# DIPLOMAMUNKA

Major György

**Major György**

**2023**

**MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM**

**NÖVÉNYVÉDELMI INTÉZET**

**BUDAPEST**

# AZ ALLICIN ÉS A KVERCETIN HATÁSA A *PHYLLOSTICTA AMPELICIDA* MICÉLIUMNÖVEKEDÉSÉRE, *IN VITRO*

Major György

**Major György**

**Növényorvosi MSc**

**Konzulens: Dr. Tóth Annamária**

**Budapest, 2023**

**Tanszékvezető: Dr. Horváthné Petróczy Marietta**

**Tartalom**

Felhasznált rövidítések ... 5
1. Bevezetés ... 6
2. Célkitűzés ... 7
3. Irodalmi áttekintés ... 8
3.1. Ökológiai szőlőtermesztés helyzete Európában ... 8
3.2. Növényi anyagok az ökológiai szőlőtermesztésben ... 9
*3.3. Phyllosticta ampelicida* ... 9
3.3.1. Rendszertani besorolása ... 9
3.3.2. Biológiája ... 9
3.3.3. Tünetek kialakulása ... 10
3.3.4. Védekezés konvencionális szerekkel ... 11
3.3.5. Védekezés ökológiai gazdálkodásban ... 13
3.3.6. Réz és kén hatékonysága feketerothadás ellen ... 14
3.3.7. Feketerothadás ellen használható, új, ökológiai növényvédő szerek ... 14
3.3.8. Biológiai növényvédelmi lehetőségek kutatása *Phyllosticta ampelicida* ellen ... 14
3.4. Növényi anyagok kutatása *Phyllosticta ampelicida* ellen ... 15
3.4.1. Antifungális hatású növényi kivonatok aktív komponensei ... 16
3.4.2. Magyarországon, nagy mennyiségben elérhető, antifungális hatású növények ... 16
3.4.3. Csalán ... 17
3.4.4. Fokhagyma ... 17
3.5. *Phyllosticta ampelicida in vitro* tenyésztése ... 18
3.5.1. *In vitro* fungicides vizsgálatok ... 18
4. ANYAG ÉS Módszer ... 20
4.1. A vizsgálat helye és ideje ... 20
4.2. A vizsgálat anyaga ... 20
4.2.1. A kísérlet során használt izolátum ... 20
4.2.2. Felhasznált eszközök ... 20
4.2.3. Táptalaj ... 20
4.2.4. Felhasznált anyagok ... 21
4.2.5. Számítások ... 21
4.3. A vizsgálat módszere ... 22
4.3.1. A kórokozó átoltása ... 22
4.3.2. Az allicin és a kvercetin hatásának vizsgálata a micélium növekedésére ... 23

Major György

4.3.3. A vizsgált koncentrációk beállítása ..... 24
5. Eredmények, diszkusszió ..... 26
5.1. A réz-szulfát hatása a micéliumnövekedésre ..... 27
5.2. A kvercetin hatása a micéliumnövekedésre ..... 28
5.3. Az allicin hatása a micéliumnövekedésre ..... 29
5.4. Következtetések ..... 30
6. Összefoglalás ..... 31
7. Köszönet nyilvánítás ..... 32
8. Irodalomjegyzék ..... 33

Major György

## FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK

- DMI - demetiláz inhibitor
- QoI – Quinone outside Inhibitor
- QiI - Quinone inside Inhibitor
- MIC – legkisebb gátló koncentráció (Minimum inhibitory concentration)
- $EC_{50}$ – 50%-os hatást kiváltó koncentráció
- $EC_{90}$ – 90%-os hatást kiváltó koncentráció
- PDA – burgonya dextróz agar
- OA – zabpehely agar
- V8A – 8 féle zöldséget tartalmazó agar

