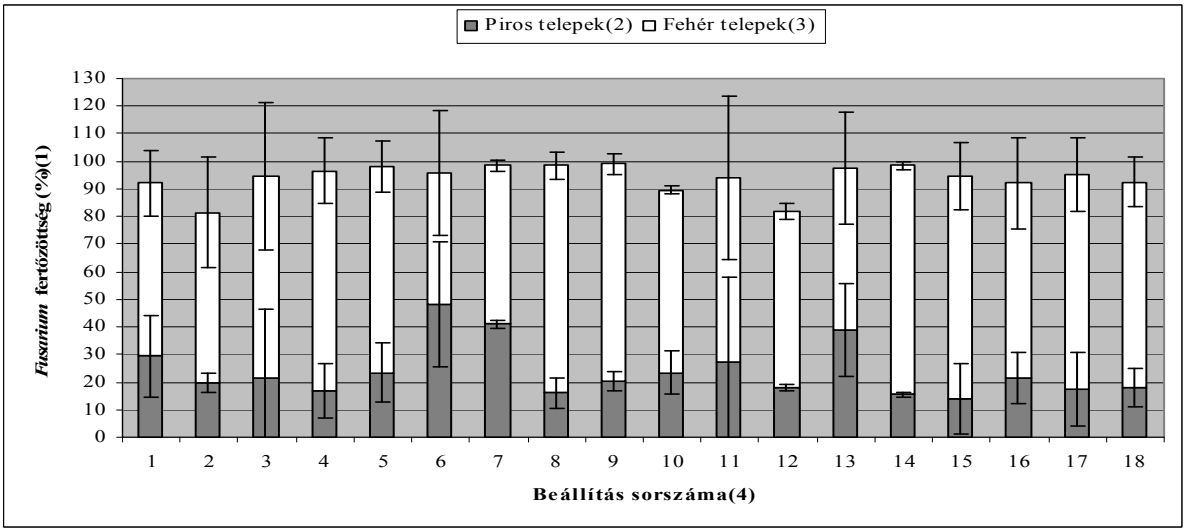



*Figure 2: Internal Fusarium infection of wheat samples*
Fusarium infection (%)(1), red colony(2), white colony(3), number of setting(4)

Az eltérő vetésforgó és a búza *Fusarium* fertőzöttsége közötti összefüggést vizsgálva az eredményeink alapján az állapítható meg, hogy nincs szignifikáns különbség közöttük. Ahogy az a *3. ábrán* is látható a

bikultúra (kukorica - búza) és trikultúra (kukorica - borsó - búza) esetén a *Fusarium* fertőzöttség nagyon hasonlóan alakult.

*3. ábra*: **Vetésforgó hatása a búza minták belső *Fusarium* fertőzöttségére**

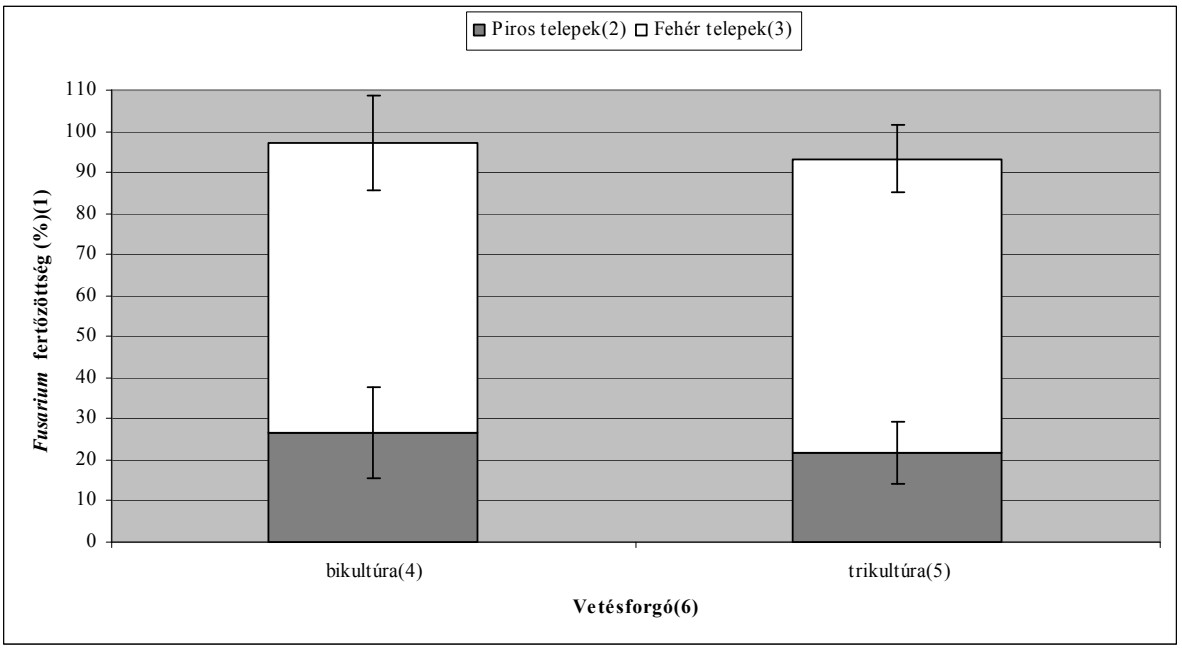



*Figure 3: Effect of crop rotation on the internal Fusarium infection of wheat samples*
Fusarium infection (%)(1), red colony(2), white colony(3), biculture(4), triculture(5), crop rotation(6)

A különféle intenzitású növényvédelmi kezelések és a búza *Fusarium* fertőzöttsége közötti összefüggést vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az extenzív (3 alkalommal történő fungicides kezelés) növényvédelmi kezelés esetén szignifikánsan kisebb ($P<0,05$) volt a búzaszemek *Fusarium* fertőzöttsége, mint az extenzív és az átlagos kezelés esetén. Bár még ez az alacsonyabb érték is nagyobb, mint 90% (*4. ábra*).

*4. ábra*: **Növényvédelem hatása a búza minták belső *Fusarium* fertőzöttségére**

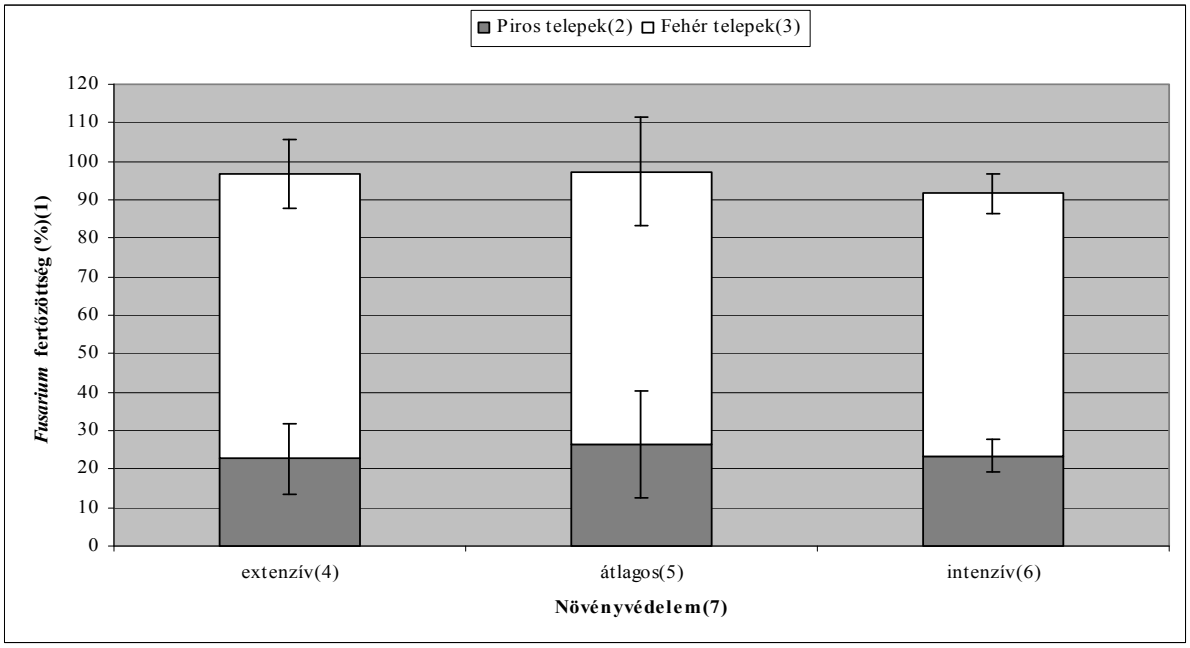



*Figure 4: Effect of plant protection on the internal Fusarium infection of wheat samples*
Fusarium infection(%)(1), red colony(2), white colony(3), extensive(4), average(5), intensive(6), plant protection(7)

Az eltérő nitrogén műtrágya adagok hatását vizsgálva, arra a megállapításra jutottunk, hogy a fertőzöttség szempontjából nem volt szignifikáns különbség a három dózis között. Ebben az esetben is 90% felett volt mind a három beállítás esetén a búzaszemek *Fusarium* fertőzöttsége (*5. ábra*).

*5. ábra*: **Nitrogén műtrágya hatása a búza minták belső *Fusarium* fertőzöttségére**

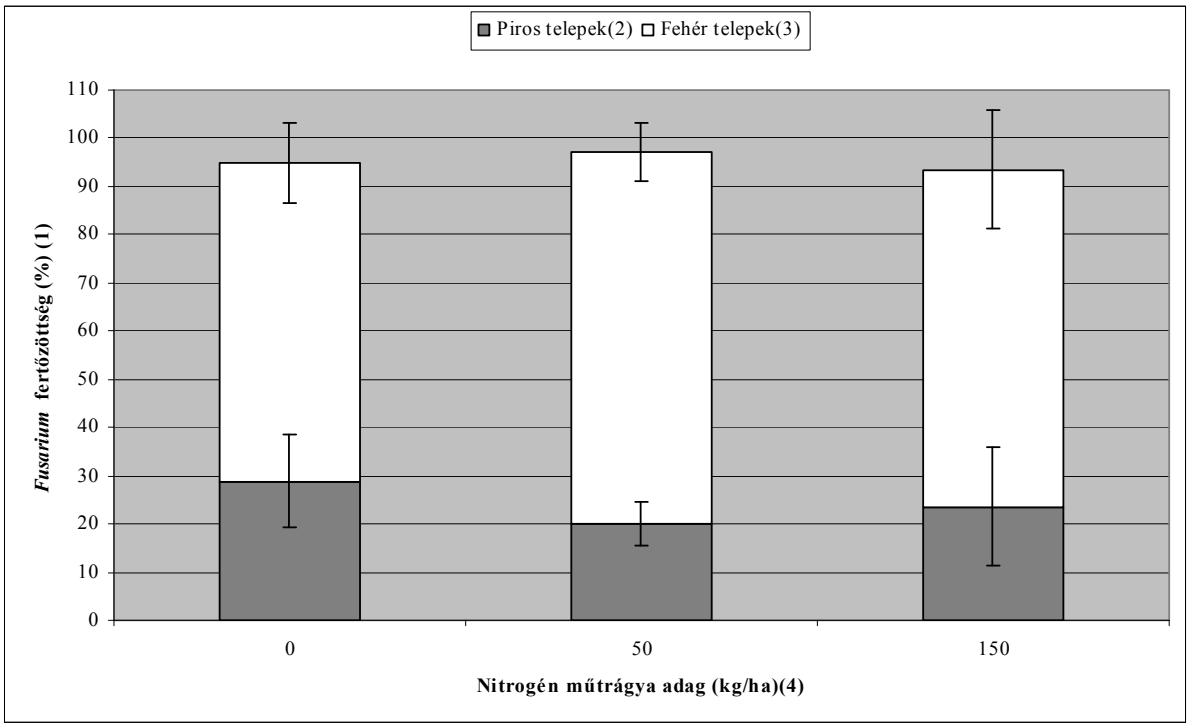



*Figure 5: Effect of nitrogen fertilizer on the internal Fusarium infection of wheat samples*
Fusarium infection(%)(1), red colony(2), white colony(3), nitrogen fertilizer dose (kg $ha^{-1}$)(4)

**Búzaminták DON toxin szennyezettségének alakulása**

A búzaminták DON toxin szennyezettségére vonatkozóan az Európai Unió 500 µg/kg alatti határértéket ír elő. Vizsgálataink során a 18 kísérleti beállítás közül csupán egy esetben (6. beállításnál 650 µg/kg) tapasztaltunk határérték fölötti eredményt. A többi beállításból származó minták esetén határérték alatt volt a DON toxinok mennyisége (*2. táblázat*).

*2. táblázat*

**Búzaminták DON toxin szennyezettségének alakulása**

| Beállítás sorszáma(1) | DON (µg/kg)(2) | Beállítás sorszáma(1) | DON (µg/kg)(2) | Beállítás sorszáma(1) | DON (µg/kg)(2) |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | <500 | **7** | <500 | **13** | <500 |
| **2** | <500 | **8** | <500 | **14** | <500 |
| **3** | <500 | **9** | <500 | **15** | <500 |
| **4** | <500 | **10** | <500 | **16** | <500 |
| **5** | <500 | **11** | <500 | **17** | <500 |
| **6** | ***650*** | **12** | <500 | **18** | <500 |

*Table 2*: *DON toxin contamination of wheat samples*
Number of setting(1), DON (µg $kg^{-1}$)(2)

## *KÖVETKEZTETÉSEK*

A 18 kísérleti beállítás esetén a búzaminták penészgombaszámát illetően elmondható, hogy a búza mintákon $10^3$ TKE/g nagyságrendben találhatóak penészgombák. Az egyes beállítások között szignifikáns különbségeket tapasztaltunk. A legnagyobb penészgombaszámot a 9. beállítás (bikultúra – extenzív növényvédelem – 150 kg/ha nitrogén műtrágya adag) esetén tapasztaltuk.

A búzaminták belső *Fusarium* fertőzöttségét vizsgálva igen magas (80 és 100% közötti) értékeket kaptunk. A fehér színű micélium telepet képző *Fusarium*ok jóval nagyobb arányban fordultak elő, mint a piros pigmentet termelők.

A vetésforgó, növényvédelem és nitrogén műtrágya adag és a búza *Fusarium* fertőzöttsége közötti összefüggést vizsgálva csak az eltérő növényvédelmi kezelések esetén tapasztaltunk szignifikáns különbséget. Az intenzív (háromszori fungicides) kezelés esetén ugyanis szignifikánsan alacsonyabb fertőzöttségi értéket kaptunk.

A búzaminták DON toxin tartalma, valamint a penészgombaszáma és *Fusarium* fertőzöttsége közötti összefüggést vizsgálva, a szakirodalmi adatokhoz hasonlóan, a mi kutatási eredményeink is alátámasztották azt az állítást, hogy a búza mikotoxin tartalma nem egyenesen arányos a penészgombaszámmal és a *Fusarium* fertőzöttséggel.

## *KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS*

A publikáció elkészítését a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú, a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 számú és a HURO/1001/323/2.2.2. számú projekt támogatta.

### *IRODALOM*

Ácsné Kovacsics L.- Búza L. (2007): Mikotoxin vizsgálati eredmények a hazai élelmiszerekben. Élelmiszervizsgálati Közlemények, 53. 83-86.

Booth, C. (1971): The genus *Fusarium*. C.M.I. Kew. Surrey. 237.

Edward, S.G. (2007): Impact granony on mycotoxin contamination of wheat and oats. SUSWAR proceedings.- Fusarium workshop. Fusarium diseases in cereals. 14.

Érsek T.-Gábotján R. (1998): Növénykórokozó mikroorganizmusok. ELTE Eötvös Kiadó Kft. Budapest. 288.

Halász Á.-Tóth Á (2011): A hazai ősz búza tételek *Fusarium* fertőzöttsége 2010-ben. Agrofórum extra, 41. 43-46.

Halász Á-Valovics A. (2012): A magyarországi őszi búza *tételek Fusarium*-fertőzöttség felmérésének eredményei 2011-ben. Agrofórum. 28-31.

Kiskó G. (1999): A penésztartalom meghatározására alkalmas módszerek I. Tenyésztéses mikrobiológiai és mikroszkópos módszerek. Élelmiszervizsgálati Közlemények, 45. 9-16.

Kovács F. (1998): Mikotoxinok a táplálékláncban. Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományok Osztálya. Budapest. 160.

Mesterházy Á. (2007): Mikotoxinok a gabonatermesztésben: az élelmiszerbiztonsági kihívás. Élelmiszerbiztonsági Közlemények, 53. 38-48.

Mesterházy Á.-Bartók T.-Lamper Cs. (2003): Influence of cultivar resistance, epidemic severity, and *Fusarium* species on the efficacy of fungicide control of *Fusarium* head blight in wheat and deoxynivalenol (DON) contamination of grain. Plant Disease, 87. 1107-1115.

MSZ ISO 7954: 1999. Mikrobiológia. Általános útmutató élesztők és penészek számlálásához. Telepszámlálási technika 25 °C-on

Motulsky, H.J. (1999): Analyzing Data with GraphPad Prism. GraphPad Software Inc., San Diego CA.

Pepó P. (2003): A műtrágyázás hatása az őszi búza fajták minőségére hajdúsági csernozjom talajon. Növénytermelés, 52. 5. 521-534.

Pepó P. (2004): Őszi búza fajtaspecifikus tápanyag-reakciójának vizsgálata tartamkísérletben. Növénytermelés, 53. 4. 329-338.

Racskó J. (2005): A tápanyagellátás és a termésminőség összefüggése az ősz búza esetén. Agrárágazat, 6. 2. 32-34.

Scudamore, K.A. (1993): Occurence and significance of mycotoxin in cereals grown and stored in the United Kingdom. Aspects of Applied Biology. 36. Cereal Quality III. 361-373.

Sohár P.né. (2007): Mikotoxinok az élelmiszerláncban. Élelmiszervizsgálati Közlemények, 53. 60-67.

Szécsi Á.-Mesterházy Á. (1998): Szelektív táptalaj alkalmazása *Fusariumok* izolálására és azonosítására gabona- és kukoricaszemekből. Növényvédelem, 34. 2. 61-66.

Szeitzné Szabó M.-Ambrus Á.-Cseh J.-Hámos A.-Szerleticsné Túri M. (2009): Gabonaalapú élelmiszerek Fusarium toxin szennyezettségének csökkentési lehetőségei. MÉBIH. 33.

Sweeney, M.J.-Donson, A.D. (1998): Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. International Journal of Food Microbiology, 43. 141-158.

Tóth Á. (2009): A hazai búzatételek fuzáriumos fertőzöttségének alakulása az utóbbi években. Növénytermesztés, 44. 46-47.

Internet1: Rendszertani besorolás. http://www.indexfungorum.org/names/names.asp

Internet2: Összefogással a Fuzárium toxinok ellen. http://www.agroinform.com/aktualis/Agroinform-Hirszolgalat-Osszefogassal-a-Fuzarium-toxinok-ellen/20091203-10433/

# Molecular biology characterization of *Cryphonectria parasitica* (MURR.) BARR isolates from different Carpathian-Basin plots

**Görcsös Gábor – Tarcali Gábor – Irinyi László – Radócz László**
Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma Mezőgazdaságtudományi Kar Növényvédelmi Intézet Debrecen
gorcsosgabi@hotmail.com

***SUMMARY***

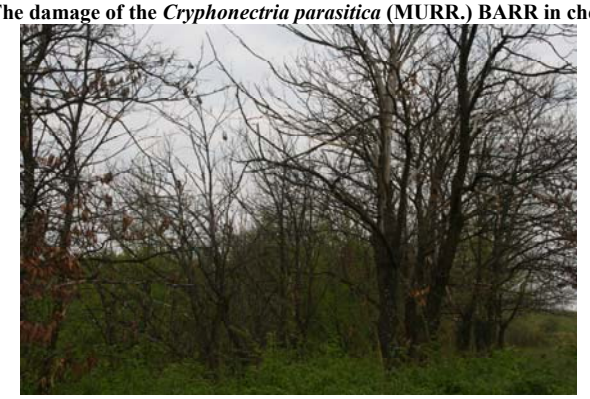
*The Cryphonectria parasitica (MURR.) BARR fungus is one of the most serious chestnut disease in Europe and North America. It originated from Eastern Asia and it was introduced into North America at the beginning of 20th century where it devastated the American chestnut (Castanea dentata, Fagaceae, Fagales) causing serious damage in orchards and in forests (Anagnostakis, 1987). Carpathian-Basin - can be found in the Mecsek, the Zala hills, the Somogy hills in Hungary, and the Foothills of the Alps in significant populations but also near the precinct of the Danube Bend and certain parts of the North Hungarian Mountains. Beyond our borders , it is produced in several regions of Slovakia and Ukraine, slopes of the Carpathian Mountains, the southern slopes and valleys of Kőhát and Gutin mountain around in Northern Transylvania, Nagybánya as well as the on the borders of Croatia, Slovenia and Austria. In Hungary, the first time when the symptoms of the disease was reported by Körtvély in 1969, but for nowadays the chestnut blight is an important and widespread plant disease in Hungary. The fungus kills the infected tree branches and the rapid death of the entire tree take place which is causing high environmental and economic concerns. In this study, we have tried to characterize the Cryphonectria parasitica isolates collecting from different Hungarian plots. Several studies using different molecular markers have been published to infer population genetic parameters and genetic diversity among the isolates originated from different regions (Hoegger et al., 2000; Marra et al., 2004; Breuillin et al., 2006; Milgroom et al., 2008). In this study we employed a part of the translation elongation factor 1 subunit alpha (EF-1α=tef1) containing both introns and exons and ITS region containing the internal transcribed spacer regions 1 and 2 and the 5.8S rDNA, as a potential genetic markers to characterize among Cryphonectria parasitica isolates.*

**Keywords:** *Cryphonectria parasitica*, ITS region, *tef1*, genetic diversity, Carpathian-Basin, chestnut

## *INTRODUCTION*

Chestnut - also native to the Carpathian-Basin - can be found in the Mecsek, the Zala hills, the Somogy hills in Hungary, and the Foothills of the Alps in significant populations but also near the precinct of the Danube Bend and certain parts of the North Hungarian Mountains. Beyond our borders , it is produced in several regions of Slovakia and Ukraine, slopes of the Carpathian Mountains, the southern slopes and valleys of Kőhát and Gutin mountain around in Northern Transylvania, Nagybánya as well as the on the borders of Croatia, Slovenia and Austria. The heterothallic ascomycete fungus, *Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr* (Syn. *Endothia parasitica* [Murr.] And.) and the casual agent of chestnut blight disease, is one of the most important fungal pathogens of chestnut in Europe and North America. It originated from Eastern Asia and it was introduced into North America at the beginning of 20th century where it devastated the American chestnut (*Castanea dentata, Fagaceae, Fagales*) causing serious damage in orchards and in forests (Anagnostakis, 1987). In the middle of the last century the pathogen was transferred into Europe (Braghi, 1946) and infected the European chesnut populations (*Castanea sativa* Mill). The pathogen kills the infected tree branches and the rapid death of the entire tree take place which is causing high environmental and economic concerns (Figure 1).

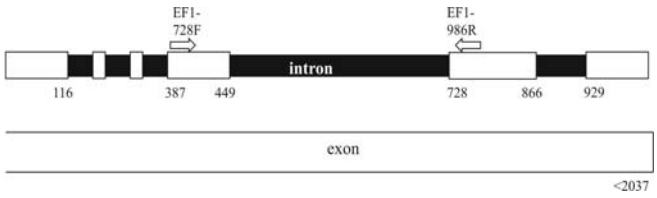
*Figure 1*: **The damage of the *Cryphonectria parasitica* (MURR.) BARR in chestnut trees**



In this study we employed a part of the translation elongation factor 1 subunit alpha (EF-1α=tef1) containing both introns and exons and ITS region containing the internal transcribed spacer regions 1 and 2 and the 5.8S rDNA, as a potential genetic markers to infer phylogenetic relationships among *Cryphonectria parasitica* isolates. Translation elongation factor 1 (Figure 2) subunit alpha (EF1α=*tef*1) is part of the cytosolic EF1

complex, whose primary function is to promote the binding of aminoacyl-tRNA to the ribosome in a GTP-dependent process (Moldave, 1985). Simultaneously, elongation factor 1α (EF-1α) is a highly conserved ubiquitous protein that has been suggested to have desirable properties for phylogenetic inference and population genetic studies (Roger *et al.*, 1999).

*Figure 2*: **Schematic structure of *tef1* gene and location of primers for phylogenetic analyses**




Ribosomal DNA (rDNA) has long been used as a potential marker for phylogenetic studies (reviewed in Avise, 2004). rRNA genes are organized in clusters of tandemly repeated units, (Figure 3.) each of which consists of coding regions (18S, 5.8S, and 28S; Gerbi, 1985) and 2 internal transcribed spacers (ITS) and intergenic spacer (formerly called the „ Non-Transcibed Spacer, NTS) region. While the coding regions are evolutionarily conserved and have been utilized for phylogenetic inferences for major phyla (reviewed in Hills and Dixon 1990), the 2 ITS regions are appropriate for detecting differences between co-specific individuals and are hence potentially useful markers to study the relationships of populations and closely related species in fungal, plant, and animal taxa due to their relatively rapid evolutionary rates (Baldwin, 1992; Schlötterer *et al.*, 1994; Mai and Coleman, 1997; Weekers *et al.*, 2001).

*Figure 3*: **Schematic structure of ITS region in *Phoma* spp. and location of primers for phylogenetic analyses**

## *MATERIALS AND METHODS*

### Isolates

In this study we analyzed 40 *Cryphonectria parasitica* strains isolated from the Carpathian-basin (Table 1 and Figure 4). Bark samples were collected from chestnut trees located in geographically determined (GPS) areas. In each site, bark samples were collected from the margin of cankers on at least 10 evenly distributed, blighted stumps. Only one bark sample was collected from each stump to avoid sampling clones. Individual samples were surface disinfected in 70% ethanol, rinsed in sterile water and then placed on PDA (40g potato dextrose agar, Scharlau, 1 l tap water). Plates were incubated at 24 °C in the dark for 7 days and ll cultures were checked for typical *Cryphonectria parasitica* characteristics. In the analyses, other *Cryphonectria parasitica* isolates were included from GenBank maintained by NCBI (GenBank; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

### Culture morphology and growth

Isolates were grown on PDA (40 g L-1) in 90mm diam. Petri dishes are incubated at 25 °C in the dark for one week. The cultures were then exposed to diffuse daylight at room temperature on the laboratory bench, and culture morphology was recorded once a week for a period of 4 weeks.

### DNA extraction

For molecular works the studied cultures were grown in 100 ml of malt broth (MB, containing 2% malt extract) for 48 hours at room temperature in the dark on a rotary shaker (125 rpm).

Mycelium from each culture was transferred to 100 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml MB. The cultures were grown at room temperature for 48 hours in the dark on a rotary shaker (125 rpm). Mycelia were harvested by vacuum filtration. Total genomic DNA was extracted from freeze-dried mycelium and isolated using NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, 740770) according to the protocol, followed the manufacturer's instructions. DNA concentrations were measured by NanoDrop (Thermo Scientific)

### Amplification of the large intron *tef1* gene

Amplifications of 50 ml PCR reaction mixture contained 25 ml 2xPCR Master Mix (Fermentas, #K0171, Burlington, Canada), 40–40 pmol each primer, 20–40 ng DNA and nuclease free water were run out.

Primers used to amplify the large intron of the *tef1* gene was amplified by the EF1-728F (5'- CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG -3' ) and EF1-986R (5'- TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC -3' ) primer pair (Druzhinina

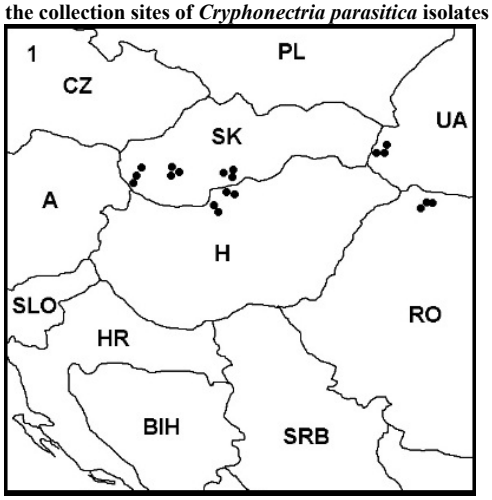
and Kubicek, 2005) according to the following program: 3 min initial denaturing at 95°C, followed by 5 cycles of 1 min at 95°C, 1 min annealing at 59°C, 1 min at 72°C and 25 cycles of 1 min at 90°C, 1 min annealing at 59°C, 1min at 72°C and 15 min final extension at 72°C. PCR was performed in a Primus (MWG Biotech, Martinsried, Germany) thermocycler. Amplification products were subjected to electrophoresis in a 0.7 % agarose gel containing EtBr for 1 hour and visualized by UV illumination. The PCR products were purified by using YM-100 Microcon Centrifugal Filter Devices (Millipore, Billerica, USA). Purified amplification products were sequenced by MWG Biotech in Germany.

*Table 1*

**Origine of *Cryphonectria parasitica* isolate**

| Name of the samples | Country | Location | Date of the collection |
|---|---|---|---|
| B1 | Hungary | Nagymaros | 13 may 2011 |
| C1 | Hungary | Nagymaros | 13 may 2011 |
| E3 | Hungary | Nagymaros | 13 may 2011 |
| F4 | Hungary | Nagymaros | 13 may 2011 |
| N2 | Hungary | Nagymaros | 13 may 2011 |
| ERSEK2 | Hungary | Érsekvadkert | 13 may 2011 |
| ERSEK3 | Hungary | Érsekvadkert | 13 may 2011 |
| BOB1-1 | Ukraine | Bobovyshche | 23 april 2011 |
| BOB1-3 | Ukraine | Bobovyshche | 23 april 2011 |
| BOB2-2T | Ukraine | Bobovyshche | 23 april 2011 |
| BOB2-3 | Ukraine | Bobovyshche | 23 april 2011 |
| BOB2-4T | Ukraine | Bobovyshche | 23 april 2011 |
| BOB3-1 | Ukraine | Bobovyshche | 23 april 2011 |
| BOB3-3 | Ukraine | Bobovyshche | 23 april 2011 |
| RO4 | Ukraine | Rostovjatica | 23 april 2011 |
| RO6 | Ukraine | Rostovjatica | 23 april 2011 |
| S1 | Ukraine | Serednje | 23 april 2011 |
| S3 | Ukraine | Serednje | 23 april 2011 |
| VEVI1 | Romania | Baia Mare | 7 september 2011 |
| VEVI2 | Romania | Baia Mare | 7 september 2011 |
| FEL1T | Romania | Baia Mare | 7 september 2011 |
| FEL4 | Romania | Baia Mare | 7 september 2011 |
| TG2 | Romania | Baia Mare | 7 september 2011 |
| TG4 | Romania | Baia Mare | 7 september 2011 |
| KOBA2 | Romania | Baia Mare | 7 september 2011 |
| KOBA4T | Romania | Baia Mare | 7 september 2011 |
| KEK2 | Slovakia | Modrý Kameň | 8 december 2011 |
| KEK4 | Slovakia | Modrý Kameň | 8 december 2011 |
| KEK6 | Slovakia | Modrý Kameň | 8 december 2011 |
| KEK8 | Slovakia | Modrý Kameň | 8 december 2011 |
| PAR4 | Slovakia | Párovské Háje | 18 january 2012 |
| PAR5 | Slovakia | Párovské Háje | 18 january 2012 |
| PAR9 | Slovakia | Párovské Háje | 18 january 2012 |
| MOD1 | Slovakia | Modra | 18 january 2012 |
| MOD4 | Slovakia | Modra | 18 january 2012 |
| BRAT1 | Slovakia | Bratislava | 18 january 2012 |
| BRAT3 | Slovakia | Bratislava | 18 january 2012 |
| SVE1 | Slovakia | Svätý Jur | 18 january 2012 |
| SVE3 | Slovakia | Svätý Jur | 18 january 2012 |

*Figure 4*: **Map showing the collection sites of *Cryphonectria parasitica* isolates involved in this study**




**Amplification of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) and translation elongation factor 1-alpha (tef1) and sequencing**

Amplifications of 50 µl PCR reaction contained 25 µl 2X PCR Master Mix (ImmoMix, Bioline, 25020), 40-40 pmol each primer, 20-40 ng of genomic DNA and nuclease free water were run out.

Primers (IDT) used to amplify approx. 520bp of the ITS region containing the internal transcribed spacer regions 1 and 2, moreover the 5.8S rDNA are based on published composite sequences, SR6R and LR1 (White *et al*., 1990) with the following amplification protocol: 3 min initial denaturing at 95°C, followed by 5 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min annealing at 50 °C, 1 min at 72 °C and 25 cycles of 1 min at 90°C, 1 min annealing at 50°C, 1 min at 72 °C and 15 min final extension at 72 °C.

The large intron (approx. 300bp) of the *tef1* gene was amplified by the EF1-728F and EF1-986R primer pair (Druzhinina and Kubicek 2005) according to the previously described protocol with a temperature of 56 °C rather than 50°C.

PCR was performed in a Primus (MWG Biotech) thermocycler. Amplification products were subjected to electrophoresis in a 0.7 % agarose gel containing EtBr and visualized by UV illumination. The PCR products were purified by using Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, 740609). Purified amplification products were sequenced by MWG Biotech Company in Germany.

**Data analysis**

The obtained DNA sequences were aligned first with ClustalX (Thompson *et al.,* 1997) automatically and manually checked for ambiguities and adjusted, when necessary, using Genedoc (Nicholas *et al.,* 1997). Single gaps were treated either as missing data or as the fifth base and multistate characters as uncertain. In phylogenetic analyses *tef1* and ITS fragments of other *Cryphonectria parasitica* from GenBank maintained by NCBI were also included. Parsimony analyses (Kluge and Farris 1969; Farris 1970; Fitch 1971) were performed using PAUP 4.0 (Swofford 2002) and consisted of heuristic searches with 1 K random addition sequences and tree bisection–reconnection (TBR) branch swapping. All characters were equally weighted and alignment gaps were treated as missing data. The stability of clades was assessed with 1 K BS replications. Phylogenetic trees were drawn by TREEVIEW (Page 1996).

***RESULTS***

The genomic DNA concentrations after the extraction were about 100 ng/µl. PCR amplifications resulted in single fragments of ca 350bp of *tef1* fragment and in single fragments approx. 560bp of the rDNA gene containing the internal transcribed spacer regions 1 and 2 and the 5.8S regions was amplified. There was no size variation observed among amplified *tef1* and ITS fragments.

ITS fragments to 547 bp to aid alignment with sequences downloaded from GenBank. Parsimony analysis of the ITS fragment revealed 299 constant sites, 172 parsimony-informative sites, and 76 parsimony -uninformative sites among all isolates.

The phylogentic tree based on ITS sequencse (Figure 5) is drawn by parsimony analysis. Topological robustness in parsimony analysis was estimated using 1000 bootstrap replicates. The numbers above the lines on the Fig. 4 represent the bootstrap values which support the robustness of the clades. The *C. parasitica* isolates are grouped in several clades which indicates the high variability in ITS sequences. However the clades do not represent the studied geographical regions. The isolates originated from the same regions are not grouped together, they are found mixed in different groups. The ITS sequences downloaded from the GenBank are also found in different clades on the phylogenetic trees. The robustness of the tree was supported by relative high bootstrap values.

*Figure 5*: **Phylogenetic relationships of *Cryphonectria parasitica* strains inferred by Parsimony analysis of ITS sequences. The numbers above the lines represent the bootstrap (bootstrap=1000) values. Our isolates are indicated by different colors, the isolates downloaded from GenBank indicated by black color**

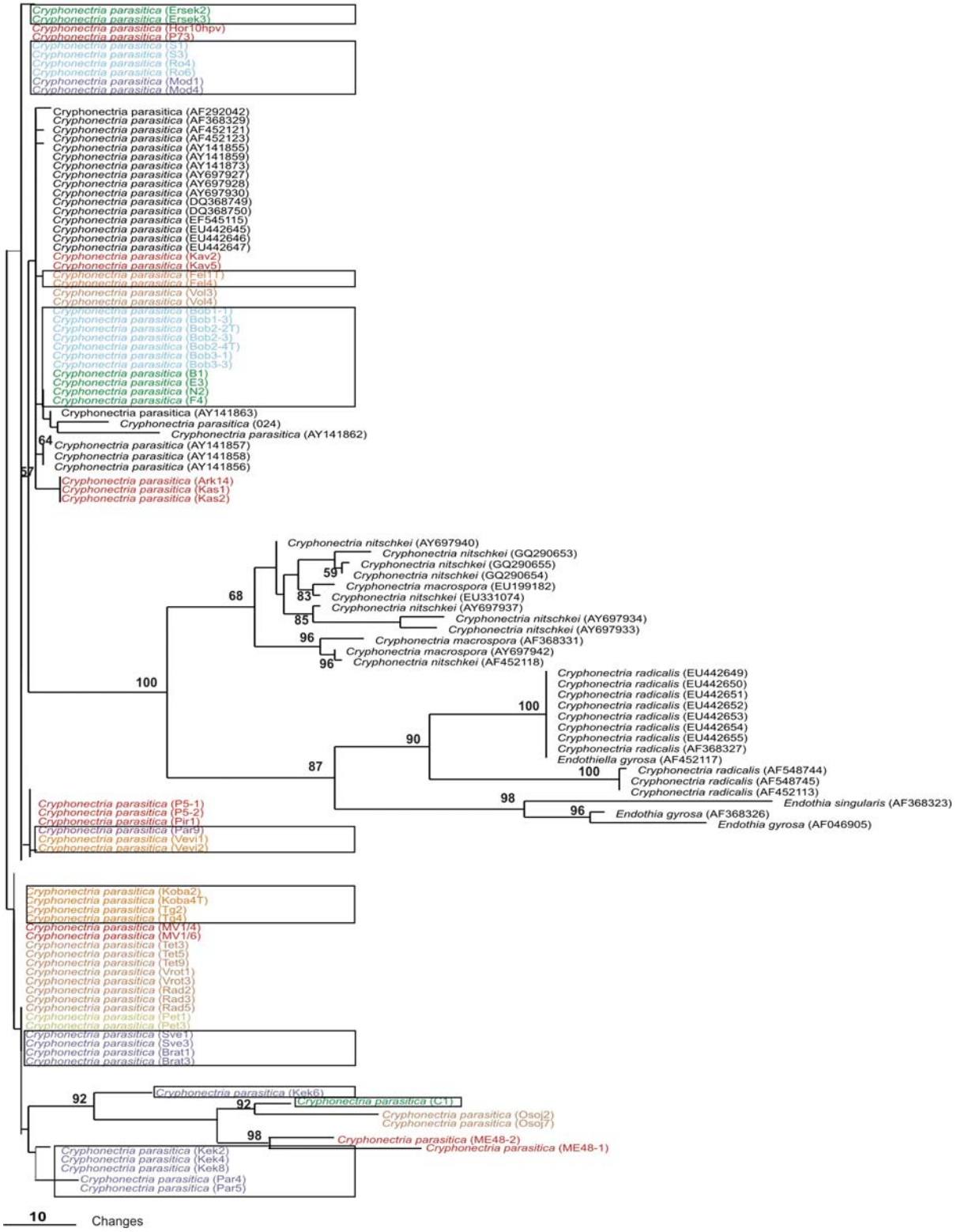
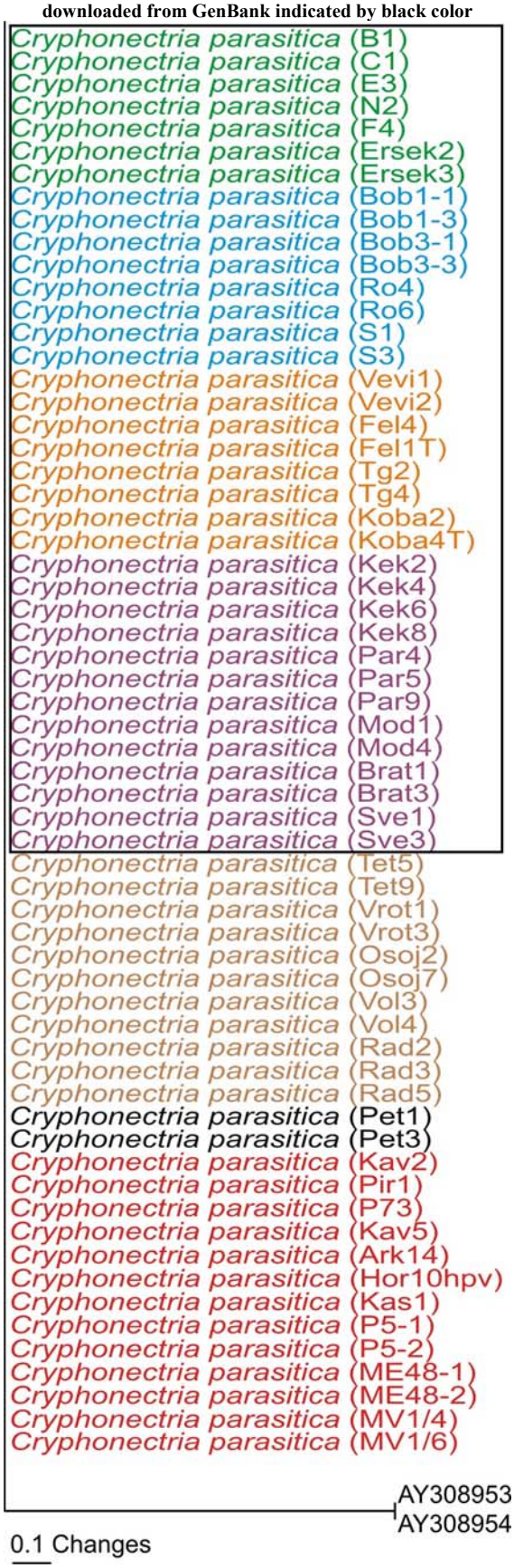


*Figure 6*: **Phylogenetic relationships of *Cryphonectria parasitica* strains inferred by Parsimony analysis of *tef1* sequences. The numbers above the lines represent the bootstrap (bootstrap=1000) values. Our isolates are indicated by different colors, the isolates downloaded from GenBank indicated by black color**



*Tef1* sequences were edited to 320bp for the alignment. At the time of the analyses, only two *tef1* sequences were available in the database. In the case of *tef1* fragment, no differences were found during the alignment. The *tef1* sequences of all isolates were perfectly identical.

The phylogenetic tree based on partial sequences of EF-1α genes sequences (Figure 6.) is drawn by parsimony analysis. Parsimony analysis of the *tef1* fragment did not revealed any estimable values. Only little differences were found between the *tef1* sequences of our isolates and the ones downloaded form GenBank but this could be attributed to the mis-sequencing of the *tef1* sequences found in the GenBank. Our results show that there is no variability in *tef1* sequences among *C. parasitica* isolates collected from Europe.

## *CONCLUSIONS*

In this study we tried to use ITS sequences and Translation elongation factor 1 subunit alpha (EF1α) encoding gene (*tef1*) to resolve phylogenetic relationships at intra specific level among *Cryphonectria parasitica* isolates collected from different geographical regions of Central-Europe. The ITS sequences proved variable but this kind of variability does not represent the geographical regions where they were collected. Our results shows that the ITS sequences are suitable for phylogenetic studies among *C. parasitica* isolates but they do not represent geographical distributions. Further work need to be done to see whether there are other characteristics which is correlates with the variability of IT sequences. Translation elongation factor 1 subunit alpha (EF1α) encoding gene (*tef1*) has been proved to be a useful gene to resolve phylogenetic relationships at species level, as well as in deeper divergences of fungi (Roger *et al.,* 1999; Druzhinina and Kubicek 2005). In our study, the *tef1* sequences have not showed any differences, they were identical in all isolates supporting that these sequences remained conservative within this species. The result shows that the *tef1* sequences are not well suited for delineating phylogenetic relationships within *C. parasitica* isolates collected from different regions of Europe.

In the future, it would be interesting to study the phylogenetic relationships among *C. parasitica* isolates but collected from other continent like Asia or North-America. The difference among the *Cryphonectria parasitica* isolates originated from the Carpathian-Basin was not insignificant because only six sites were considered as informative for the parsimony analysis. The bootstrap values were not enough high either to support real differences among isolates. Significant, well based differences were not found between Hungarian isolates. Little differences were found between Hungarian, Greek and isolates from database which constitute separate groups. It show also that the *tef1* sequences could be suitable for studying *C. parasitica* isolates originated from geographical places far away from each other. As the differences among the different studied isolates were insignificant, we mean that the evolutionary distance by *tef1* sequences within *Cryphonectria parasitica* isolates is too small to get well based consequences for the population diversity of this species.

### *REFERENCES*


Anagnostakis SL, (1987). Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. Mycologia 79: 23–37.

Baldwin, B.G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. Molecular Phylogenetics and Evolution 1: 3-16.

Braghi, A. (1946). Il cranco del castagno causato da *Endothia parasitica* Ital. Agric. 7: 406-412.

Breuillin F. Dutech C. Robin C. (2006). Genetic Diversity of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers. Mycological research 110, 288-296.

Druzhinina, I., Kubicek, C.P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species cluster? Journal of Zhejiang University Science 6B: 100-112.

Farris, J.S. (1970). Estimating phylogenetic trees from distances matrixes. American Nature 106: 645-668.

Fitch, W.M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Systematic Zoology 20: 406-416.

Hoegger, P.J., Rigling, D., Holdenrieder, O., Heiniger, U. (2000). Genetic structure of newly established populations of *Cryphonectria parasitica*. Mycological Research 104: 1108-1116.

Kluge, A.G., Farris, J.S., (1969). Quantitative phyletics and the evolution of anurans. Systematic Zoology 18: 1-32.

Mai, J.C. and Coleman, A.W. (1997). The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. Journal of Molecular Evolution 44: 258-271.

Marra, R.E., Cortesi, P. Bissegger, M., Milgroom, M.G. (2004). Mixed mating in natural populations of the chestnut blight fungus. *Cryphonectria parastica*. Heredity 93: 189-195.

Milgroom, M.G., Sotirovski, K., Spica, D., Davis, J.E., Brewer, M.T., Milev, M., Cortesi, P. (2008). Clonal population structure of the chestnut blight fungus in expanding ranges in southeastern Europe. Molecular Ecology 17: 4446-4458.

Moldave, K. (1985). Eukaryotic protein synthesis. Annual review of biochemistry 54: 1109-1149.

Nicholas, K.B., Nicholas, Jr. H.B., Deerfield, II D.W.I. (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. Embnew news 4: 14.

Page, R.D.M. (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358.

Roger, A.J., Sandblom, O., Doolittle, W.F., Philippe, H. (1999). An evaluation of elongation factor 1α as a phylogenetic marker for eukaryots. Molecular biology and evolution 16: 218-233.

Schlötterer, C., Hauser, M., Haeseler, A. von, Tautz, D**.** (1994). Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. Molecular Biology and Evolution 11: 513-522.

Swofford, D.L. (2002). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

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.

Weekers, P.H.H., Jonckheere, F.J.,de, Dumont, H.J. (2001). Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representative of the genus *Calopteryx* (Insecta: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent west European zone. Molecular Phylogenetics and Evolution 20: 89-99.

# Az okra (*Abelmoschus esculentus* Moench) rizoktónia ellenállóságának vizsgálata

# Strain dependent response of okra (*Abelmoschus esculentus* Moench) to soil-borne rhizoctonia infection

**Bittsánszky András[1] - Vittal Ravishankar Rai[2] - Oros Gyula[1]**
[1]MTA ATK Növényvédelmi Intézet, Budapest
[2]Dept. Studies in Microbiology, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore-, India
bittsanszky.andras@*agrar.mta.hu*

## ÖSSZEFOGLALÁS

*Az okra csírázását a különböző forrásokból származó rizoktónia törzsek eltérő mértékben gátolták, azonban ez a hatás független volt a törzsek származási helyétől és taxonómiai besorolásától. A* Rhizoctonia zeae *– Európában először budai telepített pázsitról izolált törzse – az okrával szemben patogénnek bizonyult, és a* R. solani *törzsekhez viszonyítva közepesen agresszív. A rizoktónia fertőzött talajban csírázó okra magoncok hipokotilja még azon esetekben is rövidült és megvastagodott, ha a betegségszindróma egyéb tünetei nem jelentek meg, és a csíranövény más vonatkozásokban a kontrollhoz hasonlóan fejlődött. A* R. zeae *az okrán és a vetésforgóba javasolt növényfajokon a* R. solani*hoz hasonló betegségtüneteket okozott, a tüneti kép növényegyedenként változott. A* R. zeae *gazdaköre leginkább a hagymáról és a pázsiton vele együtt előforduló* R. solani *törzsekéhez hasonlított. A vetésforgóba javasolt növények közül az* Eleusine coroacana *és a* Triticum spelta *üvegházi körülmények között toleránsnak bizonyult a R. zeae iránt.*

## *SUMMARY*

*Okra seedlings tolerated soil-borne* Rhizoctonia *infection in strain dependent manner. There was no connection revealed between pathogenity of strains and their origin or taxonomic position, however, the okra proved to be susceptible to strains highly pathogenic to other host plants as well.* R. zeae*, a species new for European fungi, was as aggressive to okra as the most potent* R. solani *strains. The effect of Rhizoctonia infection on mass accumulation of hypocotyls was more prominent than that of cotyledons. The syndroma picture of disease caused by* R. zeae *was indistinguishable of that caused by* R. solani *strains of various origin and taxonomic position. The host range of* R. zeae *similar to* R. solani *strains isolated from turf and onion. Amongst plants proposed for crop rotation in okra cultivation* Eleusine coroacana *and* Triticum spelta *proved to be tolerant to* R. zeae *in greenhouse provocative tests. The selection of tolerant okra varieties to these pathogenic fungi is important both for quality food production and crop rotation.*

**Kulcsszavak:** okra, rizoktónia, *Waitea circinata, Thanatephorus cucumeris*, betegség-ellenállóság
**Keywords:** okra, rhizoctonia, *Waitea circinata, Thanatephorus cucumeris*, susceptibilty

## *BEVEZETÉS*

Az okra (*Abelmoschus esculentus* Moench, Malvales, Malvaceae) afrikai eredetű növény, amit ma már az egész trópusi, szubtrópusi övezetben termesztenek. Kiválóan tűri a szárazságot és jól fejlődik szegény talajokon is. Főként zöld hüvelyeit fogyasztják, azonban a fiatal hajtások és a levelek is ehetők, akár főzelékként, akár nyersen, salátaként készítve. Az utóbbi évtizedekben kiváló beltartalmi értékei miatt fogyasztása Európában is növekszik. Az érett magvakból kb. 15% jó minőségű zöldessárga étolaj nyerhető (Martin, 1982), azonban az olajtartalom elérheti a 30%-ot is (May *et al*., 1990).

Az okra termesztése viszonylag biztonságos, kevés betegsége van, és a rovarok sem látogatják, így a növények többnyire egészségesek és rovarmentesek. Azonban néha előfordulhatnak mag- vagy talajeredetű gombafertőzések (Mohan *et al*., 2010), így *Fusarium oxysporum*, *Pythium* sp. (Kida *et al*., 2006), *Sclerotium rolfsii* (Koné *et al*., 2010) és *Rhizoctonia* (Golden and Vangundy, 1975) okozta tőpusztulás. A mageredetű kórokozók elleni vegyszeres és biológiai védekezés lehetőségeit alaposan megvizsgálták (Hema *et al*., 1991; Begum *et al*., 2003a,b; Pugliese *et al*., 2008). Az ellenálló fajták termesztése megfelelő művelési eljárások alkalmazásával ugyancsak biztonságos lehet (Begum *et al*., 2005, Begum 2006). A *Thanatephorus* anamorfák indolizidin típusú mikotoxinokat (1. ábra) termelhetnek, melyek részt vesznek a betegségszindróma kiváltásában. A gazdanövény és a kísérő mikrobióta deteriorációs képessége fontos szerepet játszik a rizoktóniákkal szembeni ellenállóságban (Shanmugam *et al*., 2001).

*1. ábra*: **A *Rhizoctonia leguminicola* Gough et Elliot termelte mikotoxinok szerkezete**

*Figure 1.*: Structure of mycotoxins produced by *Rhizoctonia leguminicola* Gough and Elliott.

Európában először Budapesten, ismeretlen eredetű magból telepített gyepen (*Lolium* és *Festuca*) lépett fel a – múlt század közepe óta az Egyesült Államokból terjedő új, kórokozó gomba – a *R. zeae* Voorhees (teleomorf: *Waitea circinata* Warcup & P.H.B. Talbot). A *R. solani* Kühn AG-4-es törzsével (teleomorf: *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk) közösen okozott pázsit pusztulást (Vajna and Oros, 2005a). Kövics és Lőrincz (2001) pedig beszámoltak a *Rh. cerealis* (teleomorf: *Ceratobasidium cereale* D.I. Murray and Burpee) első igazolt hazai előfordulásáról búzán. Mindhárom faj a *Ceratobasidiacae* (*Cantharellales, Basidiomycota*) családba tartozik. A rókagomba alkatúak rendjét alkotó hét család nemzetségeinek fajai többségükben szaprotrófok, vagy a növényekkel szimbiotikus kacsolatban élnek (Otero *et al.*, 2002; Moncalvo *et al.*, 2006), s utóbbiak a gyökér-rizoplán/rizoszféra mikrotérségben élő mikrobiális konzorciumok hasznos tagjai. A *Ceratobasidiaceae* családba tartozó nyolc nemzetség közül néhányba (*Ceratobasidium*, *Thanatephorus*, *Waitea*) fakultatív növénykórokozó fajok is tartoznak. Ezeket a gyakorlatban az anamorf nemzetségek szerint (*Ceratorhiza*, *Rhizoctonia*) nevezik meg (Kirk *et al.*, 2008). Gazdakörük széles, a fertőzések leggyakrabban talajeredetűek, a betegségszindróma tünetei változatosak, egyszerű szemrevételezéssel gyakran nehéz pontosan megítélni a kórokot. Tekintettel arra, hogy az okra Indiában fontos zöldségnövény, illetve termesztésének hazai kiterjesztése indokolt, szükségesnek láttuk a Kárpát medencében új, Indiában még ismeretlen kórokozó, a *R. zeae* iránti fogékonyságának vizsgálatát, illetve a *R. zeae* törzs agresszivitásának összehasonlítását különböző *Rhizoctonia* fajokéval. Bevontuk a vizsgálatokba az okra termesztésben vetésforgóba javasolt növényeket is (Kimenju *et al*., 2010).

## *ANYAG ÉS MÓDSZER*

A Növényvédelmi Intézet törzsgyűjteményéből származó, különböző forrásokból izolált rizoktónia törzseket burgonya-dextróz agaron tartottuk fenn. A csávázatlan okra magvakat, illetve az összehasonlításra használt többi növény magvait (1. táblázat) kereskedelmi forgalomból szereztük be.

A sterilizált barna erdőtalaj+tőzeg (3+1) keveréket tenyészedényben átszövettük a gombával, és a felszínére vetettük a magvakat, majd letakartuk 5 mm vastag steril keverékkel. Kontrollként a rizoktóniával nem fertőzött talaj szolgált. Nyomon követtük a csírázást, és az értékelést egy négyfokú skála (1. táblázat) szerint értékeltük a sziklevelek vagy a koleoptil teljes kifejlődése után a kontroll növényeken. A módszert korábban részletesen ismertettük (Vajna and Oros, 2005b: Bittsánszky *et al*., 2012).

Az eredmények elemzéséhez az Excel 2003 (Microsoft, Redmonton, USA) statisztikai funcióit és a Statistica 5 (StatSoft, Tusla, USA) programcsomagot használtuk. Az adatfeldolgozás eredményének grafikus ábrázolásához a Power Point 2003 (Microsoft, Redmonton, USA) programot használtuk.

## *EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS*

Az okra csíranövényeken a rizoktónia fertőzést követő megbetegedés elsődleges tünete a gyökérnyak epidermiszének barnulása, ami a fogékony kapcsolatban a gyökércsúcs irányába terjedő szövetrothadás után a csíra pusztulásához vezet (2. ábra). Amennyiben a gyökérnyakon csak különböző mélységű bemaródások keletkeztek, a csíranövény tovább fejlődött, egy részük azonban az első valódi levél kifejlődése előtt elhervadt. A túlélők azonban gyengén fejlődtek, a gyökérrendszer jelentősen visszamaradt, a mellékgyökerek többsége gyorsan elpusztult. Az ellenállónak tekintett esetekben a növények nem különböztek a kontrolltól, a gyökérrendszer jól fejlődött, azonban a gyökerekből készített metszetekben mikroszkópi vizsgálattal kimutatható volt a gomba jelenléte, továbbá esetenként az egyébként tünetmentes gyökerek felszínén nagy számú álszklerócium fejlődött. A *R. zeae* és a *R. solani* törzsek okozta tüneti kép hasonló. Csak mikroszkópi vizsgálattal lehetett megkülönböztetni őket az álszkleróciumok szerkezete alapján.

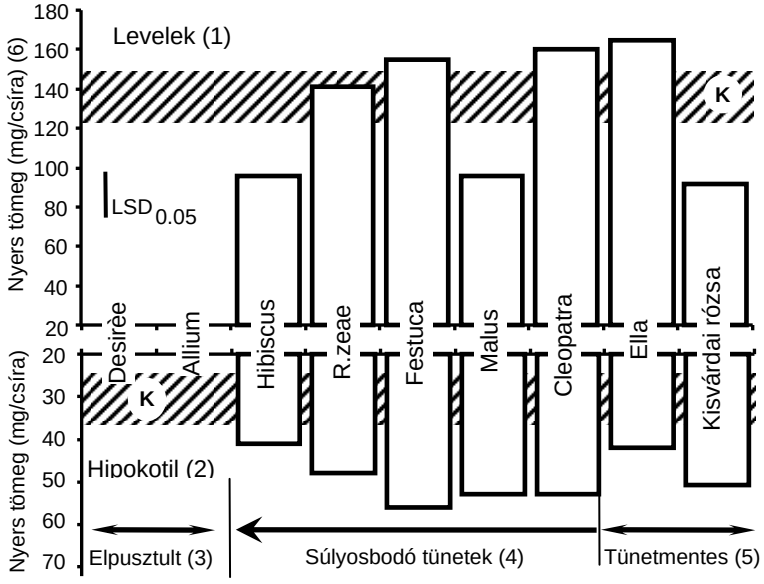
*2.ábra*: **A rizoktónia fertőzés elsődleges tünetei okra magoncokon**

Mag eredetű fertőzés (seed-borne infection) Talaj eredetű fertőzés (soil-borne infection, root neck rot)

*Figure 2*: Symptoms of *Rhizoctonia* infection on okra seedlings

Több esetben apró barna foltokat okozott a fertőzés a gyökereken, azonban ez nem feltétlenül vezetett a növekedés gátlásához. Az okra valódi leveleit egyik rizoktónia törzs sem fertőzte meg, míg a rokonfaj gyapot levelén a hagymáról és a hibiszkuszról izolált *R. solani* törzsek léziókat okoztak. A vizsgálatokba bevont többi gazdanövény esetében hasonló jelenségek voltak megfigyelhetők. A rizoktónia fertőzött talajban csírázó magoncok hipokotilja minden esetben rövidebb, de vaskosabb volt, mint a kontroll növényeké, és szingifikánsan megnőtt a nyerstömeg (3. ábra). Az epikotil feletti rész tömege vagy nem különbözött, vagy kevesebb volt, mint a kontroll növényeké.

*3. ábra*: **Rizoktónia talajfertőzés hatása az okra csíranövények fejlődésére**




A ferdén vonalkázott sávok a fertőzetlen talajban fejlődött okra magoncok tömegfelhalmozását jelző konfidencia határokal jelzik (p=0,05)

*Figure 3*: Mass accumulation of okra seedlings as influenced by soil-borne *Rhizoctonia* infection. The skew lined sectors mark the interval (p=0.05) of mass accumulation by seedlings grown up in *Rhizoctonia* free soil. Leaves (1), Hypocotyl 2) , Killed (3), Aggressivity increasing (4), |Symptomless (5), Fress weight (mg/seedling) (6)

A különböző forrásból származó *R. solani* törzsek mindegyike megfertőzte az okra csíranövényeket, és közülük a hagymáról és Desirée burgonya fajtáról izolált - azonos anasztomózis csoportba (AG4) tartozó - törzsek már a csírázásnak induló magvakat elpusztították (1. táblázat). Azonban a taxonómiai helyzetnek vélhetően nincsen szerepe az okra iránti patogenitásban, mivel a *Hibiscus chinensis*-ről és a Kleopátra burgonyafajtáról izolált AG4 törzsek kevésbé voltak patogének. Az okra a *R. zeae* iránt közepesen fogékonynak bizonyult összevetve a *R. solani* törzsek iránti fogékonyságával.

*1. táblázat*

**Az okra és a vetésforgóba javasolt növények fogékonysága rizoktónia törzsek iránt.**

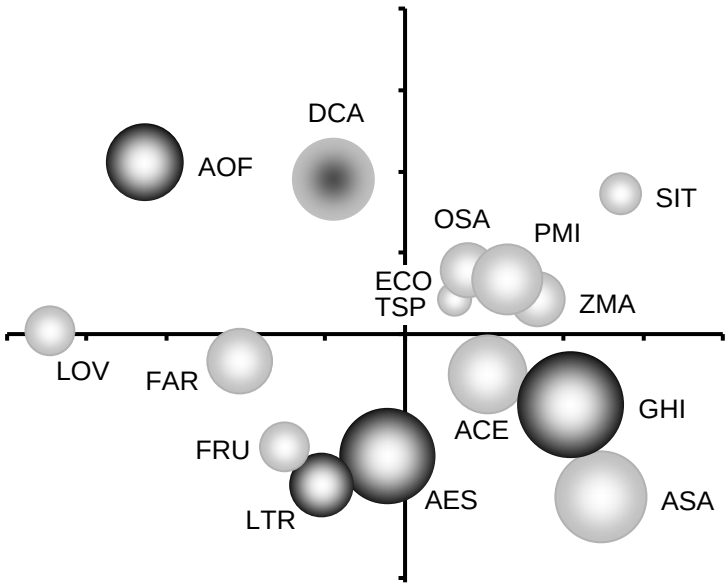
| No. | Species | *R. zeae* | *Rhizoctonia solani* strains | | | | | | | | Nem beteg | Elpusztult[a(1)] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | FES | ONI | MAL | HIB | CLE | DES | ELL | ROS | | |
| 1 | *A. esculentus* Moench. | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 2 | 0 | 3 |
| 2 | *Lavatora trimestris* L. | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 5 | 2 |
| 3 | *Althea officinalis* L. | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| 4 | *Gossipium hirsutum* L. | 1 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 | 1 | 0 | 4 |
| 5 | *Daucus carota* L. | 3 | 1 | 3 | 0 | 2 | 3 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 |
| 6 | *Festuca rubra* L.[b] | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 5 | 0 |
| 7 | *F. arundinacea* Schreb. [b] | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| 8 | *Eleusine coracana* Gaertn. | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 |
| 9 | *Triticum spelta* L. | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 |
| 10 | *Oryza sativa* L. | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 1 |
| 11 | *Setaria italica* L. | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 1 |
| 12 | *Zea mays* L. (var. *everta*) | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| 13 | *Lagurus ovatus* L. | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 |
| 14 | *Panicum milliaceum* L. | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 3 | 1 |
| 15 | *Allium cepa* L. | 1 | 0 | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| 16 | *Allium sativus* L. | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| | Nem beteg[c(2)] | 3 | 9 | 1 | 9 | 3 | 8 | 5 | 9 | 10 | | |
| | Elpusztult[c(1)] | 1 | 0 | 3 | 0 | 5 | 1 | 3 | 1 | 0 | | |

A törzsek kódja: *R. solani* törzsek burgonya fajtákról (CLE=Kleopátra, DES=Desirée, ELL=Ella és ROS=Kisvárdai rózsa), FES= a *R. zeae*-val együtt előforduló törzs, HIB= *Hibiscus rosa-sinensis*-ről, MAL= *Malus domestica*-ról, ONI= *Allium cepa*-ról; RZE= *R, zeae*.
A növények rendszertani helyzete (ordo): 1-4=Malvales, 5=Apiales, 6-14=Poales, 15-16=Asparagales. Az 5-16 fajokat az okra termesztésben vetésforgóba javasolják.
A talajeredetű fertőzés iránti fogékonyság értékelésére a következő skála szolgált: 0=egészséges (tünetmentes), 1=növekedésben visszamaradt, a gyökérnyakon apró léziók, nincs csírapusztulás; 2=tipikus betegségtünetek (törpülés, gyökérrothadás, gyökérnyaki léziók, csírapusztulás), de legalább egy túlélő csíra előfordult; 3=az összes csíranövény elpusztult.
[a]A 2-16 fajok iránti patogenitást jellemző esetszámok. [b]A *R. zeae* előfordulási helyén gyepet alkotó fajok. [c]Az *R. solani* törzsek (1-15) iránti fogékonyságot jellemző esetszámok.
*Table 1.*: Susceptibility of okra and plants recommended for crop rotation to *Rhizoctonia* strains.
The abbreviations of strains are as follows: *R. solani* strains ELL, CLE, DES of potato, FES of grass-land, HIB of *Hibiscus rosa-sinensis* L., MAL of *Malus domestica* Bork., ONI of *Allium cepa* L. Taxonomic position (ordo) of plant species: 1-4=Malvales, 5=Apiales, 6-14=Poales, 15-16= Asparagales. Plants 4-15 recommended to crop rotation in okra cultivation. Data of susceptibility of these plants were taken of an earlier publication (Oros and Vajna, 2005) The susceptibility of plants to soil-borne infection was evaluated by four fold scale as follows: 0=healthy, 1=depressed growth and sporadic lesions on root neck, no damping off; 2=typical disease symptom and as minimum as one plant survived; 3=all plants died.
[a]Susceptibility and tolerance of species calculated as a sum for *R. solani* strains. [b]Grasses grown on field of first appearance of *R. zeae* in Europe. [c]The pathogenicity of *Rhizoctonia* strains calculated as a sum for species 1-15. Killed (1), Symptomless (2)

A mályvafélék fogékonysága rizoktóniák iránt jelentősen különbözött. A kerti madármályva lényegesen ellenállóbb mint az okra, a gyapot pedig kifejezetten fogékony a talajeredetű rizoktónia fertőzésekre. A vetésforgóba javasolt növények közül a sárgarépa kifejezetten fogékony a *R. zeae* iránt is, ezért használata nem javasolható. Az *Eleusine coroacana* és a tönkölybúza viszont kifejezetten ellenállónak bizonyult, és a többi vizsgálatba vont növénytől eltérően egyik *Rhizoctonia* törzs sem betegítette meg súlyosan az előbbieket csírakorban.

A növények reakciója az egyes törzsek iránt rendkívül változatos volt. A betegségszindróma összes tünetei nem mindig jelentek meg a magoncokon, így például külsérelmi nyomok hiányában is elhervadtak, vagy a gyökérnyak súlyos károsodása (bemaródások) nem feltétlenül vonta maga után a pusztulásukat. A fertőzésre adott válaszreakciók mértéke és változatossága nincs kapcsolatban a növények rendszertani státuszával (4. ábra).

*4. ábra*: **A gazdanövények hasonlósága különböző rizoktónia törzsek iránti fogékonyságuk alapján**

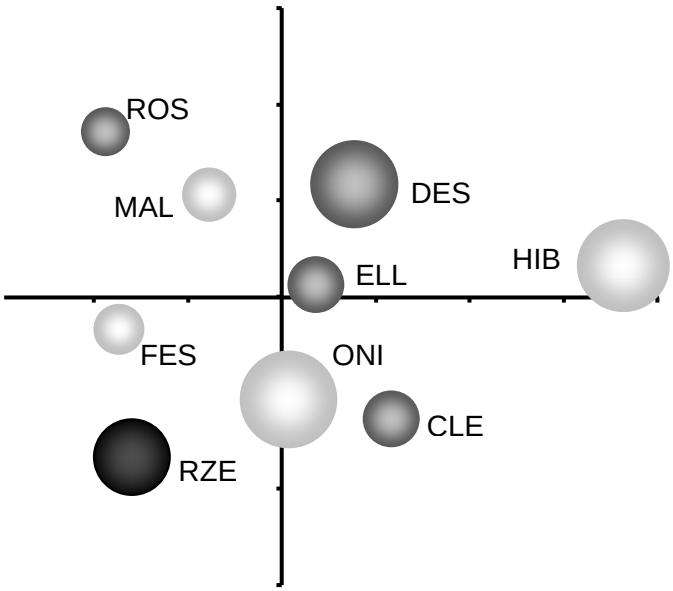



A kétdimenziós NonLinear Map kiszámításához az 1. táblázat adatait használtuk. A körök mérete az egyes növényfajok potenciális rizoktónia fogékonyságával arányos. A mályvaféléket sötét körök jelzik. A rövidítések a latin nevek kezdőbetűi (lásd 1. táblázat).
*Figure 4*.: Similarity of host plants by their susceptibility to the range of *Rhizoctonia* strains. Non-linear map was calculated of the data of Table 1. The abbreviations can be raised of plant names listed in Table 1. The size of circles is proportional to the potential susceptibility of plants to *R. solani* strains. The *Malvales* species are marked with dark balls.

A mályvafélék nem képeztek önálló csoportot, illetve a szorosabban összetartó fajok fogékonysága jelentősen különböző, például az okra, a tollkalász és a nádképű csenkesz közel helyezkednek egymáshoz.

Gazdanövénykörük szerint csoportosítva a *R. zeae* elkülönül a *R. solani* törzsektől (5. ábra). Az azonos anasztomózis csoportba tartozó *R. solani* törzsek sem képeznek gazdanövénykörük szerint szoros klasztert. A *Hibiscus*ról, hagymáról és Desirée burgnyafajtáról izolált törzsek (AG-3) ugyanúgy távol esnek egymástól, mint a csenkeszről és a Kleopátra burgonyafajtáról izolált törzsek (AG-4). Mindez arra utal, hogy a patogenitást több tényező befolyásolja, és ezek nem feltétlenül vannak az összes törzsben egyidejűleg jelen.

*5. ábra*: **Rizoktónia törzsek csoportosítása gazdanövénykörük hasonlósága alapján**




A kétdimenziós NonLinear Map kiszámításához az 1. táblázat adatait használtuk. A törzsek kódja megfelel az. 1. táblázatban közöltnek. A körök mérete az egyes törzsek potenciális patogenitásával arányos. A burgonyáról izolált törzseket sötét körök jelzik.
*Figure 5*: Similarity of *Rhizoctonia* strains by their host range. Non-linear map was calculated of the data of Table 1. The size of circles is proportional to the potential agressivity of strains to plants studied. The strains isolated of potato varieties are marked with dark grey.

A gazdakörök átfedése és betegségszindróma tüneti megjelenésének nagyfokú változatossága, illetve a potenciális gazdanövények különböző intraspecifikus csoportokba tartozó törzsek iránti fogékonysága – még ha eltérő mértékű is – arra a feltételezésre utal, hogy a rezisztencia-nemesítés mellett szükség lesz a megfelelő biológiai védekezés kidolgozására is a biztonságos és minőségi élelmiszertermelés érdekében. A talajeredetű kórokozók elleni vegyszeres védekezésnek ugyanis korlátokat szabnak a környezetvédelmi követelmények.

## *KÖVETKEZTETÉSEK*

Az okra csírázását a különböző forrásokból származó rizoktónia törzsek eltérő mértékben gátolták, azonban ez a hatás független volt a törzsek származási helyétől és taxonómiai besorolásától.

Az okra közepesen fogékony a *Rhizoctonia zeae* és a *R. solani* iránt, bár az egyes törzsek patogenitása jelentősen különbözött egymástól. A *R. zeae* gazdaköre leginkább a hagymán és pázsiton vele együtt előforduló *R. solani* törzsekéhez hasonlított.

Az okra elsősorban gyökérnyakon keresztül fertőződött, és a rizoktónia fertőzött talajban csírázó okra magoncok hipokotilja még azon esetekben is rövidült és megvastagodott, ha a betegségszindróma egyéb tünetei nem jelentek meg, és a csíranövény más vonatkozásokban a kontrollhoz hasonlóan fejlődött.

A *R. zeae* az okrán és a vetésforgóba javasolt növényfajokon a *R. solanihoz* hasonló betegségtüneteket okozott, azonban tüneti kép növényegyedenként változott.

A vetésforgóba javasolt növények közül az *Eleusine coroacana* és a *Triticum spelta* üvegházi körülmények között toleránsnak bizonyult a *R. zeae* iránt.

### *IRODALOM*


Begum, M. (2006): Studies on seed-borne fungal diseases of Okra [*Abelmoschus esculentus* L. (Moench)] and their management. PhD Thesis, University of Mysore, India.

Begum, M., Ravishankar Rai, V. and Lokesh, S. (2003a): Role of bacterial and fungal bioagents in the management of some seeed-borne diseases of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environm. Sci. 5, 575-580.

Begum, M., Ravishankar Rai, V. and Lokesh, S. (2003b): Effect of some plant growth promoting rhizobacteria on seed borne fungal pathogen in okra. Indian Phytopath. 56, 156-158.

Begum, M., Lokesh, S., Ravishankar Rai, V., Shylaja, M. D., Kumar, B. V. and Shetty, H. S. (2005): Evaluation of certain storage conditions for okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) seeds against potential fungal pathogens. Int. J. Agric. Biol. 7, 550-554.

Bittsanszky, A., Ravishankar Rai, V. and Oros, G. (2012): Response of glutathione conjugation system to soil soil-borne *Rhizoctonia* infection of okra. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 47(2):191-202.

Golden, J.K. and Vangundy, S.D. (1975): Disease complex of okra and tomato involving nematode, *Meloidogyne incognita*, and soil-inhabiting fungus, *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 65(3) 265-273.

Hema, L.R., Shivanna, M.B., Kumar, V., Krishnappa, M., Prakash, H.S. and Shetty, H.S. (1991): Control of seed-borne fungi in okra (*Hibiscus esculentus*) by fungicidal seed treatment. Indian Journal of Agricultural Sciences, 61(10):778-782.

Kida, K., Tojo, M., Yano, K. and Kotani, S. (2006): First report of *Pythium ultimum* var. *ultimum* causing damping off on okra in Japan. New Disease Reports, 14, 3.

Kimenju, J. W., Mweke, A. N., Mutitu, E. W. and Mutua, G. K. (2010): Poor hosts of root knot nematodes and their application as rotation crops in okra production. African J. Hort. Sci. 3, 63-71.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi* (10th ed.). Wallingford: CABI. p. 116.

Koné, D., Mohamed, D., Soro, S., Bolou Bi, B.A. and Kouadio, Y.J. (2010): First Report of Southern Blight of Okra (*Abelmoschus esculentus*) Caused by *Sclerotium rolfsii* in Côte d'Ivoire. Plant Disease, 94(11): 1379.

Kövics, G. J., Lőrincz, N. (2001): Causal agents of stem-base diseases of winter wheat in Eastern Hungary. Resources of the environment and sustained development. Analele Universitátii Din Oradea. Tom. VII. Partea I-a. Fasc. Agric. Hortic. 37-44.

Martin, F.W. (1982): "Okra, Potential Multiple-Purpose Crop for the Temperate Zones and Tropics". Economic Botany, 36: 340-345.

Mays, D.A., Buchanan, W., Bradford, B.N. and Giordano, P.M. (1990): Fuel production potential of several agricultural crops. Advances in new crops: 260-263.

Mohan, S., Devasenapathy, D., Venilla, C. and Gill, M. S. (2010): Pest and Disease Management in Organic Ecosystem. IPM Booklet, Tamil Nadu University, India.

Moncalvo, J-M., Nilson, R.H., Koster, B., Dunham, S.M., Bernauer, T., Brandon Matheny, P., Porter, T.M., Margaritescu, S., Weiss, M., Garnica, S., Danell, E., Langer, G., Langer, E., Larsson, E. and Larsson, K-H. (2006): The cantharelloid clade: dealing with incongruent gene trees and phylogenetic reconstruction methods. Mycologia, 98(6): 937-948.

Otero, J.T., Ackerman, J.D. and Bayman, P. (2002): Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia* like fungi from tropical orchids. American Journal of Botany, 89:1852-1858.

Pugliese, M., Garibaldi, A. and Gullino, M. (2008): Microbial enrichment of compost with *Trichoderma* sp. to enhance suppressiveness against *Rhizoctonia solani.* Phytopathology, 98, S6, S128.

Shanmugam, V., Sriram, S., Babu, S., Nandakumar, R., Raguchander, T., Balasubramanian, P. and Samiyappan, R (2001): Purification and characterization of an extracellular α-glucosidase protein from *Trichoderma viride* which degrades a phytotoxin associated with sheath blight disease in rice. J. Appl. Microbiol., 90, 320-329.

Vajna, L. and Oros, G. (2005a): First report of *Rhizoctonia zeae* in Hungary. Plant Pathology, 54:250.

Vajna L. és Oros Gy. (2005b): Pázsitfüvek foltos pusztulása Magyarországon. A *Rhizoctonia zeae* és a *R. solani* szerepe a pázsitfüvek pusztulásában. Növényvédelem, 59: 149-157.

# The effect of epiphytic bacteria on selected rust fungi

**Małgorzata Schollenberger [1]- Karolina Felczak [1] – Karolina Borowska [1]**
[1] Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 166 str., 02-787 Warsaw, Poland
malgorzata_schollenberger@sggw.pl

***SUMMARY***

*The aim of our study was isolation of epiphytic bacteria which colonized the phyllosphere of daisy, carnation and rose and check their antagonism against spores of Puccinia distincta (daisy rust), P. arenariae (carnation rust) and Phragmidium mucronatum (rose rust). Among 107 obtained bacterial isolates 23 showed the effects on rusts spores in laboratory tests. This impact was manifested in the deformations of spores, the abnormal growth of fungal hyphe and unusual distribution and concentration of pigment in both: spores and newly emerging hyphe.*

*Based on phenotypic identification isolates were classified into genera: Aureobacterium, Bacillus, Cellulomonas, Enterobacter, Micrococcus, Nocardia and Pseudomonas.*

**Keywords:** bacteria, antagonism, rusts of ornamentals

## *INTRODUCTION*

Biological control can result from many different types of interaction between organisms. In all cases pathogens are antagonized by the presence and activities of other organisms that they encounter (Cook and Baker 1983). Bacteria are known as producer of different antibiotic and enzymes and this is why they can be very useful and attractive as biological control agents (BCAs). But there is only few information about effectiveness of bacteria in reducing fungal diseases like rusts. Rytter *et al.* (1989) found, among 12 isolates ofm *Bacillus* spp. obtain from leaves of pelargonium, one strain of *Bacillus subtilis,* which inhibited spore germination of *Puccinia pelargonii – zonalis,* the causal agent of geranium rust. *In vivo* tests this strain reduced the incidence of rust pustules on inoculated leaves in greenhouse. Sometimes happened, that bacterial strains known as antagonists to fungal pathogens were effective in greenhouse experiments in reducing bean rust severity (Yuen et. al.2001). One of them, *Stenotrophomonas maltophilia,* chitinolytic strain, gave protection similar to application of thiophanate methyl or thiophanate methyl combined with maneb in reducing bean rust severity. In Brazil one isolate of *Bacillus* sp., selected from 393 microorganisms, reduced coffee rust (*Hemileia vastatrix*) intensity as effectively as copper hydrocide and was considered a potential biocontrol agent for coffee rust for organic crop system in Brazil (Haddad *et al.,* 2009).

## *MATERIALS AND METHODS*

### Isolation of epiphytic bacteria

Probes of 10 leaves of *Bellis perenis, Dianthus barbatus* and *Rose* sp.were put in 500 ml Erlenmayer flasks with 250 ml of saline. Flasks were shaking four times for minute with 30 minutes intervals using microshaker. Then 0.1 suspension was plated onto NA (Nutrient Agar Difco). After 3 days incubation in temperature $27^0$ C separate colony with different form and color were transfer to tubes with NA slants formed collection.

### Interaction between bacteria isolates and rusts spores

The observation in the hanging drop using a light microscope were carried out. For that examination aeciospores of *Puccinia distincta,* urediospores of *Phragmidium mucronatum* and teliospores of *P. arenariae* were put in a drop of water and mixed with suspension of different bacteria isolates. The slides were protected against the loss of moisture using vaseline. Addtionally they were placed in Petri dishes with wetted blotting paper. After 72h light microscope was used for showing the interaction between isolates of bacteria and spores of rusts in the hanging drop.

### Identfication of bacteria

The following phenotypic properties of bacteria were determined: Gram reaction with 3% KOH (Suslow *et al.,* 1982), presence of oxidase**,** catalase (Kovacs 1956, Bradbury 1988), spore production (Bradbury 1988), cell morphology and motility (Bradbury 1988), fluorescent pigment production (King *et al.,* 1954), oxidative/fermentative test (O/F) (Hugh and Leifson 1953), levan production from sucrose (Lelliott and Stead 1987), hydrolysis of starch and nitrate reduction (Bradbury 1988), presence of arginine dihydrolase (Thornley 1960), production of pectolytic enzymes (Bradbury 1988).

Using Bradbury's key (1988) and Bergey's Manual (Buchanan and Gibbons 1974) antagonistic bacterial isolates were classified to genera.

## *RESULTS AND DISCUSSION*

Epiphytic bacteria were isolated from phylloplane of healthy and infected, with rusts symptoms, leaves. Dominated isolates daisy orgin (67), smaller groups constituted isolates from carnation (31) and rose (9) leaves.

Antagonistic activity of all 107 isolates against rusts spores were tested *in vitro* - in hanging drop. Observations under a light microscope showed some acvtivity of 27 isolates against rusts spores. Mostly we could see bacteria cells gathering on the surface of spores wall or arounded them. Another type of adverse effect of bacteria on germinating *Phragmidium mucronatum* uredospores was abnormal development and deformation of single hyphe cells seen as swelling (Figure 1). Often it was accompanied by atypic distribution of pigment in hyphe cells (Figure 2). In contact with bacterial cells shape of urediospores of *P. mucronatum* and aeciospores of *Puccinia dispersa* has changed, usually eliptic they were pentagon or hexagon (Figure 3). Not only shape but also partly or complete fade of uredospores and aeciospores was effect of presence of some bacteria (Figure 2 and 4).

*Figure1.* **Abnormal growth of *Phragmidium mucronatum* hyphe caused by gathering *Cellulomonas* rods**

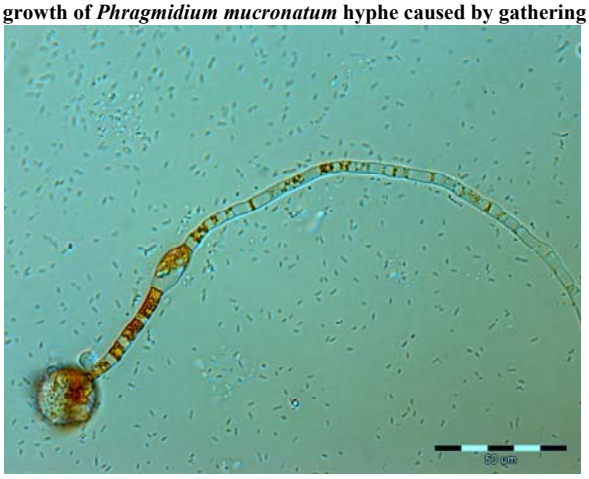
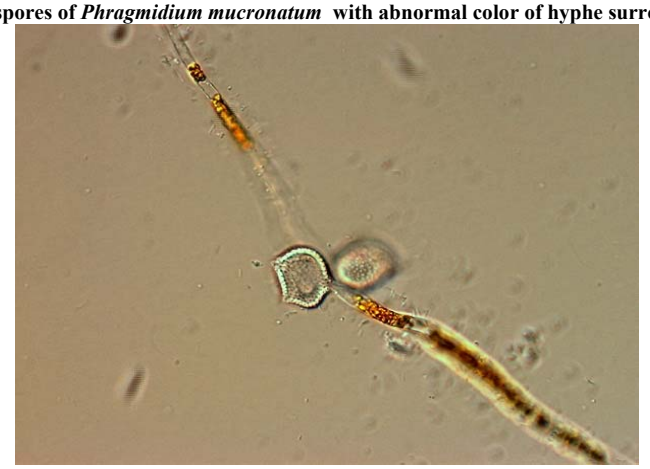


*Figure 2:* **Germinating uredospores of *Phragmidium mucronatum* with abnormal color of hyphe surrounded by *Aureobacterium* sp.**



Among 23 isolates with antagonistic activity against rusts spores dominated *Bacillus* (6) and *Micrococcus* (7) strains. Using conventional identification methods based on phenotypic characteristics we classified two strains as *Bacillus circulans,* single strains as *B. macerans* and *B. polymyxa* and two as *Bacillus* sp. Although bacteria from this genus are known as good antagonist of ornamental plants rusts (Rytter *et al.,* 1988) in our study they are not differt from other genera in effectivenes. Tests with germinating uredospores of *Phragmidium mucronatum* showed, that any bacterial isolates produced chitinase. On the other hand fall of pigment concentration in aeciospores and uredospores suggested changes in permeability of spores wall. We don't know if it cause additionally lost of spores vitality.

Phylloplane of three plants: daisy, carnation and rose was colonized by various bacteria. Some of genera occurred numerous (*Bacillus, Micrococcus),* some were represented by single isolates as *Cellulomonas* sp., *Nocardia* sp., *Aurebacterium* sp. and by few as *Enterobacter* spp.(3) and *Pseudomonas* spp. (4). So many strains represented 7 genera with antagonistic activity against rusts spores indicate, that any strain has specific mechanism of action.

*Figure 3:* **Discoloration and deformation of aeciospores of *Puccinia distincta* surrrounded by *Micrococcus* sp.**

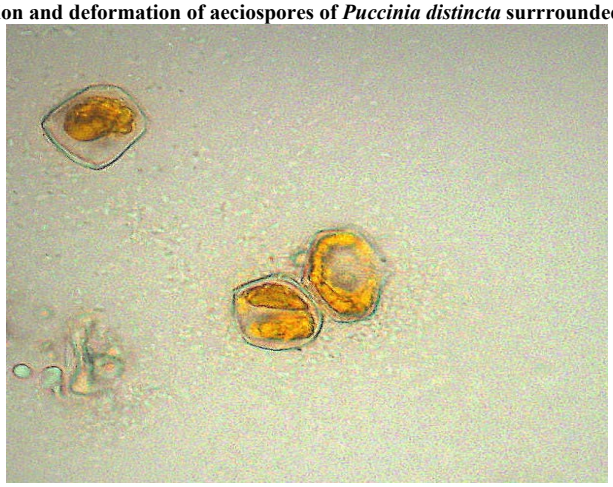
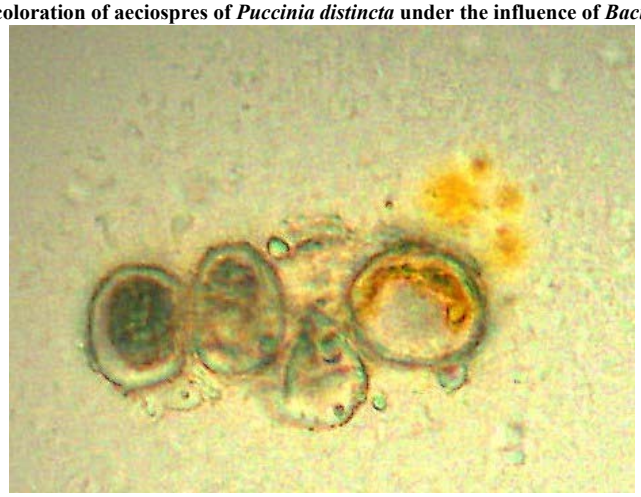


*Figure 4:* **Discoloration of aeciospres of *Puccinia distincta* under the influence of *Bacillus polymyxa***



***ACKNOWLEDGEMENTS***

The project was founded by the National Science Centre, Krakow, Poland – Projeckt N N310 440038

*REFERENCES*

Bradbury J.F. (1988): Identification of cultivable bacteria from plants and plant tissue cultures by use of simple classical methods. Acta Hort. 225: 27−37.

Buchanan R.E., Gibbons N.E. (1974): Bergey's manual of determinative bacteriology. The Williams and Wilkins. Baltimore. MD. USA.

Cook K.J., Baker K.F. (1983): The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press, St. Paul, MN.

Haddad F., Maffia L.A., Mizubuti E.S.G., Teixeira H. (2009): Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazl. Biological Control 49: 114-119.a

Hugh R., Leifson E. (1953): The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 80: 24−26.

King E.O., Ward M.K., Raney D.E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab.Clin. Med. 44: 301−307.

Kovacs N. (1956): Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature 178: 703.

Lelliott R.A., Stead D.E. (1987): Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.

Rytter J.L., Lukezic F.L., Craig R., Moorman G.W. (1989): Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. Phytopathology 79: 367-370.

Suslow T.V. Schroth M.N. Isaka M. (1982): Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology. 72: 917−918.

Thornley M.J. (1960): The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram negative bacteria on the basis of arginine metaboilism. J. Appl. Bact. 23: 37.

Yuen G.Y., Steadman J.R., Lindgren D.T., Schaff D., Jochum C. (2000): Bean rust biological control using bacterial agents. Crop Protection 20: 395-402.

# Occurrence of garlic and actinidia viruses in Poland

**Sala-Rejczak K.[1] – Chodorska M.[1] – Nowak P.[1] – Paduch-Cichal E.[1] – Szyndel M.S.[1] – Latocha P.[2]**

Warsaw University of Life Sciences - SGGW, Faculty of Horticulture and Landscape Architecture

[1]Department of Plant Pathology

[2]Department of Environmental Protection

Nowoursynowska 159, 02-776, Warsaw, Poland

kinga_sala_rejczak@sggw.pl

***SUMMARY***

*Garlic (*Allium sativum *L.) and* Actinidia *spp. plants can be infected by many viruses. The viruses can be spread by vectors and by vegetative propagation of the plants. Eight garlic viruses transmitted by mites, belong to the Allexivirus genus. This paper describes the detection and identification of three garlic viruses: Garlic virus A (GarV-A), Garlic virus B (GarV-B) and Garlic virus C (GarV-C) and actinidia viruses: Alfalfa mosaic virus (AMV) and Cucumber mosaic virus (CMV) by serological DAS-ELISA test. The virus survey was conducted in eleven garlic production fields and actinidia fields located in different regions of Poland. Leaf and bulb samples from 80 garlic plants showing mosaic, deformation, yellow stripesand and leaves of actinidia plants showing mosaic, chlorotic spots and areas, during the 2011-2012 growing season were tested. Results indicated that 38 samples of garlic (47.5%) were infected with GarV-A,49 samples (61.3%) with GarV-B and 14 samples (17.5%) with GarV-C. Actinidia spp. plants (15 from 100) were infected with Cucumber mosaic virus. The viral particles were observed used the transmission electron microscope ('sap-dip' technique). RT-PCR was used to confirm the occurrence of three viruses in symptomatic garlic plants with total RNA extracted from leaves of DAS-ELISA-positive (9 samples) and negative samples (5 samples) using the primer pairs designed in the conserved region of open reading frame ORF5 (coat protein) and ORF6 (nucleic acid binding protein) of GarV-A, GarV-B and GarV-C. Products of the expected size (444 bp for GarV-A, 576 bp for GarV-B and 679 bp for GarV-C) were amplified only from the DAS-ELISA-positive samples.*

**Keywords:** garlic, actinidia, virus, ELISA, electron microscope, coat protein gene

## *INTRODUCTION*

Virus diseases of garlic (*Allium sativum* L.) are widespread throughout the world, causing serious damage to crop yields and quality. Garlic plants are propagated vegetative, resulting in widespread infection by viruses. These infections cause severe yield losses that vary depending on the cultivars, but it some cases reach 60% (Conci *et al.,* 2002). Garlic can be infected by many viruses, including members of the genus *Allexivirus* (family *Alphaflexiviridae*) (King *et al.,* 2011). This genus contains viruses that have all been detected only in *Allium* spp., they have occur in multiple infections and are thought to be mite-transmitted (Lu *et al.,* 2008). They are also mechanically transmissible to *Chenopodium murale*. In Korea this viruses caused mosaic or streak symptoms in cultivated garlic (Koo *et al.,* 1998). Virions of the *Allexivirus* are very flexous filamentous about 800 nm in length and 12 nm in diameter, have helical symmetry and a surface pattern of cross-banding. The genome is a single-stranded positive sense RNA (size ~9.0 kb) and comprises six ORFs (Chen *et al.,* 2004).

The Actinidia genus belongs to the Actididiaceae family. The most world popular species in commercial crops are: *Actinidia deliciosa*, *A. chinensis* and *A. arguta*. Virus infected Actinidia plants are source of these pathogens and cause the risk for both the existing and new plantations. Some viruses may be transmitted by vectors and can be moved into Actinidia from other hosts. Since 2003 some the most important actinidia viruses have been identified, mainly in materials originated from China: *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Ribgrass mosaic virus* (RMV), two viruses with a wide spectrum of host plants: *Alfalfa mosaic virus* (AMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Clover *et al.,* 2003, Pearson *et al.,* 2010).

The purpose of this work was the detection and identification of garlic viruses: *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C) in eleven garlic production fields located in different regions of Poland and *Alfalfa mosaic virus (AMV) and Cucumber mosaic virus* (CMV) in actinidia plants. The DAS-ELISA results was confirmed using molecular biology technique (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), for garlic viruses. Electron microscope was also used for selective garlic plants infected with *Allexiviruses* and selective symptomatic actinidia plants.

## *MATERIALS AND METHODS*

### Survey of virus infection in garlic and actinidia plants

Garlic and actinidia plants showing viral disease symptoms were randomly collected from garlic and actinidia production fields located in different regions of Poland during the 2011-2012 growing season. The Garlic leaves and bulbs (80 samples) were tested by DAS-ELISA using antibodies to GarV-A, GarV-B and GarV-C from Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Germany), following the protocol described by Clark and Adams (1977). The actinidia leaves were tested by DAS-ELISA

using Loewe Biochemica GmbH (Germany) reagents. Extract from the investigated plants was obtained by adding 2.5 ml of sample extraction buffer (dilution 1:10) to 0.250 g plant tissue. Substrate hydrolysis was recorded using the Infinite® 200 PRO (Tecan) with the filter of 405 nm wavelength. Samples were considered positive if their optical density readings were at least twice of negative control.

**Electron microscope (EM)**

Viral particles were observed in transmission electron microscope (Jeol JEM 1220, Japan). The virus preparations were prepared from plant sap, diluted 1:20 in phosphate buffer with 0.5% $Na_2SO_3$ addition, according to the 'sap-dip' EM technique described by Szyndel (1997). Preparations were stained with 2% uranyl acetate.

**Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

Total RNA was extracted from 100 mg tissues of leaves of 9 infected (DAS-ELISA-positive) and 5 healthy garlic plants using the Spectrum$^{TM}$ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, Germany). RNA from each sample was eluted in 50 µl of RNAse free water. For RT-PCR, Titan One Tube RT-PCR System (Roche) was used with the primer pairs designed in the conserved region of the open reading frame ORF5 (coat protein) and ORF6 (nucleic acid binding protein) (Table 1).

*Table 1*

**The Reverse Trascriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) primers for amplification of the coat protein (CP) and nucleic acid binding protein (NABP) genes of GarV-A, GarV-B and GarV-C together with nucleotide sequence and annealing temperatures.**

| Virus | Primer | Nucleotide sequence | Tm (°C) | Annealing temperature (°C) |
|---|---|---|---|---|
| GarV-A | ACPF | 5'-ATGTCGAATCCAACTCAGTCG-3' | 52.4 | 52 |
| | ACPR | 5'-AGACCATGTTGGTGGCGCG-3' | 55.4 | |
| GarV-B | BCPF | 5'-TGACGGGCAAACAGCAGAATAA-3' | 53 | 50 |
| | BCPR | 5'-ATATAGCTTAGCGGGTCCTTC-3' | 52.4 | |
| GarV-C | CCPF | 5'-TTGCTACCACAATGGTTCCTC-3' | 52.4 | 51 |
| | CCPR | 5'-TACTGGCACGAGTTGGGAAT-3' | 51.8 | |

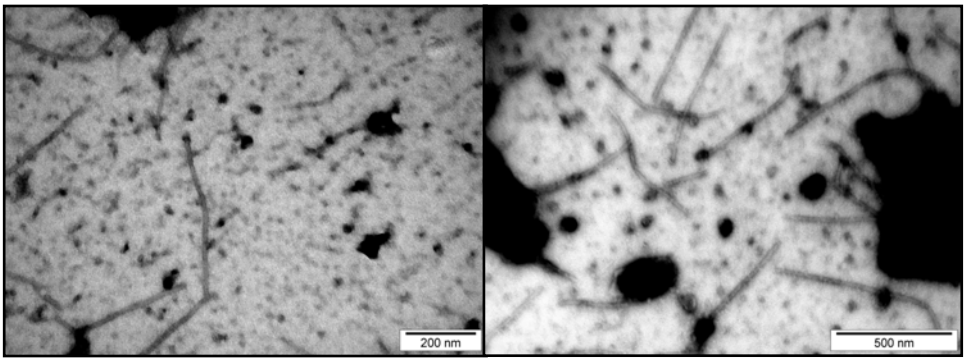
The primer pair specific to the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase chloroplast (*Rbc1*) gene (Rbc1-F/Rbc1-R 5'-TACTTGAACGCTACTGCAG-3' and 5'-CTGCATGCATTGCACGGTG-3') (Sanchez-Navarro *et al.,* 2005) was used as the internal control to amplify the corresponding mRNA in garlic leaf tissue by RT-PCR. Single tube RT-PCR used a 30 min heating step at 50°C and a 2 min heating step at 94°C followed by 35 cycles of 30 sec melting at 94°C, 45 sec annealing at -°C (Table 1), and 45 sec elongation at 68°C with a final extension of 7 min at 68°C. The reaction products were resolved by electrophoresis in the buffer TBE in 1.2% agarose gel.

## *RESULTS*

**Survey of virus infection in garlic and actinidia plants**

The incidence of virus infection in garlic and actinidia plants collected from production fields was surveyed by serological ELISA test. Results indicated that 38 samples of garlic (47.5%) were infected with *Garlic virus A*, 49 samples (61.3%) with *Garlic virus B* and 14 samples (17.5%) with *Garlic* virus C. Mosaic symptoms, deformation and yellow stripes were noted on leaves on DAS-ELISA-positive plants. The symptomatic Actinidia spp. plants (15 from 100 investigated) were infected with.

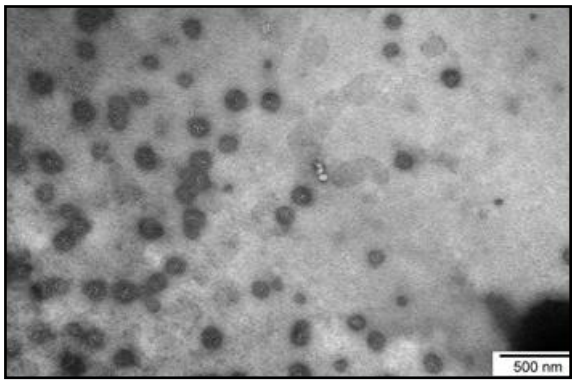
*Figure 1:* **The electron microscope image of garlic viruses particles**



**Electron microscope**

In electron microscope preparations obtained from garlic and actinidia leaves virus particles were observed. Based on the EM data, about 600-800 nm in length of the rod shaped *Allexiviruses* particles (Figure 1.) and isometric particles similar to the *Cucumber mosaic virus* (Figure 2.) were observed. During the observation we reported that different viruses were mixed within a garlic plants.

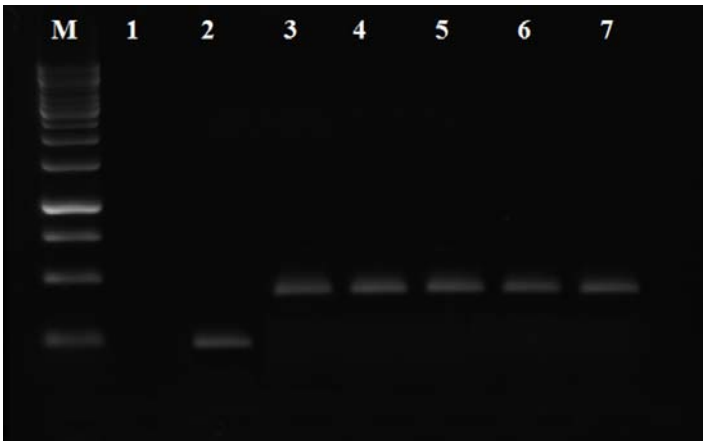
*Figure 2:* **The electron microscope image of actinidia virus particles.**




**Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

The presence of GarV-A, GarV-B and GarV-C was confirmed by RT-PCR in nine leaf samples. Products of the expected size (444 bp for GarV-A, 576 bp for GarV-B and 679 bp for GarV-C) were amplified only from the DAS-ELISA-positive samples. As expected, no product was amplified from total RNA of healthy garlic leaves while a 183 bp long fragment corresponding to the plant internal control Rbc1 was obtained (Figure 3.).

*Figure 3:* **Agarose gel analysis of Garlic virus A amplicons obtained by RT-PCR assays. Lane M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas); lanes 1-2: healthy garlic plants (DAS-ELISA-negative samples); lanes 3-7: samples infected with GarV-A (DAS-ELISA-positive samples). The GarV-A amplicons are shown at 444 bp. The Rbc1 amplicon is shown at 183 bp.**




## *DISCUSSION*

Garlic is an economically important plant grown worldwide as a medicinal plant and spice. Growers traditionally produce their own garlic propagative material, therefore the observed heavy viral infection and implies a potentially high reduction in yield and quality of this crop.