Major György

# 1. BEVEZETÉS

A magyarországi szőlőtermesztés növényvédelme, Európa többi országához hasonlóan, az amerikai kontinensről érkező gombás betegségekkel és kártevőkkel vált égető kérdéssé. A filoxéra pusztítása, a legismertebb történet és az is egészen biztos, hogy ez hagyta a legmaradandóbb nyomot a borkultúránkon, a fajtaváltásoknak és új termőhelyek keresésének köszönhetően. Ez a kártevő azonban, amekkora gondot okozott, olyan hirtelen is vált ártalmatlanná a szőlő alanyra oltásának köszönhetően. A gombás betegségek kisebb, vagy legalábbis helyrehozható károkat okoztak. Még ha el is vitték egy-egy évben a termés egészét. Ezek közül a lisztharmat és a peronoszpóra az 1800-as évek második felében telepedhettek meg nálunk. Az ellenük való preventív védekezés egy rendkívüli véletlennek köszönhetően már 1883-ban megszületett. 1885-ben a bordói keverék a ma is használt összetevőkkel, csak arányaikban eltérően, nyilvánosságra is lett hozva (Charles, 1909).

A feketerothadás is észak-amerikai eredetű, a szőlő növény minden zöld részét fertőző betegség. Európában azonban csak később és kisebb károkat okozva jelent meg. Tömeges megjelenése a kétezres évek óta jelent problémát. Magyarországon 1999-ben írta le először Mikulás József. A betegséget azonban csak 2010 után kezdték igazán komolyan venni a gazdálkodók, az év időjárásából adódó első komoly, országos kártételt követően. Ebben az évben több európai országban is járványszerű terjedését tapasztalták a feketerothadásnak (Monchiero *et al.*, 2016). A tapasztalatok azt mutatják, hogy kártétele azóta is növekszik. Ezt több tényező is befolyásolhatja. Az éghajlat változásnak, az ökológiai gazdálkodás terjedésének és ellenálló rasszok megjelenésének együttes hatására gyanakodhatunk. A konvencionális növényvédőszerekkel kiküszöbölhető a kártétele, de az Európai Unió célkitűzéseinek és Magyarország ebben vállalt céljainak elérése érdekében fontos lenne olyan, ökológiai gazdálkodásban is használható anyagokat találni melyekkel a feketerothadás kártétele, ha nem is megszüntethető, de kiszámíthatóan kordában tartható, reális költségek mellett.

Major György

# 2. CÉLKITŰZÉS

Mivel a probléma leginkább az ökológiai szőlőtermesztést érinti, a megoldást érdemes úgy keresni, hogy az ökológiai termesztésben biztosan engedélyt kapjon. Ennek az elvnek a mentén jutottam arra, hogy növényi anyagok hatását lenne érdemes megvizsgálni. Az eddigi kutatásokra alapozva azt gondolom, hogy érdemes a növényi kivonatok legerősebb antifungális hatást mutató komponenseit magukban, meghatározott dózisban vizsgálni. Majd ezek hatékonyságát összehasonlítani az ökológiai gazdálkodásban használatos réz-szulfáttal. A növényi kivonatok gyakran több antifungális anyagot is tartalmaznak. Ugyanakkor az is gyakori, hogy ezek közül egy, nagyságrendekkel erősebb a többinél. Ezért úgy gondolom, hogy előremutatóbb egy komponens pontosan ismert dózisát használni, mint növényi kivonatok sok komponensű, de ismeretlen hatóanyagmennyiségű elegyét.

Gyakori probléma az ökológiai növényvédelemben az alacsony hatásfok. Véleményem szerint, ha antifungális hatású növényi kivonatok leghatásosabb, aktív komponenseinek, gomba növekedésgátló hatását összehasonlítjuk az ökológiai növényvédelemben használt anyagok hatékonyságával, az által megismerhetjük ezeknek a bioaktív anyagoknak a valódi jelentőségét. Új növények vizsgálat alá vonását segíthetjük, amennyiben azok tartalmazzák bármely erős hatású aktív hatóanyagot. Ez megoldaná azt a problémát, hogy az antifungális hatású növényi kivonatok gyakran egzotikus növényekből származnak, ezáltal drágán beszerezhetők.