The allexiviruses, *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B) and *Garlic virus C* (GarV-C) transmitted by *Aceria tulipae* (Van Dijk *et al.,* 1991) which are reported in this study, induce a mild mosaic, deformation and yellow stripes or no symptoms in *Allium* species (Yamashita *et al.,* 1996), viruses usually occur in mixed infections. *Garlic virus A* (47.5%) and *Garlic virus B* (61.3%) were detected at a high frequency in garlic plants from fields located in various region of Poland, while *Garlic virus C* (17.5%) was detected with a low frequency. However, these results suggested that these viruses are of considerable epidemiological significance.

In Europe, the occurrence of viruses infecting garlic has been reported only in France (Lot *et al.,* 1998), Greece (Dovas *et al.,* 2001) and the Czech Republic (Klukácková *et al.,* 2004, Smékalová *et al.,* 2010), but in Poland only limited data are currently available.

Although ELISA has often been employed for virus diagnosis in garlic (Conci *et al.,* 2003, Shahraeen *et al.,* 2008), RT-PCR is a more efficient and sensitive method of virus detection. Standard RT-PCR has been used to

detect allexiviruses (Dovas *et al.,* 2001). In our study we designed RT-PCR primers for amplification of CP and NABP genes of GarV-A, GarV-B and GarV-C. The amplicons of GarV-A, GarV-B and GarV-C were received only for DAS-ELISA-positive plants.

Up till now, a few viral species attacking actinidia have been detected and described. The first virus, which presence was confirmed in *A. chinensis* plants coming from China was the *Apple stem grooving virus* (ASGV) (Clover *et al.,* 2003). Another virus was assigned to the Tobamovirus genus. On the infected leaves of *A. chinensis* and *A. deliciosa* plants one were observed chlorotic spots, rings, patterns and mosaics. Detailed biological and serological tests, electron microscopic observations and the molecular analyses level showed, that the investigated object is the *Ribgrass mosaic virus* (RMV) (Pearson *et al.,* 2007, Chavan *et al.,* 2009). Other viral species affecting actinidia are: two species with a wide spectrum of host plants, belonging to the Bromoviridae family: *Alfalfa mosaic virus* (AMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Pearson *et al.,* 2010). Since viruses were found in the source material coming from China it can be expected that they can be present both in the mother plant collections and in commercial plantations. So far, there has been no research on the finding of Actinidia spp. viruses under Polish conditions. Recognition of the actual state of virus attacking actinidia plantations will allow working out the optimal recommendation for protection against that group of pathogens.

Studies involving other species of the genus *Allexivirus* and actinidia plants viruses are currently continued in Poland. Viruses are mainly transmitted with the propagation material. Infected plants, including mother plants, comprise the pathogen source and risk for the already existing and new plantations. What is more, some of the viral species described in literature may be transmitted by vectors, which is the extra means of spreading viral diseases.

***REFERENCES***


Chavan R.R.-Pearson M.N.-Cohen D. (2009): Partial characterization of a novel Tobamovirus infecting Actinidia chinensis and A. deliciosa (Actinidiaceae) from China. Eur. J. of Plant Pathol. 124, 244-259.

Chen J.-Zheng H.Y.-Antoniw J.F.-Adams M.J.-Chen J.P.-Lin L. (2004): Detection and classification of allexiviruses from garlic in China. Arch. Virol. 149, 435-445.

Clark M. F.-Adams A. N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34, 475-483.

Clover G.R.G.-Pearson M.N.-Elliot D.R.-Tang Z.-Smales T.E.-Alexander B.J.R. (2003):. Characterization of a strain of Apple stem grooving virus in Actinidia chinensis from China. Plant Pathol. 52, 371-378.

Conci V.C.-Lunello P.-Buraschi D.-Italia R.R.-Nome S.F. (2002): Variations of *Leek yellow stripe virus* concentration in garlic and its incidence in Argentina. Plant Dis. 86, 1085-1088.

Conci V.C.-Canavelli A.-Lunello P. (2003): Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. Plant Dis. 87,1411–1415.

Dovas C.I.-Hatzibukas E.-Salomon R.-Barg E.-Shiboleth Y.M.-Katis N.I. (2001): Comparison of methods for virus detection in Allium spp. J Phytopathol. 149, 731–737.

King A.M.Q.-Adams M.J.-Carstens E.B.-Lefkowitz E.J. (2011): Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

Klukácková J.-Navrátil M.-Veselá M.-Havránek P.-Safárová D. (2004): Occurrence of garlic viruses in the Czech Republic. *Acta* fytotechnica *et zootechnica* 7, 126-128.

Koo B. J.-Chang M. U.-Choi Y. D. (1998): Garlic mite-borne virus isolated from cultivated garlic in Korea. Plant Pathol. J. 14,136-144.

Lot H.-Chovelon V.-Souche S.-Delecolle B. (1998): Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. Plant Dis. 82,1381-1385.

Lu Y.W.-Chen J.-Zheng H.Y.-Adams M.J.-Chen J.P. (2008): Serological relationshipd among the over-expressed coat proteins of Allexiviruses. J Phytopathology 156, 214-255.

Pearson M.N.-Chavan R.R.-Cohen D. (2007): Viruses of Actinidia: Do they pose a threat to kiwifruit production? Acta Hort. 753, 639-644.

Pearson M.N.-Cohen D.-Chavan R.R.-Blovin A.G.-Cowell S.J. (2010): Molecular characterization of viruses from kiwifruit. Julius-Kuhn-Archiv. 427, 87-91.

Sanchez-Navarro J.A.-Aparicio F.-Herranz M.C.-Minafra A.-Myrta A.-Pallas V. (2005): Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. European Journal of Plant Pathology 111, 77-84.

Shahraeen N.-Lesemann D.E.-Ghotbi T. (2008): Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crops in Iran. Bull OEPP/EPPO Bull. 38, 131–135.

Smékalová K.-Stavlíková H.-Dusek K. (2010): Distribution of viruses in the garlic germplasm collection of the Czech Republic Journal of Plant Pathology 92, 273-274.

Szyndel M.S. (1997): Zastosowanie technik elektrono- i immunoelektronomikroskopowych do wykrywania i rozpoznawania wirusów roślin. Rozprawa habilitacyjna. Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa.

Van Dijk P.-Verbeek M.-Bos L. (1991): Mite-borne virus isolated from cultivated *Allium* species, and their classification into two new rymoviruses in the family Potyviridae. *Neth. J. Plant Pathol*. 97, 381-399.

Yamashita K.-Sakaai J.-Hanada K. (1996): Characterization of a new virus from Garlic (*Allium sativum* L.), garlic miteborne mosaic virus. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 62, 483-489.

# New data of *Ca.* Phytoplasma prunorum occurence in the Eastern part of the Carpathian-Basin

**Gábor Tarcali – György J. Kövics**
University of Debrecen, Institute of Plant Protection, H-4032 Debrecen, Böszörményi str. 138.
tarcali@agr.unideb.hu

***SUMMARY***

*Plant diseases caused by phytoplasmas have an increasing importance for fruit growers. Apricot phytoplasma disease ("Ca. Phytoplasma prunorum") was first reported from France in Europe, in 1924 from. In 1992, the disease was identified in Hungary. Based on the growers' signals serious damages of "*Candidatus *Phytoplasma prunorum" (Seemüller and Schneider, 2004) (formerly: European stone fruit yellows phytoplasma, ESFY disease) could be observed in several stone fruit gardens in the famous apricot-growing area nearby the town of Gönc, Northern-Hungary. Field examinations were started in 2009 in Borsod-Abaúj-Zemplén County. Our goals were to diagnose the occurrence of* Ca. *Phytoplasma prunorum on stone fruits in the North-Hungarian growing areas by visual diagnostics and to confirm data by laboratory PCR-based examinations. 40 collected samples were tested in laboratory trials, and at 22 samples from apricot, peach, cherry, sour cherry and wild plum were confirmed the presence of phytoplasma. Field investigation were also done in a Western-Romanian apricot plantation, and the presence of phytoplasma disease was also identified. It was the first time that* Ca. *Phytoplama prunorum had been identified in the western part of Romania. On the basis of these observations it seems evident that the notable losses caused by Ca. Phytoplasma prunorum is a new plant hygiene problem for fruit growers to manage, especially for apricot producers in Hungary and other Cental-European countries as well.*

**Keywords:** *Ca.* Phytoplasma prunorum, European stone fruit yellows pytoplasma, ESFY, stone fruits, apricot, peach

## *INTRODUCTION*

Phytoplasma diseases occur on several crops throughout the world, and these agents have increasing importance for fruit growers. Until 1967, plant diseases known as „yellows diseases" were thought to be caused by viruses. In 1967, Japanese researchers (Doi *et al.*, 1967) found microorganism by electron microscope in yellows diseased plants. This new class of plant disease agents was named a "mycoplasma-like organism" (Welliver, 1999). In 1992, characterization of the organisms associated with yellows diseases had progressed to a point where it became clear they were unique and should be given their own name: PHYTOPLASMA (ICSB, 1993; Gundersen *et al.*, 1994).

Phytoplasmas are serious pathogens of several important plants, including coconut, sugarcane, rice, sandal wood in tropical and sub-tropical regions of the world, causing a wide variety of symptoms that range from mild yellowing to the death of infected plants. Phytoplasmas also cause very serious diseases on several important crops and fruits in the temperate zone. Stolbur disease of potato and tomato (*Candidatus* Phytoplasma solani) is one of the most common plant disease caused by phytoplasmas. Apple and pear have also phytoplasma originated diseases (*Ca.* Phytoplasma mali, *Ca.* Phytoplasma pyri), but grape and maize are also endangered by phytoplasmas. These agents reside in the phloem tissues of the plants, and they require a vector to be transmitted from plant to plant, and this normally takes the form of sap sucking insects such as leaf hoppers, in which they are also able to replicate. Phytoplasmas cannot be transmitted mechanically.

„*Candidatus* Phytoplasma prunorum (Seemüller and Schneider, 2004) [(syn: European Stone Fruit Yellows Phytoplasma; ESFY (Kövics, 2009)] is one of the most important diseases of apricot on several growing sites in Hungary. Apricot phytoplasma disease is well known for a long time in many European countries (Lederer and Seemüller, 1992). It was reported first in Europe in 1924, in France, (Chabrolin, 1924) although it was named that time as "Apoplexy". In many European countries the disease has been identified as one of the most prevalent problems threatening apricot trees (Jarausch *et al*., 2001; Navratil *et al.*, 2001; Torres *et al*., 2004). In Hungary and in the neighbouring Central-European countries it is a relatively new and serious pathogen for the apricot cultivation. The disease was observed first on apricot in Hungary in 1992 (Süle, unpublished) although its apoplexy-like symptoms had been noticed before too. Later on occurrence of the ESFY was confirmed by molecular biological examinations in Hungary (Viczián *et al.,* 1997; Süle *et al.,* 1997). After that, similar symptoms were also observed on other stone fruits (Mergenthaler, 2004). Occurrence of phytoplasma disease was observed in peach (Németh *et al*., 2001), *Prunus serrulata* (Lorenz *et al.,* 1994), *Prunus mahaleb* cv. Cemany (Varga *et al*., 2001) and *Prunus spinosa* (Jarausch *et al*., 2001) as well. The disease on cherry was reported in France as "Molieres-disease" (Benrhard *et al.*, 1977), but several experts thought that cherry is resistant to phytoplasma infection (Jarausch *et al.,* 2000). European plums have been determined to be tolerant to *Ca.* Phytoplasma prunorum, whereas Japanese plums are highly susceptible (Carraro *et al*, 1998; Mona *et al*, 2008). The psyllid *Cacopsylla pruni* Scopoli was described as the main vector of *Candidatus* Phytoplasma prunorum (Carraro *et al*., 2001; Fialová *et al.*, 2007).

## *MATERIALS AND METHODS*

Field examinations were done on several stone fruit gardens in Borsod-Abaúj-Zemplén county (on Gönc Apricot Growing Area), in Hajdú-Bihar county (Hajdúdorog) and in West-Romania, near Oradea city (Biharpüspöki) between 2009-2012 (12 apricot cultivars, 1 peach population, 4 sour cherry and 1 cherry plantation).

Our first goal was to visually identify *Ca.* Phytoplasma prunorum infection on stone fruits (especially on apricot) on the examined Northern-Hungarian an Romanian growing areas.

During the field examinations infection ratio (I%) and infection index (Ii) [according to a classification system (*Table 1*)] were calculated in the various stone fruit plantations based on the visible symptoms of the disease caused by *Ca.* Phytoplasma prunorum. The classification system contains 5 infection degrees, and the symptoms are getting more and more serious from the I. degree towards the V. degree. Infection degrees were classified on the basis of the following symptoms:

-on leaves: yellow colour change and rolling of leaves to its abaxial surface,
-on branches: general yellowing or „scalding-like" drying,
-in the trunk: having striped the bark of tree, orange or light brown colour change is visible in the phloem
-on trees: general yellowing on several branches or general drying similar to the destruction of the apricot die-back (apoplexy) but there is no secretion of resin; withered, dead or felled tree,
-at the plantation: infections and destruction of trees starting in a circular direction around the infected tree.

Usually 100 trees were examined on a site (except the smaller fruit gardens). 10 fruit trees of a circle were randomly selected for examination from 10 circles, that is 100 trees in total.

*Table 1*

**Scale of infection index (Fi) classification system** (Tarcali and Kövics, 2009)

| Infection degrees | Symptoms |
|---|---|
| I | Healthy tree |
| II | Symptoms on leaves, on 1 branch |
| III | General yellowing or drying, symptoms on several branches, |
| IV | 1 dead branch |
| V | Dead or felled tree |

Plant samples were collected from the supposedly infected trees, based on the visible symptoms (living leaves, pieces of branches and pieces of roots) by a sharp sampling knife for further laboratory examinations. The identification of phytoplasma is only possible from living plant parts. Identification is not possible from dead plant samples because of the life of the pathogen twit to the living phloem of the plant (Mergenthaler, 2004).

In the laboratory, molecular biological examinations were applied (PCR) to identify first the phytoplasma, and then the kind of the phytoplasma. The primers, sequences and programs which were applied on the PCR examination in order to identify the phytoplasma are shown in the *Table 2.*

*Table 2*

**Used sequences and programs on laboratory examinations (name of primer (1), sequences (2), position (3), programme (4)**

| Name of primer (1) | Sequences (5'->3') (2) | Position (bp) (3) | Programme |
|---|---|---|---|
| **P1** | AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT | 6-28 | 94°C-5min; 94°C-1min **55**°C-1min 72°C-2min (35 cycles); 72°C-10min |
| **P7** | TTCTCGGCTACTTCCTGC | 1818-1836 | |
| **fU5** | CGGCAATGGAGGAAACT | 370-387 | 95°C-3min; 95°C-1min **55**°C-1min 72°C-1min (35 cycles); 72°C-5min |
| **rU3** | TTCAGCTACTCTTTGTAACA | 1230-1250 | |
| **ECA1** | AATAATCAAGAACAAGAAGT | | 95°C-1min; 95°C-30sec **55**°C-30sec 72°C-30sec (35 cycles); 72°C-3min |
| **ECA2** | GTTTATAAAAATTAATGACTC | | |
| **fO1** | CGGAAACTTTTAGTTTCAGT | 61-81 | 94°C-3min; 94°C-1min **55**°C-1min 72°C-1min (35 cycles); 72°C-7min |
| **rO1** | AAGTGCCCAACTAAATGAT | 1115-1135 | |

## *RESULTS*

### Results of the field examinations

Field examinations on the research of *Ca* Phytoplasma prunorum was begun on 02 October, 2009 in the village of Bekecs (near Szerencs city). Four apricot plantations, one peach, one cherry, and three sour cherry plantations were examined on that year. The visual experience was the view of a very depressing situation, the apricot plantations were heavily destructed by phytoplasma disease, and a great number of apricot trees were dead or felled in the fruit gardens. Yellowing and rolling leaves on the apricot branches and several drying branches were found on the apricot trees. A similar situation was visible on peach, and the same was experienced on cherry and sour cherry trees. Very serious destruction of 85% was experienced in the Bekecs-Téglaszín apricot garden on 3 hectares. It was the most heavily infested and destructed apricot population among the examined spots. Very serious infection ratio was measured; out of the one hundred examined trees as many as, 85 were infected, and according to the classification system (*Table 1*) 65 were dead or felled, as it is visible in the column V. of *Table 3,* showing the degree of infection. Other stone fruit kinds were also examined during the field investigations. A more moderate infection was experienced in a 12-13-year-old peach cultivar where phytoplasma infection with a rate of 21% was experienced. The destruction rate on peach was not so high as it was on apricot, but the problem with *Ca.* Phytoplasma prunorum seemed to be evident there. Three sour cherry and one cherry plantations were examined as well. Destruction (of various rates) caused by phytoplasma were found. On the first examined sour cherry plantation the infection rate was very high (62%) and there were several withered or felled trees. It was easily observable that sour cherry and cherry are also endangered by *Ca.* Phytoplasma prunorum infection. A comparatively new, only 4-year-old apricot plantation was examined first. Most trees were healthy, but there were a few trees (2%) infected by *Ca.* Phytoplasma prunorum (*Table 3*). According to the description by Süle *et al.* (2003), on the apricot trees the first symptoms of the pathogen can be observed from the age of 3 or 4, and this thesis was justified in the visited apricot garden. The cultivars (cv.) of apricot grown on the plantations were the following ones: Ceglédi Óriás (Cegléd Giant), Ceglédi Arany (Cegléd Gold) and Magyar Kajszi (Hungarian Apricot). The cultivar Cegléd (new local varieties in Hungary) are more susceptible to phytoplasma disease than the old one, the Hungarian Apricot.

In 2010, further field research work were done in 6 fruit gardens in Borsod-Abaúj-Zemplén County, and 1 apricot plantation was visited and examined in West-Romania, in the village of Biharpüspöki, near the city of Oradea. Very high infection rates were measured in Bükkaranyos on 2 apricot gardens (I%: 77-84) and 1 sour cherry plantation (I%: 59) as it is shown in *Table 3*. No high infection rates were measured in the examined Romanian apricot garden, but the presence of apricot phytoplasma disease was evident, and it was the first time that *Ca* Phytoplama prunorum had been identified in the western part of Romania.

In 2011, field investigations were done repeated in Bekecs area, and in Biharpüspöki. The infection data were higher on every examined plots compared to the data of the previous years. A new field investigation spot, a sour cherry plantation in Hajdúdorog (Hajdú-Bihar County) was also examined. According to warnings of local growers there were several suspicious sour cherry trees, but there were not found any phytoplasma infected trees on our field investigation.

According to the results of the field experiences and the data of infection in the last 3 years, we can conclude on the plant health conditions of stone fruit plantations on the examined areas are rather bad. It was confirmed on apricot, peach and sour cherry in Bekecs area by the results of field investigations this year (illustrated by the photos on *Figure 3-5*) Besides, the data of the latest field examinations show that phytoplasma infection rate on peach (Bekecs-Majos plantation) has been increased significantly, as we can see the date of 22 September investigation spot (I%: 19) and 27 September investigation spot (I%: 38) in the *Table 3*. The latest data of field examination in Biharpüspöki (Romania) shows that infection of phytoplasma disease on apricot also increased (illustrated by photo on *Figure 6*).

### Results of the laboratory examinations

As many as 40 plant samples were collected on the field areas, which were examined in laboratory by PCR in the last 3 years (2009-2011). The presence of "*Ca.* Phytoplasma prunorum" was detected on 22 examined samples (*Table 4*). Phytoplasma infection was detected from the collected plant samples on all examined stone fruit varieties (apricot, peach, cherry, sour cherry, wild plum) respectively. The results of phytoplasma identifications are shown on *Figure 1* and *2*. The presence of the pathogen without any typical symptoms in tolerant wild plum was also detected, and it is obvious that wild plum may have an important part in the spreading of the pathogen.

Plant samples were also collected this year on the examined plots (Bekecs - apricot, peach, sour cherry, and Biharpüspöki –apricot), and the samples are just under laboratory identifications.

*Table 3*

**Phytoplasma infection data on the examined fields**

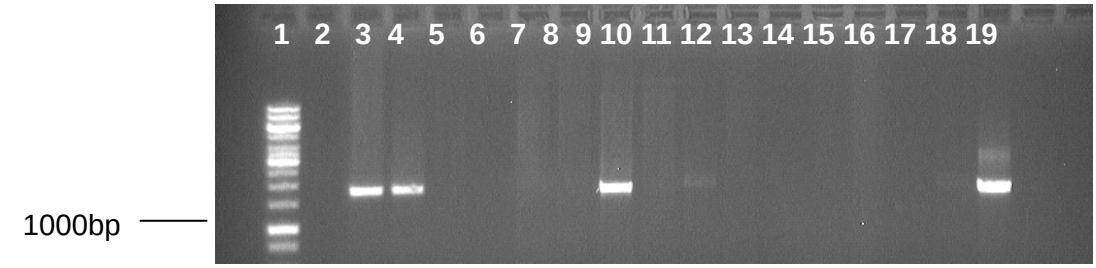
| Spots of the field examinations | Time | Tree kind | Age (year) | Area (ha) | Number of trees | Degree of infection | | | | | Ii | I% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | I | II | III | IV | V | | |
| 1.Bekecs | 02.10.2009. | Apricot | 4 | 20 | 100 | 98 | 1 | 1 | - | - | 1,03 | 2 |
| 2.Bekecs-Majos | 02.10.2009. | Apricot | 8-9 | 5 | 100 | 45 | 4 | 6 | 5 | 40 | 2,91 | 55 |
| 3.Bekecs-Téglaszín | 02.10.2009. | Apricot | 8 | 3 | 100 | 15 | 7 | 7 | 6 | 65 | 3,99 | 85 |
| 4.Bekecs | 02.10.2009. | Apricot | 12-13 | 10 | 100 | 30 | 6 | 4 | 35 | 25 | 3,21 | 70 |
| 5.Bekecs-Majos | 02.10.2009. | Peach | 8 | 6 | 100 | 79 | 7 | 2 | 2 | 10 | 1,57 | 21 |
| 6.Bekecs-Mélyárok | 02.10.2009. | Cherry | 10 | 22 | 100 | 70 | 9 | 4 | 6 | 11 | 1,79 | 30 |
| 7.Bekecs-Téglaszín | 02.10.2009. | Sour cherry | 8-9 | 5 | 100 | 38 | 14 | 10 | 8 | 30 | 2,78 | 62 |
| 8.Bekecs | 02.10.2009. | Sour cherry | 7 | 5 | 100 | 91 | 3 | 1 | 1 | 4 | 1,24 | 9 |
| 9.Bekecs-Mélyárok | 02.10.2009. | Sour cherry | 30 | 8 | 100 | 64 | 6 | 9 | 13 | 8 | 1,95 | 36 |
| 10.Bükkaranyos | 07.09.2010. | Apricot | 13 | 22,6 | 70 | 11 | 12 | 2 | 10 | 35 | 3,66 | 84 |
| 11.Bükkaranyos | 07.09.2010. | Apricot | 13 | 22,6 | 78 | 17 | 6 | 3 | 11 | 41 | 3,68 | 78 |
| 12.Bükkaranyos | 07.09.2010. | Sour cherry | 7 | 5 | 104 | 43 | 7 | 12 | 12 | 30 | 2,78 | 59 |
| 13.Bükkaranyos | 07.09.2010. | Wild plum | 13 | - | 20 | 20 | - | - | - | - | - | - |
| 14.Rátka | 07.10.2010. | Apricot | 21 | 50 | 100 | 41 | 10 | 9 | 11 | 28 | 2,72 | 59 |
| 15.Göncruszka | 07.10.2010. | Apricot | 4 | 5 | 54 | 34 | 4 | 4 | 3 | 9 | 2,06 | 37 |
| 16.Vizsoly | 07.10.2010. | Apricot | ~12 | 6 | 50 | 46 | 1 | 2 | 1 | - | 1,16 | 8 |
| 17.Boldogkőváralja | 07.10.2010. | Apricot | ~25 | 15 | 100 | 23 | 24 | 12 | 21 | 26 | 3,21 | 77 |
| 18.Abaújkér | 07.10.2010. | Apricot | ~15 | 10 | 50 | 45 | 3 | 1 | 1 | - | 1,16 | 10 |
| 19.Biharpüspöki(RO) | 14.10.2010. | Apricot | 25 | 6 | 100 | 97 | 2 | 1 | - | - | 1,04 | 3 |
| 20.Biharpüspöki(RO) | 06.08.2011. | Apricot | 26 | 6 | 100 | 87 | 6 | 3 | 3 | 1 | 1,25 | 13 |
| 21.Bekecs-Majos | 05.06.2011. | Apricot | 10-11 | 5 | 100 | 35 | 7 | 8 | 7 | 43 | 3,16 | 65 |
| 22.Bekecs-Majos | 05.06.2011. | Peach | 10 | 6 | 100 | 81 | 6 | - | 1 | 12 | 1,57 | 19 |
| 23.Bekecs-Mélyárok | 05.06.2011. | Cherry | 12 | 22 | 100 | 64 | 11 | 6 | 4 | 15 | 1,95 | 36 |
| 24.Bekecs-Mélyárok | 05.06.2011. | Sour cherry | 32 | 8 | 100 | 55 | 11 | 10 | 15 | 9 | 2,22 | 45 |
| 25.Hajdúdorog | 25.05.2011. | Sour cherry | 12 | 11 | 100 | 100 | - | - | - | - | - | - |
| 26.Bekecs-Majos | 28.08.2012. | Apricot | 11-12 | 5 | 100 | 29 | 8 | 9 | 8 | 46 | 3,34 | 71 |
| 27.Bekecs-Majos | 28.08.2012. | Peach | 11 | 6 | 100 | 62 | 8 | 8 | 7 | 15 | 2,05 | 38 |
| 28.Bekecs-Mélyárok | 28.08.2012. | Sour cherry | 33 | 8 | 100 | 63 | 5 | 11 | 13 | 8 | 1,98 | 37 |
| 29.Biharpüspöki(RO) | 11.09.2012. | Apricot | 27 | 6 | 100 | 81 | 8 | 5 | 2 | 4 | 1,40 | 19 |

*Table 4*

**Rates of examined and DNA-isolated samples of different fruit trees and the results of phytoplasma detection in 2009-2011**

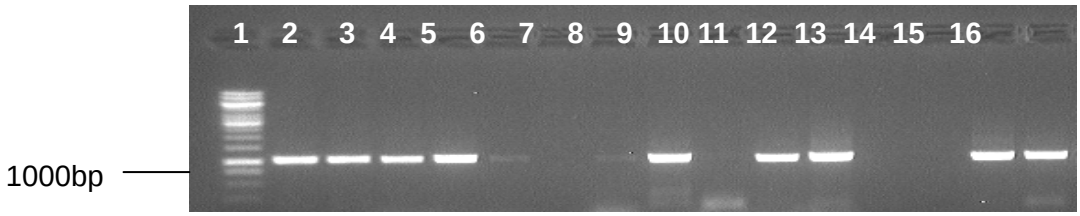
| Fruit tree species | Number of examined samples | Number of positive samples | Identified phytoplasma |
|---|---|---|---|
| apricot (*Prunus armeniaca*) | 21 | 12 | ESFY |
| peach (*Prunus persica*) | 6 | 2 | ESFY |
| cherry (*Prunus avium)* | 2 | 2 | ESFY |
| sour cherry (*Prunus cerasus*) | 10 | 5 | ESFY |
| wild plum (*Prunus cerasifera*) | 1 | 1 | ESFY |

*Figure 1:* **DNA fragments amplified by P1/P7 primers in 1% agarose gel**




1: DNA ladder; 2,5,6,8,10,12,13,14,15,16: negative samples; 18: positive ESFY control; 19: negative control; 3, 4, 7: apricot samples infected by phytoplasma; 9: infected wild plum sample; 11, 17: infected sour cherry and cherry samples

*Figure 2:* **DNA fragments amplified by FO1/rO1 group-specific primers in 1% agarose gel**




1: DNA ladder; 2,9: direct PCR; 2, 3, 4: infected apricot samples; 5: infected wild plum sample; 6, 7, 8: negative sour cherry and peach samples; 9: positive ESFY control; 10-16: nested PCR: 10: negative control; 16: positive ESFY control; 11: infected apricot sample; 12, 15: infected sour cherry samples; 13,14: negative sour cherry and peach sample

*Figure 3*: **Drying apricot trees in Bekecs in 2012**

*Figure 4*: **Dryed leaves on apricot in Bekecs in 2012**

*Figure 5*: **General yellowing on peach in Bekecs in 2012**

*Figure 6*: **Yellowing and rolling leaves on apricot in Biharpüspöki, Romania, in 2012**

Photos: G. Tarcali

## *CONCLUSIONS*

Summarizing the results of the field experiences and the degree of infection, we can state that the plant hygiene conditions of stone fruit plantations on the visited areas are rather bad. The disease caused by *Ca.* Phytoplasma prunorum is continously increasing and as a relatively new problem for fruit growers in Hungary, it seriously threatens the most important Hungarian apricot cultivations, and other stone fruits areas.

After the experiences of the field examinations it was confirmed by the laboratory results that *Ca.* Phytoplasma prunorum is a rather serious danger for stone fruits in Hungary and Central-Europe.

Our experiences resulting from our investigation show that we have to pay more attention to the increasing phytoplasma problem in stone fruits, and have to develop new and effective management strategies.

***REFERENCES***


Bernhard, R., Marenaud, C, Eymet, J., Sechet, J., Fos, A., Moutous, G. (1977): Une maladie complex de certain *Prunus*: "Le dépérissement de Moliéres". *C.R. Acad. Agric.* 2(2): 178-189.p.

Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., Osler, R. (1998): High tolerance of European plum varieties to plum leptonecrosis. Eur. J. Plant Pathology, 104: 141-145.

Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P. (2001): Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. Eur. J. Plant Pathology, 107: 695-700.

Chabrolin, C. (1924): Quelques maladies des arbres fruitiéres de la vallée du Rhone. *Ann. Epiphyties*, 10: 265-333.p.

Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. (1967): Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches broom, aster yellows, or paulownia witches broom. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 33: 259-266.

Fialová, R., Navrátil, M., Lauterer, P., Navrkalová, V. (2007): '*Candidatus* Phytoplasma prunorum': the phytoplasma infection of *Cacopsylla pruni* from apricot orchards and from overwintering habitats in Moravia (Czech Republic). Bulletin of Insectology, 60 (2): 183-184.

Gundersen, D. E., Lee, I. M., Rehner, S. A., Davis, R. E., Kingsbury, D. T. (1994): Phylogeny of mycoplasma organisms (phytoplasmas): A base for their classification. J. Bacteriol. 176, 5244-5254.

International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes (1993): Minutes of the interim meetings, 1 and 2 August 1992, Ames, Iowa. Int. J. Syst. Bacteriol., 43: 394-397.

Jarausch, W., Eyquard, J.P., Lansac, M., Mohns, M, Dosba, F. (2000): Susceptibility and tolerance of new French *Prunus domestica* cultivars to European stone fruit yellows phytoplasma. *J. Phytopathol*., 148(7): 489-493.p.

Jarausch, W., Jarausch-Wehrheim, B., Danet, J. L., Broquaire, J. M., Dosba, F., Saillard, C., Garnier, M. (2001): Detection and identification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. European J. Plant Pathology, 107: 209-217.

Kövics, Gy. (2009): Növénykórtani vademecum. NOFKA. Debrecen. pp. 470.

Lederer, M., Seemüller, E. (1992): Demonstration of mycoplasmas in *Prunus* species in Germany. *J.* Phytopathol., 134: 89-96.p.

Lorenz, K.H., Dosba, F., Poggi Pollini, C., Llacer, G., Seemüller, E. (1994): Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, 85: 771-776.p.

Mergenthaler E. (2004): Fitoplazmás betegségek Magyarországon: Korszerű diagnosztikai módszerek fejlesztése. Doktori értekezés. Budapesti Közgazdaságtudományi és Államigazgatási Egyetem Kertészettudományi Kar, Budapest. pp. 164.

Mona, G., Kadriye, C., Cigdem, U. S., Levent, S. (2008): Evaluations of apricot trees infected by *Candidatus* Phytoplasma prunorum for horticultural characteristics. Romanian Biotechnological Letters, Bucharest University, Romanian Society of Biological Sciences, 14 (1): 4123-4129.

Navratil, M. - Valova, P. - Fialova, R. - Patrova, K. (2001): Survey for stone fruit phytoplasmas in the Czech Republic. Acta Horticulture, 550: 377-382.

Németh, M., Ember, I., Krizbai, L., Kölber, M., Hangyál, R., Bozsics, G. (2001): Detection and identification of phytoplasmas in peach based on woody indexing and molecular methods. International Journal of Horticultural Science, 7: 37-41.

Seemüller, E., Schneider, B. (2004): "*Candidatus* Phytoplasma mali, "*Candidatus* Phytoplasma pyri" and "*Candidatus* Phytoplasma prunorum", the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 1217-1226.

Süle, S. (2003): A kajszi baktériumos és fitoplazmás betegségei. pp. 282-291. *In*: Kajszi. (Eds.) Pénzes, B. - Szalay, L. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

Süle, S., Viczián, O., Pénzes, B. (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása. Kertészet és Szőlészet, 45: 8-11.

Tarcali, G. , Kövics, G. J. (2009): Occurrence of stone fruit yellows phytoplasma disease in Gönc region, Northern-Hungary. 5th International Plant Protection Symposium at University of Debrecen, 20-22 October 2009, Debrecen, Hungary. Journal of Agricultural Sciences / Acta Agraria Debreceniensis, University of Debrecen 38, 69-74.

Torres, E., Martin, M. P., Paltrinieri, S., Vila, A., Masalles, R., Bertaccini, A. (2004): Spreading of EFSY phytoplasmas in stone fruit in Catalonia (Spain). J. Phytopathology, 152: 432-437.

Varga, K., Kölber, M., Németh, M., Ember, I., Erdős, Z., Bíró, E., Paltrinieri, S., Martini, M., Bertaccini, A. (2001): Identification of phytoplasmas infecting sour cherry in Hungary. XVIII International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops - Top Fruit Diseases. ISHS Acta Horticulturae 550: 383-388.

Viczián, O., Süle, S., Pénzes, B., Seemüller, E. (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása Magyarországon. Új Kertgazd., 1: 48-51.

Welliver, R. (1999): Diseases Caused by Phytoplasmas. Regulatory Horticulture, Plant Pathology Circular, 42: 17-22.

# An unusual subgroup II *Cucumber mosaic virus* strain isolated from *Scopolia carniolica* in Hungary

**Pál Salamon – Katalin Nemes – Katalin Salánki**
Agricultural Biotechnological Center, 2100. Gödöllő, Szent Györgyi A. Str. 4., Hungary
salánki@abc.hu

***SUMMARY***

*An unusual subgroup II strain of Cucumber mosaic virus (CMV) has been isolated from Scopolia carniolica showed mosaic and leaf narrowing symptoms. Based on symptomatological studies the CMV.ScL isolate was classified as B(Ln) pathotype, but unusually it caused local and systemic necrosis on Nicotiana glutinosa. Using pseudorecombinants of CMV-Rs and CMV-ScL the necrotic behaviour of CMV-ScL could be mapped on the genomic RNA2.*

**Keywords:** *Cucumber mosaic virus*, *Scopolia*, symptoms, host range, virus strains, molecular biology

## *INTRODUCTION*

*Cucumber mosaic virus* (CMV), the type species of the *Cucumovirus* genus (Fam.: *Bromoviridae*) is a world wide distributed plant virus of high economical importance. CMV has an extremely wide host range covering more than 1000 plant species including a lot of cultivated plants (Palukaitis and Garcia-Arenal 2003). Because of the great number of aphid vectors and of natural sources of infection, CMV often causes epidemic diseases on vegetables (tomato, pepper, lettuce), on tobacco and on different ornamental plants (e.g. chrysanthemums, bulbous ornamentals etc.).

CMV has spherical particles of ca. 28 nm in diameter. The virions encapsidate the genomic (+) ssRNA which is divided among three RNA molecules. RNA1 (3.3 kb) is monocistronic and codes the 1a protein. RNA2 (3.0 kb) contains two overlapping ORFs, from which the proteins 2a is translated. The 2b protein is translated from a subgenomic RNA, RNA 4A (0.7 kb). RNA3 (2.2 kb) is also dicistronic and codes the 3a and 3b proteins. The last one, the structural coat protein (CP) of the virus is translated from the subgenomic RNA4 (1 kb). Particles of some CMV isolates also contain small "satellite" RNAs of ca. 300 nt long. satRNAs are "parasitic" RNAs of which the replication fully depends on the helper virus and often modify the viral symptoms (Palukaitis et al. 1992).

CMV is known to be a highly variable pathogen. Based on molecular data two main classes of strains, denoted as subgroups I and II have been established (Palukaitis et al., 1992). The subgroup I isolates were divided later into two variants, IA and IB (Roossinck et al. 1999). Minor variants that differ in pathogenicity, in symptoms caused on different host plants or in transmissibility by aphids could be detected in both of the subgroups (Wahyuni et al. 1992)**.**

In the past two decades we collected ca. 40 isolates of CMV from various host plants in Hungary. The dominance of subgroup I strains has been established. Out of them, the isolate CMV-Rs from radish was sequenced and infectious cDNA clones of this isolate was assembled (Divéki et al. 2004). Unusual isolates causing white mosaic in tobacco (CMV-Ntw) or systemic mosaic in bean (CMV-NtPv) belonged also to subgroup I strains.

The Hungarian subgroup II isolates, eg. CMV-Trk7 (Szilassy et al. 1999) were differentiated earlier by the symptoms caused in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc. The B(Re) type isolates caused initial etched pattern followed by symptomless systemic infection, while the B(Ln) type isolates induced severe narrowing (shoestring) of top leaves (Salamon, 1989).

Spontaneous infection of *Scopolia carniolica* Jacq. with CMV have been first reported by the authors some 10 years ago in Hungary (Salamon and Salánki, 2001). In spite of the variability of symptoms in *S. carniolica* we demonstrated the presence of B(Re) pathotype (subgroup II strains) in each of four plants. In spring of 2011 a novel survey in the *Scopolia* population was conducted at the same place (Forest of Botanical Garden of St. Stephen University, Gödöllő). The presence of an unusual isolate (CMV-ScL) classified as B(Ln) pathotype has been detected. This paper deals with the symptomathology of CMV-ScL and demonstrates that one of its unusual properties, namely the induction of necrosis in *Nicotiana glutinosa* could be mapped to the genomic RNA2.

## *MATERIALS AND METHODS*

For virus isolation diseased *Scopolia* leaves were homogenized in sterile mortar adding 1:1 (v/w) 1/15 M cold phosphate buffer (pH = 7,0). Leaves of young test plants dusted with carborundum were gently rubbed with the sap. Local and systemic symptoms were evaluated for 2 weeks. CMV-ScL was isolated from a single local lesion developed on *Nicotiana glutinosa* and propagated in *N. clevelandii*. Host range and symptomatological studies were carried out as described (Salamon et al. 2001).

For preparation of pseudorecombinant viruses full length cDNA clones of each of the genomic RNAs of the virus isolates CMV-Rs (Divéki et al. (2004) and CMV-ScL (Salánki et al. unpublished) were transcribed. Each of the genomic RNAs of CMV-Rs were changed with the RNAs of CMV-ScL, respectively. The parent viruses and pseudorecombinants (PRs) were propagated in *N. clevelandii*. *N. glutinosa* plants were then mechanically inoculated with leaf extract of the propagative hosts.

## *RESULTS AND DISCUSSION*

### Symptoms in *Scopolia carniolica* plants and isolation of viruses

*Scopolia* plants grown in the forest of Botanical Garden of Gödöllő showed line pattern and mosaic symptoms very similar to those described earlier (Salamon and Salánki, 2001). A single plant marked Scopolia-Ln, however, expressed mild mosaic and leaf narrowing (Ln) symptoms (Fig. 1A).

Test plants inoculated with the leaf extracts of Scopolia-Ln reacted with local and systemic symptoms characteristic to CMV-B(Ln), ie. necrotic local lesions developed in *Chenopodium* spp., systemic mosaic expressed in cucumber while local echted rings and systemic leaf narrowing appeared in *N. tabacum* cv. Xanthi-nc. However, *N. glutinosa*, a well known test plant of CMV reacted unusually. Large necrotic lesions were induced on the inoculated leaves, followed by severe systemic necrosis and death of the plants. The virus isolate transmitted from a single lesion retained the necrotic behaviour in *N. glutinosa* and was investigated by host range and molecular properties.

### Host range and symptomathology of CMV-ScL

CMV-ScL caused local infection in *Chenopodium* spp. as well as in *Phaseolus* and *Vigna* plants (Table 1.). It induced systemic mosaic disease in cucumber. The great majority of Solanaceous species reacted with severe systemic leaf narrowing symptoms, while local and systemic necrosis were induced in *N. glutinosa* and *N. edwardsonii* plants. *Acnistus australis* proved susceptible only locally.

### Mapping the necrotic effect of CMV-ScL using peseudorecombinant viruses

The parent viruses, CMV-Rs and CMV-ScL caused mosaic and necrosis on *N. glutinosa*, respectively. PRs of the genotypes RRS, SRR and SRS induced mosaic symptoms, while the pseudorecombinant RSR in which the RNA2 of CMV-Rs was exchanged with RNA2 of CMV-ScL caused local and systemic necrosis very similar to those of CMV-ScL. (Fig 1)

Based on the pathological and molecular properties (Salánki et al. unpublished) the ScL virus isolate could be identified as a subgroup II strain of cucumber mosaic virus. The leaf narrowing symptoms caused in most of the *Solanaceous* hosts is characteristic to the B(Ln) pathotype, but unusually CMV-ScL caused specific necrotic reaction in *Nicotiana glutinosa*. Similar symptoms were observed only in *N. edwardsonii*, the hybrid of *N. glutinosa* and *N. cleveladii.* Using pseudorecombinant viruses this unusual character of CMV-ScL could be mapped on the viral RNA2 in contrast of the CMV-Ns (subgroup I isolate) in which the necrotic phenotype was determined by the RNA1 (Divéki et al 2004).

*Table 1*

**Host range and symptomathology of CMV-ScL**

| Plant species | Local symptoms | Systemic symptoms |
|---|---|---|
| ***CHENOPODIACEAE*** | | |
| ***Chenopodium*** | | |
| ***amaranticolor*** | **pnl** | **-(ni)** |
| ***Ch. murale*** | **nl** | **-(ni)** |
| ***Ch. quinoa*** | **nl** | **-(ni)** |
| ***CUCURBITACEAE*** | | |
| ***Cucumis sativus*** | | |
| ***cv.* Delicatess** | **cf** | **mo** |
| ***LEGUMINOSAE*** | | |
| ***Phaseolus vulgaris*** | **pnl** | **-(ni)** |
| ***Vigna sinensis*** | **nl** | **-(ni)** |
| ***SOLANACEAE*** | | |
| ***Acnystus aurtralis*** | **sl** | **-(ni)** |
| ***Capsicum annuum L. cv.*** | | |
| **Albaregia** | **cs** | **mo, ln** |
| ***Datura stramonium*** | **cs** | **mo, ln** |
| ***Nicotiana benthamiana*** | **cs** | **mo, ln** |
| ***N. clevelandii*** | **cs** | **mo, ln** |
| ***N. edwardsonii*** | **nl** | **tn, d** |
| ***N. glutinosa*** | **nl** | **tn, d** |
| ***N. megalosiphon*** | **nr** | **mo, ln** |
| ***N. rustica*** | **cs** | **mo, ln** |
| ***N. sylvestris*** | **cs** | **mo, ln** |
| ***N. tabacum cv. Xanthi-nc*** | **er** | **ln** |
| ***Solanum lycopersicum cv.*** | | |
| **Rutgers** | **sl** | **ln** |
| ***S. tuberosum cv.* Kisvárdai** | | |
| **rózsa** | **sl** | **ln** |

Abbreviations: cs = chlorotic spots; -(ni) = not infected; ln = leaf narrowing; pnl = pin-point lesions;sl = symptomless; mo = mosaic; er = etched rings; nl = necrotic lesions;

*Fig.1* **Symptoms caused by CMV-ScL on Nicotiana glutinosa**

***REFERENCES***

Divéki, Z. – Salánki, K. – Balázs, E. (2004): The necrotic pathotype of the cucumber mosaic virus(CMV) Ns strain is solely determined by amino acid 461of the 1a protein. Molecular Plant Microbe Interaction 17, 837-845.

Palukaitis, P. - García-Arenal, F. (2003): Cucumoviruses. Adv. Vir. Res. 62:241-323.

Palukaitis, P. - Roossinck, M.J. - Dietzgen, R.G. - Francki, R.I.B. (1992): Cucumber mosaic virus. Adv. Virus Res. 41:281-348

Salamon, P. (1989):Virus diseases and viruses of cultivated and wild-growing Solaneaous plants in Hungary.2. Natural hosts of Cucumber mosaic virus (CMV) in the family Solanaceae. Növényvédelem 25, 97-109 (In Hungarian).

Salamon, P. – Salánki, K. (2001): Virus diseases and viruses of cultivated and wild-growing Solaneaous plants in Hungary.4. Spontaneous occurrence of cucumber mosaic virus (CMV) on Scopolia carniolica Jacq. Növényvédelem 37, 123-127.

Szilassy, D. - Salánki, K. - Balázs, E. (1999): Molecular evidence for the existence of two distinct subgroups in cucumber mosaic cucumovirus. Virus Genes 18, 221-227

Wahyuni, W.S., - Dietzgen, R. G. - Hanada, K. - Francki, R.I.B. (1992).Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. Plant Pathol 41, 282-297.

# Mass occurrence of the citrus flatid planthopper (*Metcalfa pruinosa* (Say, 1830)) (Hemiptera: Flatidae) in an agricultural hedgerow at Gödöllő (Hungary)

**András Bozsik**

University of Debrecen, Centre for Agricultural and Applied Economic Sciences, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management, Institute of Plant Protection, Debrecen, Hungary,

e-mail: bozsik@agr.unideb.hu

***SUMMARY***

*Citrus flatid planthopper,, a native insect to North America have had for a long time a scarce economic importance there. However, being polyphagous made small damage on citrus trees and some ornamentals.In 1979 it was introduced to Italy where it established and spread quickly. It is now an invasive alien species continually spreading in South and Central Europe causing considerable damage in grape wine and various ornamentals. Present study shows the results of a humble investigation in Gödöllő (Hungary). On the majority (70%) of the trees and shrubs have been found adults, vaxy filaments and nymph cuticles of* M. pruinosa. Infested plants – among them some with American origin – were: *Acer negundo, Celtis occidentalis, Clenatis vitalba, Crataegus monogyna, Lycium barbarus, Morus alba, Prunus padus, Prunus serotina, Prunus spinosa, Robinia pseudo-acacia, Rosa canina* and *Ulmus campestris*. *The hedgerow was situated between an alfalfa field and the railway line. The length of similar hedges can be merely in Pest county several hundred km, which means M. PRUINOSA has plenty of opportunity for spreading along the railway and infest agricultural and ornamental cultures.*

**Key words**: *Metcalfa pruinosa*, citrus flatid planthopper, invasive alien species, Hungary, hedgerow, mass occurrence

## *INTRODUCTION*

*Metcalfa pruinosa* (Say, 1870) is native to North America from where it was accidentally introduced to Italy in 1979 (Zangheri and Donadini 1980). After a rapid spreading in Italy it managed to get to more than 15 European countries (Strauss 2010). *M. pruinosa* has been settled in Italy, France (Della Giustina 1986), Slovenia (Sivic 1991 in Strauss 2010), Switzerland (Jermini *et al.,* 1995), Croatia (Maceljski *et al.,* 1995 in Strauss 2010), Austria (Kahrer and Moosbeckhofer 2003), Greece (Drosopoulos *et al.,* 2004 in Strauss 2010), Spain (Pons *et al.,* 2002 in Strauss 2010), Serbia and Montenegro (Hrncic 2003), ungary (Orosz and Dér 2004),Bulgaria (Tomov *et al*., 2006 in Strauss 2010), Turkey (Karsavuran and Güçlu 2004 in Strauss 2010), Bosnia Herzegovina (Gotlin Culjak *et al.,* 2007 in Strauss 2010), Romania (Grozea *et al.*, 2011) and was found also in Albania and Slovakia (DAISIE website 2013). *M. pruinosa* populations found in the UK and Bohemia were successfully eradicated by insecticide treatments (C. Malumphy and P. Lauterer, personnel communication in Strauss 2009).

Its harm is little in the USA: some fruit trees and ornamentals suffered small damage and aesthetic injury (Mead 1969). Being polyphagous, *M. pruinosa* attacked various cultivated and wild trees, shrubs and weedy plants in Italy (Bagnali and Luccchi 2000). Sucking of nymphs can cause deformation and injury of shoots and twigs leading to wilt and destruction. Grape quality damaged considerably as a consequence of nymphs' feeding (acidity and sugar content altered) and also soyabean suffered a 30-40% yield loss in Italy (Ciampolini *et al.,* 1987). Grape quality decreased heavily by the honeydew production of *M. pruinosa* and the following sooty mould formation in France (Della Giustina and Navarra 1993). Ornamentals in nurseries and parks are in danger because of the vaxy filaments produced on leaves and shoots by *M. pruinosa* (Lauterer 2002, Strauss 2010). It was revealed that some *M. pruinosa* were infected with various phytoplasmas but they could not transmit them in experiments (Bressan *et al.,* 2006 in Strauss 2010).

In Bohemia, Austria and Romania started thorough observations and investigations to get to know its spread, host plants and control opportunities. In Austria using the CLIMEX® programme various parameters (temperature index, diapausa index, moisture index, cold, wet, dry and heat stresses) were investigated in order to find the susceptible Austrian areas and cultures and also worked on the control opportunities (Strauss 2010).

*M. pruinosa* occurred in Hungary (Budapest) in 2004 but its expansion and injury has not been reported considerably. On its first occurrence no damage was found. The pest was observed on feeding *Ambrosia artemisiifolia* L. in Szabolcs-Szathmár county (Szőke L. personnel communication, 2011), which was considered as a possible A. *artemisiifolia* control. It was found also on grape in Budapest in 2010 (Bozsik not published, 2010).

The aim of this paper is to show a local mass outbreak of *M. pruinosa* in a hedgerow at Gödöllő which a long-lasting shelter and spreading opportunity could be and also to give some information on its host plant diversity.

### Morphology

Mead (1969) and Lauterer (2002) gave a detailed morphological characterisation on adults and nymphs, thus here only a very brief description will be provided. Adults are 7-8 mm in length. Dorsal surface of the body and forewings are blackish brown. Body and forewings are covered with a whitish powdery secretion making the blackish colour grey-bluish. The nymphs' body is flattened and white, covered with a dense waxy substance

forming long filaments at the apex. The same waxy secretion is produced on leaves and shoots where the nymphs feed. The 5th – last – instar is 5-6 mm long. Development stage of nymphs can be distinguished by the size of head capsule and wing pads (Lauterer, 2002).

**Life cycle**

*M. pruinosa*has one generation a year and overwinters as eggs laid in the bark of damaged twigs (Mead, 1969, Lauterer 2002). In France and Austria, nymphs can hatch from May to mid July and suck phloem sup of host plants and produce a lot of honeydew. They have 5 growth stages. Finishing development adults emerge in August and begin laying eggs. Egg production can be maximum 90 eggs (Della Giustina**,** 1987, Kahrer *et al.,* 2009).

**Host plants**

*M. pruinosa* is a polyphagous planthopper feeding on a great diversity of plants. Unfortunately, because of this high diversity it is difficult to prove its preference and future injury.

In the USA, *M. pruinosa* was found on citrus, grape fruit, orange, grape, many forest and fruit trees, shrubs and some herbs (Mead, 1969).

Bagnoli and Lucchi (2000) reported more than 200 host plants from different families for *M pruinosa* in Italy. In the Czech Republik, *M. pruinosa* slightly damaged ornamental plants like *Thuja occidentalis* L., *Juniperus communis* L., *Sorbus aucuparia* L., *Lilium* sp. and were found also on some woody species (Lauterer, 2002). In Austria (Vienna), the following host plant species were observed: *Acer* ssp., *Ailanthus altissima L.*, *Buxus microphylla L.*, *Catalpa bignonioides L.*, *Clematis* ssp., *Deutzia* ssp., *Euonymus* ssp., *Fraxinus excelsior L., Hibiscus* ssp., *Lonicera* ssp., *Mahonia quifolium L.*, *Parthenocissus quinquefolia L.*, *Paulownia tomentosa* L., *Prunus* ssp., *Robinia pseudoacacia L.*, *Rubus fruticosus L.*, *Sambucus nigra L.*, *Spirea* ssp., *Symphoricarpus albus L.*, *Viburnum burkwoodii* (Kahrer *et al.,* 2009) and *Urtica dioica* L. (Strauss 2010). In Serbia (Belgrad), *M. pruinosa* were reported on woody species in the genera: *Acer*, *Aesculus*, *Gleditchia*, *Robinia*, *Ailanthus*, *Populus*, *Platanus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Ulmus*, *Tilia*, *Cornus*, *Fraxinus*, *Quercus* and *Thuja* (Mihajlović 2007). In Romania, it was collected and seen on *Acer saccharinum* L., *Juglans nigra* L., *Juniperus* sp., *Thuja occidentalis* L., *Buxus sempervirens* L., *Albizia julibrissin Durazz., Potentila (Dasiphora) fruticosa* L., *Cycas revoluta* Thunb., *Vitis vinifera* L., *Atriplex hortensis* L., *Sambucus nigra* L., *Melissa officinalis* L., *Philadelphus coronarium, Ligustrum vulgare* L., *Hibiscus rosa-sinensis l. an Rosa* sp. (Grozea *et al.,* 2011). In Hungary, *M. pruinosa* was observed in Budapest on the following plants: Acer sp., *Aesculus hippocatanum* L., *Berberis* sp., *Crataegus* sp., *Hibiscus* sp., *Syringa* sp., Ulmus sp. (Orosz and Dér, 2004).

The pest was monitored on feeding *Ambrosia artemisiifolia* L. in Szabolcs-Szathmár county (Szőke L. personnel communication, 2011), which was considered as a possible *A. artemisiifolia control.* It was found also on grape in Budapest in 2010 (Bozsik not published, 2010).

**Control**

In its native area it usually no needs for control except in case of obvious damage which is a rarity (Mead, 1969). Cutting twigs infested with eggs or treatments with horticultural oil and insecticidal soap is enough against *M. pruinosa* (Rebek, 2009). Chlorpyriphos and imidacloprid was efficient in Austria. Fenitrothion was used successfully in the Czech Republic (Lauterer, 2002). Strauss (2009) studied control opportunities with special regard for the use of the natural enemy, *Neodryinus typhlocybae* (Ashmead 1893) (Hymenoptera: Dryinidae) which has been released and used in Italy, France, Slovenia, Switzerland, Croatia, Greece, the Netherlands and Spain (Tommasini *et al.,* 1998 in Strauss 2009; Ciglar *et al.,* 1998 in Strauss 2009; Jermini *et al.,* 2000; Žežlina *et al.,* 2001 in Strauss 2009; Malausa 1999 in Strauss 2009; A. Sala, personnel communication 2007 in Strauss 2009). She showed that *N. typhlocybae* attacked and parasitised only *M. pruinosa* and the native European planthoppers were saved (Strauss 2009). *Coccinella septempunctata* feeds also on *M. pruinosa* (Kahrer *et al.,* 2009).

**Route of spreading**

Spreading of *M. pruinosa* in Hungary could be with transported tree and ornamental seedlings from areas where the pest is established or the planthopper itself could migrate from the same localities. According to Lauterer (2002) the natural annual spreading of *M. pruinosa* is aboit 50 m on each direction. Grozea *et al.,* 2011 thought *M. pruinosa* individuals flew in Romania (Temes County) from the neighbouring Serbia and Hungary. It means that the density of this planthopper in our country was estimated high.

## *MATERIALS AND METHODS*

As a consequence of an accidental finding of a *M. pruinosa* adult when passing by a semi-natural hedgerow at Gödöllő (small town in the north of Hungary, 25 km away from Budapest) detailed visual investigation of the shrubbery was carried out. Leaves and shoots of trees and shrubs for *M. pruinosa* and its rests were carefully examined at every 10 m along a 650 m part of the hedge on 28-30. August 2012, and the findings were noted. Altogether 65 plants were chosen and observed. The hedge came along at the one side of a cultivated alfalfa field and at the other side of the railway track. Characteristic woody plants were: *Acer negundo* L.*, Acer saccharinum* L.*, Celtis occidentalis* L.*, Clematis vitalba* L.*, Cornus sanguinea* L.*, Crataegus monogyna Jacquin, 1775, Eounymus europeus, Lycium barbarum* L. *, Morus alba* L.*, Prunus padus, Prunus serotina, Prunus spinosa, Robinia pseudoacacia, Rhamnus cathartica* L.*, Rosa canina, Ulmus campestris. R. pseudoacacia* and *P. spinosa* predominated. All the plants – except *R. pseudoacacia, A. negundo, A. saccharinum, C. occidentalis, L. barbarum, M. alba, P. serotina* - belong to the native Hungarian flora. *R. pseudoacacia, A. negundo, A. saccharinum, C. occidentalis, P. serotina* are native to North America.

## *RESULTS AND DISCUSSION*

Adults, nymph cuticles and waxy filaments of *M. pruinosa* were found on the leaves and shoots. No living nymphs have been observed. 46 (70.8%) of the 65 examined plants showed the presence of *M. pruinosa*. 7 plant species were exotic of the 16 hedge trees and 5 of the 7 exotics were native to North America which is also the original country of *M. pruinosa* (Table 1). However, interestingly no individual or any rest of the *M. pruinosa* have been found on *A. saccharinum*, also native to America. The length of this kind of hedge - running parallel with the railway line – can be more than several hundred km long only in Pest county. This means that the hedge can be a huge reservoir of *M. pruinosa*, an invasive species. These hedges have enormous beneficial importance as resources for firewood, medicinal plants, fruits, berries, mushrooms, bee pastures; structures like ecological networks, corridors and barriers, shelter for protected plant and animal species, and natural enemies. The management of these hedges is generally cutting the trees in every 5 or 10 years to gain some heating material and making a better view. It is a chance that there is neither money, nor intension for spraying with chemical insecticides these structures. This means that in case of introduced invasive pests without natural enemies, there is quite a high risk for establishing and spreading in such a peaceful new environment especially when many formerly established plants make easier this process.

*Table 1*

**Occurrence of adults, filaments and nymph cuticles of *Metcalfa pruinosa* on trees and shrubs of a Gödöllő hedgerow**

| Plant species examined | Number of infested plants | Number of plants with adults | Number of plants with vaxy filaments | Number of plants with rests of nymph cuticles |
|---|---|---|---|---|
| *Acer negundo* | 1 | | 1 | |
| *Celtis occidentalis* | 1 | | 1 | |
| *Clematis vitalba* | 4 | | 4 | 2 |
| *Crataegus monogyna* | 1 | 1 | 1 | 1 |
| *Lycium helimifolium* | 1 | | 1 | |
| *Morus alba* | 2 | 1 | 2 | |
| *Prunus padus* | 1 | | 1 | |
| *Prunus serotina* | 2 | 2 | 2 | 1 |
| *Prunus spinosa* | 15 | 4 | 15 | 5 |
| *Robinia pseudoacacia* | 7 | 2 | 7 | 2 |
| *Rosa canina* | 1 | 1 | 1 | 1 |
| *Ulmus campestris* | 10 | 1 | 10 | 2 |
| | | | | |
| Total | 46 | 12 | 46 | 14 |

How is possible to manage this situation? In Great Britain and Bohemia eradication was successful (C. Malumphy and P. Lauterer, personnel communication in Strauss 2009). Perhaps, it was due to the generally colder and more humid climate of both countries which did not favoured the development and reproduction of the pest. Thus, this eradication with pesticides in Hungary cannot be a right answer. In Austria there was a mass outbreak in Vienna in 2003 and the pest continued spreading and was found also in Graz. According to the risk analysis of Strauss (2010) mainly organic orchards and vineyards in Burgerland, Lower Austria and Styria are threatened by *M. pruinosa*. She proposed inspection of trade and trade pathways of trees and ornamentals, parking sites and gardens along transport routes, pesticide application and the introduction of *N. typhlocybae.* What can we do in Hungary? Our climatic conditions are more favourable for the planthopper than those in Austria. Our facilities (personnel and material) are limited. The spread of *M. pruinosa* is not estimated and

known. The only efficient and environmental friendly control opportunity might be the introduction of natural enemies in this case *N. typhlocybae* already used in Italy and tested for not target organisms in Austria (Strauss 2009).

## *CONCLUSIONS*

Occurrence and reproduction of *M. pruinosa* have been observed in an agricultural hedgerow at Gödöllő. Adult *M. pruinosa*, nymphs cuticles and their waxy secretions were observed but the trees and shrubs did not damage. This is the first verified appearance of this IAS in this area. The author has been studied this shrubbery and the fields around for more then 10 years but has not observed this planthopper until now. Regarding the hedgerow management, there are excellent conditions (high plant diversity with many American plant species) for the quick and long-lasting establishment of *M. pruinosa*. The only efficient control opportunity would be the introduction of its natural enemy, *N. typhlocybae*. Regarding the environmental and climatic conditions of the country it is dubious that continual inspections or verifications could help not to mention the chemical eradication. A list of host plants and their preference can make more accurate the known diversity of this pest.

## *REFERENCES*


Bagnoli, B. and Lucchi, A. 2000. Dannosità e misure di controllo integrato. In: A. Lucchi, (ed.). La *Metcalfa* negli ecosistemi italiani. ARSIA. Regione Toscana, Italy. Pp. 65-88.

Della Giustina**,** W. 1987. *Metcalfa pruinosa* (Say 1830), nouveaute pour la faune de France (Hom. Flatidae). Bulletin de la Societé Entomologique de France 191(3-4): 89-92.

DAISIE Metcalfa pruinosa factsheet. Dekivering alian invasive species inventories for Europe. http://www.europe-aliens.org/ Accessed 26 September 2012

Grozea, I., Gogan, A., Virteiu, A.M., Grozea, A., Stef, R., Molnar, L., Carabet, A. and Dinnesen, S. (2011) Metcalfa pruinosa Say (Insecta: Homoptera: Flatidae): a New pest in Romania. African Journal of Adricultural Research 6 (27): 5870-5877.

Kahrer, A., Strauss, G., Stolz, M., Moosbeckhofer, R. 2009 Beobachtung zur Faunistik and Biologie der vor kurzem nach Österreich eingeschleppten Bläulingszikade (*Metcalfa pruinosa*). Beiträge zur Entomofaunistik, 10: 17-30.

Kahrer, A, Moosbeckhofer, R (2003) Ein neuer Schädling –Metcalfa pruinosa – in Österreich eingeschleppt. Bienenvater 10:16

Lauterer, P. 2002. Citrus flatid planthopper, *Metcalfa pruinosa* (Hemiptera: Flatidae), a new pest of ornamental horticulture in the Czech Republic. Plant Protection Science 38(4): 145-148.

Mead, F.W. (1969 Citrus flatid planthopper, *Metcalfa pruinosa* (Say) Homoptera: Flatidae. Florida Department of Agriculture, Division of Plant Industry, Entomology Circular No. 85. 1-2.

Mihajlović, Lj. (2007) *Metcalfa pruinosa* **(**Say**) (**Homoptera**:** Auchenorrhyncha**)** a new harmful species for entomofauna of Serbia. Glacnik Sumarskog Fakulteta, Beograd, 95: 127-134.

Orosz A. és Dér Zs**.** (2004): Idejében szólunk a *Metcalfa pruinosa* (Say, 1830) kabóca esetleges megjelenéséről. Növényvédelem, 40 (3): 137–141.

Rebek, E.J. (2009**)** Pest du Jour: Flatid Planthoppers. Pest alerts, Oklahoma State University, 8 (16): 2. http://entoplp.okstate.edu/Pddl/

Strauss, G**.** 2009. Host range testing of the nearctic beneficial parasitoid *Neodriynus typhlocybae.* Biocontrol, 54: 163-171.

Strauss, G**.** 2010. Pest risk analysis of *Metcalfa pruinosa* in Austria. Journal of Pest Science 83(4): 381-390.

Zangheri, S. and P. Donadini**.** 1980. Comparsa nel Veneto di un omottero neartico: *Metcalfa pruinosa* Say (Homoptera, Flatidae). Redia 63: 301-305.

# Study on the most important elaterid pests (Coleoptera: Elateridae) in Hungary in 2012: species distribution and damage risk

**Antal Nagy – István Szarukán – Erzsébet Lovász – István Dávid**
University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management, Institute of Plant Protection
H-4032 Debrecen, Böszörményi út 138.
nagyanti76@gmail.com

***SUMMARY***

*The click beetles and their larvae (wireworms) are dangerous pest of different economically important crops of Hungary. They cause damage mostly in maize, sunflower and wheat. In order to develop the effectiveness of actions against them we need actual distribution and abundance data on the most important species. In 2010 a country wide sampling program was started to collect actual data on six Agriotes species. In 2012 26 sampling sites were studied with species specific pheromone traps in Transdanubia (14) and Eastern Hungary (12). We determined the distribution and relative frequency of the six studied species. In this sampling period 72583 individuals of the six sampled species and 1627 individuals of additionally caught elaterid species were trapped. On the basis of distribution of most abundant species we assigned the areas of the country endangered by wireworms.*

**Keywords:** click beetle, wireworm, Elateridae, maize, plant protection, pest, pheromone trap

## *INTRODUCTION*

The family of click beetles (Coleoptera: Elateridae) has approximately 8000 known species, and 131 species of them occure in Hungary (Merkl and Mertlik 2005). Agricultural significance of species depends on the life type of their larva (wireworm), which may be omnivorous, phytophagous, saprophagous or carnivorous. Species of *Agriotes* genus are considered as the most significant elaterid pests in Hungary, because of their phytophagous life form and their outstanding abundance. Species of this genus are the most dominant ones in the elaterid assemblages with approximately 80-90 % relative frequency in the Hungarian arable lands. They can cause significant damage especially in maize, sunflower, and in case of strong infection in winter wheat – and in horticulture (Tóth 1990).

The biology and damage of most noxious click beetles species are extensively studied. Their life cycle, seasonal dynamics and host range are generally well known, and there are numerous data on their distribution. However, protection against wireworm damage must be found on up to date distribution and frequency data, which contribute significantly to effective plant protection (Tóth 1990).

The easiest way to study elaterid pest assemblages is trapping with species specific pheromone traps. These traps are suitable for detection of presence of each species and studying of their seasonal dynamics (Tóth *et al.,* 2002). Furthermore, in case of *A. ustulatus,* an economic threshold was determined by Furlan *et al.* in 1996 (Internet 1), which is 200-250 individuals/trap/year. The trap effectiveness of this relatively agile species is higher than the less agile ones. In case of parallel damage of *A. lineatus*, *A. obscurus* and *A. sputator* Anon (in Blackshaw et al 2008) recommended economic threshold of 150 individuals/trap/year in the UK. For this reason – in spite of different thresholds and the lack of such estimation for other click beetle species – this value may be reliable for them because of their similar biology, and may be a general threshold for protection against wireworms (Internet 1).

The studied species has different response to their sex pheromone traps: *A. lineatus* traps are more effective than *A. obscurus*, while *A. sputator* is relatively static species with less trap effectiveness (Blackshaw & Vernon 2008, Blackshaw *et al.*, 2008). Considering these results the trap counts could not be simply added, however the damage caused by different species are added in real. In this study counts of different species were summarize separately.

In view former results, the distribution and frquency of the most important six *Agriotes* species (*A. brevis, A. sputator, A. obscurus, A. lineatus, A. rufipalpis, A. ustulatus*) of Hungary were studied on maize fields in 2012. This study was a continuation and an extension of a country wide click beetle monitoring started in 2010 (Nagy *et al*., 2010, 2011). This paper shows the results of the year 2012.

This study was supported by Syngenta Ltd.

## *MATERIALS AND METHODS*

The spatial distribution and the abundance of most dangerous *Agriotes* species (*A. brevis, A. sputator, A. obscurus, A. lineatus, A. rufipalpis* and *A. ustulatus*) were studied in different regions of Hungary in 2012. Samplings were carry out on 26 maize fields representing main Hungarian maize producing areas (and completing sampling areas of former two years (Nagy *et al.,* 2010, 2011)). In compliance with it sex pheromone traps were set on maize fields of typical maize producing areas of 14 counties: Hajdú-Bihar (2), Borsod-Abaúj-Zemplén (2), Heves (3), Jász-Nagykun-Szolnok (2), Pest (2), Bács-Kiskun (1), Fejér (2), Tolna (1), Baranya (1),

Komárom-Esztergom (2), Győr-Moson-Sopron (3), Zala (1), Vas (2), Veszprém (2) (*Table 1, and Fig. 1 and 2*) Pheromone traps were set in edge of maize fields where this crop is produced regularly.

Yatlor type traps were used in case of *A. brevis, A. sputator, A. obscurus, A. lineatus* and *A. rufipalpis*, while Csalomon VarB type traps were used in case of *A. ustulatus*. In the traps commercialized species specific Csalomon type pheromone capsules were used (Internet 2).

Traps were set in four replications in sampling sites in case of each species. The order of replications always was "brevis", "sputator", "obscurus/lineatus" combined, "rufipalpis/sordidus" combined. VarB traps of *A. ustulatus* were set approximately two month later between "brevis" and "sputator" traps. The distance between neighbouring traps was 20 metres so the replicated traps were 80 metres far from each other. Yatlor type traps were set in the edge of maize fields and VarB type traps were set in the maize stand near the edge. The destroyed and disappeared traps were recovered or substituted. The traps were emptied every two weeks.

The "brevis" and "rufipalpis/sordidus" Yatlor traps were checked seven times (14-week period) while "sputator" and "obscurus/lineatus" eight times (16-week period) because of different population dynamic of species in the studied year. Pheromone capsules were changed once during this time. The experience given in former years (Nagy *et al.*, 2010, 2011) showed that the adult beetles emerge earlier in Transdanubia (West Hungary), so the traps were set up earlier in this region than in eastern Hungary. Yatlor traps worked from 29 March to 20 July in Transdanubia and from 5 April to 27 July in eastern Hungary. Considering seasonal dynamic of *A. ustulatus* VarB traps were set later. These traps worked from 22 May to 16 August in Transdanubia and from 30 May to 22 August in eastern Hungary. Pheromone capsules were changed two times, after four-week use in this case (*Table 2*).

Caught adults were killed by moth-killer insecticide, and samples were stored in a refrigerator until count and identification. The sampled individuals were identified after keys of Dolin (1991) and Laibner (2000) and Elateridae collection of University of Debrecen, Plant Protection Institute.

Spatial distribution and relative frequencies of the studied species were evaluated. Besides the specimens of six directly sampled *Agriotes* species the other caught click beetles were also identified. Data of these additional species can be used in further biogeographical or faunistical studies. In order to evaluate the damage risk of different regions we used total number of sampled individuals ($N_{total}$=individuals/year) and mean number of sampled individuals per traps ($N_{mean}$=individuals/trap/year) for each studied species in each sampling site.

*Table 1*

**Click beetle (Elateridae: *Agriotes* sp.) sampling sites in Hungary 2012**

| Transdanubia (Western Hungary) | | Eastern Hungary | |
|---|---|---|---|
| Code of sites | Sites | Code of sites | Sites |
| 1 | Bicske | 12 | Újszász |
| 2 | Kocs | 13 | Jászberény |
| 3 | Kisigmánd | 14 | Dabas |
| 4 | Töltéstava | 15 | Szabadszállás |
| 5 | Kóny | 16 | Cegléd |
| 6 | Szil | 17 | Fenyőharaszt |
| 7 | Zsédeny | 18 | Apc |
| 8 | Kám | 19 | Füzesabony |
| 9 | Zalaegerszeg | 20 | Mezőkövesd |
| 10 | Kisszőlős | 21 | Újcsanálos |
| 11 | Nagyacsád | 22 | Látókép (Debrecen) * |
| 23 | Dalmand * | 26 | Biharkeresztes |
| 24 | Bicsérd* | - | - |
| 25 | Enying | - | - |

*: sites sampled continuously during 2010-2012

*Table 2*

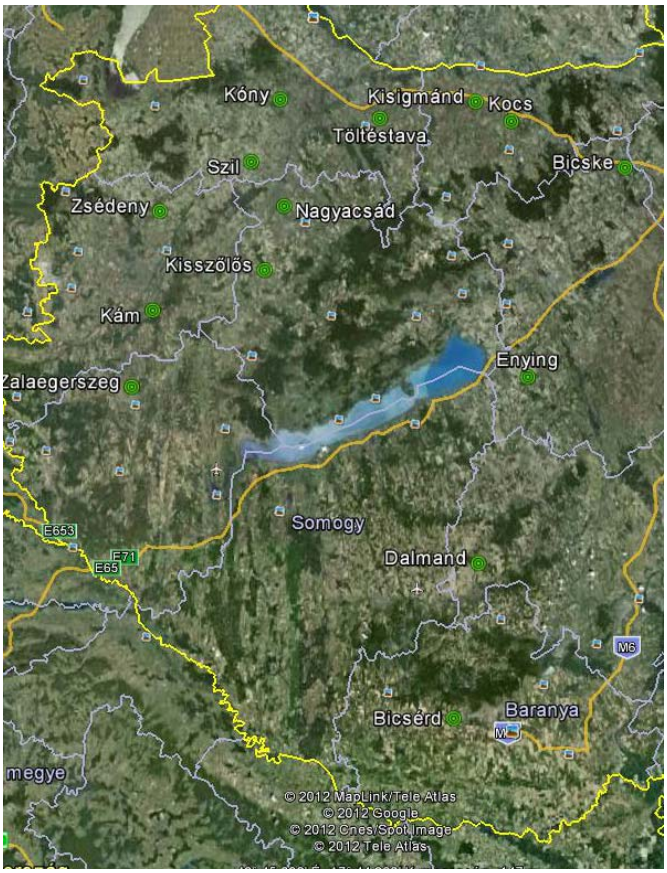
**Timetable of samplings of click beetle pests (Elateridae: *Agriotes* sp.) in Hungary in 2012 (Yatlor: *A. brevis* (B), *A. sputator* (S), *A. obscurus* + *A. lineatus* (O), *A. rufipalpis* + *A. sordidus* (R); VarB: *A. ustulatus*)**

| Yatlor | VarB | Eastern Hungary | Transdanubia (Western Hungary) |
|---|---|---|---|
| trap setting | | 14th week | 13th week |
| 1st empty (1) | | 16th week | 15th week |
| 2nd empty (1) | | 18th week | 17th week |
| 3rd empty (1) / change (2) | | 20th week | 19th week |
| 4th empty (1) | trap setting | 22nd week | 21st week |
| 5th empty (1) | 1st empty (1) | 24th week | 23rd week |
| 6th empty (1) | 2nd empty (1) / change (2) | 26th week | 25th week |
| 7th empty (1) / gather (3): B, R | 3rd empty (1) | 28th week | 27th week |
| 8th empty (1) /gather (3): S, O | 4th empty (1) / change (2) | 30th week | 29th week |
| | 5th empty (1) | 32nd week | 31st week |
| | 6th empty (1) / gather (3) | 34th week | 33rd week |

emptying traps (1), changing pheromone capsules (2), gathering traps (3)

*Figure 1:* **Location of sampling sites (n=12) of the most common click beetle pests (Elateridae: *Agriotes* sp.) in eastern Hungary in 2012 (Map: GoogleEarth 2012)**

*Figure 2:* **Location of sampling sites (n=14) of the most common click beetle pests (Elateridae: *Agriotes* sp.) in Transdanubia (western Hungary) in 2012 (Map: GoogleEarth 2012)**



## *RESULTS AND DISCUSSION*

During the study 3744 samples (Yatlor: 3120, VarB: 624) were evaluated. Only *A. sordidus* were not caught of directly sampled species. Considering our results and former distribution data of this species we can assume that *A. sordidus* do not occur in Hungary. The total number of individuals sampled by Yatlor traps was 37990, while VarB traps caught 34593 specimens of *A. ustulatus* which was the most abundant one among six studied species. It was followed by *A. sputator* with 27858 individuals while the other four species were much less abundant. Altogether 72583 individuals of the studied species and additionally 1627 individuals of 24 other elaterid species were caught in 2012 (*Table 3*). During the three-year study (2010-2012) the mean number of sampled individuals per site varied between small intervals (Nagy *et al.,* 2010, 2011).

*Table 3*

**Total number of individuals of the directly sampled six *Agriotes* (Coleoptera: Elateridae) species and of the additionally caught 24 species in Hungary in 2012**

| Species | Total number of sampled individuals |
|---|---|
| *Agriotes brevis* | 2336 |
| *Agriotes sputator* | 27858 |
| *Agriotes obscurus* | 624 |
| *Agriotes lineatus* | 4170 |
| *Agriotes rufipalpis* | 3002 |
| *Agriotes ustulatus* | 34593 |
| Total number of sampled individuals | **72583** |
| Total number of individuals of additionally caught species | 1627 |

*A. sputator*, *A. lineatus* and *A. ustulatus* occurred in all studied sites in 2012. Distribution of *A. rufipalpis* was sporadic in Transdanubia while it was characteristic for eastern Hungarian sites. *A. obscurus* occurred mostly in Transdanubia with lower abundances and only there specimens could be sampled in a hilly area of East Hungary (21. – Újcsanálos, *Figure 1*, *Table 4*). In 2012 distribution of species were similar than former studied years (Nagy *et al.,* 2010, 2011)

Between 2010 and 2012 *A. ustulatus* and *A. sputator* were the most abundant regardless the spatial distribution of sampling sites. *A. lineatus* and *A. rufipalpis* reached economically significant abundance only in some areas. *A. brevis* was a wide-ranging species in through the sampled areas but generally showed small abundances, while *A. obscurus* were sparsely distributed. In former studies *A. ustulatus*, *A. sputator*, *A. lineatus*, *A. brevis* and *A. obscurus* were the most dominant species, although the rank of them belonged to the geographical location of studied sites (Bognár 1958, Szarukán 1973, 1977, Tóth 1990). The first really precise identification key for elaterid larvae was published by Dolin in 1964 (Dolin 1964). Because of the problematic identification of *A. obscurus* and *A. ustulatus* larvae, data on *A. obscurus* published before 1964 are unreliable. First and last our data showed that *A. ustulatus* and *A. sputator* has being kept their dominance, while abundance of *A. brevis* has being decreased during the last decades. Henceforward *A. lineatus* and *A. rufipalpis* may be dominant in some areas (*Table 4*).

Traps caught additionally 24 elaterid species in 2012, accordingly the total species number was 30, which is almost one fourth of the Hungarian elaterid fauna (131 species, Merkl & Mertlik 2005). During the tree-year study altogether 34 species were found in 68 sapling sites (Nagy *et al.*, 2010, 2011). Among additional species *A. modestus*, *B. megerlei* and *M. brunneus* occurred only in eastern Hungary while *A. acuminatus*, *A. elongatus, A. sanquinolentus*, *A. sinuatus*, *D. marginatus*, *D. cinereus* and *P. tesselatus* could be found only in Transdanubia (*Table 4*). The mean species richness of the Tarnsdanubian sites was 10.9 (species/site) while the eastern Hungariran ones showed value of 8.42.

Considering the directly sampled six species the largest elaterid abundances (individuals/site) were found in Kisigmánd (N=6154), Dalmand (N=5776), Jászberény (N=5580), Fenyőharaszt (N=4624) and Újszász (N=4458). The first two of them are located in Transdanubia and the others are in Eastern Hungary, but among the first ten sites only three Transdanubian sites could be found. The mean number of elaterid pests per site was higher in eastern Hunagary (3417 individuals/site) than in Transdanubia (2372 individuals/site). This showed that the mean infestation is higher in the eastern part of the country. In 13 sampling sites (7 Tansdanubian and 6 East Hungarian) *A. ustulatus*, in 11 sites (7 Tansdanubian and 4 East Hungarian) *A. sputator*, while in 2 sites (1 Tansdanubian and 1 East Hungarian) *A. lineatus* were dominant (*Table 4*).

The economic threshold determined by Furlan *et al.* (1996) (250 individual/trap/year) were exceeded by *A. ustulatus* in 11 areas, *A. sputator* in 10 areas and *A. lineatus* in one area. Furthermore abundances of *A. ustulatus*, *A sputator* and *A. rufipalpis* were between 200 and 250 individuals/trap/year in two, two and one areas respectively. Economically significant damage may be expected in case of five of the fourteen Transdanubian and in case of eleven of twenty East Hungarian areas. In Transdanubia *A. sputator* could be seen as a dangerous species in Kisigmánd (3) and Bicsérd (24) and *A. ustulatus* exceeded economic threshold in Zsédeny (7) and

Enying (25) while in Dalmand (23) both of them occurred with economically significant abundance. Beyond that in Kocs (2) and Kisszőlős (10) *A. ustulatus*, while in Bicske (1) *A. sputator* approximated the economic threshold ($N_{mean}$=200-250 individuals/trap/year) (*Table 5*).

The damage risk was higher in Eastern Hungary, the abundance of species did not overstep the economic threshold only in Füzesabony (19). In case of Dabas (14) and Cegléd (16) *A. sputator* and in case of Újcsanálos (21), Debrecen-Látókép (22) and Biharkeresztes (26) *A. ustulatus* showed larger abundances than the economic threshold. In four sites (Újszász 12, Pusztamonostor 13, Fenyőharaszt17 and Mezőkövesd 20) abundance of both *A. ustulatus* and *A. sputator* while in Szabadszállás (15) three species (*A. sputator*, *A. ustulatus*, *A. lineatus*) collectively exceeded the 250 individuals/trap/year threshold. The last five sites were extremely infected. Additionally in Apc (18) the abundance of *A. sputator* approached the economic threshold by seven individuals. Despite the damage risk caused by different species could not be simply added in case of the sites where two or even three species together exceeded the economic threshold, especially high damage can be predicted (*Table 5*).

*Table 4*

**Distribution, abundances and spatial constancy (c [%]) of the sampled six *Agriotes* (*) and additionally caught elaterid species (Coleoptera: Elateridae) in the 26 sampling sites in 2012**

| | Transdanubia | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 23 | 24 | 25 |
| *Agriotes brevis* (Candeze, 1863) * | 7 | 71 | 91 | 224 | 41 | 83 | 414 | 133 | 113 | 282 | 177 | 4 | 234 | 3 |
| *Agriotes sputator* (Linnaeus, 1758) * | 955 | 520 | 5929 | 385 | 310 | 30 | 482 | 623 | 531 | 206 | 692 | 2379 | 1433 | 275 |
| *Agriotes obscurus* (Linnaeus, 1758) * | 289 | 0 | 0 | 1 | 0 | 5 | 1 | 296 | 17 | 8 | 1 | 3 | 0 | 0 |
| *Agriotes lineatus* (Linnaeus, 1767) * | 76 | 239 | 64 | 68 | 658 | 7 | 2 | 56 | 28 | 235 | 88 | 188 | 109 | 107 |
| *Agriotes rufipalpis* (Brullé, 1832) * | 11 | 8 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| *Agriotes ustulatus* (Schaller, 1783) * | 210 | 853 | 70 | 548 | 196 | 607 | 3521 | 16 | 343 | 844 | 423 | 3202 | 293 | 1566 |
| Adrastus rachifer (Geoffroy, 1875) | 60 | 212 | 157 | 292 | 60 | 10 | 2 | 0 | 14 | 1 | 7 | 118 | 0 | 24 |
| Agriotes acuminatus (Stephens, 1830) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 4 | 7 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 |
| Agriotes modestus Kiesenwetter, 1858 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Agriotes proximus Schwarz, 1891 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Agrypnus murinus (Linnaeus, 1758) | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampedus elongatus (Schönherr, 1817) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampedus sanquinolentus (Schrank, 1776) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ampedus sinuatus (Germar, 1844) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Athous haemorrhoidalis (Fabricius, 1801) | 4 | 0 | 5 | 6 | 17 | 9 | 0 | 11 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Athous bicolor (Goeze, 1777) | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Brachygonus megerlei (Lacordaire, 1835) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cidnopus pilosus (Leske, 1785) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Dalopius marginatus (Linnaeus, 1785) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Dicronychus cinereus (Herbst, 1784) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Dicronychus rubripes (Germar, 1824) | 0 | 0 | 7 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Drasterius bimaculatus (Rossi, 1790) | 17 | 0 | 9 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 6 | 8 | 10 | 1 | 0 |
| Hemicrepidius hirtus (Herbst, 1784) | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Limonius minutus (Linnaeus, 1758) | 0 | 0 | 3 | 0 | 5 | 14 | 16 | 14 | 15 | 5 | 0 | 13 | 13 | 0 |
| Melanotus brunnipes (Germar, 1824) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Melanotus crassicollis (Erichson, 1841) | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Melanotus punctolineatus (Pelerin, 1829) | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| Melanotus villosus (Geoffroy, 1785) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Prosternon tessellatum (Linnaeus, 1758) | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Synaptus filiformis (Fabricius, 1781) | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Number of Species | 12 | 6 | 14 | 13 | 12 | 13 | 10 | 15 | 8 | 15 | 8 | 11 | 8 | 8 |
| Number of individuals of six studied species | 1548 | 1691 | 6154 | 1233 | 1205 | 732 | 4420 | 1124 | 1032 | 1575 | 1381 | 5776 | 2069 | 1958 |
| Total number of individuals | 1633 | 1903 | 6346 | 1540 | 1292 | 784 | 4445 | 1209 | 1062 | 1605 | 1398 | 5920 | 2088 | 1986 |

| | Eastern Hungary | | | | | | | | | | | | $N_{total}$ | c [%] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 26 | | |
| *Agriotes brevis* (Candeze, 1863) * | 60 | 5 | 57 | 116 | 0 | 8 | 3 | 109 | 17 | 22 | 20 | 42 | 2336 | 96.2 |
| *Agriotes sputator* (Linnaeus, 1758) * | 1498 | 1207 | 1474 | 1116 | 1638 | 1542 | 972 | 539 | 1159 | 746 | 746 | 471 | 27858 | 100.0 |
| *Agriotes obscurus* (Linnaeus, 1758) * | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 624 | 38.5 |
| *Agriotes lineatus* (Linnaeus, 1767) * | 49 | 28 | 87 | 1589 | 7 | 43 | 3 | 72 | 103 | 28 | 100 | 136 | 4170 | 100.0 |
| *Agriotes rufipalpis* (Brullé, 1832) * | 703 | 92 | 604 | 262 | 46 | 53 | 4 | 97 | 74 | 31 | 67 | 936 | 3002 | 61.5 |
| *Agriotes ustulatus* (Schaller, 1783) * | 2148 | 4248 | 361 | 1053 | 511 | 2978 | 373 | 532 | 1979 | 2423 | 2907 | 2388 | 34593 | 100.0 |
| Adrastus rachifer (Geoffroy, 1875) | 12 | 8 | 3 | 0 | 11 | 2 | 0 | 0 | 14 | 0 | 1 | 0 | 1008 | 73.1 |
| Agriotes acuminatus (Stephens, 1830) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 | 23.1 |
| Agriotes modestus Kiesenwetter, 1858 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 3.8 |
| Agriotes proximus Schwarz, 1891 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 5 | 19.2 |
| Agrypnus murinus (Linnaeus, 1758) | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 19.2 |
| Ampedus elongatus (Schönherr, 1817) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 7.7 |
| Ampedus sanquinolentus (Schrank, 1776) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 7.7 |
| Ampedus sinuatus (Germar, 1844) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3.8 |
| Athous haemorrhoidalis (Fabricius, 1801) | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 62 | 38.5 |
| Athous bicolor (Goeze, 1777) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 26.9 |
| Brachygonus megerlei (Lacordaire, 1835) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 3.8 |
| Cidnopus pilosus (Leske, 1785) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 11.5 |
| Dalopius marginatus (Linnaeus, 1785) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 37 | 3.8 |
| Dicronychus cinereus (Herbst, 1784) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 7.7 |
| Dicronychus rubripes (Germar, 1824) | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 11.5 |
| Drasterius bimaculatus (Rossi, 1790) | 2 | 0 | 140 | 51 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 | 260 | 50.0 |
| Hemicrepidius hirtus (Herbst, 1784) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 5 | 19.2 |
| Limonius minutus (Linnaeus, 1758) | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 4 | 0 | 0 | 1 | 110 | 57.7 |
| Melanotus brunnipes (Germar, 1824) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3.8 |
| Melanotus crassicollis (Erichson, 1841) | 6 | 4 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 21 | 26.9 |
| Melanotus punctolineatus (Pelerin, 1829) | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 23.1 |
| Melanotus villosus (Geoffroy, 1785) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 11.5 |
| Prosternon tessellatum (Linnaeus, 1758) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 15.4 |
| Synaptus filiformis (Fabricius, 1781) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 11.5 |
| Number of Species | 10 | 8 | 12 | 6 | 5 | 9 | 10 | 8 | 10 | 8 | 6 | 9 | | |
| Number of individuals of six studied species | 4458 | 5580 | 2583 | 4136 | 2202 | 4624 | 1355 | 1349 | 3332 | 3253 | 3840 | 3973 | | |
| Total number of individuals | 4480 | 5593 | 2742 | 4187 | 2213 | 4632 | 1362 | 1357 | 3355 | 3255 | 3841 | 3982 | | |

*Table 5*

**Mean numbers of sampled individuals ($N_{mean}$=individuals/trap/year) of six studied *Agriotes* species in the 26 sampling sites in 2012**

| Species | Sampling site | | n | $N_{mean}$ | | ±SD | Sampling site | | n | $N_{mean}$ | | ±SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *A. brevis* | 1 | Bicske | 6 | 1.8 | | 2.1 | 14 | Dabas | 19 | 14.3 | | 2.6 |
| *A. sputator* | | | 32 | 238.8 | * | 76.9 | | | 32 | 368.5 | ** | 152.8 |
| *A. obscurus* | | | 21 | 72.3 | | 60.0 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. lineatus* | | | 22 | 19.0 | | 16.5 | | | 21 | 21.8 | | 26.6 |
| *A. rufipalpis* | | | 5 | 2.8 | | 3.2 | | | 28 | 151.0 | | 127.1 |
| *A. ustulatus* | | | 14 | 52.5 | | 34.7 | | | 13 | 90.3 | | 24.3 |
| *A. brevis* | 2 | Kocs | 21 | 17.8 | | 4.6 | 15 | Szabadszállás | 16 | 29.0 | | 26.5 |
| *A. sputator* | | | 31 | 130.0 | | 68.1 | | | 30 | 279.0 | ** | 45.2 |
| *A. obscurus* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. lineatus* | | | 23 | 59.8 | | 42.4 | | | 27 | 397.3 | ** | 71.5 |
| *A. rufipalpis* | | | 6 | 2.0 | | 0.8 | | | 26 | 65.5 | | 25.6 |
| *A. ustulatus* | | | 16 | 213.3 | * | 103.6 | | | 11 | 263.3 | ** | 52.0 |
| *A. brevis* | 3 | Kisigmánd | 16 | 22.8 | | 6.4 | 16 | Cegléd | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. sputator* | | | 32 | 1482.3 | ** | 742.4 | | | 32 | 409.5 | ** | 118.5 |
| *A. obscurus* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. lineatus* | | | 16 | 16.0 | | 13.5 | | | 5 | 1.8 | | 1.0 |
| *A. rufipalpis* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 10 | 11.5 | | 10.8 |
| *A. ustulatus* | | | 10 | 17.5 | | 15.1 | | | 15 | 127.8 | | 47.0 |
| *A. brevis* | 4 | Töltéstava | 24 | 56.0 | | 26.8 | 17 | Fenyőharaszt | 8 | 2.0 | | 0.0 |
| *A. sputator* | | | 29 | 96.3 | | 18.4 | | | 31 | 385.5 | ** | 113.6 |
| *A. obscurus* | | | 1 | 0.3 | | 0.5 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. lineatus* | | | 23 | 17.0 | | 6.8 | | | 10 | 10.8 | | 12.2 |
| *A. rufipalpis* | | | 6 | 1.8 | | 1.7 | | | 15 | 13.3 | | 13.2 |
| *A. ustulatus* | | | 16 | 137.0 | | 58.3 | | | 19 | 744.5 | ** | 388.2 |
| *A. brevis* | 5 | Kóny | 13 | 10.3 | | 10.3 | 18 | Apc | 3 | 0.8 | | 1.0 |
| *A. sputator* | | | 26 | 77.5 | | 22.0 | | | 31 | 243.0 | * | 83.4 |
| *A. obscurus* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. lineatus* | | | 24 | 164.5 | | 167.1 | | | 2 | 0.8 | | 1.5 |
| *A. rufipalpis* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 4 | 1.0 | | 0.8 |
| *A. ustulatus* | | | 13 | 49.0 | | 18.4 | | | 14 | 93.3 | | 38.2 |
| *A. brevis* | 6 | Szil | 20 | 20.8 | | 11.7 | 19 | Füzesabony | 22 | 27.3 | | 24.2 |
| *A. sputator* | | | 12 | 7.5 | | 6.2 | | | 31 | 134.8 | | 42.1 |
| *A. obscurus* | | | 4 | 1.3 | | 1.3 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. lineatus* | | | 6 | 1.8 | | 1.0 | | | 13 | 18.0 | | 2.2 |
| *A. rufipalpis* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 15 | 24.3 | | 20.5 |
| *A. ustulatus* | | | 14 | 151.8 | | 26.6 | | | 15 | 133.0 | | 39.4 |
| *A. brevis* | 7 | Zsédeny | 23 | 103.5 | | 24.0 | 20 | Mezőkövesd | 10 | 4.3 | | 1.7 |
| *A. sputator* | | | 27 | 120.5 | | 48.1 | | | 32 | 289.8 | ** | 170.9 |
| *A. obscurus* | | | 1 | 0.3 | | 0.5 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. lineatus* | | | 2 | 0.5 | | 0.6 | | | 21 | 25.8 | | 15.9 |
| *A. rufipalpis* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 15 | 18.5 | | 7.0 |
| *A. ustulatus* | | | 17 | 880.3 | ** | 374.6 | | | 19 | 494.8 | ** | 227.9 |
| *A. brevis* | 8 | Kám | 23 | 33.3 | | 21.5 | 21 | Újcsanálos | 8 | 5.5 | | 4.8 |
| *A. sputator* | | | 30 | 155.8 | | 110.1 | | | 32 | 186.5 | | 93.2 |
| *A. obscurus* | | | 21 | 74.0 | | 72.1 | | | 2 | 0.8 | | 1.5 |
| *A. lineatus* | | | 18 | 14.0 | | 10.8 | | | 9 | 7.0 | | 9.4 |
| *A. rufipalpis* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 10 | 7.8 | | 3.3 |
| *A. ustulatus* | | | 6 | 4.0 | | 2.9 | | | 19 | 605.8 | ** | 252.3 |
| *A. brevis* | 9 | Zalaegerszeg | 23 | 28.3 | | 17.6 | 22 | Debrecen-Látókép | 12 | 5.0 | | 2.7 |
| *A. sputator* | | | 32 | 132.8 | | 24.4 | | | 29 | 186.5 | | 143.1 |
| *A. obscurus* | | | 9 | 4.3 | | 1.7 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. lineatus* | | | 11 | 7.0 | | 8.0 | | | 15 | 25.0 | | 20.6 |
| *A. rufipalpis* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 18 | 16.8 | | 9.6 |
| *A. ustulatus* | | | 10 | 85.8 | | 40.5 | | | 15 | 726.8 | ** | 232.9 |
| *A. brevis* | 10 | Kisszőlős | 28 | 70.5 | | 30.3 | 23 | Dalmand | 3 | 1.0 | | 1.2 |
| *A. sputator* | | | 30 | 51.5 | | 21.9 | | | 29 | 594.8 | ** | 34.5 |
| *A. obscurus* | | | 5 | 2.0 | | 1.8 | | | 1 | 0.8 | | 1.5 |
| *A. lineatus* | | | 25 | 58.8 | | 49.3 | | | 23 | 47.0 | | 3.2 |
| *A. rufipalpis* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. ustulatus* | | | 20 | 211.0 | * | 62.8 | | | 24 | 800.5 | ** | 207.8 |
| *A. brevis* | 11 | Nagyacsád | 23 | 44.3 | | 17.6 | 24 | Bicsérd | 26 | 58.5 | | 25.5 |
| *A. sputator* | | | 31 | 173.0 | | 17.1 | | | 32 | 358.3 | ** | 136.2 |
| *A. obscurus* | | | 1 | 0.3 | | 0.5 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. lineatus* | | | 22 | 22.0 | | 9.5 | | | 18 | 27.3 | | 21.6 |
| *A. rufipalpis* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. ustulatus* | | | 12 | 105.8 | | 31.8 | | | 18 | 73.3 | | 61.3 |
| *A. brevis* | 12 | Újszász | 21 | 15.0 | | 4.8 | 25 | Enying | 2 | 0.8 | | 1.5 |
| *A. sputator* | | | 32 | 374.5 | ** | 107.2 | | | 26 | 68.8 | | 10.8 |
| *A. obscurus* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. lineatus* | | | 19 | 12.3 | | 1.0 | | | 18 | 26.8 | | 12.7 |
| *A. rufipalpis* | | | 28 | 175.8 | | 39.2 | | | 6 | 1.8 | | 1.0 |
| *A. ustulatus* | | | 18 | 537.0 | ** | 78.1 | | | 18 | 391.5 | ** | 158.4 |
| *A. brevis* | 13 | Pusztamonostor | 4 | 1.3 | | 1.3 | 26 | Biharkeresztes | 11 | 10.5 | | 8.8 |
| *A. sputator* | | | 32 | 301.8 | ** | 59.1 | | | 31 | 117.8 | | 19.7 |
| *A. obscurus* | | | 0 | 0.0 | | 0.0 | | | 0 | 0.0 | | 0.0 |
| *A. lineatus* | | | 10 | 7.0 | | 2.9 | | | 22 | 34.0 | | 13.7 |
| *A. rufipalpis* | | | 20 | 23.0 | | 7.4 | | | 26 | 234.0 | * | 108.1 |
| *A. ustulatus* | | | 20 | 1062.0 | ** | 231.6 | | | 20 | 597.0 | ** | 78.6 |

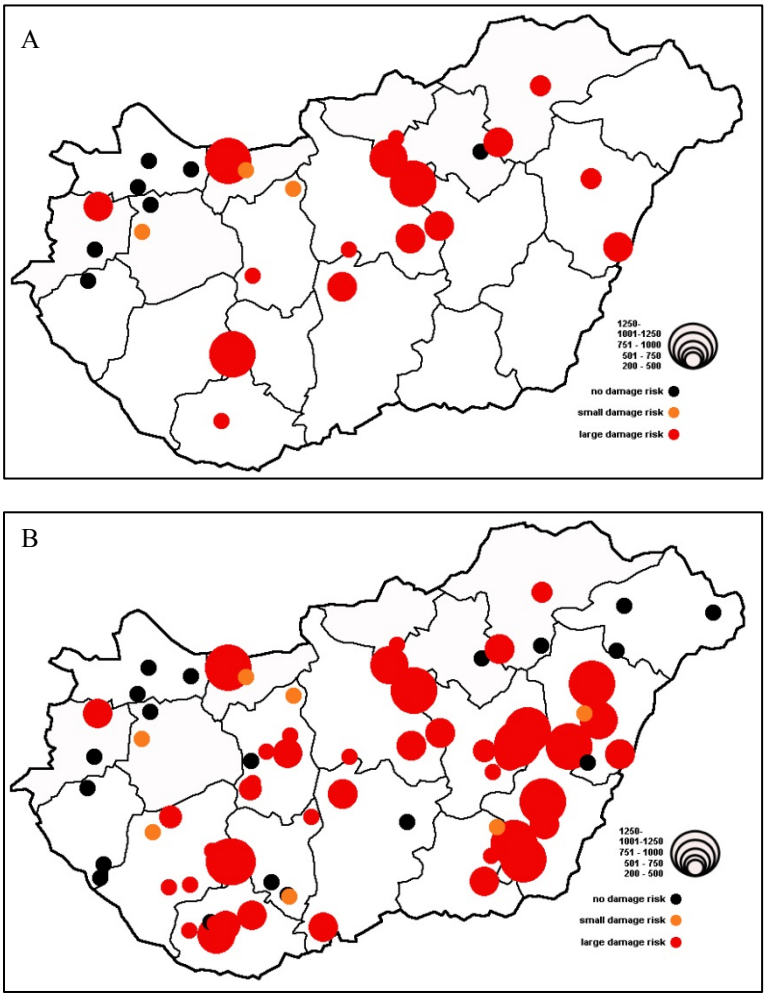
n: number of positive samples, ±SD: standard deviation, **$N_{mean}$>250 individuals/trap/year (economic threshold), * $N_{mean}$= 200-250 individuals/trap/year.

Although the composition of the studied elaterid pest assemblages showed large spatial differences, the formerly detected differences between Transdanubian and eastern Hungarian areas decreased in 2012. The abundances of the two dominant species *A. sputator* and *A. ustulatus* were more balanced in this year than in former two years (Nagy *et al.,* 2010, 2011). Mostly these two dominant species can cause significant economic risk, but the less abundant *A. lineatus*, *A. rufipalis* and *A. brevis* increase this danger in case of many areas. On the basis of geographic distribution of the most abundant species areas infected by click beetles or wireworms are easily determine (*Fig. 3*)

On the basis of three-year study we determined the distribution and actual relative abundances of the most dangerous elaterid pests in Hungary. The most infected and endangered areas are the eastern and south-eastern part of the Alföld (Great Hungarian Plain; Hajdú-Bihar, Jász-Nagykun-Szolnok, Békés and Csongrád counties), the hillfoot of the North Hungarian Hilly Area (Heves and Pest counties), the Mezőség (Fejér and Tolna counties) and the Transdanubian Hilly Area (Somogy and Baranya counties). In the sandy area of Szabolcs-Szatmár-Bereg county (northeast Hungary) and in the western part of the country (Győr-Moson-Sopron, Vas, Veszprém and Zala counties) we could not expect significant economic damage caused by wireworms of *Agriotes* species.