Az ökológiai gazdálkodás fontos pontja a fenntarthatóság, ezért fontos lenne olyan növények használata melyek a mi éghajlatunkon termeszthetőek. A növény hatóanyag tartalmánál fontosabb paraméter az előállításának, így a termesztésének, kivonásának és szállításának ára. Ezek elengedhetetlen fontosságú tényezők egy gyakorlatban is használható fungicid előállításában. A növényi kivonatok használatát és az aktív komponenseikből készített fungicidek engedélyezését nagyban segítheti, ha azok szerepelnek a NÉBIH egyszerű anyagainak listáján.

Ezen támpontok alapján, úgy döntöttem, hogy egy kísérlet keretein belül megvizsgálom a csalán egyik antifungális hatású komponensének, a kvercetinnek és a hagymafélék egyik komponensének, az allicinnek a *Phyllosticta ampelicida* micélium növekedésére gyakorolt hatását, *in vitro* körülmények között. A kapott eredményeket pedig a réz-szulfát hatékonyságával fogom összevetni, hogy a kapott eredményekből következtethessünk ezeknek az anyagoknak az ökológiai növényvédelemben betöltendő helyére.

Major György

# 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 3.1. Ökológiai szőlőtermesztés helyzete Európában

Európa mezőgazdasága a magas hozzáadott értékű és a drága, réspiaci termékek előállításával tud versenyképes maradni. Az ökológiai gazdálkodásból származó termékek is ilyenek, ezért egész Európában növekszik az ökológiai gazdaságok száma. Sok növénykultúrában szinte lehetetlen kivitelezni ezt. A gabonatermesztésben akkor várhatunk nagy változásokat, amikor megjelennek az ökológiai termesztésben engedélyezett, megfizethető gyomirtó szerek. A szőlőtermesztés különleges helyzetben van ebből a szempontból. A szőlőtermesztésben a herbicid használat könnyen elkerülhető, az inszekticidek használata sem indokolt minden évben. A gombás betegségek elleni védekezés az, ami meghatározó a szőlő növényvédelmében. Nagy könnyebbség, hogy az erre több mint száz éve használt réz és kén hatóanyag ökológiai gazdálkodásban engedélyezett és nem drágábbak a konvencionális növényvédőszereknél. Persze szőlőnél is kell számolni jelentős veszteségekkel néhány évente, de a bor árába ez beleépíthető. Európa legtöbb országában szinte folyamatosan túltermelés van borból, ezért az átállással járó terméskiesés még jót is tehetne a bor piacának.

Magyarország most sincs a mezőny élén ökológiai szőlőtermesztésben, de folyamatosan növekszik itthon is az ökológiai szőlészetek száma. 1998-ban az ökológiai szőlőterületek aránya még csak 0,3% volt (Willer és Zanoli, 2000). Ez 18 év alatt a nyolcszorosára nőtt (1. táblázat). Sajnos ebben szerepet játszott a szőlőterület csökkenése is.

1. táblázat:
Európa országainak ellenőrzött ökológiai termesztésbe vont szőlőterülete hektárban és a teljes szőlőterülethez viszonyított aránya százalékban, 2016 (Donkó *et al.*, 2018)

| | Terület (ha) | Arány (%) |
|---|---|---|
| Ausztria | 5088 | 10,9 |
| Bulgária | 5390 | 14,7 |
| Csehország | 885 | 5,6 |
| Franciaország | 70732 | 9,3 |
| Németország | 8000 | 8 |
| Görögország | 4033 | 3,6 |
| Magyarország | 1637 | 2,4 |
| Olaszország | 103545 | 15,5 |
| Portugália | 3074 | 1,8 |
| Románia | 2024 | 1,2 |
| Szlovákia | 110 | 1,3 |
| Spanyolország | 106720 | 11,6 |
| Svájc | 789 | 5,3 |
| Törökország | 13961 | 3,2 |