In order to more effective use of monitoring data we should understand the mechanisms underlying dynamic of species and pest assemblages. The analysis of connection among species distribution, composition of assemblages and background parameters (e.g. soil type, geographic situation, habitat diversity etc.) is in process.

*Figure 3*: **Abundance of the most dominant *Agriotes* species in the 26 sites sampled in 2012 (A) and in the 68 sampling sites studied during 2010-2012 (B)**




Size of circles proportional with mean number of species (individuals/trap/year) reached the economic threshold ($N_{mean}$>250 individuals/trap/year), and colours show the probability of economic damage considering the number of species exceeded the economic threshold.

***ACKNOWLEDGEMENT***

The authors thank the staff of the Plant Protection Institute (University of Debrecen) for their help in labour work and all of our partners who permitted samplings on their fields. The financial background of the study was submitted by the Syngenta Ltd.

***REFERENCES***

Blackshaw R. P.-Vernon R. S. (2008): Spatial relationship between two agriotes click-beetle species and wireworms in agricultural fields. *Agricultural and Forest Entomology* 10, 1-11.

Blackshaw R. P.-Hicks H.-Vernon R. S. (2008): O.39 – Sex pheromone traps for monitoring wireworm populations: how effective are they? ENDURE International Conference 2008: Diversifying crop protection, 12-15 October 2008 La Grande-Motte, France – Oral presentation.

Bognár S. (1958): Ökológiai megfigyelések és védekezési kísérletek a pattanóbogár lárvákkal (*Col. Elateridae*) kapcsolatban. In. I'só I. szerk.: Kukoricatermesztési kísérletek 1953-1957. Akadémiai Kiadó, Budapest

Dolin V. G. (1964): Личинки жуков-щелкунов (проволочники) Европской части СССР Изд."Урожай" Kiev (In Russian)

Dolin V. G. (1991): Fauna Hungarica, Coleoptera: Elateridae. kézirat Budapest, 213 p.

Internet 1.: http://www.julia-nki.hu/csalomon/images/2/pdf/mezeipattano.pdf; 2010-10-06

Internet 2.: http://www.julia-nki.hu/csalomon/list_by_lat_name.html; 2010-10-06

Laibner S. (2000): Elateridae of the Czeh and Slovak Republics. Kabourek, Zlín. 292 p.

Merkl O-Mertlik J. (2005): Distributional notes and check list of click beetles (Coleoptera: Elateridae) from Hungary. *Folia Entomologica Hungarica* 66, 63-80.

Nagy A.-Dávid I.-Szarukán I. (2010): Növényvédelmi szempontból fontos magyarországi *Agriotes* fajok elterjedésének és tömegességi viszonyainak vizsgálata. *Journal of Agricultural Sciences* 39(Supplement): 53-60.

Nagy A.-Szarukán I.-Lovász E-Dávid I. (2011): Kártevő *Agriotes* (Coleoptera: Elateridae) fajok elterjedésének és tömegességi viszonyainak vizsgálata Magyarország fő kukoricatermő területein. *Journal of Agricultural Sciences* 43(Supplement): 107-113.

Szarukán I. (1973): Kis pattanóbogarak (Agriotes spp. – Elateridae) a hajdúsági löszhát lucernásaiban. *Növényvédelem* 9, 433-439.

Szarukán I. (1977): Pajorok (Melolonthidae) és drótférgek (Elateridae) a KITE taggazdaságainak talajaiban 1975-ben. *Növényvédelem* 13, 49-54.

Tóth M.-Furlan, L. (2004) Conference of IOBC/WPRS – WG Entomopathogens and Entomoparasitic Nematodes (Inssbruck, Austria, 11-13 October 2004)

Tóth M.-Furlan L.-Szarukán I.-Ujváry I. (2002): Geranyl hexanoate attracting male click beetles *Agriotes rufipalpis* Brullé and *Agriotes sordidus* Illiger (Col., Elateridae). Journal of Applied Entomology 126, 312–314.

Tóth Z. (1990): Pattanóbogarak (Elateridae). In. Jermi T-Balázs K. szerk.: Növényvédelmi állattan kézikönyve (3/a). Akadémiai Kiadó, Budapest, 30-69.

# Effect of post-emergence herbicides on the chlorophyll content of maize inbred lines

**P. Bónis – T. Árendás – G. Micskei – C. Szőke – L. C. Marton**
Agricultural Institute, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár, Brunszvik u. 2.
bonis.peter@agrar.mta.hu

***SUMMARY***

*Changes in the chlorophyll and carotenoid contents of maize inbred lines in response to normal and double doses of post-emergence herbicides were investigated in a small-plot field experiment in a dry year. The experiment was set up on chernozem soil with forest residues in Martonvásár and involved three inbred lines and three herbicides. The treatments were applied in the 5–7-leaf stage of maize. The herbicides contained the following active ingredients: Tembotrione + Isoxadifen-ethyl, Mesotrione + Terbuthylazine and Bentazone + Dicamba. The chlorophyll and carotenoid contents of samples taken from the upper leaves of the plants 14 days after spraying were determined using a spectrophotometer.*

*The chlorophyll (a+b) and carotenoid contents of the leaf samples were significantly influenced (P=0.1%) by the genotype. Based on the mean square values in the statistical analysis, the inbred lines had the most important role in determining the quantity of the two main photosynthetic pigments (96% of the variation) and the carotenoid content (82%). No significant difference was found between the effect of the three herbicides and the two application rates on the chlorophyll (a+b) content of the lines, but the herbicide doses significantly influenced the carotenoid content at the P=1% level. Averaged over the doses and genotypes, no significant difference was found between the herbicides Only the herbicide containing Tembotrione was found to cause a slight, but non-significant reduction in the chlorophyll (a+b) content of the lines at the time of testing.*

*The chlorophyll a/b ratio was not significantly influenced by the herbicide treatments, averaged over the doses and genotypes, but both rates of herbicide resulted in a shift in this ratio, which had the lowest value in the control. No significant difference was observed between the single and double doses. The chlorophyll a/b values differed significantly in the individual genotypes.*

**Keywords:** maize inbred lines, post-emergence, herbicide, chlorophyll, carotenoid

## *INTRODUCTION*

Weed control is an important component in the field technology for the production of hybrid maize seed, and usually involves the application of chemical compounds. The inbred nature of the parental lines makes them more sensitive to environmental stress effects than the hybrids developed from them, so before application it important to ensure that the herbicides will not damage the given hybrid or line. Many authors have reported extremely different levels of herbicide tolerance in various maize genotypes (Berzsenyi *et al.,* 1994, Bónis *et al.,* 2004, Green 1998, Green and Ulrich 1993, 1994, Shimabukuro, 1971, Widstrom and Dowler 1995). The herbicides authorised for use in seed production do not cause phytotoxic damage on the majority of maize genotypes when applied in conformity with the manufacturer's instructions, but in the case of sensitive inbred lines or under unfavourable conditions either clearly visible or masked symptoms may appear. In general, if the damage is non-lethal, the plants gradually recover in the course of the vegetation season, and the symptoms may disappear completely.

Some groups of herbicide active ingredients exert their effect by inhibiting photosynthetic processes (Kádár 2010). A characteristic symptom of most herbicides, and particularly of those that inhibit photosynthetic electron transport, is the yellowing or whitening (chlorosis) of the leaves, which is the consequence of the irreversible photodestruction of chlorophyll and other pigments (Szigeti and Vágújfalvi 1983). It was observed by Sunohara *et al.* (2010) that auxinic herbicides also influence the chlorophyll content of weeds. Chlorophylls and their accessory pigments, the carotenoids, are to be found in all photosynthesising organisms. In higher plants the chlorophylls can be divided into two fractions, chlorophyll a and chlorophyll b. The ratio of these two fractions is usually around 3:1, which may alter slightly in response to external conditions (Láng 2002).

Stress tolerance is also greatly influenced by the year (Bónis *et al.,* 2011). Over the last decade extreme weather conditions (abiotic stress) have been experienced with increasing frequency, testing the adaptability of all living creatures. Both biotic and abiotic stress factors may cause damage to the photosynthetic apparatus of higher plants (Almási *et al.,* 2005).

## *MATERIALS AND METHODS*

Changes in the chlorophyll content of three maize inbred lines in response to the post-emergence application of herbicides were monitored in an experiment set up on chernozem soil with forest residues in Martonvásár in the dry year of 2011. The most important climatic parameters during the maize vegetation season are summarised in *Table 1*. The rainfall sum was only half the 30-year mean; the deficiency was greatest at the beginning and end of the season, but the whole vegetation season was dry, while the mean temperature was slightly higher than the 30-year mean.

*Table 1*

**Rainfall and temperature conditions during the vegetation period of maize in 2011**

| Month | 10-day period | Rainfall (mm) | | | | Mean temperature (°C) | | | Hot days ($t_{max}$>30°C) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 2011 | 30-year mean | Δ | Σ Δ | 2011 | 30-year mean | Δ | 2011 | 1999-2010 |
| Apr. | 1st | 0.3 | 12 | -11.7 | -11.7 | 13.1 | 10.4 | 2,7 | 0 | 0 |
| | 2nd | 0.7 | 13 | -12.3 | -24.0 | 10.4 | 10.8 | -0,4 | 0 | 0 |
| | 3rd | 6.7 | 18 | -11.3 | -35.3 | 13.9 | 12.6 | 1,3 | 0 | 0 |
| May | 1st | 15.2 | 18 | -2.8 | -38.1 | 11.7 | 14.8 | -3,1 | 0 | 1 |
| | 2nd | 11.0 | 16 | -5.0 | -43.1 | 16.4 | 17.0 | -0,6 | 0 | 1 |
| | 3rd | 0.7 | 22 | -21.3 | -64.4 | 18.8 | 17.3 | 1,5 | 0 | 2 |
| June | 1st | 14.1 | 26 | -11.9 | -76.3 | 20.7 | 19.1 | 1,6 | 1 | 2 |
| | 2nd | 0.1 | 22 | -21.9 | -98.2 | 19.4 | 19.5 | -0,1 | 0 | 3 |
| | 3rd | 36.4 | 25 | 11.4 | -86.8 | 19.8 | 20.6 | -0,8 | 2 | 3 |
| July | 1st | 3.2 | 18 | -14.8 | -101.6 | 20.3 | 21.0 | -0,7 | 4 | 4 |
| | 2nd | 30.2 | 16 | 14.2 | -87.4 | 23.2 | 22.0 | 1,2 | 6 | 5 |
| | 3rd | 23.3 | 19 | 4.3 | -83.1 | 17.2 | 21.5 | -4,3 | 0 | 5 |
| Aug. | 1st | 4.7 | 18 | -13.3 | -96.4 | 20.0 | 21.6 | -1,6 | 2 | 4 |
| | 2nd | 0.8 | 15 | -14.2 | -110.6 | 21.0 | 21.0 | 0,0 | 4 | 4 |
| | 3rd | 0.0 | 13 | -13.0 | -123.6 | 23.2 | 19.6 | 3,6 | 7 | 3 |
| Sept. | 1st | 1.1 | 10 | -8.9 | -132.5 | 20.4 | 18.8 | 1,6 | 4 | 1 |
| | 2nd | 10.9 | 14 | -3.1 | -135.6 | 19.1 | 16.4 | 2,7 | 5 | 0 |
| | 3rd | 0.0 | 17 | -17.0 | -152.6 | 16.0 | 14.6 | 1,4 | 0 | 0 |
| Σ or Mean | | 159,4 | 312 | - | - | 18.0 | 17.7 | - | 35 | 38 |

The active ingredients and doses of the three herbicides applied in the treatments are listed in *Table 2.*

*Table 2*

**Treatments in the experiment**

| | Treatment | Dose ( l a.i. $ha^{-1}$ ) | |
|---|---|---|---|
| | | Normal | Double |
| 1. | Control | - | - |
| 2. | Tembotrione + Isoxadifen-ethyl | 99 + 49.5 | 198 + 99 |
| 3. | Mesotrione + Terbuthylazine | 140 + 660 | 660 + 1320 |
| 4. | Bentazone + Dicamba | 960 + 270 | 1920 + 540 |

Among the active ingredients, Tembotrione and Mesotrione exert their herbicide effect by inhibiting the 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) enzyme which is essential for the biosynthesis of carotenoids. In the absence of carotenoids, the chlorophyll in plants exposed to the UV radiation in sunlight is decomposed, so the plants whiten and die. Maize is capable of decomposing the active ingredient, but the efficiency of this process differs greatly in individual genotypes, and some inbred lines exhibit symptoms of sensitivity (characteristic whitening of the leaves). The appearance of these symptoms depends to a great extent on external environmental conditions (rainfall, light, temperature). Terbutylazine belongs to the triazine group of active ingredients and exerts its effect via the inhibition of electron transport in photosynthesis system II. Bentazone, a member of the benzonitrile group, has a similar effect, while Dicamba influences the functioning of the plant hormone system, resulting in deformed leaves or supporting roots, which may cause the stem to snap in cold windy weather.

The herbicides were applied post-emergence, in the 5–7-leaf stage of three Martonvásár maize inbred lines (Line 1, Line 2, Line 3) using the maximum recommended dose and double this dose. The experiment was laid out in two replications. Samples were taken from the upper treated leaves 14 days after spraying and measurements were made on the carotenoid and chlorophyll (a+b) content and on the chlorophyll a/b ratio using a Beckman Coulter A23615 Du 720 General-Purpose Spectrophotometer. The calculations were made using the method of Lichtenthaler (1987). The aim of the work was to determine what changes were caused by the normal and double doses of the selected herbicides in the chlorophyll and carotenoid contents of three maize inbred lines.

The data were evaluated with three-factor analysis of variance, using the M-STAT C program.

## *RESULTS*

### Changes in the chlorophyll (a+b) content

The genotype was found to have a significant (P=0.1%) effect on the chlorophyll (a+b) content of leaf samples taken 14 days after the treatment *(Table 3)*. Of the three factors analysed (herbicide, dose, genotype), the inbred lines were found to play a decisive role, based on the mean square values (not shown), in determining the quantities of the two main photosynthetic pigments (being responsible for 96% of the variation). The differences between the genotypes were also demonstrated by the fact that the chlorophyll (a+b) content of samples taken from the plants on untreated control plots was 25% lower in Line 1 and 54% lower in Line 2 than in Line 3 (100%). In terms of the chlorophyll (a+b) content there was no significant difference between the herbicides or between the doses. Among the herbicides, only that containing Tembotrione caused a slight but non-significant reduction in the chlorophyll (a+b) content of the lines at the time of testing.

*Table 3*

**Effect of the treatments on the chlorophyll (a+b) content of maize (µg/g fresh weight) in the herbicide tolerance experiment**

| Herbicide | Chlorophyll (a+b) |
|---|---|
| Tembotrione + Isoxadifen-ethyl | 1980.0 |
| Mesotrione + Terbutylazine | 2137.7 |
| Bentazone + Dicamba | 2167.2 |
| $LSD_{5\%}$ | 185.8 |
| Dose | |
| Control | 2020.6 |
| Normal dose | 2074.8 |
| Double dose | 2019.6 |
| $LSD_{5\%}$ | 277.0 |
| Genotype | |
| Line 1 | 2340.5 |
| Line 2 | 1438.7 |
| Line 3 | 2335.7 |
| $LSD_{5\%}$ | 426.4 |

### Changes in the carotenoid content

As in the case of the chlorophyll (a+b) content, the carotenoid content of maize leaves was also influenced to the greatest extent (P=0.1%) by the genotype *(Table 4)*. In the control treatment, Line 3 had the highest carotenoid content (100%), compared with which those of Line 2 and Line 1 were 32 and 36% lower, respectively. The mean squares calculated in the analysis (not shown) indicated that 82% of the variation in the carotenoid content could be attributed to the inbred line and 16.5% to the dose.

*Table 4*

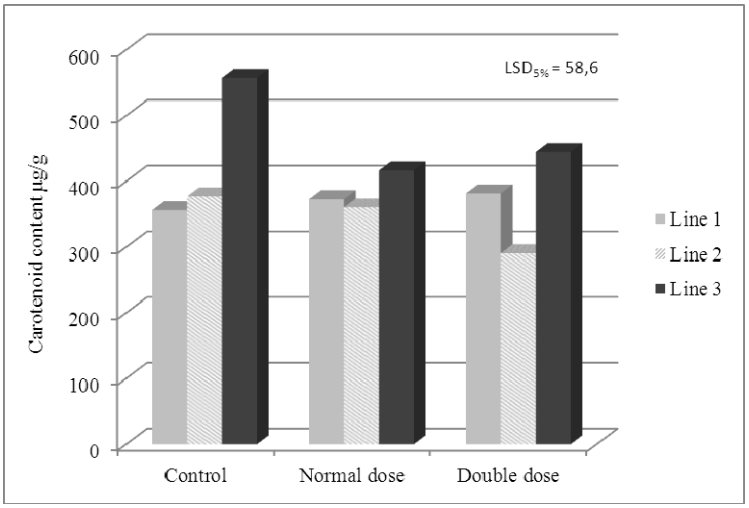
**Effect of the treatments on the carotenoid content of maize (µg/g fresh weight) in the herbicide tolerance experiment**

| Herbicide | Carotenoid |
|---|---|
| Tembotrione + Isoxadifen-ethyl | 384.5 |
| Mesotrione + Terbuthylazine | 398.9 |
| Bentazone + Dicamba | 402.6 |
| LSD5% | 21.0 |
| Dose | |
| Control | 418.7 |
| Normal dose | 372.9 |
| Double dose | 362.4 |
| LSD5% | 35.1 |
| Genotype | |
| Line 1 | 360.3 |
| Line 2 | 333.5 |
| Line 3 | 460.2 |
| LSD5% | 33.8 |

The effect of the dose was significant at the P=1% level, while no significant difference could be detected between the three herbicides, averaged over the doses and genotypes. The carotenoid contents of the lines were significantly modified by the two doses of herbicide (*Figure 1*). In Line 3, both the single and the double dose caused a significant reduction, and in Line 2 only the double dose, while neither dose had a significant effect on the carotenoid content in Line 1.

Averaged over the three genotypes and the herbicides, both doses (normal and double) reduced the carotenoid content of the lines. The double dose of Tembotrione induced a significant drop in the carotenoid content.

*Figure 1:* **Changes in the carotenoid contents of the inbred lines as a function of the herbicide dose, averaged over the herbicides**




**Changes in the chlorophyll a/b ratio**

Averaged over the doses and genotypes, the herbicide treatments had no significant effect on the chlorophyll a/b ratio (*Table 5.*), but the herbicide doses induced a shift in the chlorophyll a/b ratio compared with the control, with the lowest ratio in the control treatment. There was no significant difference between the normal and double rates. There were significant differences in the chlorophyll a/b ratio between the genotypes.

*Table 5*

**Effect of the treatments on the chlorophyll a/b ratio of maize in the herbicide tolerance experiment**

| Herbicide | Chlorophyll a/b |
|---|---|
| Tembotrione + Isoxadifen-ethyl | 3.28 |
| Mesotrione + Terbutylazine | 3.10 |
| Bentazone + Dicamba | 3.26 |
| $LSD_{5\%}$ | 0.30 |
| Dose | |
| Control | 2.75 |
| Normal dose | 3.26 |
| Double dose | 3.36 |
| $LSD_{5\%}$ | 0.25 |
| Genotype | |
| Line 1 | 3.76 |
| Line 2 | 2.87 |
| Line 3 | 2.74 |
| $LSD_{5\%}$ | 0.48 |

## *DISCUSSION*

The three maize lines gave a good representation of the varying reaction types arising due to genetic diversity. One of the lines exhibited no significant change in green pigment content in response to the herbicide doses, while one only responded with a spectrophotometrically detectable reduction when treated with double the authorised dose, averaged over the three herbicides. The maize genotype containing the largest quantity of carotenoids exhibited a significant reduction even at the recommended dose, and no further significant decline was observed in plants treated with the double dose.

***REFERENCES***

Almási A.-Sárvári É.-Bóka K.-Lózsa R.-Sági Z.-Gáborjányi R. (2005): A klorofill-protein komplex változásai tobamovírusokkal fertőzött, eltérő rezisztencia-rezisztenciatípusú paprikanövényekben. (Changes in chlorophyll-protein complexes in tobamovirus infected pepper varieties with different levels of resistance.) Növényvédelem 41, 349–354.

Berzsenyi Z.-Bónis P.-Árendás T.-Berényi G. (1994): Comparative investigations on the efficacy and selectivity of different herbicides in maize. Z. PflKrankh. PlfSchutz, Sonderh. 14, 457–466.

Bónis P.-Árendás T.-Berzsenyi Z.-Marton, L. C. (2004): Herbicide tolerance studies on maize inbred lines. Z. PflKrankh. PlfSchutz, Sonderh. 19, 901–907.

Bónis P.-Árendás T.-Berzsenyi Z.-Marton L. Cs. (2011): Kukorica genotípusok herbicid toleranciájának változása aszályos és csapadékos évjáratokban. Changes in the herbicide tolerance of maize genotypes in wet and dry years. Acta Agraria Debreceniensis 43. 124-127.

Green J. M. (1998): Differential tolerance of corn (*Zea mays*) inbreds to four sulfonylurea herbicides and bentazon. Weed Technology 12, 474–477.

Green J. M.-Ulrich, J. F. (1993): Response of corn (*Zea mays*) inbreds and hybrids to sulfonylurea herbicides. Weed Science 41, 508–516.

Green J. M.-Ulrich J. F. (1994): Response of maize (Zea mays) inbreds and hybrids to rimsulfuron. Pestic. Science 40, 187-191.

Kádár A. (ed.) (2010): Vegyszeres gyomirtás és terméssszabályozás. (Chemical Weed Control and Yield Regulation.) Private publication 382 p.

Láng F. (2002): Növényélettan. A növényi anyagcsere 1. Fotoszintézis. (Plant Physiology. The Plant Metabolism 1. Photosynthesis.)ELTE Eötvös Kiadó. Budapest. 177-264.

Shimabukuro R. H.-Frear D. S.-Swanson H. R.-Walsh W. C. (1971): Glutathione conjugation an enzimatyc basis for atrazine resistance in corn. Plant Physiology 47, 10-14.

Sunohara Y.-Shirai S.-Wongkantrakorn N.-Matsumoto H. (2010): Sensitivity and physiological responses of *Eleusine indica* and *Digitaria adscendens* to herbicide quinclorac and 2,4-D. Environmental and Experimental Botany. 68, 157–164.

Szigeti Z.-Vágújfalvi D. (1983): Klorofill fotooxidáció serkentése herbicidekkel és kivédése reduktánsokkal. (Enhancement of chlorophyll photooxidation with herbicides and protection against it with reductants.) *Botanikai Közlemények* 70, 159–164.

Widstrom N. W.-Dowler C. D. (1995): Sensitivity of selected field corn (Zea mays) to nicosulfuron. Weed Technology 9, 779-782.

# Quantitative and qualitative analysis of weed seed bank in row crops on the territory of Vojvodina

**Konstantinović B. – Meseldžija M. – Blagojević M. – Samardžić N. – Konstantinović Bo.**
Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovica 8, Novi Sad
E-mail: brankok@polj.uns.ac.rs

***SUMMARY***

*Studies weed seed distribution in the soil enable predicting which weeds will occur and to what extent in various crops. In this manner it is possible to make more efficient and economical plan of measures for their control. During the period 2009-2012 weed seed bank studies were performed in soybean, maize and sunflower crop at localities Bački Maglić, Despotovo and Žabalj. Soil samples were taken from the same plot twice, the first time after sowing and before emergence of all three crops, and the second one after picking, i.e. harvesting of crops. Samples were taken from different depths of the arable soil layer, i.e. 0-10 cm, 10-20 cm and 20-30 cm. Sieving of the soil samples was performed in laboratory conditions through copper sieves of various diameters, after which followed separation and determination of weed seeds by manuals. Amount and density of weed seeds to greatest extend depend upon soil type, preceding crops, soil tillage, as well as of herbicide use. Density of weed seeds can affect crops, but size of weed seed bank can be reduced by herbicide use in the phase of weed germination and shooting. Weed seed bank has effect to distribution of annual, as well as perennial weed species, which has impact to spread of weed community over the years. Number of weed seeds proved to be dominant in the soil layer of 0-10 cm, while the smallest quantities were separated from the layer of 20-30 cm. At localities Bački Maglić and Žabalj, in soybean and sunflower crops, the highest number of weed seeds was established in the layer of 0-10 cm, and the lowest in the layer of 20-30 cm. At locality Despotovo in maize crop the lowest number of weed seeds was found in the soil layer of 10-20 cm, and the highest in the layer of 0-10 cm.*

**Key words**: vertical distribution, seed bank, soybean, maize, sunflower, abundance of weeds

## *INTRODUCTION*

Soil type and tillage, as well as crop species to great extent effect to quantity of weed seeds in the soil. Soil seed bank represent past, as well as potential future size of weed plant community above ground (Swanton & Booth, 2004). Weeds represent one of the most important limiting factors in agricultural production. In competition to life space and nutrients (Bhatt and Singh, 2007), they affect yield reduction in grown crops (Sen, 2000; Vasileiadis, 2007) and presence of weed seeds reduces market value of agricultural products (Renton *et al.*, 2006). During weed seed bank studies, it must be kept in mind that it is only a part of a complex and dynamic system consisting of soil, plants, animals and microorganisms. It is exposed to different influences and changes, therefore results of its studies provide immediate, but not the final image of the situation on the terrain (Menalled, 2008). In the paper are presented studies of weed seed bank on the territory of the Autonomous Province of Vojvodina, at localities Bački Maglić, Despotovo and Žabalj under soybean, maize and sunflower crops in the 2009-2012 and distribution of seeds of weed species was established at soil depths of 0-10, 10-20 and 20-30 cm. Monitoring of changes in weed seed bank over time provides insight into efficiency of the implemented weed control measures and possibilities of weed occurrence in the future (Cavers, 1995; Ambrosio *et al.*, 2004).

Weed seeds are not evenly distributed in the field, but in certain places they occur in higher or lower number. Uneven concentration of seeds is usually consequence of poor dispersal and spread of newly formed seeds near mother plant, or it is caused by human impact on weeds that mature simultaneously with the crop, and weed seeds dispersal in direction of rows (Forcela, 2003). Tillage and crop rotation are the primary agricultural activities that have an effect on the reduction in volume of the weed seed bank in the soil. However, tillage causes ejection of great number of weed seeds to the surface where dormancy is interrupted, they start to germinate and shoot. Seed from the surface is also plowed into the deeper soil layers where it goes into the phase of dormancy and represents future potential source of weeds (Konstantinović, 2008).

## *MATERIALS AND METHODS*

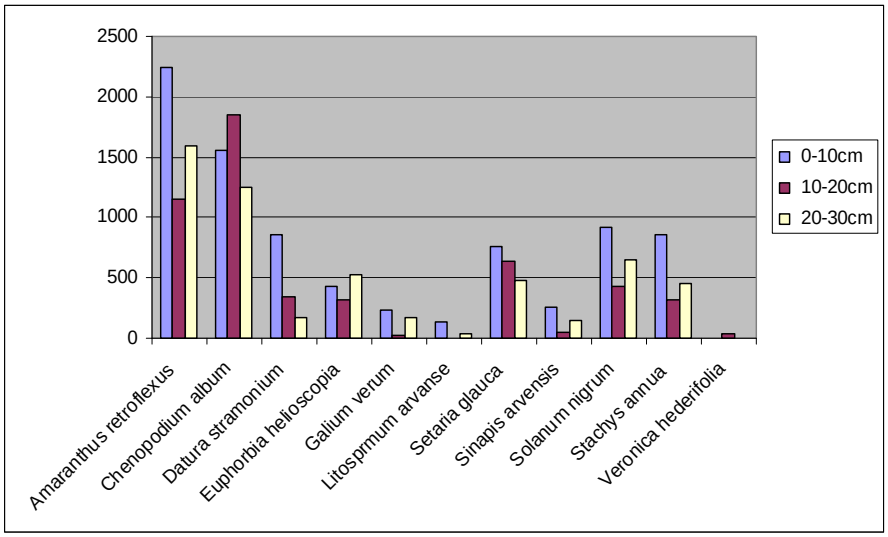
In the period 2009-2012, weed seed bank studies were performed under soybean crop at locality Bački Maglić, under maize crop at locality Despotovo and under sunflower crop at locality Žabalj. At locality Bački Maglić, autumn 25 cm deep tillage, cultivation and spring pre-sowing preparation were regularly applied, while at localities Despotovo and Žabalj, apart from 30 cm deep soil tillage, only pre-sowing preparation was performed. Samples were taken from the same experimental plots, by metal probe of 4 cm in diameter from depths of 0-10, 10-20 and 20-30cm (methods of Conn, 1987 and Sharatt 1998). Seed extraction was performed first by rough sieving of soil samples through a copper sieve of 5 mm in diameter. This was followed by sieving through sieves of 0.5 mm in diameter, under water spray. The samples which included an average of 1.5 kg of the soil were rinsed with water through a copper sieve of 0.25 mm in diameter. The discharge from the sieve dried at room temperature for several days, and after that followed manual extraction of seeds. After drying of

the obtained samples followed separation of weed seeds and their determination by microscopes and determinators (Kronaveter and Boža, 1994).

***RESULTS***

At locality Despotovo, the highest average number of all weed seeds in maize crop was established in the soil layer of 0-10 cm with 8244 per $m^2$, and the lowest in the layer of 10-20 cm with 5164 seeds per $m^2$. At locality Despotovo, in the soil layer of 0-10 cm, 10 weed species were determined, i.e. dominant weed species *Amaranthus retroflexus* L. (2248 seeds per m²) and *Chenopodium album* L. (1556 seeds per m²); in the soil layer of 10-20 cm dominance of seeds of weed species *Chenopodium album* L. (1854 seeds per m²) and *Amaranthus retroflexus* L. (1158 seeds per m²) was established, while in the soil layer of 20-30 cm, as well as in the previous two layers the highest number of seeds of weed species *Amaranthus retroflexus* L. (1589 seeds per m²) and *Chenopodium album* L. (1245 seeds per m²) were found. (*Figure 1*).

*Figure 1*: **Types of weed seeds at locality Despotovo in maize crop at different soil depths in the period 2009-2012**




At locality Žabalj in sunflower crop, the highest average number of seeds of weed species was determined in the soil layer of 0-10 cm (7075 seeds per $m^2$), and the lowest in the layer of 10-20 cm (5443 seeds per $m^2$). At locality Žabalj, in the soil layer of 0-10 cm, 9 weed species were established, abd dominant weed species were *Amaranthus retroflexus* L. (1745seds per m²) and *Chenopodium album* L. (1652 seeds per m²); in the soil layer of 10-20 cm dominance of seeds of weed species *Chenopodium album* L. (1324 seeds per m²) and *Datura stramonium* L. (1121 seeds per m²) was established, while in the soil layer of 20-30 cm the highest number of seeds of weed species *Amaranthus retroflexus* L. (1422 seeds per m²) was found (*Figure 2*).

At locality Bački Maglić studies of soil samples under soybean crop were performed in order to establish weed seed bank in the arable soil layer of 0-30 cm. Significant quantity of weed seed in the studied arable soil layer was established, and seeds of 9 weed species were determined, of which dominant were annual broad-leaved weeds, as well as at the two previous localities: *Datura stramonium* L., *Chenopodium album* L., *Stachys annua* L., *Solanum nigrom* L., *Euphorbia helioscopia* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Polygonum aviculare* L., *Polygonum lapathifolium* L. and *Bilderdykia convolvulus* (L.) Dum. Presence of quarantine weed species *Cuscuta epithymum* L. was established. The highest average number of all weed seeds was determined in the soil layer of 0-10 cm (10523 seeds per $m^2$) and the lowest in the layer of 20-30 cm (9039 seeds per $m^2$). In the surface soil layer dominated seed of weed species *Amaranthus retroflexus* (3125 seeds per $m^2$), while in the layer of 10-20 cm dominated seed of *Chenopodium album* (2923 seeds per $m^2$). Dominance of *Amaranthus retroflexus* with 2271 seeds per $m^2$ was established at depth of 20-30. (*Figure 3*).

*Figure 2:* **Types of weed seeds at locality Žabalj in sunflower crop at different soil depths in the period 2009-2012**

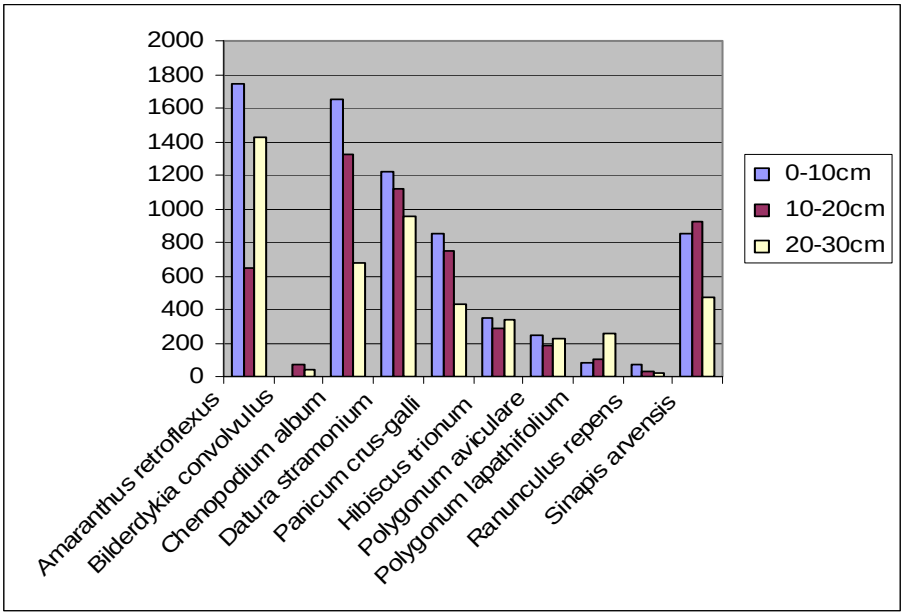



*Figure 3*: **Types of weed seeds at locality Bački Maglić in soybean crop at different soil depths in the period 2009-2012 .**

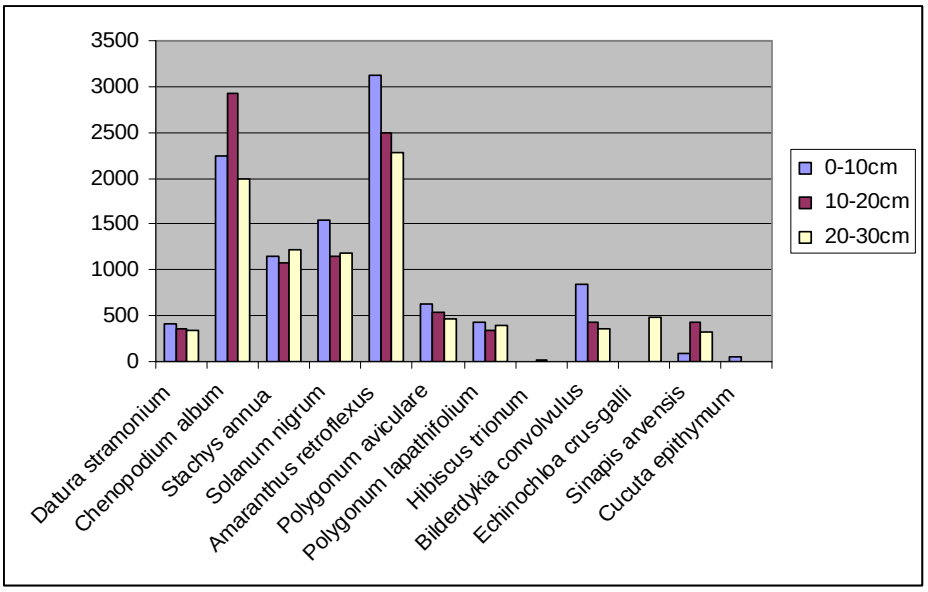



*Table 1*

**Statistical data processing on number of seeds from the studied localities**

| Locality | Standard deviation (δ) | Variation coefficient - (V%) |
|---|---|---|
| Despotovo | 583 | 104.5 |
| Bački Maglić | 900 | 110.1 |
| Žabalj | 522 | 89.8 |

Statistical data processing showed that the maximum deviation of the number of seeds per different soil layers was at locality Bački Maglić (900), while the minimum deviations were recorded for localities Despotovo (583) and Žabalj (522) (table 1). Data processing of variation coefficient revealed the lowest percentage of variation at locality Žabalj (89.8%), while at locality Bački Maglić the variation percentage between seeds of

weed species was the highest (110.1%). Allocated seeds belong to weed species that are typical for row crops such as soybean, but also for maize, sunflower and etc. (Konstantinović, 1999; Konstantinović *et al.*, 2008).

## *DISCUSSION*

Maize, sunflower and soybean are row crops that have great distance between rows and plants in a row, and their growth is slower in the first development phases, which enables shooting and development of weeds and early establishment of weed community in maize (Konstantinović, 2011). Maize weed community is typical row crop one, and floristically very rich. It comprises about 150 weed species that do not have equal importance in weediness. Only lower number of species participates in building of characteristic maize weed community, and these are: *Abuthilon theophrast, Ambrosia artemisiifolia, Amaranthus retroflexus, Chenopodium album, Cirsium arvense, Convolvulus arvensis, Cynodon dactylon, Digitaria sanguinalis, Hibiscus trionum, Rubus caesius, Echinochloa crus-galli, Polygonum aviculare, Polygonum lapathifolium, Polygonum persicaria, Setaria glauca, Setaria viridis, Solanum nigrum,* and *Sorghum halepense* (Konstantinović, 1999).

At the studied locality Despotovo 11 weed species seeds were determined: *Amaranthus retroflexus* L., *Chenopodium album* L., *Datura stramonium* L., *Euphorbia helioscopia* L.,*Galium verum* L., *Litosprmum arvanse* L., *Setaria glauca* L., *Sinapis arvensis* L., *Solanum nigrum* L., *Stachys annua* L., and *Veronica hederifolia* L. (*Figure 1*). At this locality, majority of these weed species was found in the layer of 20-30 cm, and total number of separated seeds in all three layers was 18872 seeds per m². Reasons for this are regular soil tillage, with application of deep autumn cultivation, tillage before spring pre-sowing preparation and permanent herbicide use.

At the studied locality Žabalj 10 weed species seeds were determined : *Amaranthus retroflexus* L., *Bilderdykia convolvulus* L., *Chenopodium album* L., *Datura stramonium* L., *Panicum crus-galli* L., *Hibiscus trionum* L., *Polygonum aviculare* L., *Polygonum lapathifolium* L., *Ranunculus repens* L., and *Sinapis arvensis* L. (*Figure 2*). At this locality, majority of weed species was found in the layer of 0-10 cm, and the lowest number of weed seeds was in the layer of 20-30 cm. Total number of separated seeds in all three layers was 17359 seeds per m².

At the studied locality Bački Maglić, as at the first locality, 12 weed species seeds were determined : *Datura stramonium* L., *Chenopodium album* L., *Stachys annua* L., *Solanum nigrum* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Polygonum aviculare* L., *Polygonum lapathifolium* L., *Hibiscus trionum* L., *Bilderdykia convolvulus* L., *Echinochloa crus-galli* L., *Sinapis arvensis* L. and one quarantine weed species, *Cuscuta epithymum* L. (*Figure 3*). At locality Bački Maglić, in all three soil layers was found total number of 29316 seeds per m². The highest number of weed seeds per m² was found in the layer of 0-10cm. For this amount of weed species seeds per square meter in soybean crop are definitely responsible weak application of cultural practices, i.e. use of very shallow autumn tillage, lack of pre-sowing preparation and certainly shortage of herbicide treatments.

### *REFERENCES*


Ambrosio L.A.-Iglesias L.- Marin C.- Monte J.P. (2004): Evaluation of sampling methods and assessment of the sample size to estimate the weed seedbank in soil, taking into account spatial variability. Weed Research 44: 224–236.

Bhatt M.D.-Singh S.P. (2007): Soil seed bank dynamics of weed flora in upland and lowland paddy cultivation areas of far western Nepal. Scientific World 5: 54-59.

Conn J.C. (1987): Effects of tillage and straw management on Alaskan weed vegetation: a study on newly cleared land, Soil Tillage Res. 9 (1987), pp. 275–285.

Forcella F.-Webster T.-Cardina J. (2003): Protocols for weed seed bank determination in agro- ecosystems. Weed Management for Developing Countries. Addendum 1.

Konstantinović B.- Meseldžija M.- Konstantinović Bo. (2008): Distribution of weed species seed under different crops and in various soil lazers. Polish Journal of Natural Science, 5, 298-299.

Konstantinović B. (1999). Poznavanje i suzbijanje korova. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Konstantinović B. (2011). Osnovi herbologije i herbicidi. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Konstantinović B.-Meseldžija M.- Konstantinović Bo. (2008): Distribution of weed species seed under different crops and in various soil lazers. Polish Journal of Natural Science, 5, 298-299.

Kronaveter Đ.- Boža P. (2004): Poznavanje semena najčešćih korova u semenarstvu, Univerzitet u Novom Sadu, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.

Menalled F. (2008): Weed Seedbank Dynamics & Integrated Management of Agricultural Weeds. Montana State University and Montana State University Extension of populations and communities. Weed Technology, 18, 1496–1502. Polish Journal of Natural Science, 5, 298-299.

Renton M.- Peltzer S.- Diggle A. (2006): Using the Weed Seed Wizard to Understand and Manage the Weed Seedbank. Australian Society of Agronomy.

Sharratt B.S. (1998): Barley yield and evapotranspiration governed by tillage practices in interior Alaska, Soil Tillage Res. 46, pp. 225–229.

Sen D.N. (2000): Weeds in rainfed cropping in Indian desert. Environment and Agriculture: At the cross road of New Millennium vol. I (eds.) P.K. Jha, S.B. Karmacharya, S.R. Baral and P. Lacuol. Ecological Society (ECOS), Kathmandu, Nepal, pp. 223-228.

Swanton, C.J., Booth, B.D. (2004): Management of weed seedbanks in the context a study on newly cleared land, Soil Tillage Res. 9 (1987), pp. 275–285.

Smutný V.- Křen J. (2002): Improvement of an elutriation method for estimation of weed seedbank in the soil. Rostinná Výroba 48(6): 271–278.

Vasileiadis V.P.-Froud-Williams R.J.-Eleftherohorinos I.G. (2007): Vertical distribution, size and composition of the weed seedbank under various tillage and herbicide treatments in a sequence of industrial crops. Weed Research 47:222–230.

# Gyomirtó szerek összehasonlítása napraforgóban kétszikű gyomnövények ellen

# Herbicidal control of annual broadleaf weeds in sunflower

**Dávid István – Kovács Endre**
Debreceni Egyetem, AGTC MÉK, Növényvédelmi Intézet
idavid78@gmail.com

***ÖSSZEFOGLALÁS***

*Vegyszeres gyomirtási kísérletet állítottunk be napraforgóban 2012-ben Debrecenben a gyomirtási hatékonyság és az esetleges fitotoxikus hatások vizsgálatára. A kísérletben hét herbicid kombinációt teszteltünk hét gyomfajon: Chenopodium album, Ambrosia artemisiifolia, Amaranthus retroflexus, Polygonum lapathifolium, Datura stramonium, Abutilon theophrasti, Xanthium italicum. Öt kezelésben csak preemergens kijuttatást, 2 kezelésben pedig preemergens és posztemergens herbicid kijuttatást végeztünk. A kezelések kisparcellán, három ismétlésben történtek.*

*A preemergens kezelések számára optimális körülmények voltak a vizsgálatban, a napraforgó pedig zárt állományt alkotott, így a gyomirtó szerek hatása kiválóan érvényesülhetett. A C. album, A. retroflexus és P. lapathifolium elleni hatékonyság mindegyik kombináció esetében jó vagy kiváló volt. A D. stramonium-ot a preemergens kezelések többsége, és a posztemergens kezelések egyaránt hatékonyan irtották. A. artemisiifolia esetében a fluorkloridon, terbutilazin és imazamox hatóanyagot tartalmazó kezelések emelkedtek ki, A. theophrasti esetében pedig az oxifluorfen és imazamox hatóanyagot tartalmazók. A X. italicum fajt csak az imazamox kezelés pusztította hatékonyan.*

***SUMMARY***

*Herbicidal weed control experiments were established in sunflower in Debrecen, Hungary, in 2012 to evaluate the biological activity and fitotoxicity of several treatments. Seven herbicide combinations were examined against seven weed species: Chenopodium album, Ambrosia artemisiifolia, Amaranthus retroflexus, Polygonum lapathifolium, Datura stramonium, Abutilon theophrasti, Xanthium italicum. Only preemergent herbicides were applied in five treatments, and there were preemergent and postemergent herbicide application in two cases. The field study was done on small plots and in three replications.*

*There were optimum conditions for preemergent herbicide application and biological activity, and sunflower formed closed canopy in the middle of the summer, so there was an excellent base to maximum efficacy of herbicides. Biological activity of all treatments was good or excellent on C. album, A. retroflexus, P. lapathifolium. Most preemergent treatments and both postemergent treatments were effective against D. stramonium. The best efficacy was observed against A. artemisiifolia in case of combinations included fluorkloridon, terbuthylazine or imazamox, and the best efficacy was observes against A. theophrasti in case of combinations included oxifluorfen or imazamox. Only imazamox application gives effective control of X. italicum.*

**Kulcsszavak:** napraforgó, gyomirtás, herbicid
**Keywords:** sunflower, weed control, herbicide

## *BEVEZETÉS*

A napraforgó termesztés mértéke Magyarországon az utóbbi egy-másfél évtizedben 500.000 hektár körül stabilizálódott, jelenleg a legnagyobb területen termesztett olajnövény hazánkban. Vegyszeres gyomirtásában hosszú időn keresztül a preemergens kezelések voltak egyeduralkodók, amelyek a mai napig meghatározó szerepet játszanak e növénykultúra gyommentesítésében. A 2000-es évek elejétől kezdve azonban egyre hangsúlyosabbá válik az állománykezelések szerepe ebben a kultúrában is. Ennek több oka is van, melyek közül az egyik a gyomflóra átalakulása. Az utóbbi évtizedekben olyan nehezen irtható gyomfajok szaporodtak fel Magyarországon, melyek kikényszerítették a napraforgó gyomirtás rendszerének az átalakulását is, pl. parlagfű, szerbtövis fajok, selyemmályva, csattanó maszlag. Másrészt a preemergens kezelések megfelelő hatásához szükséges bemosó csapadék bizonytalansága is olyan technológiák kialakítását követelte meg, melyek nagyobb hatásbiztonságot nyújtanak. (Dávid és mtsai. 2006, Dávid és Kovács 2007, Dávid 2011a, Dávid 2011b, Dávid 2012a, Dávid 2012b, Hlavács és Simon 2010, Hoffmanné Pathy 2005, Novák és mtsai. 2011)

A napraforgó vegyszeres gyomirtásában az utóbbi 10 év legnagyobb változását a herbicid toleráns hibridek megjelenése jelentette, amivel lehetővé vált a nehezen irtható kapás gyomok elleni hatékony védekezés a napraforgó állományában. Mivel a preemergens kezelésekre kevésbé érzékeny, ugyanakkor nagy versenyképességű gyomfajok a napraforgó termőterületének jelentős részét már megfertőzték, így néhány év alatt a herbicid toleráns napraforgók termőterülete – és az arra alapozott gyomirtási technológia – elérte az összes napraforgó vetésterület felét. (Dávid 2011a, Papp 2011, Szabó 2010)

A herbicid ellenálló hibridekben használható imazamox és tribenuron-metil hatóanyagok biztonságos megoldást jelentenek a napraforgó veszélyes gyomnövényeivel szemben, ugyanakkor a sikeres védekezéshez szükséges a technológiai fegyelem betartása. A kezelések megfelelő időzítése meghatározó a védekezés

sikeressége szempontjából, hiszen – különösen a nehezen irtható fajok esetében – a túlfejlett egyedek ellen romlik a hatékonyság. (Hoffmanné Pathy 2005, Szabó 2010)

Bár jelenleg lehetőség van rá, hogy kizárólag posztemergens gyomirtó szerek alkalmazásával mentesítsük a napraforgót a gyomnövények okozta versengéstől, a tapasztalatok mégis alátámasztják azt a véleményt, hogy herbicid ellenálló hibridekben is célszerű alapkezelést használni a posztemergens felhasználású készítmények hatásspektrumának szélesítésére, hatékonyságuk javítására. (Dávid 2011a, Szabó 2010)

2012-ben vizsgálatot állítottunk be a napraforgó gyomirtására, ahol azonos körülmények között hasonlítottunk össze több, Magyarországon széles körben használt herbicidet, hatékonyság és esetleges fitotoxicitás szempontjából. A kezeléseket olyan területen végeztük el, ahol értékelhető mennyiségben jelen voltak a napraforgó legjelentősebb magról kelő kétszikű gyomnövényei.

## *ANYAG ÉS MÓDSZER*

2012. évben állítottunk be vegyszeres gyomirtási vizsgálatot napraforgóban kétszikű gyomnövényekkel erősen fertőzött területen Debrecenben, a Debreceni Egyetem Növényvédelmi Intézet bemutatókertjében. A kezeléseket kisparcellás kísérletben, 3 ismétlésben végeztük el. A kezelések során felhasznált készítményeket az 1. táblázat mutatja be.

*1. táblázat*

**A kezelésekben felhasznált készítmények**

| A készítmény neve (1) | Gyártó (2) | Hatóanyag (3) |
|---|---|---|
| Afalon Dispersion | Agan (IL) | 450g/l linuron |
| Dual Gold 960 EC | Syngenta (CH) | 960g/l S-metolaklór |
| Gardoprim Plus Gold | Syngenta (CH) | 312g/l S-metolaklór + 187g/l terbutilazin |
| Goal Duplo | Dow Agrosciences (US) | 480g/l oxifluorfen |
| Pledge 50 WP | Sumitomo Chemical (JP) | 50% flumioxazin |
| Pulsar 40 SL | BASF Agro (CH) | 40g/l imazamox |
| Racer | Agan (IL) | 25% fluorkloridon |
| Spectrum | BASF (DE) | 720g/l dimetenamid-p |

*Table 1: Applied herbicides*

The name of the herbicide (1), producer (2), active ingredients (3)

A herbicides kezeléseket két időpontban végeztük el:

- április 18-án, a vetést követő 2. napon (preemergens kezelések),
- május 22-én (posztemergens kezelések).

A herbicidek kijuttatása Kertitox kisparcellás permetező géppel történt, 200 liter lémennyiséggel, XR TEEJET 110 03 VP szórófejjel. Az egyes kezelések felsorolása a 2. táblázatban látható.

*2. táblázat*

**Kezelések**

| Kezelés sorsz. (1) | Készítmény (2) | Dózis (3) | Kijuttatás (4) |
|---|---|---|---|
| 1. | Gyomos kontroll | - | - |
| 2. | Dual Gold 960 EC<br>Afalon Dispersion | 1,6 l/ha<br>2 l/ha | preemergens (5)<br>preemergens |
| 3. | Dual Gold 960 EC<br>Racer | 1,6 l/ha<br>2,5 l/ha | preemergens<br>preemergens |
| 4. | Dual Gold 960 EC<br>Goal Duplo | 1,6 l/ha<br>0,5 l/ha | preemergens<br>preemergens |
| 5. | Dual Gold 960 EC<br>Pledge 80 WP | 1,6 l/ha<br>80 g/ha | preemergens<br>preemergens |
| 6. | Gardoprim Plus Gold<br>Dual Gold 960 EC | 4 l/ha<br>0,4 l/ha | preemergens<br>preemergens |
| 7. | Spectrum<br>Pulsar 40 SL | 1,2 l/ha<br>1 l/ha | preemergens<br>posztemergens (6) |
| 8. | Spectrum<br>Pulsar 40 SL | 1,4 l/ha<br>1,2 l/ha | preemergens<br>posztemergens |

*Table 2: Treatments*

The number of the treatment (1), the name of the herbicide (2), dose (3), application timing (4), preemergent (5), postemergent (6)

A vizsgálat beállítása agyagos vályog talajon történt, melynek szerves anyag tartalma 3 %. A termesztett napraforgó hibrid: Neoma. A területen meghatározó gyomnövények, melyekre a gyomirtási kísérletet értékelni

lehetett: ürömlevelű parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia* L.), fehér libatop (*Chenopodium album* L.), csattanó maszlag (*Datura stramonium* L.), selyemmályva (*Abutilon theophrasti* Medic.), lapulevelű keserűfű (*Polygonum lapathifolium* L.), Olasz szerbtövis (*Xanthium italicum* Mor.), szőrös disznóparéj (*Amaranthus retroflexus* L.).

A napraforgó és a gyomnövények fejlettségi állapotát a 3. táblázat mutatja a kezelések időpontjában. Posztemergens gyomirtó szer kijuttatás csak a 7. és 8. kezelésekben történt. Ezek korábban preemergens kezelést is kaptak, aminek következtében a fehér libatop, szőrös disznóparéj és a lapulevelű keserűfű jelentősen meggyérült, a csattanó maszlagon pedig növekedési depresszió és fitotoxikus tünetek voltak láthatók, így ezek képe eltért a kontroll parcellákétól már a posztemergens kezelések előtt is.

*3. táblázat*

**A napraforgó és a gyomnövények fejlettsége a kezelések napján**

| Növény neve (1) | április 18. (2) | május 22. (3) | |
|---|---|---|---|
| | | kontroll parcellák (4) | 7., 8. számú parcellák (5) |
| *Helianthus annuus* | mag | 4-6 levél | 4-6 levél |
| *Chenopodium album* | mag | 4-10 levél | 4-10 levél |
| *Ambrosia artemisiifolia* | mag | 4-8 levél | 4-8 levél |
| *Polygonum lapathifolium* | mag | 4-8 levél | 4-8 levél |
| *Amaranthus retroflexus* | mag | 4-8 levél | 4-8 levél |
| *Datura stramonium* | mag | 3-5 levél | 1-5 levél |
| *Abutilon theophrasti* | mag | 3-5 levél | 3-5 levél |
| *Xanthium italicum* | mag | 4-6 levél | 4-6 levél |

Table 3: Phenological stages of weed species and sunflower

Names of plant species (1), 18 April (2), 22 May (3), Weedy control plots (4), Treatments No. 7 and 8 (5)

A preemergens kezelést követő 2 hétben 19 mm csapadék hullott, a kezelést követő 4 hétben pedig 51 mm.

A gyomirtó hatékonyság értékelése június 14-én, július 24-én és szeptember 12-én történt, a kontroll parcellákhoz viszonyított pusztulási százalékok meghatározásával.

## *EREDMÉNYEK*

A vizsgálat helyszínén 7 gyomfaj volt meghatározó: a fehér libatop, parlagfű, szőrös disznóparéj, lapulevelű keserűfű, csattanó maszlag, selyemmályva, olasz szerbtövis. E fajokon túl foltszerűen vagy szórványosan előfordult mezei aszat, aprószulák, pokolvar libatop, karcsú disznóparéj, vadkender. A gyomnövények már június közepén 83%-os borítást adtak, a napraforgó pedig mindössze 14%-ot. Július végére a gyomfajok térhódítása tovább nőtt, elérte a 92%-ot, a napraforgóé pedig 8%-ra csökkent. Szeptember közepére a napraforgó beérett, a lombját elveszítette, a gyomnövények térhódítása kis mértékben tovább nőtt. A gyomfajok közül gyakoriságában kiemelkedett a parlagfű (30% feletti borítási értékekkel), és a fehér libatop (20% feletti értékekkel). A további öt kiemelt faj 5-8%-os fedettséget ért el. (1. ábra)

*1. ábra:* **A gyomnövények és a napraforgó borítási értékei a kontroll parcellákban**

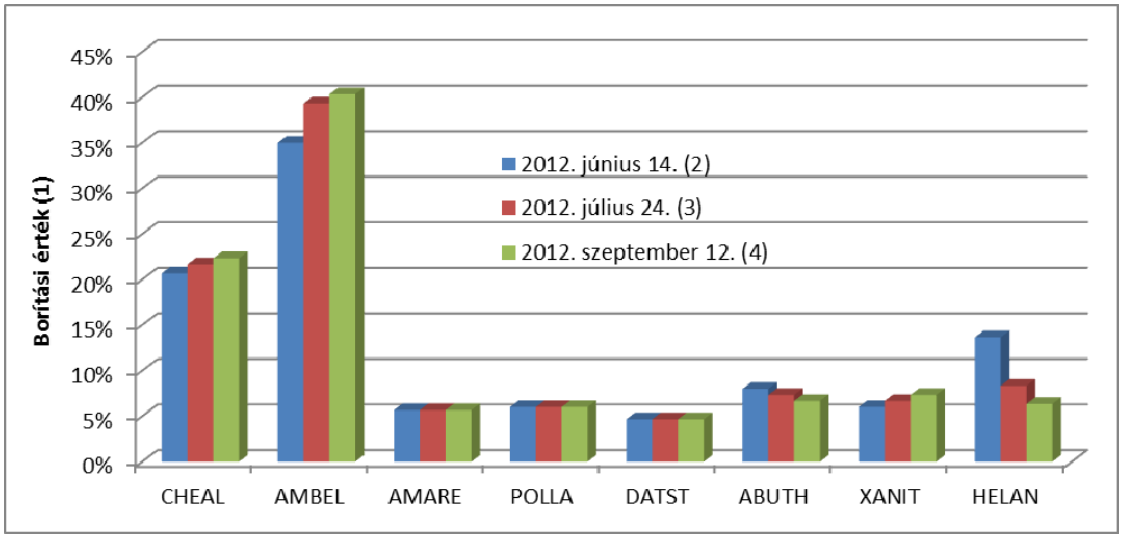



*Figure 1: Ground covers of weed species and sunflower in weedy control plots*

Ground cover (1), 14 June 2012 (2), 24 July 2012 (3), 12 September 2012 (4)

A kezelések közül a preemergens időzítéssel kijuttatott herbicidek kifejezetten kedvező körülmények között dolgozhattak. A kezelést követő két héten belül közel 20 mm bemosó csapadék érkezett, majd a további 2 hétben újabb, jelentős mennyiségű csapadék hullott. A továbbiakban bekövetkező száraz időjárás miatt a gyomok utókelése nem volt jellemző, és a napraforgó állomány gyomelnyomó képessége is kitűnően érvényesülhetett a kezelt parcellákban. Az állománykezelések (7 és 8 kezelésben) idejére egyes gyomfajokat (pl. fehér libatop, szőrös disznóparéj) jelentősen meggyérített, másokat károsított a dimetenamid-p alapkezelés, de a gyomnövények egy része (különösen parlagfű, selyemmályva, olasz szerbtövis esetében) nem károsodott számottevő mértékben, egyedei között az imazamox kijuttatása napján több meghaladta az optimális 2-4 leveles fejlettséget.

A preemergens és posztemergens kezelések első egységes értékelése június 14-én történt (4. táblázat). A fehér libatop, szőrös disznóparéj és lapulevelű keserűfű esetében közel tökéletes hatékonyságot tapasztaltunk, a többi faj elleni hatékonyságban azonban voltak kisebb-nagyobb különbségek. A parlagfű esetében a kezelések gyakorlatilag 90% körüli pusztulást eredményeztek, kivéve az S-metolaklór + fluorkloridon kombinációt, ahol a hatékonyság meghaladta a 95%-ot. A csattanó maszlag irtásában ekkor – a csak preemergens kezelést kapott parcellák közül – a fluorkloridon, oxiflourfen vagy fluioxazin herbicidet tartalmazók értek el 90% körüli eredményt, az imazamox posztemergens kijuttatásával azonban 100%-os volt a hatás. A selyemmályva esetében az alapkezelések közül egyedül az oxifluorfen tartalmú kombináció érte el illetve haladta meg a 90 %-ot, a posztemergens imazamox kezelést kapó parcellák viszont elérték/meghaladták a 95% hatékonyságot. Az olasz szerbtövisen a preemergens kezelések csak átmeneti tüneteket okoztak, az imazamox hatóanyagot is tartalmazó 7. és 8. kezelésekben azonban 97%-os volt a hatás.

4. táblázat

**A kezelések hatékonysága az 1. értékelés alkalmával**

| | Kezelés (hatóanyag g/ha) (1) | CHEAL | AMBEL | AMARE | POLLA | DATST | ABUTH | XANIT |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Pusztulási % (2) | | | | | | |
| 2 | S-metolaklór (3) (1536)+ linuron (4) (900) | 100 | 91 | 100 | 100 | 33 | 40 | 10 |
| 3 | S-metolaklór (1536) + fluorkloridon (5) (625) | 100 | 96 | 100 | 99 | 92 | 77 | 39 |
| 4 | S-metolaklór (1536) + oxifluorfen (6) (240) | 100 | 92 | 100 | 100 | 88 | 93 | 10 |
| 5 | S-metolaklór (1536) + flumioxazin (7) (40) | 99 | 87 | 98 | 100 | 93 | 84 | 10 |
| 6 | S-metolaklór (1632) + terbutilazin (8) (748) | 100 | 93 | 99 | 100 | 79 | 68 | 10 |
| 7 | dimetenamid-p (9) (864) + imazamox (40) | 96 | 92 | 100 | 98 | 100 | 95 | 97 |
| 8 | dimetenamid-p (1008) + imazamox (10) (48) | 98 | 92 | 99 | 100 | 100 | 96 | 97 |

*Table 4: Efficacy of treatments at the time of first evaluation*

Treatments: a.i. g/ha (1), biological activity (2), S-metolachlor (3), linuron (4), fluorchloridone (5), oxyfluorfen (6), flumioxazin (7), terbuthylazine (8), dimethenamid-p (9), imazamox (10), CHEAL-Chenopodium album, AMBEL-Ambrosia artemisiifolia, AMARE-Amaranthus retroflexus, POLLA-Polygonum lapathifolium, DATST-Datura stramonium, ABUTH-Abutilon theophrasti, XANIT-Xanthium italicum.

Július végén a gyomirtott napraforgó parcellák zárt állományt alkottak, jól érvénysült a gyomelnyomó képességük, amivel a kultúrnövény jelentősen hozzájárult a herbicidek jobb hatáskifejtéséhez. Ennek köszönhetően olyan gyomfajok és herbicidek vonatkozásában is jó vagy elfogadható hatékonyságot tapasztaltunk, melyeknél az 1. értékelés alapján nem volt várható. (5. táblázat)

A fehér libatop, szőrös disznóparéj, lapulevelű keserűfű elleni hatékonyság mindegyik herbicid kombináció esetében 96 és 100% közé esett. A csattanó maszlag pusztulásának mértéke a 3-8 kezelésekben elérte/meghaladta a 95%-ot.

5. táblázat

**A kezelések hatékonysága a 2. értékelés alkalmával**

| | Kezelés (hatóanyag g/ha) (1) | CHEAL | AMBEL | AMARE | POLLA | DATST | ABUTH | XANIT |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Pusztulási % (2) | | | | | | |
| 2 | S-metolaklór (3) (1536)+ linuron (4) (900) | 96 | 88 | 100 | 100 | 85 | 89 | 0 |
| 3 | S-metolaklór (1536) + fluorkloridon (5) (625) | 100 | 94 | 99 | 99 | 98 | 82 | 0 |
| 4 | S-metolaklór (1536) + oxifluorfen (6) (240) | 98 | 88 | 100 | 100 | 100 | 94 | 0 |
| 5 | S-metolaklór (1536) + flumioxazin (7) (40) | 100 | 90 | 100 | 100 | 100 | 90 | 0 |
| 6 | S-metolaklór (1632) + terbutilazin (8) (748) | 100 | 93 | 100 | 100 | 95 | 89 | 0 |
| 7 | dimetenamid-p (9) (864) + imazamox (40) | 99 | 92 | 99 | 100 | 100 | 96 | 97 |
| 8 | dimetenamid-p (1008) + imazamox (10) (48) | 100 | 95 | 99 | 100 | 100 | 96 | 97 |

*Table 5: Efficacy of treatments at the time of second evaluation.*

Treatments: a.i. g/ha (1), biological activity (2), S-metolachlor (3), linuron (4), fluorchloridone (5), oxyfluorfen (6), flumioxazin (7), terbuthylazine (8), dimethenamid-p (9), imazamox (10), CHEAL-Chenopodium album, AMBEL-Ambrosia artemisiifolia, AMARE-Amaranthus retroflexus, POLLA-Polygonum lapathifolium, DATST-Datura stramonium, ABUTH-Abutilon theophrasti, XANIT-Xanthium italicum.

A parlagfű irtásában a csak preemergens kezelést kapott parcellákon a gyomnövényen tapasztalt pusztulási százalék 88 és 94 % közé esett. Hatékonyságukban kissé kiemelkedtek a fluorkloridon és terbutilazin hatóanyagot tartalmazó kombinációk. A dimetenamid-P + imazamox kezelések eredményessége a dózis függvényében 92-95% volt.

A selyemmályva elleni hatékonyság az alapkezelések közül az oxifluorfen vagy flumioxazin hatóanyagot tartalmazó kombinációk esetében érte el a 90%-ot, egyéb esetekben 80 és 89% között eredményt adtak. A legjobb hatékonyságot a posztemergens kezelések biztosították (96%).

A szerbtövisek ekkorra kiheverték az alapkezelések okozta átmeneti stresszt, azoknak gyakorlatilag semmilyen hatása nem mutatkozott, az imazamox posztemergens kijuttatásával azonban 97%-os pusztulást lehetett elérni.

A betakarítás előtti utolsó értékelés alkalmával (szeptember 12.) a fehér libatop, szőrös disznóparéj, lapulevelű keserűfű, csattanó maszlag esetében jelentős változást nem tapasztaltunk az előző értékelés eredményeihez viszonyítva.

Parlagfű esetében mérsékeltebb hatásúak voltak a kombinációk, mint a fent felsorolt fajok ellen, de a kontroll parcellákon tapasztalt óriási fertőzés ellenére összességében elfogadható vagy jó eredményt nyújtottak a gyomfaj visszaszorításában. A preemergens kezelések közül a fluorkloridon és terbutilazin tartalmúak adtak 90% feletti hatékonyságot. A posztmergens kezelések dózistól függően 91-95% pusztulást eredményeztek.

A selyemmályva irtásában a preemergens kezelések közül egyedül az oxifluorfen hatóanyagú kombináció hatékonysága haladta meg kis mértékben a 90%-ot. 80% feletti eredményt adtak a linuron, flumioxazin, terbutilazin tartalmú kezelések. Az imazamox posztemergens kijuttatásával 93%-os hatékonyságot értünk el.

Az olasz szerbtövis irtásában a korábbi felvételezésekhez hasonlóan csak az imazamox tartalmú kezelés bizonyult hatékonynak. (6. táblázat)

6. táblázat

**A kezelések hatékonysága a 3. értékelés alkalmával**

| | Kezelés (hatóanyag g/ha) (1) | CHEAL | AMBEL | AMARE | POLLA | DATST | ABUTH | XANIT |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Pusztulási % (2) | | | | | | |
| 2 | S-metolaklór (3) (1536)+ linuron (4) (900) | 97 | 85 | 99 | 100 | 80 | 87 | 0 |
| 3 | S-metolaklór (1536) + fluorkloridon (5) (625) | 100 | 93 | 100 | 98 | 98 | 78 | 0 |
| 4 | S-metolaklór (1536) + oxifluorfen (6) (240) | 95 | 84 | 100 | 100 | 100 | 92 | 0 |
| 5 | S-metolaklór (1536) + flumioxazin (7) (40) | 100 | 88 | 99 | 100 | 100 | 89 | 0 |
| 6 | S-metolaklór (1632) + terbutilazin (8) (748) | 100 | 93 | 99 | 100 | 94 | 87 | 0 |
| 7 | dimetenamid-p (9) (864) + imazamox (40) | 100 | 91 | 100 | 100 | 100 | 93 | 97 |
| 8 | dimetenamid-p (1008) + imazamox (10) (48) | 100 | 95 | 100 | 100 | 100 | 93 | 97 |

*Table 6: Efficacy of treatments at the time of third evaluation*

Treatments: a.i. g/ha (1), biological activity (2), S-metolachlor (3), linuron (4), fluorchloridone (5), oxyfluorfen (6), flumioxazin (7), terbuthylazine (8), dimethenamid-p (9), imazamox (10), CHEAL-Chenopodium album, AMBEL-Ambrosia artemisiifolia, AMARE-Amaranthus retroflexus, POLLA-Polygonum lapathifolium, DATST-Datura stramonium, ABUTH-Abutilon theophrasti, XANIT-Xanthium italicum.

Május 14-én, az akkor 4 leveles napraforgóra, 20 mm intenzív csapadék hullott, aminek következtében néhány nap múlva látványos fitotoxikus tüneteket tapasztaltunk az oxifluorfen hatóanyagot tartalmazó kombinációknál. Más kezelésekben károsodásra utaló jelek nem voltak. A június 14-i értékelésnél megállapítottuk, hogy a később fejlődő levelek semmilyen tünetet nem mutattak, de ekkor még ebben a kezelésben a napraforgó állomány átlagosan 15 cm-rel alacsonyabb volt, mint egyéb kezelésekben, a július 24-i értékeléskor azonban már semmilyen szemmel látható különbség nem volt. (2. ábra)

## *KÖVETKEZTETÉSEK*

A napraforgó gyomirtására hét kezelés eredményességét hasonlítottuk össze *Chenopodium album, Ambrosia artemisiifolia, Amaranthus retroflexus, Polygonum lapathifolium, Datura stramonium, Abutilon theophrasti, Xanthium italicum* gyomfajok ellen. A hét kezelés közül kettő tartalmazott posztemergens kijuttatású herbicidet.

A preemergens kezelések szempontjából igen kedvező körülmények adódtak. A talaj állapota optimális volt a hatáskifejtéshez, és megfelelő mennyiségű csapadék hullott a kezeléseket követően. A későbbi száraz időjárás nem kedvezett a gyomok utókelésének, és a napraforgó is egészséges, zárt állományt alkotott, ami tovább javította a herbicidek hatásának az érvényesülését.

A posztemergens kezelések idején a gyomfajok jelentős része meghaladta az optimális 2-4 leveles fejlettségi állapotot, ami nem kedvezett ezek hatáskifejtésének.

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a fehér libatop, szőrös disznóparéj és lapulevelű keserűfű – megfelelő bemosó csapadék esetén – biztonsággal irtható a vizsgálatban alkalmazott preemergens kombinációkkal (2-6. kezelések).

A kedvező körülmények miatt a preemergens kezelések elfogadható vagy jó eredményt adtak olyan gyomfajok ellen is, melyek mélyről kelők, ezért ellenük az ilyen típusú kezelések eredménye kérdéses lehet

(selyemmályva, csattanó maszlag, parlagfű). Bár e fajok esetében több kombináció hatékonysága nem érte el a 90%-ot, jelentős gyérülést és növekedési depressziót okoztak, ami elegendő előnyt biztosított a jól fejlődő napraforgó állománynak a versengésben.

E vizsgálatban is beigazolódott, hogy a szerbtövis fajok ellen nem lehet eredményesen védekezni preemergens kezelésekkel.

A 7. és 8. kezelésekben dimetenamid-p alapkezelést követően imazamox posztemergens kezelést végeztünk. Bár egyes fajoknál az alapkezelés okozott gyérülést, illetve fitotoxikus tüneteket, mindenképpen indokolt volt az állománykezelés. A gyomnövények fejlettsége meghaladta a kezelés számára optimális állapotot. Ilyen körülmények között célszerű az imazamox magasabb dózisát alkalmazni a jobb hatékonyság és hatásbiztonság miatt, ami az igen erős fertőzést adó parlagfű esetében be is igazolódott.

*2. ábra:* **A talajról felverődő herbicid hatása a napraforgóra**

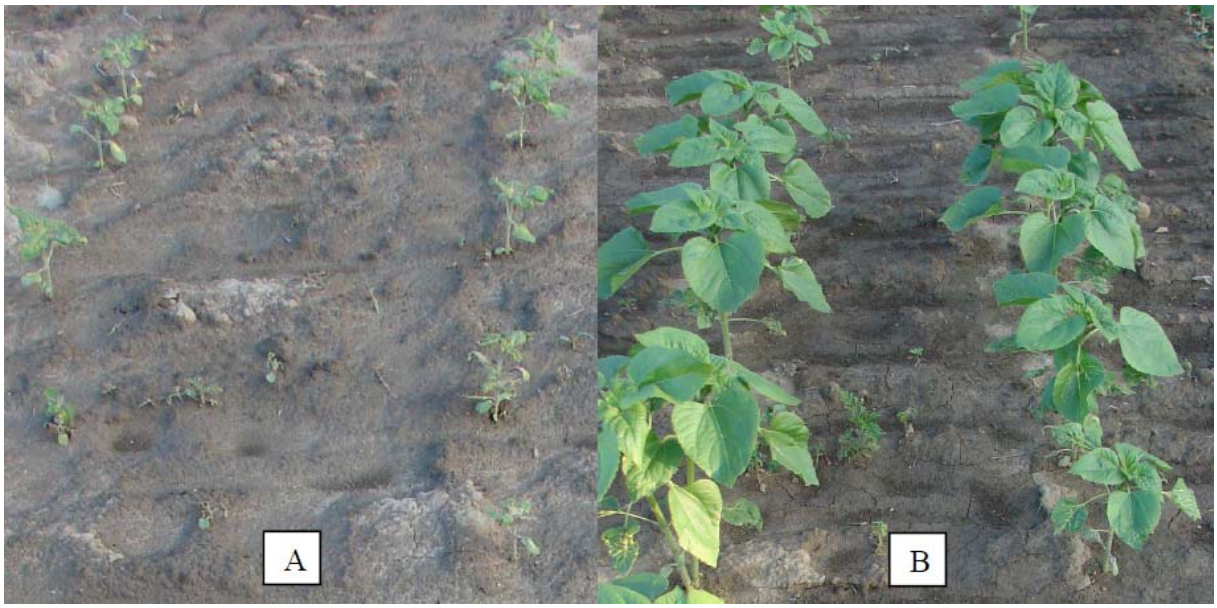



*Figure 2: The phytotoxic effect of herbicides splashed on sunflower leaves*
A – photo taken on 18 May, B – photo taken on 1 June

***IRODALOM***

Dávid I., Sági A., Tarcali G., Radócz L., Kovács I. (2006): Competition of sunflower and maize with several weed species. 4th International Plant Protection Symposium at Debrecen University, Debrecen, 18-19 October, 2006, ed.: Kövics Gy – Dávid I.., DE ATC, Debrecen 2006., Proceedings 176-184.

Dávid I., Kovács I. (2007): Competition of three noxious weeds with row crops. Cereal Research Communications 35. 341-344.

Dávid I. (2011a): A napraforgó gyomirtása. Agrárunió 2011/3,

Dávid I. (2011b): Terjedő gyomnövények Magyarországon – A szerbtövis fajok. Agrárunió 2011/4, 46-47.

Dávid I. (2012a): Terjedő gyomnövények Magyarországon – Parlagfű. Agárunió 2012/4, 38-40.

Dávid I. (2012b): Terjedő gyomnövények Magyarországon – Selyemmályva. Agárunió 2012/5, 42-44.

Hlavács B.-Simon J. (2010): Aktualitások a napraforgó gyomirtásában. Gyakorlati Agrofórum 21/3, 32-34.

Hoffmanné Pathy Zs. (2005): A napraforgó vegyszeres gyomirtása. Növényvédelem 41/7, 334-337.

Novák R., Dancza I., Szentey L., Karamán J. (2011): Az ötödik országos gyomfelvételezés Magyarország szántóföldjein. VM, Budapest, pp. 570

Papp Z. (2011): A napraforgó gyomirtása napjainkban. Gyakorlati Agrofórum Extra (40.), 38-48.

Szabó L. (2010): Napraforgó. In: Vegyszeres gyomirtás és termésszabályozás. Szerkesztette: Kádár A. Kiadja a szerkesztő, 204-214 p.

# Gyógynövény termesztési képzési anyag kis és közepes agrárvállalkozók számára (EU Lifelong Learning program 2010-2012)

# HERBS – training material of herbs for supporting agricultural SME-s

**Kövesd Andrea[1] – Schwikker Zsófia[1] – Szeprethy Tibor[2] – Börzsöny Tünde[3] – Magdalena Bartosova[4] – Jaroslav Havlicek[5] – Manuela Schröder[6]**

[1]Trebag Kft, Nagykovácsi
[2]Corvinus Egyetem, Budapest
[3]VM KASzK Szakképző Iskola - Mezőgazdasági, Erdészeti Szakképző Iskola, Piliscsaba
[4]Slovak Agricultural University in Nitra
[5]Life sciences University of Prague
[6]Ländliche Erwachsenenbildung Prignitz-Havelland e.V.
andrea.kovesd@trebag.hu

***ÖSSZEFOGLALÁS***

*Az Európai Unió Lifelong Learning programja keretében 2010-ben benyújtásra került gyógynövény termesztési szakképzési anyag, amelynek a célcsoportja az agrárszektorban dolgozó vállalkozások és a szakképző intézmények voltak. A projekt az innovációs transzfer kategóriájába tartozik, Németországban kifejlesztett képzési anyagot adaptálja Magyarországra és Csehországra és Szlovákiára. A projekt folyamán 25 gyógynövény termesztési technológiája lett átdolgozva, beleértve a növényvédelmi ismereteket is. A projekt folyamán olyan középfokú tananyag előállítása volt a célunk, amely a mindennapi életben praktikusan használható információforrás a gazdák számára. A képzési törzsanyagot 15 modul alkotja, a további 10 modult az adott partnerek ország specifikus igényeinek figyelembe vételével állítottuk össze. A nyelvenként összeállított tananyag DVD formájában elérhető.*

***SUMMARY***

*The vocational training material on herbal plants cultivation was submitted in the frame of the European Union's Lifelong Learning Program in 2010. The target group of the project was the enterprises and vocational training institutions of the agricultural sector; in the innovation transfer category. The training material developed in Germany, was adapted to the conditions of Hungary, Czech Republic and Slovakia. The complete cultivation technology of 25 herbal plants was revised during the project including knowledge on plant protection as well. The aim of the project was to develop an intermediate training material, which can serve as a practical information source for the farmers interested. The core of the material contains 15 modules, with 10 additional modules, developed according to the specific needs of the partner countries. The training material assembled by language is available in DVD format.*

**Kulcsszavak:** oktatás, életen át tartó tanulás, gyógynövények, növényvédelem
**Keywords:** training, lifelong learning, herbal plants, plant protection

## *BEVEZETÉS*

Az Európai Unió Lifelong Learning programja keretében 2010-ben benyújtásra került gyógynövény termesztési szakképzési anyag, amelynek a célcsoportja az agár szektorban dolgozó vállalkozások és a szakképző intézmények voltak. A pályázatot nemzetközi konzorcium valósította meg, amelynek tagjai 4 országból származtak (Csehország, Szlovákia, Németország és Magyarország). A partnerek között felsőoktatási intézmények (Prágai Élettudományi Egyetem, Szlovák Agrártudományi Egyetem), szakképző intézmények (VM KASzK Szakképző Iskola, Ländliche Erwachsenenbildung Prignitz-Havelland e.V) és a Bács-Kiskun megyei Agárkamara is megtalálható. A projekt koordinátori feladatkört a Trebag Kft látja el.

## *ANYAG ÉS MÓDSZER*

A projekt az innováció transzfer program keretében valósult meg, németországi oktatási anyagot ültettünk Közép-Európai környezetbe. Az eredeti anyagot korszerűsítettük, kiegészítettük és videó felvételekkel bővítettük.
A projekt időtartama 2 éves, 2012. október végén zárul. Az első hat hónapban a résztvevő országok igényfelmérést végeztek a törzsanyag és az oktatási módszer meghatározására.
A törzsanyag a következő részekből áll:
- Gyógynövénytermesztés története
- Termesztő üzemi feldolgozás
- Gyógynövények szárítása, csomagolása
- Illóolaj előállítás
- Gyógynövényi hatóanyagok

Részletesen a következő gyógynövények kerültek kidolgozásra: ánizs, bazsalikom, borsfű, borsmenta, citromfű, édeskömény, fehér mályva, mustár, kakukkfű, koriander, kömény, levendula, maghéj nélküli tök, orvosi kamilla, orvosi zsálya. További 10 modul csak nemzeti szinten hozzáférhető. Német nyelven hozzáférhető: csicsóka, festő buzér, festő csülleng, szudáni fű, vörös acsalapu, cseh nyelven hozzáférhető: konyhakömény, szamóca, szlovák nyelven hozzáférhető: bíbor kasvirág, majoranna, máriatövis.

Minden gyógynövény különálló egységet képez, amely a magába foglalja a kultúrtörténeti bevezetőt, általános ismertetőt, környezeti igényt, előveteményt, talaj-előkészítést, tápanyagellátást szaporítás, ápolás, növényvédelem, termőüzemi feldolgozás és általános minőségi követelmények.

A tananyagban kidolgoztunk minden gyógynövényhez tartozó hálódiagramot is, amely a kritikus termesztési pontok bemutatásán alapul. Az egységes szerkezet kidolgozásakor az egyszerű áttekinthetőségre és könnyű érthetőségre törekedtünk. Növényvédelmi résznél kihangsúlyoztuk a tüneteket (lehetőség szerint képpel illusztrálva), a javasolt védekezési módszereknél igyekeztünk kitérni az agrotechnikai módszerekre, és lehetőség szerint a biológiai módszerekre is.

A képzési törzsanyag általános részeihez video felvételek készültek, amelyeket beépítettünk a mind oktatási anyagba, mind magába a hagyományos képzésbe. A program keretében demo CD elkészült, amely általános információkat ad a projekt célkitűzéseiről, a programról és a partnerekről, kiegészítve egy rövid videóval. A projektet bemutató honlap http://www.herb-education.eu címen elérhető.

## *EREDMÉNYEK*

Az oktatási anyag akkreditálásra került a Bács-Kiskun Megyei Agárkamra által, és PL6598 számú program akkreditációs számot viseli. A projekt eredménye egy 40 órás akkreditált képzési anyag, mely magába foglalja gyógynövényekről szóló tananyagot és egy tanári kézikönyvet is.

## *KÖVETKEZTETÉSEK*

A két éves projekt alatt sikeres és hiánypótló oktatási anyag került kialakításra, mely nemcsak a konzorcium partnerek országaiban váltotta be az várakozásokat, nem több országból érkezett megkeresés a további közös fejlesztések kialakításra.

### *IRODALOM*

Bernáth J. (2000): Gyógy- és aromanövények. Mezőgazda Kiadó, Budapest

Bernáth J., Német É. (2007): Gyógy- és fűszernövények gyűjtése, termesztése és felhasználása.

Glits M., Horváth J., Kuroli G., Petróczi I. (1997): Növényvédelem. Mezőgazda Kiadó, Budapest

Grünwald, J., Janicke, C. (2008): Zöldpatika. Mérték Kiadó, Budapest

Hunyady K., Béres I., Kazinczy G. (2000): Gyomnövények, gyomirtás, gyombiológia. Mezőgazda Kiadó, Budapest

Kloss J. (2010): Gyógyító növények, GABO

Kothe, H.W. (2007): 1000 Gyógynövény. Alexandra Kiadó

Kováts A. (1981): Növénytermesztési praktikum. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest

Lacasa, A., Llorens, J.M. (1998): Los trips y su control biológico II. Ed Pisa, Alicante, 312 pp.

Radnóti J., Romvári V. (1972): Gyógyító növények. Medicina Könyvkiadó, Budapest

Seprős I. (2001): Kártevők elleni védekezés. I-II. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest

Seprős I. (2002): Növényorvosi tanácsok. Szaktudás Kiadó, Budapest

# Integrált növényvédelemi lehetőségek szélesítése a fekete bodzában

# Development of integrated pest management in black elderbarry

**Márton Melinda Ibolya – Tarcali Gábor**
Debreceni Egyetem, Agrár- és gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi- és Környezetgazdálkodási Kar, Növényvédelmi Intézet, Debrecen
tarcali@agr.unideb.hu

***ÖSSZEFOGLALÁS***

*A fekete bodza évezredek óta ismert fontos gyógynövény, és kiváló természetes színező anyag. Magyarországon 1977-ben indult termesztése, és mára közel 3000 ha-on termesztik. A számos károsító által veszélyeztetett növény védelmére nagyon kevés engedélyezett növényvédő szer áll rendelkezésre, mivel a fekete bodza az úgynevezett kis kultúrák közé tartozik. Kísérletünk célja volt olyan növényvédő szerek alkalmazása, amelyek eredményesen használhatók lehetnek a fekete bodza integrált növényvédelmében. Kísérleti területünket három részre osztottuk, egy integrált kísérletre, egy ökológiai kísérletre és egy kezeletlen kontroll területre. A kezelések során összesen 8 növényvédő szert használtunk fel kísérleti engedéllyel, valamint további 4 engedélyezett készítményt alkalmaztunk. A kezelések eredményeit értékeltük, összehasonlítottuk az integrált, az ökológiai és a kontroll kísérlet adatait. Megállapítottuk, hogy az integrált és ökológiai ültetvényben hatékonyak voltak a kezelések, noha meg kell jegyezni, hogy a rendkívül meleg és száraz időjárás miatt nem minden várt károsító lépett fel az ültetvényben. A kezelt területeken a terméseredmények is jobbak voltak. Célunk volt továbbá megállapítani a kísérleti engedéllyel felhasznált peszticidek növényvédő szer hatóanyag-maradék értékeit. Akkreditált laboratóriumban elvégeztettük a növényi minták analízisét, és megállapításra került, hogy minden a kísérlet során felhasznált növényvédő szer hatóanyag-maradéka a megengedett szint alatt volt.*

***SUMMARY***

*Black elderbarry (Sambucus nigra L.) is traditionally used as a medicinal plant, but its excellent natural colouring capacity is also well-known for a long time. Although, this plant is a „small culture" in Hungary, nowadays it is cultivated on almost 3000 ha in our country. Black elderberry is endangered by several different pests and diseases, but plant control is difficult because of the too little licensed pesticides. A field experiments were done on a black elderberry plantation to model a possible integrated pest management technology and on ecological technology. Eight different pesticides with experimental licences and further four licenced pesticides were applied to control the different pests and diseases. The results of the integrated plant control and the ecological control were compared to the untreated control plants. It was verifiable that the integrated and ecological treatments were efficient. Although we have to say that because of the extremely dry and hot weather several pest and diseases of black elderbarry did not occur. In addition residue levels of the used pesticides were analysed at an accredited laboratory. It was detected that the residue levels in the plant samples were below the permissible limit.*

**Kulcsszavak:** fekete bodza, integrált növényvédelem, ökológiai növényvédelem, engedélyezett növényvédő szer, kísérleti engedély, hatóanyag maradék vizsgálat
**Keywords:** black elderbarry, integrated pest management, ecological plant protection, licenced pesticide, experimental licence, residue level analysis

## *BEVEZETÉS*

A fekete bodza *(Sambucus nigra L.)* gyógyhatása, kiváló természetes festő- és színező tulajdonsága már évezredek óta ismert. (Hanspeter, 2004). Utóbbi a magas antociántartalomnak köszönhető, amiért az Egyesült Államokban már az 1890-es évek végén termesztették (Porpáczy, 1987). Európában először csak 1954-ben, Dániában, Magyarországon 1977-ben indították az első termesztési kísérletek (Sípos, 2010; Szeőke, 2006). Mivel a fekete bodza Közép-Európában is őshonos, ezért honosítása nem ütközött különösebb nehézségbe. Az utóbbi években már hazánkban is egyre többen foglalkoznak vele, de a legnagyobb ismerői közé továbbra is az osztrák kutatók tartoznak. Magyarországon legalább a duplája a fekete bodza ültetvények összterülete (Vértes, 2006; Sípos, 2010), de a hektáronként termésmennyisége harmada az osztrák átlagnak, 3 tonna. Magyarországon a Haschberg fajta terjed el, amelyet 1965-ben nemesítettek Ausztriában (Hanspeter, 2004).

Míg a hazai hagyományos bogyós gyümölcsűek termésmennyisége és termőterülete a 90-es évekhez képest legalább harmadával csökkent, addig a fekete bodzáé folyamatosan növekszik (Kosztolányi, 2012). 1999-ben nagymértékű telepítések kezdődtek hazánkban az 50%-os állami támogatásnak köszönhetően (Sípos, 2010). Akkoriban még szinte „csodanövényként" beszéltek róla. Nagy volt az érdeklődés iránta, mivel még kevés ismert kórokozója és kártevője volt észlelhető (Porpáczy, 1997). A kísérletünknek helyet adó egri Márton család is ekkor létesítette az első ültetvényt. Mint minden termesztésbe vont növény, így a fekete bodza is sok növényvédelmi problémával rendelkezik, mivel a nemesítés során nem csak a termés mennyisége, hanem a növények betegségekkel és kórokozókkal szembeni fogékonysága is megnőtt (Schmid és Henggeler, 1989). A

biotikus károkok mellett az abiotikusok is egyre nagyobb arányban fordulnak elő. Szélsőséges években a napégés és felfagyás is jelentős terméskiesést eredményezhet (Szeőke, 2006).

A hazánkban már közel 3000 ha-on termesztett fekete bodza jelenleg az úgynevezett kiskultúrákhoz tartozik. Kevés engedélyeztetett növényvédő szer áll a termesztők rendelkezésére, ezért növényvédelme -különösen a csapadékos években- nehezen oldható meg. Leggyakoribb és legismertebb kártevői a gyakran kolóniát alkotó levéltetvek, de az atkák is szinte minden ültetvényen előfordulnak (Mezey, 2006). Míg baktériumos betegségekről keveset, addig a gombás betegségekről már sokkal többet tudunk. A cerkospórás, fillosztiktás, fómás, aszkohitás, szürkepenészes betegség és az ágelhalás tartozik a leggyakoribb gombás fertőzések közé (Szeőke, 2006).

Az integrált növényvédelem összehangolja a növényvédelmi módszereket, melynek célja a minél kisebb mértékű a környezetterhelés mellett, hogy csak indokolt esetben alkalmazzon növényvédő szert. (Szabó, 2004)Ehhez nagyon fontos például a fentebb említett levéltetvek betelepülési időpontjának ismerete, erre legelterjedtebb a sárga tálas módszer és a sárga ragacslap (Jenser, 2003). Míg az integrált termesztés fontos eleme a növényvédelem, addig az ökológiai termesztésben szerényebbek a lehetőségek, például utóbbinál valamennyi szintetikus tápanyagforma alkalmazása tilos (Holb, 2005). A kísérletnek helyet adó ültetvényben a pályázati előírásoknak megfelelően, a biológiai védekezés fontos elemeként kihelyeztek 36 madárodút, melyek az ellenőrzések alapján hasznosnak bizonyultak. Nem csak madarak, hanem pelék is birtokba vették. Ezek olyan hasznos szervezetek, melyek viselkedésükkel vagy táplálkozásmódjukkal a kultúrnövényeket károsító más élőlények tömeges fellépését akadályozzák meg. A sorközöket az 1980-as évek végéig a termő ültetvényekben is rendszeresen „feketeugaros" művelésben részesítették, kísérleti ültetvényünkben is így volt ez 2010 őszéig. Ez több szempontból is hátrányos. Károsítja a gyökereket, rombolja a talaj szerkezetét, és rontja a talaj felső rétegének víz- és tápanyag-gazdálkodását (Szalay, 2009), mint ahogy ezt sajnos tapasztalták is.

Jelen kísérletünk céljaiként a következőket határoztuk meg:

- Integrált növényvédelmi technológia kidolgozása a fekete bodzában is feltételezhetően hatékony, kísérleti engedélyt kapott fekete bodzában új növényvédő szerek alkalmazásával.
- Az integrált ültetvényen regisztrált eredmények összehasonlítása az ökológiai kísérleti terület és a kezeletlen kontroll terület adataival.
- Hatóanyag-maradék vizsgálat a kísérleti engedéllyel alkalmazott növényvédő szerek esetében.
- Javaslat kidolgozása a kísérletben felhasznált növényvédő szerek engedélyeztetési lehetőségének megvizsgálására fekete bodzában.

## *ANYAG ÉS MÓDSZER*

### A terület bemutatása

A kísérletet Egerszalók (Heves megye) külterületén lett beállítva Márton Miklós 4 ha-os családi ültetvényében. A terület 2-3%-os lejtésű, talajtípusa agyagbemosódásos barna erdőtalaj, fizikai talajfélesége vályog-agyag. A fák több mint 10 évesek, állapotuk az elmúlt évek szélsőséges időjárásának köszönhetően közepesnek mondható. Jelenleg minden második sorközt kaszálnak, és lucernával vetnek be. A fák alatt évekig csak kaszáltak, de az idei száraz év hatására egy részén áttértek a vegyszeres gyomirtásra. A sorközök gyomszabályozását évekig tárcsával oldották meg, de 2011-től áttértek a kultivátorra, mivel a sokévi tárcsázással kialakulhatott a tárcsa-talpréteg, és ez is hozzájárulhatott a 2010 évi nagymértékű fapusztuláshoz. A tápanyag utánpótlást a területen nem csak a trágyázás jelenti, a metszés után összegyűjtött ágakat szárzúzóval összezúzzák, és visszaforgatják a talajba.

### A kísérlet módszere és a felhasznált növényvédő szerek

A kísérletben célunk volt egy integrált növényvédelmű, egy ökológiai kezelésű és egy kontroll terület kijelölése, és ezek növényvédelmének biztosítása a termesztési célnak megfelelő anyagokkal és egyéb lehetőségekkel. A kísérlet részére az ültetvényben három 6x7 fából álló területet került kijelölésre. A megfelelő kísérleti engedélyek birtokában az egyik területen integrált, a másikon ökológiai kezelést végeztünk, a harmadik pedig a kontroll terület lett. A területen korábban jelentős kezelést nem végeztek, csupán szükség esetén, ha a károsítás mértéke elérte a küszöbértéket. Az elmúlt évek tapasztalatai alapján a legjelentősebb károsítók ellen kiválasztottuk az egyéb hasonló kultúrákban hatékonynak mondható szereket, és a károsítás várható időpontjában elvégeztük a növényvédő szeres kezeléseket az integrált kísérleti területen. Az ökológiai területen az ökológiai gazdálkodásban engedélyezett peszticideket alkalmaztunk. A kontroll területen semmilyen kémiai beavatkozás nem történt. A kísérletben felhasznált növényvédő szeres kezelések részleteit ismertetjük az 1. táblázatban. A kísérleti céllal alkalmazott növényvédő szereket a 04.2/3233-2/2012. számú kísérleti engedély birtokában alkalmaztuk jogszerűen, az engedélyben meghatározott módon.

*1. táblázat*

**A növényvédő szeres kezelések és azok időpontjai**

| A kezelés időpontja | Integrált növényvédelmi kísérlet | Ökológiai kísérlet |
|---|---|---|
| 04.11. | MERPAN 80 WDG<br>ORTUS 5 SC – 0,8 l/ha | |
| 05.30 | MERPAN 80 WDG – 2 kg/ha<br>CALYPSO 480 SC – 0,2 l/ha | CHAMPION 50 WP – 3 kg/ha<br>BIOLA AGRO – 2 % |
| 07.18. | QUADRIS MAX – 2 l/ha<br>ACTARA 25 WG – 30 g/100 l víz | KÉN (THIOVIT JET ) 4 kg/ha<br>KÁLISZAPPAN |
| 08.07. | TELDOR 500 SC – 1 l/ha<br>STEWARD 30 DF – 150 g/ha | CUPROXAT FW – 4 l/ha<br>DIPEL ES – 1,5 l/ha |

**A kísérlet eredményeinek értékelése.**

***Termésmennyiség vizsgálat és összehasonlítás:***

Ehhez mindhárom kísérleti területen kijelöltünk 10-10 fát. Mindhárom területen megmértük a termés súlyát, majd összehasonlítottuk a kapott eredményeket.

***A fertőzöttségi adatok értékelése:***

A kísérlet tervezésénél a valószínűsíthetően fellépő károsítókat vettük figyelembe, és az eredmények értékelésénél ezekre helyeztük a hangsúlyt.

A várható állati kártevők: levéltetvek (*Aphis spp*.), bodza-levélatka (*Epitrimerus trilobus*), kétfoltos takácsatka (*Tetranychus urticae*), amerikai fehér medvelepke (*Hyphantria cunea*) voltak. A levéltetvek, levélatkák eddig minden évben, az amerikai fehér medvelepke viszont csak 3-4 évente jelent meg. Utóbbinak a 2011-es évben súlyos volt a kártétele, ezért minden második nap bejártuk az ültetvényt és eltávolítottuk a fészkeket. A levéltetvek előrejelzésére színcsapdát, az amerikai fehér medvelepkére pedig feromoncsapdát helyeztünk ki. A levéltetvek károsítását a Banks-skála segítségével értékeltük.

A várható gombás betegségek: cerkospórás levélfoltosság (*Cercospora depazeoides*), fómás levélfoltosság (*Phoma sp.*), szürkepenészes rothadás (*Botrytis cinerea*). A cerkospórás levélfoltosságot évekig csekély mértékben detektáltunk, de az utóbbi időben komolyabban számolni kellett vele. A fertőzöttség értékelése vizuálisan történt a betegség jól látható tünetei alapján. A cerkospóra tünetei a leveleken megjelenő maximum 6 mm nagyságú foltok, amelyek néha szabálytalan alakúak, fehéres szürkék, sötétebb peremmel. A foltokon a levél mindkét oldalán a gomba barnás konídium telepei láthatók. A konídiumok mikroszkóp alatt megnyúlt, tű alakúak. A foltok pergamenszerűen beszáradnak, töredezhetnek, súlyos fertőzéskor a levelek lehullnak. 2009-ben és 2010-ben figyeltük meg először az ültetvény szélén, mindössze három fán, tavaly viszont már közel 50 fára terjedt át, idén pedig már az ültetvény felén mutatkozott. A fertőzés nálunk a 2011-es évig csak néhány fán okozott nagyobb mértékű lombvesztést, de egyes gazdálkodóknál már évekkel ezelőtt megjelent, és súly kárt okozott, ezért ők minden évben elvégzik a szükséges megelőző kezeléseket. Fómás levélfoltosság eddig egy évben, kisebb mértékben, foltszerűen, míg szürkepenészes rothadás 2 évben fordult elő, utóbbi több tonnás termésveszteséget okozott. A szürkepenész ellen akkor védekezni már nem tudtunk, megjelenése akkoriban váratlanul érte a termelőket, terméséréskor már nincs lehetőség kezelésre. A fómás levélfoltosság és a szürkepenészes rothadás vizuálisan észlelhető tüneteinek bemutatását jelen leírásban nem látjuk indokoltnak, mivel a kísérletünk évében ezek a betegségek értékelhető mértékben nem jelentkeztek.

***Hatóanyag-maradék vizsgálat:***

A kísérleti terület az AKG integrált gyümölcstermesztési programban részt vesz, az általunk kiválasztott növényvédő szerek mindegyike engedélyezett benne. Az ökológiai parcellában alkalmazott szerek pedig használhatóak a Biokontroll Hungária Nonprofit Kft. besorolása alapján ökológiai termesztésben. A kezelések után hatóanyag-maradék vizsgálatot kértünk, amit a NÉBIH Szolnoki Növényvédőszermaradék-analitikai Laboratóriumban végeztettünk el. A vizsgálat az alábbi hatóanyagok maradékának kimutatását tűzte ki célul:

- az integrált kezelésben felhasznált hatóanyagokból:
  - kaptán,
  - azoxistrobin,
  - indoxakarb,
  - fenhexamid,
  - tiametoxam
- az ökológiai kezelésben alkalmazott hatóanyagokból:
  tribázikus rézszulfát

## EREDMÉNYEK

A kísérleti tervünkben meghatározott kezeléseket az 1. táblázatban megjelölt időpontokban elvégeztük. A kísérleti parcellákon folyamatosan figyelemmel kísértük és vártuk a főbb károsítók esetleges megjelenését, károsításuk fellépése esetén annak mértékét.

Amerikai fehér medvelepke idén nem jelentkezett, annak ellenére, hogy az elmúlt években jelentős kárt okozott. A levéltetvek szintén jóval alacsonyabb mértékben károsítottak az elmúlt néhány évhez viszonyítva, a

ragacslap nem mutatott értékelhető eredményt. Összességében az ültetvény 5%-án figyeltük meg jelenlétüket. Az értékelésnél a Banks-skálát alkalmaztuk. Az integrált kezelésben alig mutatkoztak, mindössze 2 fán, nagyon kis mértékben, míg az ökológiaiban 1 fán, de ott már erősebb fertőzést tapasztaltunk. Atkakártételt a kezelt területen nem észleltünk, a kontroll területen és az ültetvényben viszont igen.

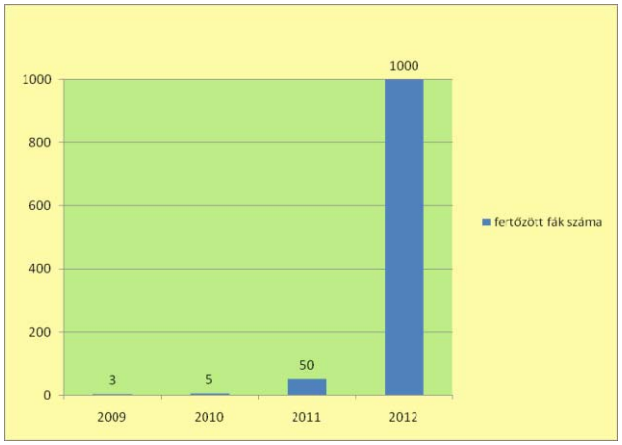
A várt gombás betegségeket a száraz nyár következtében szintén sokkal kisebb mértékben észleltük. Fómás levélbetegség sehol sem jelentkezett, és a szürkepenészes rothadás sem lépett fel értékelhető mértékben. A szürkepenész elmaradása részben a száraz évnek, részben pedig a relatív gyümölcshiánynak is lehet a következménye. Ebben az évben a fokozott kereslet hatására országszerte féléretten lelopták a bodza jelentős részét, a kísérletünknek helyet adó ültetvényben is, ezért a gazdálkodók rákényszerültek az idő előtti, a még nem teljes érett termés betakarítására.