Major György

## 3.2. Növényi anyagok az ökológiai szőlőtermesztésben

Az ökológiai és a biodinamikus szőlőtermesztés is sok növényi kivonatot, teát, komposztteát használ. Ezeknek egy részét tápanyag utánpótlás céljából használják másik részét a gombás betegségek és kártevők ellen. Az ökológiai gazdálkodás nagyobb hangsúlyt fektet ezeknek a növényeknek a megismerésére, a bioaktív hatóanyagainak felkutatására, hatékonyságuk felmérésére. A növényi kivonatok fungicid hatását átfogóan vizsgálták egy 2018-as kutatásban, mely a szőlő két fő betegségére, a peronoszpórára és a lisztharmatra keresett hatékony, természetes fungicidet. A szőlőtermesztésben leggyakrabban használt növényi kivonatok közül kettőt találtak igazán hatékonynak ezekkel szemben. A fehér fűz (*Salix alba*) és a fehér üröm (*Artemisisa absinthium*) etil-alkoholos kivonata teljes mértékben megakadályozta a peronoszpóra spóracsírázását 1 g/l-es koncentrációban (Andreu *et al*., 2018).

## *3.3. Phyllosticta ampelicida*

### 3.3.1. Rendszertani besorolása

A *Phyllosticta ampelicida* rendszertani besorolása a 2. táblázatban látható.

2. táblázat: A *Phyllosticta ampelicida* rendszertani besorolása (Internet1)

| | |
|---|---|
| Ország | *Fungi* |
| Alország | *Dikarya* |
| Törzs | *Ascomycota* |
| Altörzs | *Pezizomicotina* |
| Osztály | *Dothideomycetes* |
| Rend | *Botryosphaeriales* |
| Család | *Phyllostictaceae* |
| Nemzetség | *Phyllosticta* |

### 3.3.2. Biológiája

A szőlő feketerothadását a *Phyllosticta ampelicida* (ivaros alakja: *Guignardia bidwellii*) gombafaj okozza. A *Phyllosticta ampelicida* a szőlő teljes fenológiája alatt fertőz. Tavasszal, az előző évi bogyómúmiákon található pszeudotéciumokból aszkospórák szabadulnak ki, amik az alsó légrétegben terjednek. A primer fertőzés kialakulásáért az aszkospórák a felelősek, bár ennél a gombánál nincs szemmel látható különbség a primer és a szekunder fertőzés között. A tünetek létrejötte után kialakulnak a piknídiumok, melyek csapadék hatására kezdenek sporulálni, a belőlük kiáradó konídiumok vízzel terjedve hozzák létre a másodlagos fertőzéseket (Ferrin *et al*, 1978).

Kimutatható, hogy a fertőzés létrejöttében szerepet játszik a konídium hidrofób felületre érkezése, ezáltal a levél viaszossága, amely általában a védelmét biztosítja, ebben az esetben épp elősegíti a konídium csírázását. Ha a hidrofób felület adott és a levél felület nedves, optimális körülmények között, a csírázás egy óra alatt létrejöhet.

Maj György

Az apresszórium kialakításához 6 órára és hozzáférhető $Ca^{2+}$-ra van szükség. Az apresszórium aljáról induló hifa szubkutikulárisan növekszik a növényben (Molitor és Beyer, 2014).

Szabadföldön végzett kísérletek arra is rámutattak, hogy bár a pszeudotéciumhoz és annak aszkospóráihoz kötjük a primer fertőzés kialakulását, a piknídiumok már a rügyfakadáskor elkezdik a konídiumok szórását. A pszeudotéciumokból csak 2 héttel később kezdtek el kiszabadulni az aszkospórák a vizsgált évben. Mindkét terjedési forma eléri a maximumát mire a bogyók borsó nagyságúra nőnek. Az aszkospórák kibocsátásának csúcsa a virágzás kezdete könyékén következik be (Pirrello *et al*., 2019). Ha az időjárás lehetővé teszi, a nyár folyamán folyamatosan képződhetnek az aszkospórák, így nagyobb távolságokra tud terjedni a kórokozó. A piknídiumok tavaszi konídium termelése valószínűleg kisebb jelentőségű a fertőzés szempontjából. Ez esetleg alacsony tőkeműveléseken lehet számottevő, ahova felcsapódik az eső hatására a nyálkás fehér váladékkal borított konídium (Pirrello *et al*., 2019).

A feketerothadás fertőzéséhez a levélfelület legalább 6 órán át tartó nedvessége és magas (26,5 °C) hőmérséklet az optimális. Szélsőséges körülmények között a fertőzéshez hosszabb időre van szükség így a levélfelület nedvességnek is hosszabbnak kell lennie. 10 °C-on 24 óra, 32 °C-on 12 óra levélfelület nedvességre van szükség a fertőzés létrejöttéhez (Ferrin *et al*., 1978).

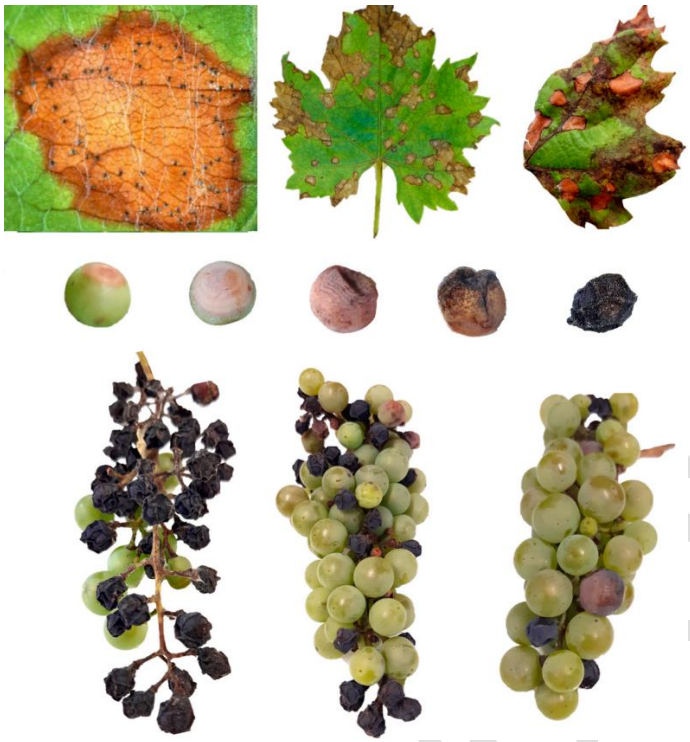
### 3.3.3. Tünetek kialakulása

Az inkubációs idő a növényi résztől, annak korától és a fertőzést követő időszak hőmérsékletétől függ. Leggyorsabban a fiatal bogyókon alakulnak ki a tünetek, a fertőzéstől számított 8-18 nap szükséges hozzá a hőmérséklettől függően. Ez a kifejlett leveleken és hajtásokon 10-21 nap. A bogyókon minél később következik be a fertőzés, annál lassabban alakulnak ki a tünetek. Akár négy hétig is képes tünetmentes maradni (Roznik, 2019).

Molitor és munkatársai (2012) a védekezés időzítésének hatását kutatva arra jutottak, hogy a *Phyllosticta ampelicida* fertőzése után 175 napfokra van szükség a tünetek megjelenéséhez, abban az esetben, ha a 6 és 24 °C között marad a hőmérséklet. Ez a fürtre is igaz, a levelekhez hasonlóan, de amikor a bogyók elkezdenek összeérni ez a szabály már nem érvényes (Molitor *et al*., 2012). Ez egy németországi kutatás eredménye, így érthető, hogy a fürtzáródáskor még benne voltak a 6-24 °C-os tartományban. Hazánkban ez a modell jóval rövidebb ideig használható a 24 °C-os felső határ miatt.

Az inkubációs idő leteltével a leveleken vörösesbarna, égésre emlékeztető, határozott szélű, nekrotikus foltok jelennek meg. A foltokban, a szélükhöz közel fekete piknídiumok figyelhetők meg. A hajtáson hosszúkás elhalt foltok jelennek meg, bennük elszórtan a termőtestek. A bogyókon behorpadó foltok alakulnak ki annak következtében, hogy a bogyó nekrotizálódó része nem növekszik. A torzuló, lilán, barnán elszíneződő bogyók később összeszáradt múmiaként a fürtben maradnak (1. ábra) (Lőrincz *et al*., 2015). A következő évi fertőzés innen tud indulni tavasszal. A fogékony periódus végén fertőződött bogyók nem száradnak össze, elbarnulnak és kellemetlen, keserűvé válnak (Molitor és Beyer, 2014). Ez a bor minőségére negatív hatást gyakorolhat a lisztharmat fertőzéshez hasonlóan, ezért ezeket a bogyókat szüretkor el kell távolítani a fürtből.