Ezzel szemben viszont a cerkospórás levélfoltosság az eddigi évekhez képest sokkal jelentősebb fertőzést mutatott. Összességében elmondható, hogy az idei rendkívül meleg és száraz nyár jelentősen befolyásolta a károsítók megjelenését is. A kezelések után megmértük a termésmennyiségeket, és összehasonlítottuk a különböző kezelések mért adatait. A kísérlet utolsó lépéseként pedig elvégeztettük a hatóanyag-maradék vizsgálatot.

**A cerkospórás fertőzöttség értékelése**

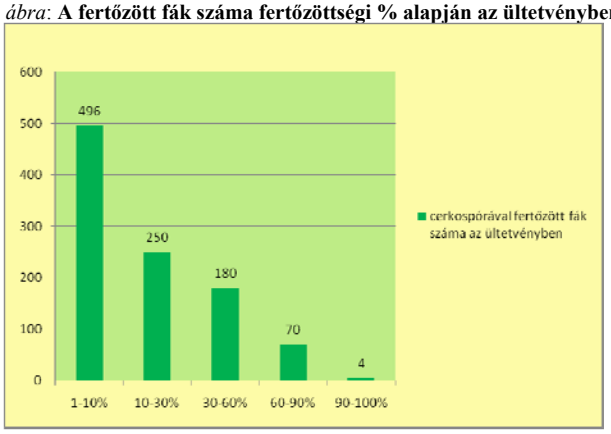
A fertőzés évről évre egyre erőteljesebb az ültetvényben. Fentebb említettük, hogy ez a levélbetegség 2009-ben jelent meg, azóta minden évben egyre több fán észleltük. A fertőzött fákat megszámoltuk (*1. ábra*). A teljes ültetvényben idén közel 1000 fán figyeltük meg a betegséget, ami az ültetvény felét jelenti.

*1. ábra:* **A cerkospóra terjedése az ültetvényben**



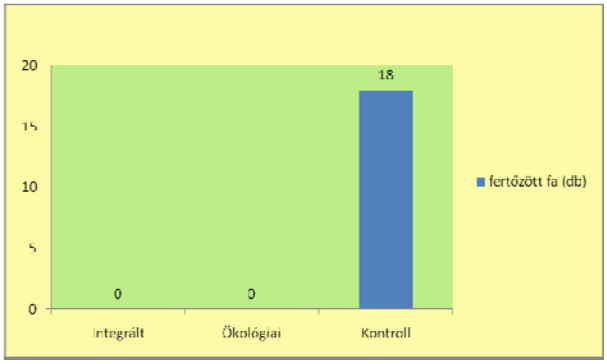

Vizuális becslés alapján megállapítottuk a fertőzött fák fertőzöttségi %-át is (*2. ábra*). Hozzávetőlegesen a fertőzött fák felén kismértékű volt a fertőzöttség, 70 fa esetében viszont már súlyosnak mondható, sőt 4 fán szinte teljes lombvesztést okozó fertőzés lépett fel, ezért jövőre mindenképpen szükséges lesz a teljes körű védekezés.

*2. ábra*: **A fertőzött fák száma fertőzöttségi % alapján az ültetvényben**



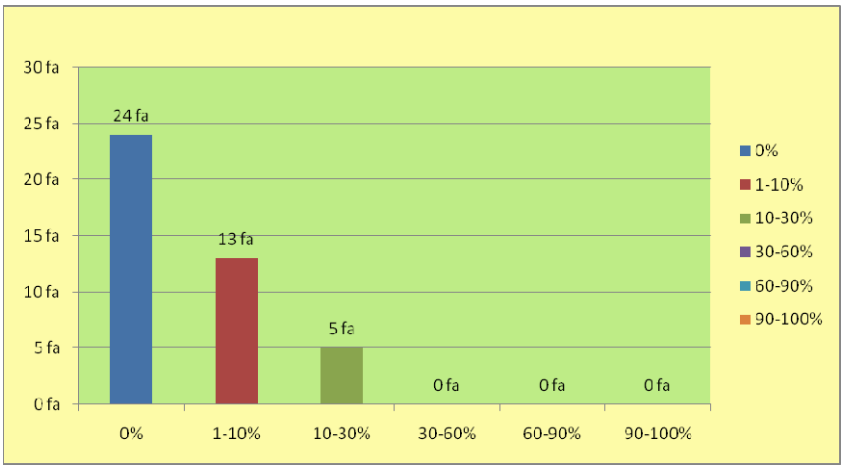

A kezelt területeken nem tapasztaltunk cerkospóra fertőzést, viszont a kontroll területen igen (*3. ábra*). Itt is megszámoltuk a fertőzött fákat. 18 fán tapasztaltunk különböző mértékű fertőzöttséget.

*3. ábra:* **Cerkospóra fertőzöttség a kísérleti területeken**




Ezután vizuálisan felmértük a kontroll terület fái fertőzöttségének mértékét (*4. ábra*). A fák több mint felén, 42-ből 24-en nem észleltünk fertőzést, 18 fán viszont jól láthatóan megjelent a betegség. A fertőzöttség a fák többségén meglehetősen alacsony volt.

*4. ábra:* **Cerkospóra fertőzöttség a kontroll területen fertőzöttségi % alapján**




Mivel a kezelt területeken (sem az integrált kezelésben, sem az ökológiai kezelésben) egyáltalán nem jelent meg a cerkospórás betegség, az alkalmazott gombaölő szeres permetezések eredményesnek nyilváníthatók.

## A termésmennyiség értékelése

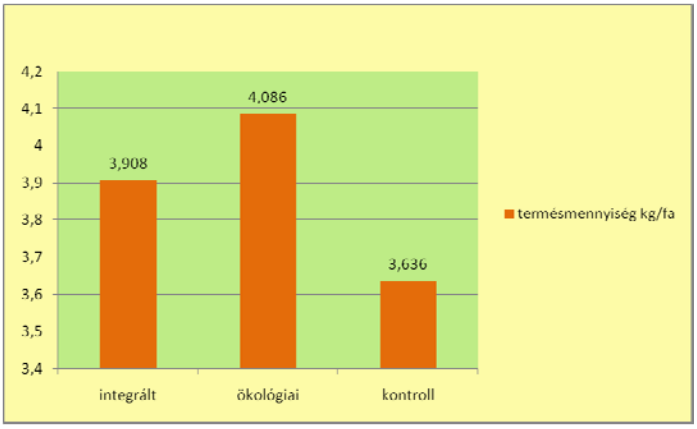
Mindhárom kísérleti területen megmértük a kiválasztott 10 fa termésének súlyát (*2. táblázat*), majd átlagoltuk az eredményt (*5. ábra*).

*2. táblázat*

**A kísérleti területek termésmennyiségi adatai (kg/fa)**

| Fák | Integrált kezelés | Ökológiai kezelés | Kontroll terület |
|---|---|---|---|
| **1** | 3,54 | 3,92 | 3,75 |
| **2** | 3,92 | 4,28 | 3,39 |
| **3** | 3,67 | 4,07 | 3,78 |
| **4** | 4,21 | 3,92 | 4,08 |
| **5** | 4,04 | 4,27 | 3,52 |
| **6** | 3,75 | 4,03 | 3,54 |
| **7** | 3,80 | 4,17 | 3,37 |
| **8** | 3,95 | 3,7 | 3,69 |
| **9** | 4,07 | 4,34 | 3,73 |
| **10** | 4,13 | 4,16 | 3,51 |
| **Átlag termés/fa** | **3,908** | **4,086** | **3,636** |

*5. ábra:* **A kísérleti területek termésmennyiségének átlaga (kg/fa)**




A kezelt területeken magasabb lett a termésátlag, mint a kezeletlen területen. Az integrálton 3,9 kg, az ökológiain 4,1 kg, a kontroll területen 3,6 kg termést adott le egy fa átlagosan. Azonban ezek az eredmények az ültetvény eddigi eredményeitől messze elmarad. Ennek oka feltételezhetően a kedvezőtlen időjárásnak, a hosszan tartó aszálynak és a magas hőmérsékletnek tudható be.

**A hatóanyag-maradék vizsgálat eredménye**

A következő táblázatban mutatja a hatóanyag-maradék vizsgálatok eredményeit az integrált ültetvényben használt növényvédő szerek esetében (*3. táblázat*). A szermaradék vizsgálat 2012. augusztus 22-én volt, és minden esetben a határértéken belül voltak az értékek.

*3. táblázat*

**Hatóanyag-maradék vizsgálat eredménye (integrált ültetvény)**

| Szer | Hatóanyag | Szermaradék tartalom | Határérték |
|---|---|---|---|
| Quadris Max | azoxistrobin | 0,047 mg/kg | 5 mg/kg |
| Teldor | fenhexamid | 1,5 mg/kg | 5 mg/kg |
| Merpan<br>Quadris Max | kaptán | 0,018 mg/kg | 0,02 mg/kg |
| Actara | tiametoxám | 0,040 mg/kg | 0,05 mg/kg |

Az ökológiai ültetvényen a tribázikus-rézszulfát hatóanyag-maradékát vizsgáltuk (*4. táblázat*).

*4. táblázat*

**Tribázikus-rézszulfát hatóanyag-maradék vizsgálat eredménye az ökológiai területen**

| | ökológiai | kontroll |
|---|---|---|
| **Cu** | 2,02 mg/kg | 1,41 mg/kg |

Az élelmezés-egészségügyi várakozási idő szintén döntő lehet egy szer alkalmazásakor. Ezért kikerestem a felhasznált hatóanyagok élelmezés-egészségügyi várakozási idejét néhány bogyósgyümölcsnél (*5. táblázat*). Az utolsó kezelést augusztus 7-én végeztük fenhexamid hatóanyaggal. Az erre vonatkozó várakozási idő a málna esetében a leghosszabb, 7 nap. Mi 15 nap múlva végeztettük el a hatóanyag-maradék vizsgálatot. A *3. táblázatban* jól látható, hogy a szermaradék jóval alacsonyabb volt a megengedettnél.

*5. táblázat*

**Az élelmezés-egészségügyi várakozási idő néhány bogyósgyümölcs esetében**

| | málna | ribiszke, köszméte | szamóca |
|---|---|---|---|
| **azoxistrobin** | 7 nap | 7 nap | 3 nap |
| **fenhexamid** | 7 nap | | 3 nap |
| **kaptán** | 10 nap | | 10 nap |
| **tiametoxám** | - | - | - |

## *KÖVETKEZTETÉSEK*

2012-es évben a károsítók a megszokottól kisebb mértékben léptek fel, ezt az kísérleti ültetvényben is tapasztaltuk. Bár nem kaptuk minden esetben a várt eredményt, ennek ellenére több értékelhető eredményt említhetünk. Az integrált kezelésű területen és az ökológiai kezelésű területen is lényegesen alacsonyabb volt az értékelhető betegség (cerkospórás levélfoltosság) fertőzöttségének mértéke, mint a kontroll területen, valamint az ültevényben, illetve a terméseredmény is magasabb volt a kezelt területeken. A kezelt kísérleti parcellákon nem csak egészségesebb volt a termés, de a minősége, külleme is kedvezőbbnek mutatkozott, ami a piacon versenyképesebbé teszi az ilyen termést. A hatóanyag-maradék értékek minden esetben a határértéken belül maradtak. Mindezek azt mutatják, hogy a kísérletben felhasznált növényvédő szerek hatékonyan és biztonságosan alkalmazhatók lehetnek a fekete bodza integrált szemléletű növényvédelmében. Az eredmények figyelemfelkeltőek lehetnek, azon illetékesek felé is, akik kezdeményezhetik a fekete bodza jelenleg igen szűk körű engedélyezetten felhasználható növényvédő szer palettájának bővítését.

## *KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS*

Megköszönjük az egri Márton Miklós család segítségét, akik fekete bodza ültetvényüket kísérletünk elvégzésére rendelkezésünkre bocsátották.

A növényvédő szer hatóanyag-maradék vizsgálatot a Magyar Növényvédő Mérnöki- és Növényorvosi Kamara Hajdú-Bihar Megyei Területi Szervezetének támogatásával végeztük el, amiért szintén köszönetünket fejezzük ki.

### *IRODALOM*

Hemgesberg H. (2004): A Bodza mint természetes gyógyszer. M-érték Kiadó, Budapest, 19-21.,34-39.

Holb I. (2005): A gyümölcsösök és a szőlő növényvédelme. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 11-13.

Jenser G. (2003): Integrált növényvédelem a kártevők ellen. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 18.

Kosztolányi A. (2012): Bogyósgyümölcsűek termesztése – Van –e fény az alagút végén?. Agrofórum extra 43. (1): 44-45.

Mezey Á.-Mezey G. (2006): A fekete bodza *(Sambucus nigra L.)* kártevőinek vizsgálata 2001-2003-ban Vácott. Növényvédelem 42 (5): 259-263.

Schmid O.-Henggeler S. (1989): Szelíd növényvédelem. Ökoszervíz Kiadó, 11-15.

Porpáczy A. (1987): Ribiszke, áfonya, bodza, fekete berkenye. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 279-284.

Porpáczy A. (1997): A festőbodza termesztése. Növényvédelmi tanácsok, 6 (11):19-20.

Sípos B. (2010): A fekete bodza termesztése. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 20-21.

Szalay L. (2009): Az integrált gyümölcstermesztés elvei (5). Agrofórum (8): 78-79.

Szeőke K.-Nagy K. (2006): A termesztett bodza *(Sambucus nigra L.)* növényvédelme. Növényvédelem, 42 (5): 265-280.

Szabó T. (2004): Az integrált növényvédelem. Mezőhír, 8 (2):56-57.

Vértes T. (2006): A bodza növényvédelme Ausztriában. Növényvédelem 42 (5): 282-283.

# Hazai búzafajták *Rhizoctonia* fogékonyságának összehasonlító vizsgálata

# Comparative study of susceptibility of Hungarian wheat varieties to *Rhizoctonia* strains

**Oros Gyula[1] – Naár Zoltán[2] – Magyar Donát[3]**

[1]MTA ATK Növényvédelmi Intézet, 1022 Budapest, Herman Ottó út 15.

[2]Eger Innovations Nonprofit Kft., 3300 Eger, Leányka u. 6.

[3]Országos Környezet-egészségügyi Intézet, 1097 Budapest, Gyáli út 2–6.

naarzoltan@t-online.hu

***ÖSSZEFOGLALÁS***

*Magyarországon köztermesztésbe vont 19 búzafajta közül az Emese, a Palotás és a Petrence bizonyult a legellenállóbbnak talajeredetű rizoktónia fertőzéssel szemben. A leggyakoribb, rendszerint a csíranövény pusztulásához vezető tünet a gyökérnyaknekrózis volt. A fertőzést túlélő egyedek fejlődése az adott fajta fogékonyságának függvényében a rizoktónia fertőzött talajban visszamaradt. A magyar nemesítésű fajták jól tolerálták az AG-8 és AG-10* R. solani *törzseket.*

*A vizsgált 26 rizoktónia törzs patogenitása és taxonómiai helyzete illetve eredete között nem találtunk összefüggést. Az* Athelia*,* Ceratobasidium*, a* Ceratorhiza *és a* Waitea *törzsek a* Thanatephorus *anamorfákhoz hasonlóan – szelektíven – fertőzték, illetve betegítették meg a búzafajtákat. A tüneti kép alapján nem lehetett elkülöníteni e kórokozókat.*

***SUMMARY***

*Among 19 wheat varieties cultivated in Hungary varieties Emese, Palotás and Petrence proved to be most tolerant to soilborne* Rhizoctonia *infection. The most frequent symptom, usually leading to dumping off was the root neck necrose. The inhibition of development of survivors in* Rhizoctonia *infested soil correlated with overall susceptibility of variety concerned. The varieties of Hungarian selection well tolerated the strains of* R. solani *AG-8 and AG-10.*

*No relationships were revealed between pathogenicity of 26* Rhizoctonia *strains studied and their axonomic position of origin. The anamorph of* Athelia*,* Ceratobasidium*,* Ceratorhiza *and* Waitea *similarly to* Thanatephorus *anamorphs selectively infected the wheat varieties, and the syndromatic pictures were undistinguishable with unarmed eye.*

**Kulcsszavak:** búza, *Rhizoctonia*, *Athelia*, *Ceratobasidium*, *Ceratorhiza*, *Thanatephorus*, *Waitea,* fogékonyság

**Keywords:** búza, *Rhizoctonia*, *Athelia*, *Ceratobasidium*, *Ceratorhiza*, *Thanatephorus*, *Waitea,* susceptibility

## *BEVEZETÉS*

Tíz évvel ezelőtt jelent meg a Kárpát-medencében a *Rhizoctonia zeae* Voorhees 1938 (teleomorph: *Waitea circinata* Warcup & P.H.B. Talbot 1962; Basidiomycota, Cantharellales) és az elsődleges vizsgálatok szerint patogenitása kifejezettebb volt az egyszikű fajok iránt, mint a társaságában előforduló *Rhizoctonia solani* Kühn (teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk; Basidiomycota, Cantharellales) törzsé, mely a kétszikűeket részesítette előnyben (Vajna és Oros, 2004; 2005a, 2005b). A *Rhizoctonia* fajok jól ismert csírakori kártevők, és emellett a gazdanövény bármely részét képesek megfertőzni. Az elmúlt két évtizedben ugrásszerűen megnövekedett a velük foglalkozó közlemények száma, aminek fő oka a rizoktóniák okozta termésveszteségek növekedése (Oros, 2005; Unal és Dolar, 2012). Ausztráliában a nyolcvanas évek végén került előtérbe a talaj eredetű rizoktónia fertőzés okozta kártétel, ami az ezredfordulón már jelentős (30-50 %) termésveszteséget okozott a búzatermesztő övezetben, hasonlóképpen Kínában is előtérbe került az őszibúzában (Chen *et al*., 2008; Hamada és Ma, 2011; Guo *et al.*, 2012). Európában és Észak Amerikában a *R. cerealis* mellett főképpen a *R. solani* AG-8 törzse károsít (Hamada, 2011), míg Törökországban öt különböző *R. solani* anasztomózis csoportot különítettek el (Demirci, 1998; Tunali *et al.*, 2008). A *R. cerealis* kártételét búzában először Kövics és Lőrincz (2001) igazolta a Nagy-Alföld keleti részén.

A rizoktóniák obligát aerob gombák. Az új művelési eljárások közül a mélyszántás elhagyása kedvez fennmaradásuknak, mivel a talaj felső rétegében képezett micéliumhálózatuk így nem sérül meg (Roget *et al.*, 1996; Paulitz et el., 2002). További kedvező feltételeket teremt a vetés előtt alkalmazott széles hatásspektrumú gyomirtó szerek – például glifozát – alkalmazása, melynek következtében a vegetáló gyomflóra pusztulása miatt jelentős mennyiségű lebontható növényi maradvány jut a talajba (Smiley és Wilkins, 1992; Baley *et al.*, 2008; Paulitz *et al.*, 2010). Jelenleg hatékony védekezési módszernek a megfelelő vetésforgót és a rezisztencia nemesítést tekinthetjük. Számos próbálkozás történt ugyan, pl. biológiai és vegyszeres védekezési eljárások, szuppresszív talaj kialakítása azonban a kártétel megelőzése érdekében végzett eddigi fejlesztések nem hoztak kielégítő eredményt (Lewis *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 2002; Barnet *et al.*, 2006; Wakelin *et al.*, 2006; Mavrodi *et al.*, 2012a, b).

Hazai gabonatermesztők kevés figyelmet fordítanak a rizoktónák kártételére, ezért szükségesnek véltük a hazai búzafajták rizoktónia fogékonyságának alaposabb vizsgálatát, különös tekintettel a *R. zeae* törzzsel szembeni viselkedésükre. Emellett meg kívántuk határozni a hatóanyag illetve betegségellenállóság

vizsgálatokhoz minimálisan szükséges esetszámot (rizoktónia törzs/búzafajta párokat illetően), mivel az irodalmi források kritkai elemzéséből arra következtettünk, hogy az ott leírt módszerek nem alkalmasak sorozatvizsgálatokra.

## *ANYAG ÉS MÓDSZER*

**Búzafajták:** A vizsgált búzafajtákat a Magvas, a Palotás és az R-23 kivételével az Elitmag Kft. (Martonvásár) bocsátotta rendelkezésre.

*Triticum aestivum* L. Karizma, Kikelet, Lona, R-23 fajták, Pannon Standard fajtacsoport (Toborzó, Bodri, Emese, Petrence, Lucilla, Magvas), Pannon Prémium fajtacsoport (Palotás, Menüett, Toldi, Suba, Ködmön, Kolo, Mazurka); *T. monococcum* L.: Alkor; *T. turgidum* L.: Hegyes.

***Rhizoctonia* törzsek:** különböző helyekről és gazdanövényekről izolált saját törzsek mellett külföldi gyűjteményből származókat is bevontunk a vizsgálatokba; *R. zeae* Voorhees – B-405 (*Festuca* és *Lolium* vegyespázsitból), *R. solani* Kühn (saját izolátumok) – hazai eredetűek: B-410 és B-411 (*Solanum tuberosum* L., Desirée és Kisvárdai rózsa), B-413 (*Malus domestica* L.), B–433 (*Festuca* és *Lolium* vegyespázsitból), B-521 (*Impatiens balsamina* L); külföldi eredetűek: B-245 (*Allium cepa* L., Kína, Henan), B-409 (*Hibiscus rosa-chinensis* L., Libia, Tripoli). *R. solani* Kühn (külföldi törzsgyűjteményben deponált törzsek) – AG-1 (B-415, CBS 522.96, *Pinus sylvestris* L., Kanada), AG-2 (B-432, *Daucus carota* L., Hollandia), AG-3 (B-446, CBS 117248, burgonya, Spanyolország), AG-4 (B-417, CBS 341.35, *Citrus* sp., Argentina), AG-4 (B-430, CBS 340.51, *Phaseolus* sp., Anglia), AG-5 (B-418, CBS 339.84, *Zeae mays* L., Hollandia), AG-6 (B-419, CBS 137.82, *Erigeron canadensis* (L.) Cronquist), AG-7 (B-420, CBS 214.84, talaj, Japán), AG-8 (B-421, CBS 101782, *Triticum aestivum* L., Ausztrália), AG-9 (B-422, CBS 970.96, *S.tuberosum* L., USA), AG-10 (B-423, CBS 971.96, *T. aestivum* L., USA), AG-11 (B-424, CBS 974.96, *Lupinus angustifolus* L., Ausztrália), AG-E (B-434, CBS 340.84, *Malus sp*., Hollandia). *R. cerealis* E.P. Hoeven 1977 (teleomorph: *Ceratobasidium cereale* D.I. Murray & Burpee 1984 Basidiomycota, Cantharellales) (B447, CBS 559.77, *T. aestivum* L., Németország), *R. fragariae* S. Husain & W.E. McKeen 1963 (teleomorph: *Ceratorhiza fragariae* (S.S. Husain & W.E. McKeen) R.T. Moore 1987) (B-438, CBS 335.62, *Fragaria* × *ananassa* Duchense, Kanada), *R. stahlii* Burgeff 1936 (teleomorph: *Mycelium radicis Platantherae chloranthae* (Custer) Rchb.), *Thanatephorus* Donk *sp*., Basidiomycota, Cantharellales) (B-441, CBS 119.92, *P. chlorantha* (Custer) Rchb.), Asparagales, Orchidaceae, Németország), *R. ramicola* W.A. Weber & D.A. Roberts (teleomorph: *Ceratorhiza ramicola* (W.A. Weber & D.A. Roberts) R.T. Moore 1987, Basidiomycota, Cantharellales) (B-427, CBS 400.51, *Pittosporum tobira* (Thunb.) W. T. Aiton, Asparagales, Orchidaceae, Florida, USA), *Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu & Kimbr. 1978 (Basidiomycota, Atheliales) (B-442, CBS 464.48, *S. tuberosum* L., Olaszország).

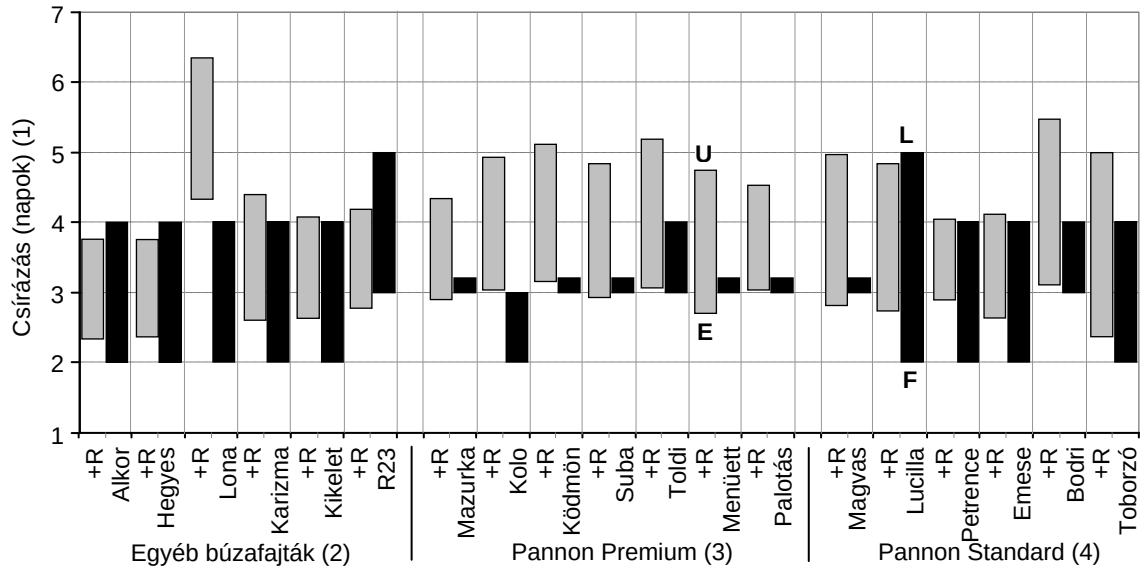
**Patogenitás vizsgálata:** Az előzetesen rizoktónával átszövetett talaj felszínére négyzethálósan (1×1 cm) helyezett búzamagvakat 5 mm vastagon sterilizált talajréteggel lefedtük, majd naponta értékeltük a csírázás menetét, illetve a növények állapotát. A tünetmentes egyedek gyökérmetszeteiben mikroszkóppal megvizsgáltuk a rizoktónia jelenlétét. A módszert korábban részletesen ismertettük a *Növényvédelem*ben (Vajna és Oros, 2005). A vetést követő nyolcadik napon lemértük a növények magasságát, megmértük tömegüket, és értékeltük kórtani állapotukat. Az egyes fajták rizoktónia ellenállóságának értékelésére hatfokú skálát használtuk: 0 = az összes csíranövény elpusztult, 1 =a magvak többsége nem kelt ki, a csíranövények többsége elpusztult, de legalább egy túlélő volt a vetést követő 8. napon súlyos tünetekkel (törpült, a levél és a gyökerek károsodtak, a gyökérnyakon bemaródás), 2 = a magvak kevesebb mint fele kelt ki, a csíranövényeken súlyos tünetek mutatkoztak, és többségük elpusztult a vetést követő 8 napon belül, 3 = a magvak több mint fele kikelt, a csíranövényeken különböző súlyosságú tünetek mutatkoztak, a gyökényaknekrózis többségüknél megjelent, a kicsírázottak több mint fele vetést követő 8 napon belül nem pusztult el, levétünetek előfordultak, 4 = a magvak csírázási erélye hasonló volt a kontrollban megfigyelthez, tehát többségük kikelt, de legalább egy elpusztult a csírázást követően, levéltünetek nem fordultak elő, 5 = a csíranövények szemmel látható tüneteket nem hordoztak. A túlélő egyedek vizsgálatára külön sorozatokat állítottunk be, és 21 napon keresztül figyeltük a fejlődésüket és kórtani állapotukat.

A mérési eredményeket mátrixba rendeztük (19 búzafajta és 26 rizoktónia törzs), majd probit értékekbe transzformáltuk, s ezen transzformált adatokat elemeztük többváltozós statisztikai módszerekkel Sváb (1979) javaslatait követve.

## *EREDMÉNYEK*

Többnyire már a vetést követő második-harmadik napon megjelentek az első csíranövények, és két nap alatt az összes mag ki is kelt. A Prémium fajtacsoport egyenletesebben csírázott, mint a Standard. A rizoktóniák jelenlétében (1. ábra) a csírázás elhúzódott, kivéve a toleránsnak mondható fajták többségét, azonban úgy tűnik, a csírázás elhúzódása önmagában nincs közvetlen kapcsolatban valamely búzafajta rizoktónia toleranciájával. A csírázás dinamikáját a 2. ábrán mutatjuk be. A fertőzött, beteg egyedek vagy feltűnően gyengébben nőttek, mint az egészségesek vagy a hajtás hossza ugyan nem különbözött lényegesen az egészségesekétől, bár a gyökérnyakon jellegzetes barna bemaródás volt található. A betegségszindróma nem minden tünete jelent meg, a

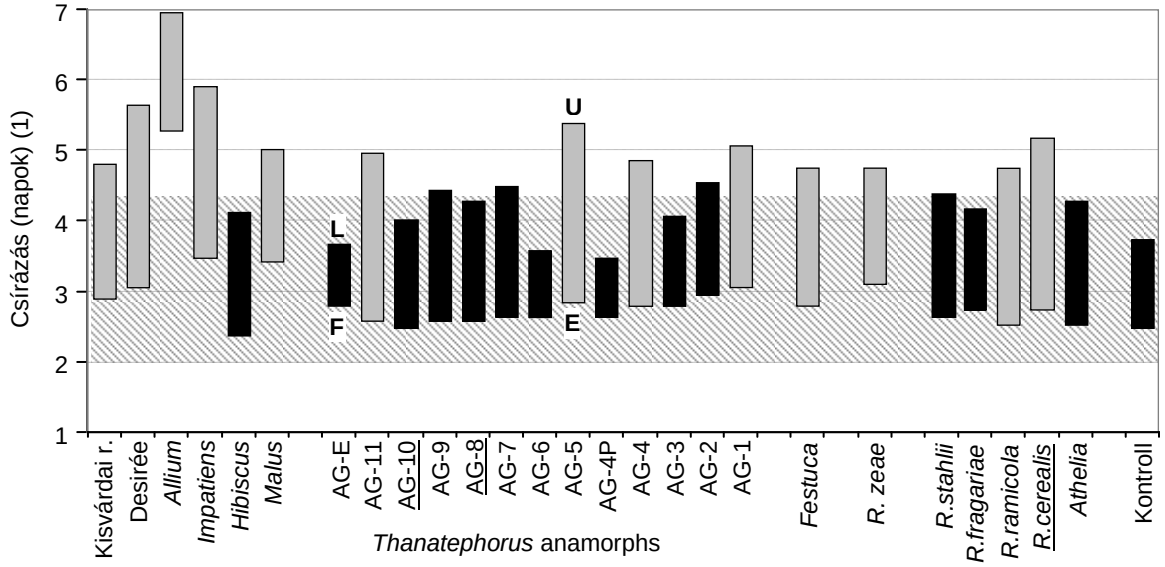
*1. ábra*: **Búzafajták csírázó magvainak fogékonysága talajeredetű *Rhizoctonia* fertőzés iránt**




A sávok az alsó értéke (E) az elsőként, míg a felső értéke (U) az utolsóként kibukkanó csíra megjelenésének időpontját jelentik. Szürke színnel jelöltük a *Rhizoctonia* fertőzött talajban és feketével a steril talajban mért értékeket. A határértékek az első (E) és az utolsó (U) mag kicsírázásának időpontját jelzik.

*Figure 1*: Susceptibility of wheat varieties to soil borne *Rhizoctonia* infection. The gray and black strips mark varieties grown up in *Rhizoctonia* infected (+R) and non-inculated (control) pots, respectively. (1)-Germination (days), (2)-other wheat varieties, (3)-Pannon Premium group of varieties, (4)-Pannon Standard group of varieties. E=F and U=L are the limits of emergence of first and last seeds.

2. ábra: ***Rhizoctonia* törzsek hatása a búzamagvak csírázási dinamikájára**




A sávok az alsó értéke az elsőként míg a felső értéke az utolsóként kibukanó csíra megjelenésének időpontját jelentik a 19 búzafajta átlagában véve. E=elsőként, U=utolsóként kicsírázott mag. Szürke színnel jelöltük azokat a törzseket, melyek jelentősen gátolták a csírázást. A ferdén vonalkázott sáv a fertőzetlen talajban csírázó magvak konfidencia határait jelzik (p=0,05)

*Figure 2*: Influence of *Rhizoctonia* strains on germination of wheat seeds. The gray strips mark strains that significantly delayed the germination. E=F and U=L are the limits of emergence of first and last seeds. The skew lined area mark the interval (p=0.05) of germination of seeds in *Rhizoctonia* free soil.

szemrevételezésre tünetmentesnek tűnő növénykék egy része is eldőlt és pusztult a koleoptil teljes kifejlődése előtt. A kidőlt egyedek gyökerein nem minden esetben lehetett tüneteket (gátolt növekedés, barna foltok,

rothadás) találni. A leggyakoribb tünet a gyökérnyak rothadása volt, de előfordultak levélfoltok is a fogékony fajtákon. Azon egyedek, melyek 14 napon belül nem pusztultak el, és túlélték a gyökérnyak fertőzést, a 21. napon feltűnően gyengébben fejlődtek, mint az ép gyökérnyakkal rendelkezők. Ugyancsak elmaradtak tömeggyarapodásban (szárazanyag-felhalmozásban) utóbbiak közül azok, melyeknél a másodlagos gyökereken léziókat lehetett megfigyelni, vagy a gyökérzetük gyengébben fejlődött. A különösen fogékony fajtákat kivéve (Bodri, Lona, Lucilla, Menüett) minden esetben (random gyakorisággal) előfordultak olyan túlélő egyedek, melyek erőteljesen nőttek, és egészséges, dús gyökérzetet fejlesztettek. A növények reakciója rendkívül heterogén volt egy ismétlésen belül is (10 növény tenyészedényenként), ami véleményünk szerint annak is a következménye, hogy a vizsgálatba vont búzafajták nem voltak alávetve szelekciónak rizoktónia fogékonyságuk tekintetben. Számos esetben fordult elő, hogy egy sorozaton belül az egyedek fele elpusztult, míg a másik fele robusztus túlélő volt. Sajnos a túlélő egyedek felnevelésére nem volt mód.

Az egyes fajták ellenállósága a különböző eredetű rizoktónia törzsek iránt nagymértékben különböző volt (1. táblázat). A *T. monococcum* és a *T. turgidum* ellenállósága a kevésbé fogékony *T. aestivum* fajtákéhoz hasonlított. A *T. aestivum* fajták között a Lona, a Menüett és a Bodri bizonyultak a legkevésbé, míg az Emese, a Palotás és a Petrence a leginkább ellenállónak. Ez az ellenállóság azonban kifejezetten törzsfüggő volt. Sajnos egyik fajta sem tolerálta az összes vizsgált rizoktónia törzset magas fokon.

A magyar búzafajták csírázását az Európában, Kínában és Ausztráliában leginkább pusztító AG-8 törzs kevéssé, míg a *R. cerealis* gyengén gátolja, ellentétben a kínai és a holland importáruról izolált törzsekkel. Viszont A *R. solani* csoport tagjai és a *R. zeae* (B-405) általi fertőzés iránti viselkedésüket tekintve a búzafajták jelentősen különböznek egymástól (például, $R^2$= 0,317, n =19, ha a pázsiton egyidejűleg jelen volt izolátummal (B-433) vetjük össze), bár az átlagértékeket tekintve a két *Rhizoctonia* faj patogenitása között csak enyhe eltérés van (2,9 és 3,1).

A *R. cerealis* jelen ugyan van a Kárpát medencében (Kövics és Lőrincz, 2001), kártétele azonban búzában Európa hűvösebb és csapadékosabb részein jelentősebb, ezért a Németországban izolált törzsét használtuk (B-447). A magyar nemesítésű fajták többsége jól tolerálta (3.6) e törzset, a gazdakör hasonlósága pedig az *R. cerealis* és a több *Rhizoctonia* törzs között csekélynek bizonyult ($r^2$<0.23). Ugyancsak kevéssé fogékonynak bizonyultak az *Athelia* (B-442) és az eperről izolált *Ceratorhiza* (B-438) törzs iránt, viszont az orchideáról származó *Ceratorhiza ramicola* (B-427) öt fajtát is (Toborzó, Bodri, Lucilla, Toldi és Lona) jelentősen károsított. Az ugyancsak orchideáról izolált *R. stahlii* (B-441) törzset viszont a Lona fajta kivételével a többiek jól tolerálták.

A búzafajták közötti hasonlóságot rizoktónia ellenállóságuk tekintetében Cluster Analízissel elemeztük (3. ábra). A fajták két jól elkülönülő csoportot képeztek. Az egyikbe a Pannon Standard fajták mellett két *T. aestivum* fajta (Kikelet és Karizma) és a *T. turgidum* (Hegyes), míg a másikba a Pannon Prémium fajták, két Pannon Standard fajta (Magvas és Petrence) és a *T. monococcum* (Alkor) tartozik. A két csoport átlagos tolerancia szintje kismértékben különbözik (A = 3,1 és B = 2,7), fogékonysági spektrumuk azonban eltérő.

Az 1. táblázat adatait a 3. ábrán bemutatott eredménynek megfelelően két almátrixra bontottuk, és kanonikus korreláció analízissel (CCA) elemeztük. Három szignifikáns egyenletet kaptunk ($R^2$ = 0,886, 0,847, 0,684 és $\chi^2$=103,2, 70,5, 42,4). Az első két egyenlet szerint a törzsek viszonylag szoros csoportot képeztek, melytől csak néhány törzs (AG-1, AG-5, AG-1) vált el különböző mértékben. A potenciális fertőzőképességnek csak a második egyenlet szerinti csoportosulásban volt szerepe. A harmadik egyenlet szerint viszont a törzsek két, egymástól jól elkülönülő szoros csoportot képeztek (4. ábra). Két *R. solani* (B-409 és B-430 = AG-4) törzs nem tartozott egyik csoporthoz sem. Mindkét csoportban előfordultak különböző fertőzőképességű törzsek, illetve az azonos anasztomóziscsoportba soroltak nem egybe tartoztak, ami véleményünk szerint arra utal, hogy a patogenitás mértékének és az anasztomózisért felelős tulajdonságoknak alárendelt szerepe van a két kórokozó csoport kialakulásában. Nyilvánvaló ugyanakkor, hogy a búza (gazdanövény) tulajdonságai meghatározóak a *Rhizoctonia* törzsek csoportosulásának kialakításában (4. ábra). Ennek oka részben az lehet, hogy a számítás alapjául vett adatmátrix a fajták talajeredetű rizoktónia fertőzésre adott válaszait tartalmazza, ami felül súlyozódik, amikor a rizoktónia törzsek fajta-szelektív fertőzőképességét, illetve egymáshoz való viszonyukat értékeljük.

*1. táblázat*

**Búzafajták betegségellenállóságának értékelése a csíranövények *Rhizoctonia* fertőzéssel szembeni ellenállósága alapján**

| *Rhizoctonia* törzsek (2) | | Búzafajták (1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | Tünetmentes (4) | Elpusztult (5) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Pannon Standard 2010 | | | | | | Pannon Prémium 2010 | | | | | | | Egyéb fajták | | | | | | |
| No. | Kód (3) | Toborzó | Bodri | Emese | Petrence | Lucilla | Magvas | Palotás | Menüett | Toldi | Suba | Ködmön | Kolo | Mazurka | R23 | Kikelet | Karizma | Lona | Hegyes | Alkor | |
| 1 | B-415 | 2 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 | 7 |
| 2 | B-432 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 3 | 2 | 5 | 3 | 5 | 4 | 4 | 3 | 5 | 5 | 12 | 0 |
| 3 | B-446 | 5 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 | 4 | 4 | 5 | 4 | 3 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 4 | 4 | 4 | 0 |
| 4 | B-417 | 1 | 2 | 4 | 5 | 5 | 2 | 5 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 5 | 5 | 4 | 1 | 5 | 4 | 6 | 0 |
| 5 | B-430 | 2 | 3 | 4 | 3 | 5 | 3 | 5 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 5 | 3 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 7 | 0 |
| 6 | B-418 | 3 | 1 | 1 | 4 | 3 | 0 | 4 | 1 | 2 | 3 | 2 | 4 | 3 | 3 | 1 | 3 | 1 | 4 | 3 | 0 | 1 |
| 7 | B-419 | 1 | 2 | 5 | 4 | 4 | 2 | 5 | 4 | 5 | 2 | 2 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3 | 2 | 5 | 5 | 9 | 0 |
| 8 | B-420 | 2 | 2 | 4 | 5 | 3 | 5 | 5 | 1 | 3 | 5 | 3 | 3 | 5 | 5 | 0 | 3 | 2 | 2 | 3 | 6 | 0 |
| 9 | B-421 | 4 | 5 | 2 | 5 | 2 | 1 | 5 | 2 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 5 | 4 | 3 | 1 | 3 | 5 | 5 | 0 |
| 10 | B-422 | 2 | 1 | 4 | 4 | 2 | 1 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 4 | 5 | 5 | 3 | 1 | 4 | 1 | 2 | 1 |
| 11 | B-423 | 5 | 2 | 4 | 5 | 3 | 5 | 5 | 4 | 3 | 3 | 3 | 5 | 5 | 2 | 5 | 5 | 3 | 5 | 5 | 10 | 0 |
| 12 | B-424 | 3 | 3 | 5 | 5 | 3 | 3 | 5 | 4 | 4 | 1 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 0 | 5 | 4 | 4 | 0 |
| 13 | B-434 | 1 | 3 | 5 | 4 | 2 | 4 | 5 | 5 | 3 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 3 | 6 | 0 |
| 14 | B-411 | 1 | 2 | 4 | 3 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 2 | 1 | 5 | 4 | 0 | 5 | 5 | 2 | 5 |
| 15 | B-410 | 2 | 1 | 4 | 4 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 5 | 3 | 1 | 4 | 1 | 1 | 6 |
| 16 | B-413 | 0 | 3 | 5 | 5 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 4 | 3 | 3 | 4 | 1 | 2 | 4 | 0 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| 17 | B-409 | 3 | 5 | 5 | 4 | 4 | 2 | 3 | 0 | 5 | 3 | 3 | 1 | 5 | 3 | 3 | 5 | 1 | 3 | 3 | 5 | 0 |
| 18 | B-245 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 |
| 19 | B-521 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 18 |
| 20 | B-433 | 4 | 3 | 2 | 4 | 4 | 0 | 5 | 1 | 0 | 3 | 2 | 2 | 4 | 3 | 5 | 4 | 1 | 5 | 3 | 3 | 1 |
| 21 | B-405 | 4 | 2 | 5 | 4 | 4 | 3 | 5 | 3 | 0 | 5 | 3 | 1 | 2 | 4 | 3 | 3 | 0 | 5 | 3 | 4 | 2 |
| 22 | B-438 | 3 | 2 | 5 | 3 | 2 | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 4 | 3 | 1 | 3 | 4 | 1 | 3 | 3 | 1 | 2 |
| 23 | B-447 | 5 | 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | 0 | 2 | 5 | 5 | 1 | 4 | 5 | 5 | 2 | 5 | 4 | 6 | 1 |
| 24 | B-441 | 4 | 3 | 5 | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 5 | 5 | 4 | 5 | 3 | 4 | 5 | 5 | 1 | 5 | 5 | 8 | 0 |
| 25 | B-427 | 1 | 1 | 5 | 3 | 0 | 3 | 4 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 1 | 5 | 4 | 2 | 0 |
| 26 | B-442 | 0 | 1 | 2 | 5 | 3 | 3 | 4 | 1 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 5 | 1 | 5 | 2 | 5 | 3 | 4 | 1 |
| Nincs tünet | | 4 | 4 | 10 | 8 | 3 | 2 | 11 | 2 | 4 | 5 | 1 | 6 | 6 | 9 | 11 | 6 | 0 | 13 | 7 | | |
| Elpusztult (5) | | 4 | 3 | 2 | 2 | 4 | 6 | 3 | 5 | 9 | 5 | 5 | 4 | 2 | 1 | 3 | 2 | 7 | 2 | 2 | | |

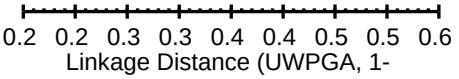
Értékelés: 0 = mind elpusztult, 5 = mind túlélte. 1-13 Standard *Rhizoctonia solani* törzsek, 14-19 saját *R. solani* izolátumok, 20 a *R. zeae* izolátumot kísérő törzs, 21 *R. zeae*, 22 *R. fragariae*, 23 *R. cerealis*, 24 *R. stahlii*, 25 *R. ramicola* és 26 *Athelia rolfsii*. A kövéren jelölt törzsek ismert búzakórokozók.

Table 1: Evaluation of the susceptibility of wheat varities to soil borne *Rhizoctonia* infection. 1-Wheat verieties, 2-Rhizoctonia stains, 3-Code, 4-Killed, 5-Symtomless. Evalutaion: 0=all germlings killed, 5=all seedlings survived.

1-13= Standard *R. solani* strains, 14-19=*R. solani* strains isolated inHungary, 20=*R. solani* strain cohabiting with *R. zeae*, 21=*R.zeae*, 22= *R. fragariae*, 23= *R. cerealis*, 24= *R. stahlii*, 25= *R. ramicola* and 26= *Athelia rolfsii*. The bold labelled strains have been isolated of wheat. (1)-Wheat varieties, (2)-*Rhizoctonia* strains, (3)-Code, (4)-Symptomless, (5)-Killed.

*3. ábra*: **Búzafajták csoportosítása talajeredetű *Rhizoctonia* fertőzés iránti ellenállóságuk alapján**

| | Fajták (1) | A(2) | C(3) | C(4) | AG1 | AG8 | AG10 | T(5) | W(6) | F(7) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | Toborzó | 0 | 5 | 1 | 2 | 4 | 5 | 2.4 | 4 | S |
| | Bodri | 1 | 5 | 1 | 0 | 5 | 2 | 2.3 | 2 | S |
| | Lucilla | 3 | 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2.7 | 4 | S |
| | Emese | 2 | 4 | 5 | 2 | 2 | 4 | 3.5 | 5 | S |
| | Kikelet | 1 | 5 | 3 | 1 | 4 | 5 | 3.5 | 3 | Ta |
| | Hegyes | 5 | 5 | 5 | 1 | 3 | 5 | 3.5 | 5 | Tt |
| | Karizma | 5 | 5 | 3 | 3 | 3 | 5 | 3.3 | 3 | Ta |
| B | Petrence | 5 | 4 | 3 | 1 | 5 | 5 | 3.7 | 4 | S |
| | Palotás | 4 | 4 | 4 | 0 | 5 | 5 | 3.5 | 5 | P |
| | R-23 | 5 | 4 | 3 | 0 | 5 | 2 | 3.3 | 4 | Ta |
| | Mazurka | 4 | 1 | 3 | 2 | 3 | 5 | 3.5 | 2 | P |
| | Magvas | 3 | 4 | 3 | 0 | 1 | 5 | 2.0 | 3 | S |
| | Kolo | 4 | 5 | 3 | 1 | 3 | 5 | 2.7 | 1 | P |
| | Alkor | 3 | 4 | 4 | 1 | 5 | 5 | 3.2 | 3 | Tm |
| | Suba | 2 | 2 | 3 | 0 | 4 | 3 | 2.6 | 5 | P |
| | Ködmön | 4 | 5 | 3 | 0 | 4 | 3 | 2.1 | 3 | P |
| | Menüett | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 4 | 2.1 | 3 | P |
| | Toldi | 2 | 0 | 0 | 1 | 4 | 3 | 2.5 | 0 | P |
| | Lona | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 3 | 1.2 | 0 | Ta |
| Átlag (8) | A | 2.4 | 4.7 | 2.6 | 1.4 | 3.3 | 4.1 | 3.1 | 3.7 | |
| | B | 3.3 | 3.0 | 2.7 | 0.6 | 3.5 | 4.0 | 2.7 | 2.8 | |

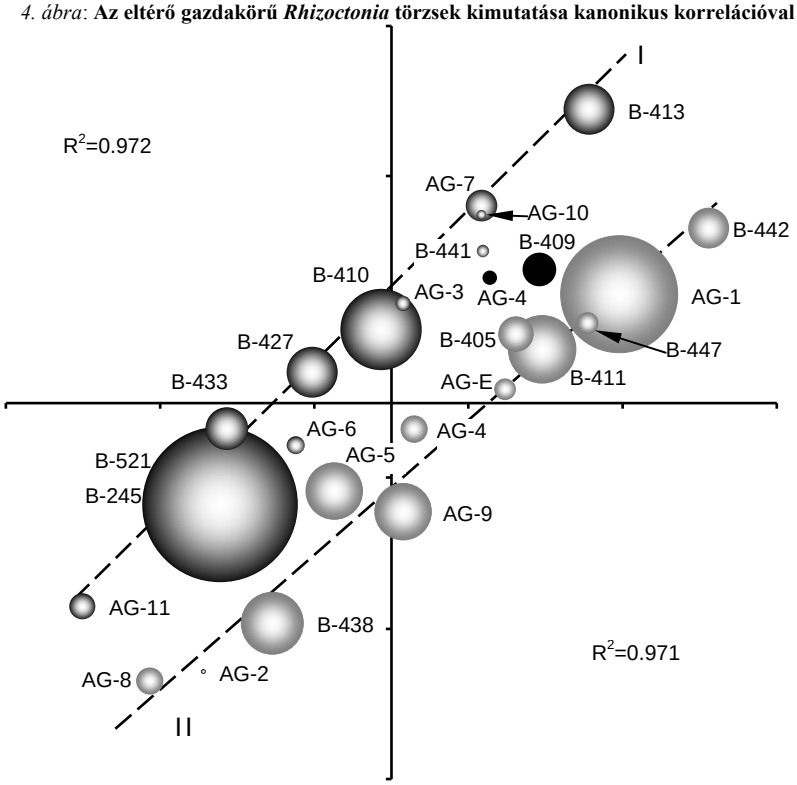



A törzsfát az 1. táblázatban foglalt adatokból számítottuk Pearson-féle korrelációs tényezőkre alapozva Unweighted Pair Group Average (UWPGA) módszerrel. P és S a Pannon Standard és Pannon Prémium fajtacsoportokat jelölik, Ta= *T. aestivum*, Tm= *T. monococcum*, Tt= *T. turgidum*. A megadott tolerancia értékek (0 = fogékony, 5 = ellenálló) az *A. rolfsii* (A), *C. cereale* (C3), *C. ramicola* (C4) és a *W. circinata* törzsek, illetve AG1, AG8 és AG10 anastomosis csoportokba tartozó *R. solani* törzsek és a T(5) = *Thanatephorus* anamorfák (*R. solani*) iránti reakciót jelzik.

*Figure 3*: Grouping of wheat varities based on their responses to soil borne *Rhizoctonia* infection. The data of Table 1 were clustered of Pearson's correlation matrix applying Unweighted Group Average method. (1) – verieties, Tolerance values to *A. rolfsii* (2), *C. cerelae* (3), *C. ramicola* (4), *Thanaephorus* anamorphs (5), *W. circinata* (6) and anastomosis groups (AG1, AG8 and AG10) of *R. solani* are of Table 1 (0=susceptible, 5=tolerant). (7) S=Pannon Standard, P=Pannon Premium, Ta= *T. aestivum*, Tm= *T. monococcum*, Tt= *T. turgidum*. (8) Average values of tolerance calculated for groups A and B.

Az 1. táblázat adatait a 3. ábrán bemutatott eredménynek megfelelően két almátrixra bontottuk, és kanonikus korreláció analízissel (CCA) elemeztük. Három szignifikáns egyenletet kaptunk ($R^2$ = 0,886, 0,847, 0,684 és $\chi^2$=103,2, 70,5, 42,4). Az első két egyenlet szerint a törzsek viszonylag szoros csoportot képeztek, melytől csak néhány törzs (AG-1, AG-5, AG-1) vált el különböző mértékben. A potenciális fertőzőképességnek csak a második egyenlet szerinti csoportosulásban volt szerepe. A harmadik egyenlet szerint viszont a törzsek két, egymástól jól elkülönülő szoros csoportot képeztek (4. ábra). Két *R. solani* (B-409 és B-430 = AG-4) törzs nem tartozott egyik csoporthoz sem. Mindkét csoportban előfordulnak különböző fertőzőképességű törzsek, illetve az azonos anasztomóziscsoportba soroltak nem egybe tartoznak, ami véleményünk szerint arra utal, hogy a patogenitás mértékének és az anasztomózisért felelős tulajdonságoknak alárendelt szerepe van a két kórokozó csoport kialakulásában. Nyilvánvaló ugyanakkor, hogy a búza (gazdanövény) tulajdonságai meghatározóak a *Rhizoctonia* törzsek csoportosulásának kialakításában (4. ábra). Ennek oka részben az lehet, hogy a számítás alapjául vett adatmátrix a fajták talajeredetű rizoktónia fertőzésre adott válaszait tartalmazza, ami felül súlyozódik, amikor a rizoktónia törzsek fajta-szelektív fertőzőképességét, illetve egymáshoz való viszonyukat értékeljük. A *Rhizoctonia* törzsek közötti viszonyt búzafajták iránti fertőzőképességük alapján (1. táblázat) Cluster Analízissel (CA) elemeztük (5. ábra). A kínai import hagymáról (B-245) és egy budai parkban hervadó *Impatiens balsaminá*ról (B-521) izolált két *R. solani* törzs különösen fertőzőképesnek bizonyult, és az R-23 fajta kivételével a többiek összes csíranövényét elpusztította (N = 5 sorozat × 2 edény × 10 mag), és az AG-E anasztomóziscsoportba sorolt *R. solani*val (B-434) együtt a többiektől határozottan elkülönült ágat képeznek ($p<0.01$). Csak kizáró okokat tudtunk megjelölni a többi törzs csoportosulásában. Azon tulajdonságok, melyek alapján a vizsgálatba vont törzsek teleomorfáit nemzetségekbe sorolják, nem játszanak szerepet a búzafajták iránt megnyilvánuló patogenitásukban (ez volt a CA alapja), ugyanis az *Athelia*, *Ceratobasidium*, *Ceratorrhiza* és *Waitea* törzsek keveredtek a *Thanatephorus* anamorfákkal. Ugyancsak jelentéktelennek tarthatjuk a *Thanatephorus* anasztomózis csoportok elkülönüléséért felelős élettani tényezőket a törzsfa szerkezetének alakításában, mivel például a két AG-4 (B-417 és B-430) törzs jelentősen eltérő pozícióban van. Hasonlóképpen nem tűnik jelentősnek a származás forrása sem, például a burgonya gumóról izolált *R. solani* törzsek közül csak a B-422 (AG-9) és a B-410 kapcsolódott szorosan, a többiek nem képeztek elkülönülő csoportot. A 4. ábrán

*4. ábra*: **Az eltérő gazdakörű *Rhizoctonia* törzsek kimutatása kanonikus korrelációval**




A kanonikus korreláció számításhoz a 3. ábrán bemutatott két fajtacsoport szerint képeztük a mátrixokat az 1. táblázat adataiból. A korrelációs tényezők az I és II egyenesek illeszkedését mutatják be. A fekete (I) és a szürke (II) körök a két csoportba sorolt törzsek potenciális agresszivitásával arányosak. A B-430 (AG-4) és a B-409 törzseket kizártuk az elemzésből.

*Figure 4*: Separation of *Rhizoctonia* strains with Canonical Correlation Analysis. According to groups shown in Figure 3 two submatrices were edited of the data comprised in Table 1 and were retaled by means of Canonic Correlation Analysis. Strains B-409 and B-430 (AG-4) were omitted of calculations. The size of black (I) and gray (II) balls is proportional to potential aggressivity of strains to wheat, respectively. The correlations coefficients demonstrate the fittness of regression ($p<0.001$).

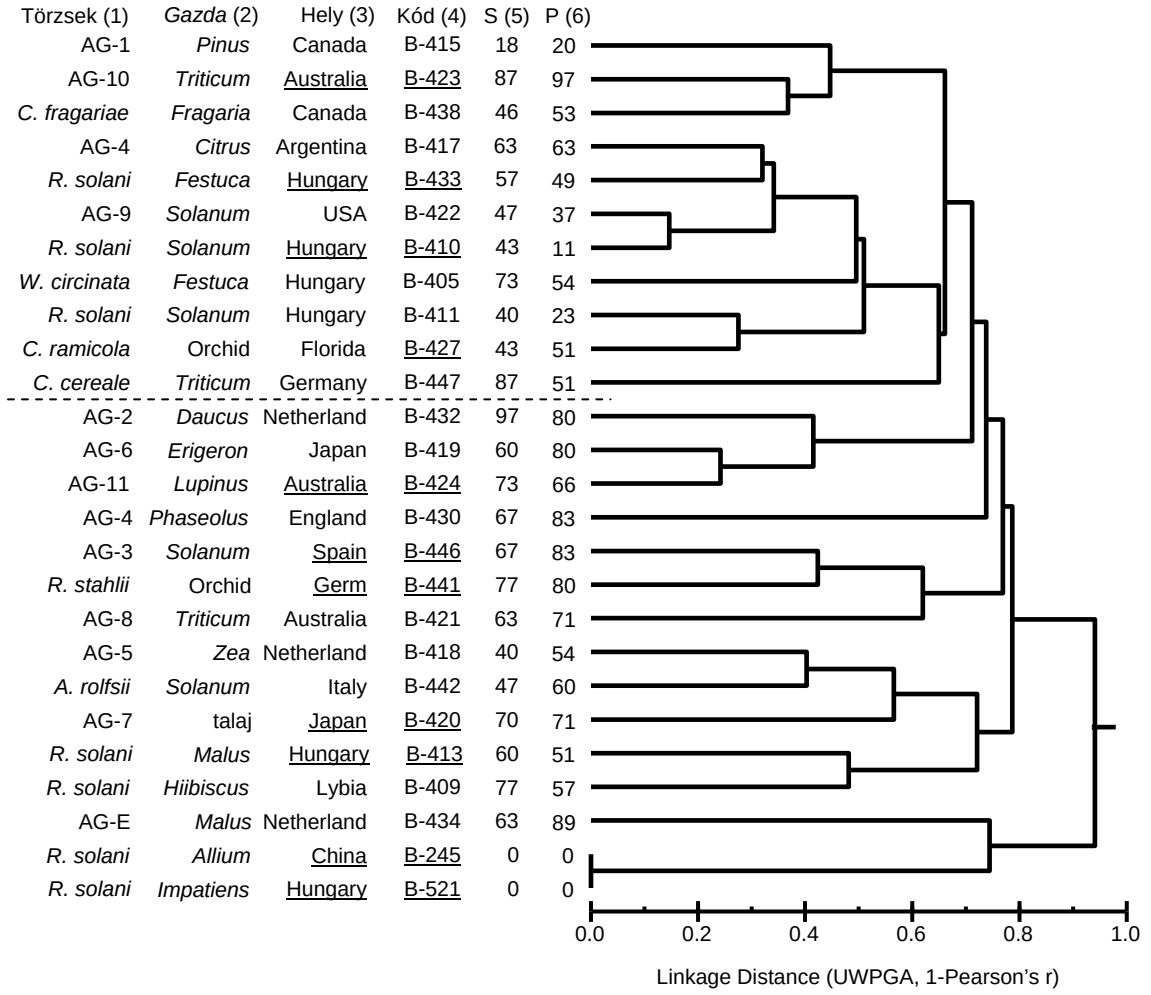
bemutatott csoportosulás okai sem befolyásolják a törzsfa szerkezetét, a CCA-val elkülöníthető két csoport tagjai ugyanis láthatóan random módon keverednek egymással.

Sajnos a külföldi törzsek pontos származási helyét csak ország szinten ismerjük, s így a biogeográfiai tényezők szerepét nem tudtuk értékelni, bár a tény, hogy a hazai izolátumok többsége a törzsfa felső részén helyezkedik el arra enged következtetni, hogy e tényezőknek van szerepe. Utóbbi feltételezést erősíti, hogy a rizoktóniák evolúciójában – lévén tipikus talajlakó, micéliumhálót képező gombák (Paulitz és Schroeder, 2005) – nagy szerepet játszik a talajbióta, melynek összetétele jelentős mértékben függ a minerális hordozó mellett a klimatikus feltételektől (Szabó, 1988).

A fertőzőképesség és gazdakör szerinti osztályozásnak a tesztelésekhez használt törzsek kiválasztásakor van jelentősége. Nyilvánvalóan nem lehet rutin széria vizsgálatokhoz 26 törzset használni sem a fejleszteni kívánt vegyületek gátló hatásának sem a fajták ellenállóságának megállapításához. Itt bemutatott eredményeink alapján úgy véljük, legalább öt törzset szükséges bevonni a fajták vagy fajtajelöltek minősítésébe: az *A. rolfsii* és a *R. cerealis* standard törzseit, legalább két *Thanatephorus* anamorfát, valamint egy, Poaceae fajról izolált *Waitea circinata* anamorfát. Ez utóbbi faj gyorsan terjed, és nem okoz ugyan súlyos tüneteket, viszont gátolja a növény fejlődését, továbbá kifejezett és nem specifikus mikoparazita tulajdonsága miatt feltehetően a mikorrhizák tevékenységét is károsan befolyásolja. Tekintettel arra, hogy az egyes rizoktónia törzsek gyakran antagonistái egymásnak, és a szimultán mikoparazitizmus kiváltásához szükséges feltételeket nem ismerjük, a *Rhizoctonia* ellenállóságot/fogékonyságot törzskeverékekkel nem lehet tesztelni.

A túlélő egyedek viselkedéséről szerzett adatokat sajnos az egyes sorozatokban előforduló túlélők számának nagyfokú variabilitása (2-100%) miatt nem lehetett fenti módon részletesen elemezni. A túlélő egyedek viselkedését szabályozó tényezők külön vizsgálatot igényelnek.

*5. ábra*: ***Rhizoctonia* törzsek csoportosítás különböző búzafajták csírázására gyakorolt gátló hatásuk alapján**




A törzsfát az 1. táblázatban foglalt adatokból számítottuk Pearson-féle korrelációs tényezőkre alapozva Unweighted Pair Group Average (UWPGA) módszerrel. Az S(4) és P(5) oszlopok a Pannon Standard és Pannon Prémium fajtacsoportok potenciális tolerancia képességét mutatják az adott *Rhizoctonia* törzs iránt. (0 = érzékeny, 100 = ellenálló). A 4. ábrán az I csoportba tartozó törzseket aláhúzással jelöltük.

*Figure 5*: Grouping of *Rhizoctonia* strains based on their inhibitory effect on germinating seeds of various weat varieties. The data of Table 1 were clustered of Pearson's correlation matrix applying Unweighted Group Average method. The columns S(5) and P(6) comprise potential tolerance values of varieties of Pannon Standard and Pannon Premium sortiments, respectively (0=susceptible, 100=tolerant). (1)-Strains, (2)-Source, (3)-Location, (4)-Code. The codes of members of group I on the Figure 4 were underlined.

## *KÖVETKEZTETÉSEK*

A magyar nemesítésű fajták provokációs kísérletekben jól elviselték a rizoktóniák jelenlétét a talajban. Azonban megfelelő talajviszonyok és a kórokozónak kedvező időjárási feltételek teljesülése esetén előfordulhat a talajeredetű rizoktónia fertőzések okozta kártétel hazai búzavetésekben is. Érdemesnek tűnik tehát kiszűrni a rizoktóniák iránt fokozottan fogékony fajtákat, melyek termesztését a szárazabb klímájú körzetekben nem célszerű javasolni, még csávázott magvakkal sem. Továbbá célszerűnek látszik a Kárpát-medence azon részeinek alaposabb vizsgálata, ahol a búzát monokultúrában vagy szegényített vetésforgóban termesztik. A vetőmagexport szempontjából mindez különösen fontos, mivel így meg lehet előzni magtételek visszautasítását.

### *IRODALOM*

Baley, G.J. – Campbell, K.G. – Yenish, J. – Kidwell, K.K. – Paulitz, T.C. (2009): Influence of glyphosate, crop volunteer and root pathogens on glyphosate-resistant wheat under controlled environmental conditions. Pest Management Science, 65(3):288-299.

Chen, L. – Zhang, Z.Y. – Liang, H.X. – Liu, H.X. – Du, L.P. – Xu, H.J. – Xin, ZY. (2008): Overexpression of TiERF1 enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat. Journal of Experimental Botany, 59(15):4195-4204.

Cook, R.J. – Weller, D.M. – El-Banna, A.Y. – Vakoch, D. – Zhang, H. (2002): Yield responses of direct-seeded wheat to rhizobacteria and fungicide seed treatments. Plant Disease, 86(7):780-784.

Demirci, E (1998): Rhizoctonia species and anastomosis groups isolated from barley and wheat in Erzurum, Turkey. Plant Pathology, 47(1):10-15.

Guo, Y.P. – Li, W – Sun, H.Y. – Wang, N. – Yu, H.S. – Chen, H.G. (2012): Detection and quantification of *Rhizoctonia cerealis* in soil using real-time PCR. *Journal Of General Plant Pathology*, 78(4):247-254.

Hamada, M.S. – Yin, Y.N. – Chen, H.G. – Ma, Z.H. (2011): The escalating threat of *Rhizoctonia cerealis*, the causal agent of sharp eyespot in wheat. *Pest Management Science*, 67(11):1411-1419.

Lewis, J.A. – Lumsden, R.D. – Locke, J.C. (1996): Biocontrol of damping-off diseases caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* with alginate prills of *Gliocladium virens*, *Trichoderma hamatum* and various food bases. Biocontrol Science and Technology, 6(2):163-173.

Kövics, G.J. – Lőrincz, N. (2001): Causal agents of stem-base diseases of winter wheat in Eastern Hungary. In: Resources of the environment and sustained development. Scientific Communication Session: Analele Universitátii Din Oradea. Tom. VII. Partea I-a. Fasc. Agric. Hortic. Konferencia helye, ideje: Nagyvárad, Románia, 2001.05.24-2001.05.26. Oradea: pp. 37-44.

Mavrodi, O.V. – Walter, N. – Elateek, S. – Taylor, C.G. – Okubara, P.A. (2012a): Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium* root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas*. Biological Control, 62(2):93-102.

Mavrodi, D.V. – Mavrodi, O.V. – Parejko, J.A. – Bonsall, R.F. – Kwak, Y.S. – Paulitz, T.C. – Thomashow, L.S. – Weller, D.M. (2012b): Accumulation of the Antibiotic Phenazine-1-Carboxylic Acid in the Rhizosphere of Dryland Cereals. Applied and Environmental Microbiology, 78(3):804-812.

Oros, Gy. (2005): *Rhizoctonia* fajok. A hazai talajmikológia fehér foltja. *10. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum Előadásai*, 2004. október 18-20. Debrecen (Szerk. Kövics Gy. és Dávid I.), Kiadja Debreceni Egyetem, pp. 321-329.

Paulitz, T.C. – Smiley, R.W. – Cook, R.J. (2002): Insights into the prevalence and management of soilborne cereal pathogens under direct seeding in the Pacific Northwest, USA. Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie, 24(4):416-428.

Paulitz, T.C. – Schroeder, K.L. – Schillinger, W.F. (2010): Soilborne Pathogens of Cereals in an Irrigated Cropping System: Effects of Tillage, Residue Management, and Crop Rotation. Plant Disease, 94( 1): 61- 66.

Roget, D.K. – Neate, S.M. – Rovira, A.D. (1996): Effect of sowing point design and tillage practice on the incidence of rhizoctonia root rot, take-all and cereal cyst nematode in wheat and barley. Australian Journal of Experimental Agriculture, 36(6):683-693.

Smiley, RW Wilkins, DE (1992): Impact of sulfonylurea herbicides on Rhizoctonia root-rot, growth, and yield of winter-wheat. Plant Disease, 76(4):399-404.

Szabó, I. M. (1988): A bioszféra mikrobiológiája. Akadémiai Kiadó, Budapest

Sváb, J. (1979): Többváltozós módszerek a biometriában. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest

Tunali, B. – Nicol, J.M. – Hodson, D. – Uckun, Z. – Buyuk, O. – Erdurmus, D. – Hekimhan, H. – Aktas, H. – Akbudak, M.A. – Bagci, S.A. (2008): Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. Plant Disease, 92(9):1299-1306.

Unal, F. – Dolar, F.S. (2012): First Report of *Rhizoctonia solani* AG 8 on Wheat in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 160(1):52-54.

Vajna, L. – Oros, Gy. (2004): Pázsitfüvek foltos pusztulása Magyarországon, a *Rhizoctonia solani* és as *R. zeae* szerepe a pázsitfüvek pusztulásában. *9. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum Előadásai*, 2004. október 20-21. Debrecen (Szerk. Kövics Gy.), Kiadja Debreceni Egyetem, pp. 200-215.

Vajna, L. – Oros, G. (2005a) First report of *Rhizoctonia zeae* in Hungary. *Plant Pathology*, 54:250.

Vajna, L. – Oros, Gy. (2005)b Pázsitfüvek foltos pusztulása Magyarországon. A *Rhizoctonia zeae* és a *R. solani* szerepe a pázsitfüvek pusztulásában. *Növényvédelem*, 59: 149-157

Wakelin, S.A. – Anstis, S.T. – Warren, R.A. – Ryder, M.H. (2006): The role of pathogen suppression on the growth promotion of wheat by *Penicillium radicum*. Australasian Plant Pathology, 35(2):253):258.

# Pivotal role of hydrogen peroxide and biokal on seed germination, seedling growth and soil borne disease of cabbage and triploid watermelon

**Yaser M. Hafez[1] ,Yousry. A. Bayoumi[2] and Tarek A. Shalaby[2]**

[1] Dept. of Agricultural Botany (Plant Pathology Branch), [2] Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kafrelsheikh University,33516-Kafr-El-Sheikh, Egypt

hafezyasser@gmail.com, ybayoumi2002@yahoo.com.sg, tashalaby@yahoo.com

***SUMMARY***

*Improving seed germination is considering an important factor in producing vegetable crops. Two vegetable crops (seedless watermelon and cabbage) were used to study the effect of soaking seeds pre-sowing in solutions of biokal 01 and hydrogen peroxide (1, 10, 20 and 50 mM). Using hydrogen peroxide and biokal 01 led to improve most of seedling quality of both crops. Final seed germination percentage (FGP), seed germination rate, seedling height, chlorophyll content and shoot fresh and dry weights of both crops seedlings were significantly increased as a result of hydrogen peroxide treatments specially at 10 and 20 mM as well as biokal 01 compared to the high concentration of hydrogen peroxide (50mM) and the control (distilled water). In the same manner, both of biokal 01 and hydrogen peroxide enhanced the enzyme activities of ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR) and catalase (CAT) in seedlings leaves of cabbage and triploid watermelon. The percentage of healthy seedlings was higher with soaking seeds in biokal 01 and hydrogen peroxide than the untreated seeds. On the other hand, the percentages of unhealthy seedlings (rotted and diseased) were significantly decreased as a result of biokal 01and hydrogen peroxide treatments.*

**Keywords**: biokal 01, $H_2O_2$, seed vigor, cabbage and seedless watermelon

## *INTRODUCTION*

Seed vigor is considering an extremely important seed quality characteristic to both breeders and farmers. Vigor has recently been defined as "those seed properties which determine the potential for rapid uniform emergence and development of normal seedlings under a wide range of field conditions" (Cantliffe *et al.,* 1987). The quality of high vigor in seeds relates to those genetic and environmental conditions from which the seed develops. Although researchers consider all attributes of seed quality, e.g., genetic, physical, physiological and pathological are received more attention with an emphasis on studies regarding reliable procedures for seed vigor evaluation and identification of the relationship between seed vigor and seedling emergence. The effects of seed vigor on stand establishment can be especially critical to crops that require spatial distribution of plants to maximize yield such as lettuce, cabbage, cauliflower, and onion (Tekrony and Egli, 1991). In this manner, delayed or lower seedling emergence may reduce yield at harvest.

Enhancing germination in various vegetables and field crops can be achieved by some seed treatments. To improve germination percentage of vegetable seeds and to increase yield, their seeds are soaked in different solutions. It was established that soaking celery seeds in Gibberellins, they germinate sooner (Brocklehurst *et al*., 1982). According to Lada *et al*. (2005), the germination power of carrot seeds increased significantly when they were soaked in the solutions of Ambiol, Glycinebetaine and Bioprotect. Seed soaking in plant activators not only improves their germination power, but also shoots became more luxuriant and had stronger roots (Jankauskienė and Survilienė, 2009, Patil *et al*., 2010). In this manner, the application of humic acid with soybean seeds increased germination rate and shoot growth (Tan and Tantiwiramannond, 1983).

Triploid watermelon seeds often exhibit poor germination and emergence, triploid seed coats are hard and thick, like those of their tetraploid parent, and this may inhibit germination and resulted low seedlings vigor (Kihara, 1951 and Grange *et al*., 2003). Improving germination and emergence of these expensive seeds would reduce overall risk to growers, thus increasing the crop's market prominence. Mechanical weakening of the seedcoat structure such as scarification, seed nicking and seedcoat removal has been reported to successfully enhance germination of triploid watermelon seed (Grange *et al.,* 2000). So, Duval and NeSmith (2000) germinated triploid watermelon seeds on agar in presence of aqueous $H_2O_2$ (0, 1, 2, 4 and 8%) at constant 28 □C in the dark, they showed that all levels of $H_2O_2$ increased final germination percentages relative to the control by 70%. Hydrogen peroxide levels >2% resulted in severe injury to germinating seeds. These findings suggest that germination barriers of are seedcoat related, and that seedcoat alteration and $H_2O_2$ can overcome these barriers. In addition, $H_2O_2$ has also stimulated germination of seeds and growth of shoots (Narimanov and Korystov, 1997). Hydrogen peroxide can also be used for surface sterilization and disinfestations of lettuce seeds (Pernezny *et al.,* 2001) to reduce root and leaf diseases caused by different soil born diseases.

Hydrogen peroxide ($H_2O_2$) has been reported to improve seed germination of *Fragaria □ananassa* Duch. (Negi and Singh, 1972). Successful methods were highly variable and ranged from seeds being soaked in high $H_2O_2$ concentrations (30%) for short periods (2 h) to germination of seeds in solutions of low $H_2O_2$ concentrations (1%). These studies suggest that $H_2O_2$ can be beneficial in promoting germination of hard-seeded species.

This research work aims to determine the effectiveness of $H_2O_2$ concentrations and $biokal_{01}$ treatments on improving seed germination seedlings quality and enzymes activity of cabbage and triploid watermelon.

## *MATERIALS AND METHODS*

Two greenhouse experiments were conducted at The Research Farm, Faculty of Agriculture, Kafrelsheikh University, Egypt during the two years of 2011 and 2012 to evaluate the effect of hydrogen peroxide and $biokal_{01}$ on the seed vigour and quality of triploid watermelon and cabbage seedlings.

**Seed materials**

Triploid watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum and Nakai] seeds were obtained from Horticulture Research Institute by Dr. S. Omran and cabbage seeds (*Brassica oleracea* var. *capitata,* cv. Quisto) were obtained from Tesco market, Hungary).

**Pre-sowing seed treatments**

Seeds were subjected to different pre-sowing treatments. Triploid watermelon and cabbage seeds were soaking in the following solutions:

1. Distilled water (Control),
2. Biokal01 solution (30%) for four hours, Biokal01(ecological fertilizer- made out of medicinal herbs (57 %), biohumus extracts (38 %), mineral water, essential oils, macro- and micro-elements (5 %),
3. Hydrogen peroxide ($H_2O_2$) at 1 mM for six hours,
4. Hydrogen peroxide ($H_2O_2$) at 10 mM for six hours,
5. Hydrogen peroxide ($H_2O_2$) at 20 mM for six hours,
6. Hydrogen peroxide ($H_2O_2$) at 50 mM for six hours, and

After each soaking treatment, seeds were washed thoroughly in running tap water and air dried before sown. Both crop seeds were sown in seedling trays 209 compartments which were filled with a commercial media (mixture of peat moss and vermiculite (1:1 v/v)

Treatments were arranged in four replicates; each treatment was one tray per each crop (209 cells) and actually occupied 150 cells per tray because the edge cells were not used for collecting data. Trays were sown manually, one seed per cell and covered with the same media. After sowing, trays were incubated in greenhouse with temperature 20$^{o}$C ±2 for cabbage crop and 28 $^{o}$C ± 2 for triploid watermelon crop. Nursery trays were watered manually every 1-3 days using a hose with sprinkler nozzle. During the seedlings growth, they were fertilized one time after the over emergence by a soluble fertilizer providing 360N- 360$P_2O_5$- 360$K_2O$ (mg/L). Fertilizer solution was applied with sprinkler system.

**Data collection and statistical analysis**

Germinated seeds were counted every 24 h. A seed was considered germinated when seedlings with cotyledons visible above the media surface. The following germination parameters were recorded:

(a) Germination percentage (GP) = (number of germinated seeds/number of tested seeds) × 100.

(b) Germination rate index (GRI) = [(G1/1) + (G2/2) + (Gx/X)]

where, G = germination on each alternate day after placement 1, 2, x = corresponding day of germination (Esechie, 1994)

(c) Corrected germination rate index (CGRI) = (GRI/FGP) × 100

where, FGP = final germination percentage

At the end of seedlings growth period in nursery (after 35 and 28 days from sowing date for cabbage and triploid watermelon, respectively), twenty plants from four replications of each treatment were randomly uprooted for growth measurement and data recorded were:

1. Seedling height (cm): It was measured from the media surface to the shoot apex,
2. Number of leaves per seedling ,
3. Total green color (SPAD color reading -501, a portable leaf chlorophyll meter, Minolta corp) was used for greenness measurements (Marquard & Timpton, 1987 and Tenga et al., 1989) on fully expanded and apical leaves without destroying them,
4. Fresh and dry weights of shoots and roots (after washing off the medium),
5. Biochemical assays of enzymic activities: For enzymatic activity assays of catalase and dehydroascorbate reductase (DHAR), according to Aebi (1984) and Klapheck et al. (1990), respectively. For enzymatic activity assay of ascorbate peroxidase (APX), according to Nakano and Asada (1981) and Asada (1992).
6. Diseased status of seedlings: It was included diseased seedlings and rotten seedlings as well as healthy ones in both crops during seedlings growth stages.

Experiments were set up in a completely randomized design with four replicates. The mean and one-way ANOVA were calculated using SPSS (version 10) software. The mean separations were carried out using Duncan's ltiple range tests (Duncan, 1955) and significance was determined at $p \leq 0.05$.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effect of $H_2O_2$ and biokal01 treatments on FGP, GRI, CGRI percentages and MDE of cabbage and triploid watermelon.

Seed germination is the most sensitive stage of a plants life cycle, when a seed succeeds emergence, it may enhance its luck to continue growth and development. Data presented in Table (1) show clearly that the control treatment (distilled water) decline the emergence percentages (FGP, GRI and CGRI) of both crops compared with of $H_2O_2$ and biokal01 treatments. The highest FGP of cabbage was 95.2% resulted by soaking seeds in $H_2O_2$ solution at 20 mM followed by $H_2O_2$ at 10 mM without significant differences. Concerning triploid watermelon, the highest value was 92.0% which obtained by $H_2O_2$ treatment at 20 mM followed by biokal 01. Using $H_2O_2$ at 1 and 50 mM and biokal 01 solutions showed intermediate values of the emergence percentages for cabbage seeds, but using $H_2O_2$ at the concentrations 1, 10 and 50 mM showed intermediate values for triploid watermelon seeds in most cases.

Also, the concentration of $H_2O_2$ at 20mM significantly decline the mean days to emergence by 6.02 and 4.44 days in cabbage and triploid watermelon, respectively compared with other treatments. Use of $H_2O_2$ at 50 mM caused the highest delay of cabbage seed emergence (7.33 days) followed by the control (7.1 days), also the highest delay of triploid watermelon emergence was obtained by control treatment (5.47) followed by $H_2O_2$ at 50 mM (4.71). Other treatments showed intermediate values in this parameter of both crops. This is in accordance with studies by Çavusoglu and Kabar (2010). Other germination speed parameters (GRI and CGRI) took the same trend of MDE and presented in Table (1).

The results declare that use of biokal 01 improved the germination percentage and the mean germination speed of cabbage and triploid watermelon compared to the control. Similar results were obtained by Piccolo *et al*., (1993).

The improved germination in the presence of $H_2O_2$ and biokal 01 may result from weakening of the seed coat (Chien and Lin, 1994) especially with triploid watermelon as $H_2O_2$ reacts with the seed coat. Triploid and tetraploid seeds had a lower emergence percentage than diploid seeds, possibly due to their higher seed coat splitting strength and weak seedling emergence strength (Sung and Chiu, 1995). This response to $H_2O_2$ levels and biokal 01 solutions provides evidence that the seed coat is the main inhibitor of germination (Shaik *et al*., 2008).

$H_2O_2$ treatment might have caused a change of hormonal balance in the seeds in favor of germination and seedling growth. Also, $H_2O_2$ treatment could have leaded to the breakdown or inactivation of the germination inhibitors such as ABA which produced in the seeds especially under stress conditions (Çavusoglu and Kabar, 2010). Also, Fontaine *et al.* (1994) proposed that $H_2O_2$ would activate the oxidative pentose phosphate pathway, resulting in promotion of germination.

$H_2O_2$ was the best among other treatments as it increases availability of oxygen to seeds at high temperatures by providing supplemental oxygen for respiration and metabolic activities (Katzman *et al*.,2001) especially at low concentrations because it also increased the activities of antioxidant enzymes and increased the plant immune system (Hafez, et al., 2012).

Seed treatment using biokal01 is known to promote germination of radish seeds to different degrees, biokal01 was distinguished for faster germination energy than seeds soaked in water (Jankauskienė and Survilienė, 2009).

*Table 1*

**Effect of hydrogen peroxide levels and biokal 01 on final germination percentage (FGP), germination rate index (GRI), corrected germination rate index (CGRI) and mean days of emergence (MDE) in cabbage and triploid watermelon.**

| Treatments | FGP | GRI | CGRI | MDE |
|---|---|---|---|---|
| Cabbage | | | | |
| Control | 78.93 c | 44.4 e | 56.7 d | 7.10 b |
| Biokal 01 | 91.03 b | 53.5 d | 59.1 c | 6.51 c |
| $H_2O_2$ 1mM | 91.80 b | 58.1 c | 63.6 b | 6.25 c |
| $H_2O_2$ 10mM | 94.30 a | 61.6 b | 64.9 b | 6.27 c |
| $H_2O_2$ 20mM | 95.23 a | 65.9 a | 68.4 a | 6.02 d |
| $H_2O_2$ 50mM | 89.83 b | 51.8 d | 57.3 d | 7.33 a |
| Triploid watermelon | | | | |
| Control | 65.17 d | 41.1 e | 63.1 c | 5.47 a |
| Biokal 01 | 91.03 a | 60.6 a | 65.9 b | 4.55 b |
| $H_2O_2$ 1mM | 79.03 c | 46.9 d | 58.4 e | 4.57 b |
| $H_2O_2$ 10mM | 85.20 b | 52.7 c | 61.2 d | 4.61 b |
| $H_2O_2$ 20mM | 92.03 a | 61.5 a | 66.3 b | 4.44 b |
| $H_2O_2$ 50mM | 85.57 b | 58.4 b | 69.4 a | 4.71 b |

Mean values followed by different letters within each column are significantly different based on Duncan's Multiple Range test at 5% level

**Effect of $H_2O_2$ and biokal 01 treatments on seedling growth of cabbage and triploid watermelon**

The effects of various soaking treatments on seedling growth parameters (seedling height, shoot and root fresh weights, shoot and root dry weights and total pigments) are presented in Table (2). All seedlings growth parameters were significantly influenced by $H_2O_2$ and biokal01 treatments with the exception of root dry weight of cabbage seedlings which was insignificantly influenced by treatments, the highest seedling growth were achieved when the seeds soaked in $H_2O_2$ at 20 mM with the exception of shoot fresh and dry weights of cabbage seedlings which resulted higher values with soaking seeds in $H_2O_2$ at 1 mM. Use of $H_2O_2$ at 1, 10 and 50 mM and $biokal_{01}$ produced intermediate values of such traits in most cases in both crops.

For total pigment, the data presented in Table (2) show that, seed treatment by hydrogen peroxide and biokal01 had a positive effect on total pigment content compared to that of the control treatment in both crops. Seedlings treated with hydrogen peroxide at 20 mM had the highest total pigments, while the control gave the lowest values in most cases. Using other $H_2O_2$ levels and biokal01 solutions gave the intermediate values in both crops. Our results are similar to those of Hartwigsen and Evans (2000) and Piccolo *et al.,* (1993) who reported increased seedling growth following humic acid application of cucumber and squash seedlings.

The influence of oxidative stress induced by hydrogen peroxide on growth and development of shoots and roots in cabbage and triploid watermelon seedlings has been documented that oxidative stress produced by $H_2O_2$ of seeds can stimulate seed germination and other stages of plant development and growth (Anonymous, 2002). For example, oxidative stress induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide can stimulates growth of sprouts and roots in barley, wheat, pea, maize and melon (Anonymous, 2002 and Hameed *et al.,* 2004). This indicated that oxidative stress induced by $H_2O_2$ could accelerate seedling and specifically root growth in both crops. The further evidences for growth enhancing effect of $H_2O_2$ signify the importance of exogenous application of $H_2O_2$ for both crops root growth enhancement and prevention from diseases (Barnett, 1976; James and Genz 1981 and Pernezny *et al*., 2001).

In the present study, increasing seedlings growth traits may have occurred due to stimulation of cell elongation process. $H_2O_2$, therefore, enhances cell division either as primary or secondary effect to counter balance the inhibition process of cell elongation (Hameed *et a*l., 2004). Exogenous application of $H_2O_2$ to seeds (both crops) can thus result into a significant increase in seedling height, fresh and dry weights of seedlings and total pigments by promoting new roots emergence that may provide more vigorous root system to two plants. More vigorous root growth by exogenous hydrogen peroxide consequently will cause higher nitrogen uptake ensuing better growth and yield of plants (Hameed *et al*., 2004). As reported earlier (Potikha *et al*., 1999), exogenous application of $H_2O_2$ prematurely promoted the secondary wall formation, therefore inhibition of root cell elongation may be a consequence of premature secondary wall formation in root cells thus blocking the further cell elongation.

The humic acid (biokal 01) significantly increased the total fresh and dry weights per seedling as compared to the control. This discrepancy suggests that humic acid effects on the seedlings were to promote cell elongation and a more efficient water uptake by seedling root as well as some humic acid uptake may have also occurred (Piccolo et *al*., (1993).

*Table 2*

**Effect of hydrogen peroxide levels and biokal01 on seedling growth of cabbage and triploid watermelon seedlings growing in trays under greenhouse.**

| Treatments | seedling height (cm) | Shoot fresh weight/ seedling (g) | Root fresh weight/ seedling (g) | Shoot dry weight /seedling(g) | Root dry weight /seedling (g) | Total pigments SPAD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cabbage | | | | | | |
| Control | 11.87 c | 1.94 e | 0.79 e | 0.16 d | 0.108 | 27.23 e |
| Biokal 01 | 13.16 ab | 2.59 c | 0.87 c | 0.18 c | 0.115 | 31.65 d |
| $H_2O_2$ 1mM | 11.86 c | 3.38 a | 0.87 c | 0.24 a | 0.115 | 33.52 b |
| $H_2O_2$ 10mM | 13.73 a | 3.07 b | 1.08 a | 0.20 b | 0.143 | 32.76 c |
| $H_2O_2$ 20mM | 14.03 a | 2.67 c | 1.01 a | 0.19 c | 0.138 | 34.86 a |
| $H_2O_2$ 50mM | 12.50 b | 2.09 d | 0.96 b | 0.19 c | 0.121 | 31.99 d |
| Triploid watermelon | | | | | | |
| Control | 12.13 c | 1.14 e | 0.048 d | 0.12 e | 0.023 b | 20.65 c |
| Biokal 01 | 14.32 b | 1.56 b | 0.078 b | 0.19 b | 0.026 a | 23.19 b |
| $H_2O_2$ 1mM | 12.20 c | 1.32 d | 0.067 b | 0.15 d | 0.024 b | 23.65 b |
| $H_2O_2$ 10mM | 12.29 c | 1.12 e | 0.031 e | 0.13 e | 0.014 c | 23.48 b |
| $H_2O_2$ 20mM | 15.63 a | 1.74 a | 0.104 a | 0.21 a 0.17 c | 0.026 a | 25.35 a 23.07 b |
| $H_2O_2$ 50mM | 14.16 | 1.46 c | 0.059 c | | 0.023 b | |

Mean values followed by different letters within each column are significantly different based on Duncan's Multiple Range test at 5% level

**Effect of $H_2O_2$ and biokal 01 treatments on enzyme activities in cabbage and triploid watermelon leaves**

It is clear from the results presented in Table (3) that with the application of biokal 01 and $H_2O_2$ levels, there was an increase in enzymes activity (catalase, dehydroascorbate reductase and ascorbate peroxidase) over the

control treatment in cabbage and triploid watermelon leaves. It is quite evidence that, the greatest enzymes activity were achieved by using either $H_2O_2$ at 20 mM or 10 mM followed by $H_2O_2$ at 1 or 50 mM and biokal01 in most cases of both crops comparing with the control treatment. The differences were highly significant in catalase and ascorbate peroxidase activities, but the differences were insignificant in dehydroascorbate reductase activity in both crops seedlings. These results indicate that hydrogen peroxide concentrations were more effective to induce catalase, dehydroascorbate reductase and ascorbate peroxidase activities than the other treatments. Biokal01 treatment was effective in some cases to induce all enzymes activity especially dehydroascorbate reductase which obtained the highest value in triploid watermelon leaves compared to $H_2O_2$ treatments. These results are in agreement with those of Bayliak *et al*. (2006) who showed that the activity of antioxidant enzymes in the wild type of yeast increased under hydrogen peroxide application.

High activities of catalase, dehydroascorbate reductase and ascorbate peroxidase in both crops leaves reflect the high resistance of seedlings against diseases and this increase may be higher around the pathogen penetration sites or infection sites (Raghavendra *et al.,* 2007) which might be played a role in the inhibition of fungal establishment (Table, 4), thereby enhanced the germination percentage, germination speed, total pigments and consequently increasing seedlings growth in both crops (Table, 3). In this manner, Sivakumar and sharma (2003) showed higher induction of such enzymes in tea plants due to accumulation of higher phenolic compounds, which may play an important role in defense mechanism in plants against the pathogens. The enzymes known as associated with antioxidant ones contribute to oxidative stress protection, providing necessary intracellular oxidant/antioxidant balance in the cell (Lushchak *et al*., 2005).

*Table 3*

**Effect of hydrogen peroxide and biokal$_{01}$ treatments on enzymes activity of cabbage and triploid watermelon seedlings growing in trays under greenhouse.**

| Treatments | Catalase (μM $H_2O_2$ $g^{-1}$ FW $min^{-1}$) | Dehydroascorbate reductase (μM DHA $g^{-1}$ FW $min^{-1}$) | Ascorbate peroxidase (μM ascorbic acid $g^{-1}$ FW $min^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| Cabbage leaves | | | |
| Control | 320.5 d | 0.970 | 0.950 c |
| Biokal01 | 345.7 c | 1.163 | 0.993 c |
| $H_2O_2$ 1mM | 350.8 c | 1.224 | 1.234 b |
| $H_2O_2$ 10mM | 469.3 a | 1.453 | 1.494 a |
| $H_2O_2$ 20mM | 460.8 a | 1.405 | 1.565 a |
| $H_2O_2$ 50mM | 380.4 b | 1.016 | 1.202 b |
| Triploid watermelon leaves | | | |
| Control | 312.7 c | 0.010 | 0.597 d |
| Biokal01 | 348.9 b | 0.035 | 0.688 c |
| $H_2O_2$ 1mM | 357.5 b | 0.015 | 0.686 c |
| $H_2O_2$ 10mM | 397.1 a | 0.025 | 0.753 b |
| $H_2O_2$ 20mM | 403.3 a | 0.034 | 0.795 a |
| $H_2O_2$ 50mM | 350.6 b | 0.030 | 0.694 c |

Mean values followed by different letters within each column are significantly different based on Duncan's Multiple Range test at 5% level

**Effect of $H_2O_2$ and biokal 01 treatments on healthy and unhealthy seedlings percentage of cabbage and triploid watermelon**

Data in Table (4) show that, healthy and unhealthy seedlings percentages of cabbage and triploid watermelon were clearly influenced by seed treatment solutions in comparison with the control treatment. All seed treatments with $H_2O_2$ and biokal01 clearly reduced the percentage of unhealthy seedlings (diseased and rotted), the best reduction was achieved by soaking seeds in $H_2O_2$ at 1 and 20 mM or 1 and 50 mM followed by $H_2O_2$ at 10 mM. However, control seedlings showed the highest disease incidence and severity (unhealthy %) in both crops. Good or healthy seedlings (non- diseased or rotted) were obviously increased with $H_2O_2$ and biokal$_{01}$ application to both crops; the highest good seedlings were resulted from $H_2O_2$ at 20 mM with cabbage and $H_2O_2$ at 1 mM with triploid watermelon seeds. Other $H_2O_2$ levels and biokal$_{01}$ treatments showed intermediate values in both crops.

The higher survival of seedlings in both crops under hydrogen peroxide treatment exposure may be explained by the compensatory elevation of enzymes activities in the seedlings treated with $H_2O_2$ (Table, 3). These enzymes known as associated with antioxidant ones contribute to oxidative stress protection, providing necessary intracellular oxidant/antioxidant balance in the cell (Lushchak *et al*., 2005) which help plant resistance against pathogens as well as produced healthy seedlings.

*Table 4*

**Effect of hydrogen peroxide and biokal$_{01}$ treatments on the percentages of healthy and unhealthy of cabbage and triploid watermelon seedlings growing in trays under greenhouse.**

| Treatments | Healthy seedlings (%) | | Unhealthy seedlings (%) | |
|---|---|---|---|---|
| | Cabbage | Triploid watermelon | Cabbage | Triploid watermelon |
| Control | 75 | 70 | 25 | 30 |
| Biokal 01 | 84 | 87 | 16 | 13 |
| $H_2O_2$ 1mM | 89 | 92 | 11 | 8 |
| $H_2O_2$ 10mM | 86 | 80 | 14 | 20 |
| $H_2O_2$ 20mM | 90 | 86 | 10 | 14 |
| $H_2O_2$ 50mM | 78 | 90 | 22 | 10 |

## *ACKNOWLEDGEMENTS*

The authors wish to thank Dr. Soliman A. Omran, Horticulture Research Institute, Agriculture Research Center, for providing the seeds of triploid watermelon.

### *REFERENCES*

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro, Meth. Enzyol., 105, 121-126.

Anonymous, 2002. Report by the Mass Governor's Advisory Council on Radiation Protection, 3rd Ed., Center for Nuclear Technology and Society at Worcester Polytechnic Institute, Worcester. http://cnts.wpi.edu:9000/rsh/dd3/_database.jsp

Asada, K. (1992*).* Ascorbate peroxidase - hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiol. Plant. 85: 235-241.

Barnett, J.P., 1976. Sterilizing southern pine seeds with hydrogen peroxide.*Tree Planters Notes,* 3: 17–9

Bayliak M., D. Gospodaryov, H. Semchyshyn and V. Lushchak (2008). Inhibition of catalase by aminotriazole *in vivo* results in reduction of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. Biochemistry (Moscow),73(4): 420-426.

Brocklehurst P. A., Rankin W. E. F., Thomas T. H. 1982. Stimulation of celery seed germination and seedling growth with combined ethephon, gibberellin and polyethylene glycol seed treatments. Plant Growth Regulation, 1(3): 195–202

Cantliffe, D.J., M. Elballa and A. Guedes. 1987. Improving stand establishment of direct seeded vegetables in Florida. Proc. Fla. State Hort. Soc., 100: 213-216.

Çavusoglu, K., and K. Kabar (2010): Effects of hydrogen peroxide on the germination and early seedling growth of barley under NaCl and high temperature stresses. EurAsia J BioSci (4): 70-79.

Chien, H. and T.P. Lin. 1994. Mechanism of hydrogen peroxide in improving the germination of Cinnamomum camphoraseed. Seed Sci. Technol.,22: 231-236.

Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F tests.Biometrics. 11: 1-42.

Duval1, J. and D. NeSmith (2000) Treatment with Hydrogen Peroxide and Seedcoat Removal or Clipping Improve Germination of 'Genesis' Triploid Watermelon. HortScience 35(1):85–86.

Esechie H (1994) Interaction of salinity and temperature on the germination of sorghum. J Agron Crop Sci 172: 194-199.

Fontaine O., C. Huault, N. Pavis, J.P. Billard (1994): Dormancy breakage of Hordeum vulgareseeds: Effects of hydrogen peroxide and scarification on glutathione level and glutathione reduct-ase activity. Plant Physiol Biochem; 32:677-83.

Grange, S., D.I. Leskovar, L.M. Pike and B.G. Cobb. (2000). Excess moisture and seedcoat alteration influence germination of triploid watermelon. HortScience, 35: 1355-1356.

Grange, S., D.I. Leskovar, L.M. Pike and B.G. Cobb. 2003. Seedcoat structure and oxygen enhanced environments affect germination of triploid watermelon. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 128: 253-259.

Hafez, Y. M., Bacsó, R., Király, Z., Künstler, A., and Király, L. (2012) Up-regulation of antioxidants in tobacco by low concentrations of $H_2O_2$ suppresses necrotic disease symptoms. Phytopathology 102:848-856.

Hameed, A., S. Farooq, N. Iqbal and R. Arshad (2004): Influence of Exogenous Application of Hydrogen Peroxide on Root and Seedling Growth on Wheat (*Triticum aestivum* L.). Inter. J. Agric.& Biolo., 6(2):366-369.

Hartwigsen, J.A. and M.R. Evans (2000): Humic acid seed and substrate treatments promote seedling root development. HortScience, 35(7):1231–1233.

James, R.L. and D. Genz, 1981. Ponderosa pine seed treatments: effects on seed germination and disease incidence. USDA Forest Service Report, 81: 13–4

Jankauskienė, Julė and Elena Survilienė (2009). Influence of growth regulators on seed germination energy and biometrical parameters of vegetables. Scientific works of the Lithuanian Institute of Hort. and Lithuanian Univ. of Agric., SODININKYSTĖ IR DARŽININKYSTĖ. 28 (3):69-76.

Katzman, L.S., A.G. Taylor and R.W. Langhans. 2001. Seed enhancements to improve spinach germination. HortScience, 36: 979-981.

Kihara, H. 1951. Triploid watermelons. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 58: 217-230.

Lada R. R., Stiles A., Blake T. J. (2005). The effects of natural and synthetic seed preconditioning agents (SPAs) in hastening seedling emergence and enhancing yield and quality of processing carrots. Scientia Horticulturae, 106(1): 25–37.

Lushchak, V., H. Semchyshyn, S. Mandryk, and O. Lushchak (2005): Possible role of superoxide dismutases in the yeast Saccharomyces cerevisiaeunder respiratory condi-tions. Arch Biochem Biophys 441: 35–40.

Marquard, R.D. and Timpton, J.L. (1987). Relationship between extractable chlorophyll and an in situ method to estimate leaf green. Hort. Sci., 22(6): 1327.

Nakano, Y., K. Asada, 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, Plant Cell Physiol., 22, 867-880.

Narimanov, A.A. and Y.N. Korystov. 1997. Low doses of hydrogen peroxide stimulate plant growth. Biologia (Bratislava), 52: 121-124.

Negi, S.P. and R. Singh. 1972. Effect of different chemicals on germination of strawberry seeds. Indian J. Hort. 29:265–268.

Patil, R.B., S.S. Mokle and S.S. Wadje (2010): Effect of potassium humate on seed germination, seedling growth andvegetative characters of *Triticum aestivum* (L.) cv.Lokavan. Inter. J. Pharma and Bio Sci. V1 (1):1-5.

Pernezny, K., R. Nagata, N. Richard, R.J. Collins and A. Carroll, 2001. Investigation of seed treatments for management of bacterial leaf spot of lettuce. *Plant Dis*, 86: 151–5

Piccolo A., G. Celano and G. Pietramellara (1993): Effects of fractions of coal-derived humic substances on seed germination and growth of seedlings (*Lactuca sativa* and *Lycopersicum esculentum*). Biol. Fertil. Soils (16):11-15.

Potikha, T.S., C.C. Collins, D.I. Johnson, D.P. Delmer and A. Levine, (1999): The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. Plant Physiol., 119: 849–858.

Raghavendra, V.B., S. Lokesh, M. Govindappa and T. VasanthKumar (2007). Dravya-as an organic agent for the management of seed-borne fungi of sorghum and its role in the induction of defense enzymes. Pesticide Bioch. & Phys., 89:190-197.

Shaik S., Y.H, Dewir, N. Singh and A. Nicholas (2008) Influences of pre-sowing seed treatments on germination of the cancer bush (Sutherlandia frutescens), a reputed medicinal plant in arid environments. Seed Sci Technol 36: 795-801.

Sivakumar, G. and R.C. Sharma (2003). Induced biochemical changes due to seed bacterization by *Pseudomonas fluorescens* in maize plants. Indian Phytopathol., 56:134-137.

Sung, J.M. and K.Y. Chiu. 1995. Hydration effecton seedling emergence strength of watermelon seeds differing in ploidy. Plant Sci., 110: 21-26.

Tan K and Tantiwiramannond D, (1983): Effect of humic acid on nodulation and dry matter production of soybean, peanut and clover. J. Soil Sci. America., 47: 1121-1124.

Tekrony, D.M. and D.B. Egli (1991). Relationship of seed vigor to crop yield: a review. Crop Science, 31 (4):816-822.

Tenga, A.Z.; Beverly, A.M. and Ormrod, D.P. (1989). Leaf greenness meter to assess ozone injury to tomato leaves. HortSci., 25: 514.