Major György



1. ábra: A feketerothadás tünetei (Bettinelli *et al*., 2023)

### 3.3.4. Védekezés konvencionális szerekkel

Az alábbiakban ismertetett szerek általában peronoszpórára vagy lisztharmatra vannak engedélyezve és kifejlesztve. A feketerothadás elleni hatékonyságukat a gyakorlat igazolta. A ditiokarbamátok hatékonyságáról ellentmondásos véleménye van a gazdáknak. A szteroid bioszintézis gátlók preventív védelemre nem alkalmasak, de a fertőzés után a gomba növekedésének gátlásával jó eredmény érhető el velük. Az inkubációs idő első felében alkalmazva elérhető, hogy ne alakuljanak ki a feketerothadás tünetei. A strobilurinok hatékonysága változó, a piraklostrobin hatékonysága mind preventív, mind kuratív módon megállja a helyét. A többi strobilurin (pl.: azoxistrobin, dimoxistrobin, fluoxistrobin) hatékonysága sokkal rosszabb ezzel a kórokozóval szemben (Ranjitham, *et al*., 2018). A piraklostrobin használata virágzástól a fürtzáródásig folyamatosan megfelelő védelmet nyújt. Szabadföldi körülmények között minimum 98%-os hatékonyságot mutat. A feketerothadásnál még nem mutattak ki strobilurin rezisztenciát, de valószínűleg meg fog jelenni, mivel az eddigi tapasztalatok szerint, szinte minden kórokozónál kialakul idővel. A hatékonysági kísérletek a ditiokarbamátok közül a metiramnak, mankocebnek és propinebnek a hosszútávú hatékonyságát bizonyították. Főként megelőző jelleggel alkalmazva hoztak jó eredményt. Kuratív hatásuk igen gyenge. A DMI fungicidekre minden kísérletben erős érzékenységgel reagált a kórokozó. Ezek esetében a kuratív hatás bizonyult a leghatékonyabbnak. A protektív védekezés hatáscsökkenéssel járt. Laboratóriumi körülmények között a *Phyllosticta ampelicida* mutatott rezisztenciát a DMI fungicidek közül a fenarimolra. A gazdáknak azonban nem volt ilyen tapasztalata szabadföldön (Molitor és Beyer, 2014).

Major György

A preventív védekezést a szőlő virágzásának kezdetén kell elkezdeni, amennyiben az addigi permetezések hatóanyagai nem hatásosak a feketerothadás ellen. A második permetezést teljes virágzásban, a harmadikat két héttel a virágzás után érdemes elvégezni. Ezek közül is a virágzáskori védekezések a legfontosabbak, a virágzás után végzett fungicides kezelések hatékonysága egyre rosszabb (Ranjitham *et al*., 2018). Ez a fürt legsérülékenyebb időszaka. A bogyók fogékonysága az idő előrehaladtával folyamatosan csökken.

Összességében a konvencionális szerekkel akkor is kordában tartjuk a kórokozót, ha nem figyelünk rá különösebben (3. táblázat). Azért érdemes rá külön figyelmet fordítani ebben az esetben is, mert a fertőzési forrás folyamatos, alacsony intenzitású, termelődésével felszaporodhat kellően a kórokozó, hogy az alkalmas körülmények között komoly kárt okozzon (Molitor és Beyer, 2014).

3. táblázat
Növényvédőszerek hatékonysága a feketerothadás ellen különböző alkalmazásmódok mellett (Molitor és Beyer, 2014)

| Hatóanyag | Fungicid csoport | Hatékonyság (%-ban) | kezelés módja |
|---|---|---|---|
| Tiofanát-metil | Karbamátok | 90 | 1 |
| Réz-hidroxid | Réz tartalmúak | 47 | 2 |
| Mankoceb | Ditiokarbamátok | 86 | 3 |
| Metiram | Ditiokarbamátok | 77 | 3 |
| Mankoceb | Ditiokarbamátok | 98 | 3 |
| Mankozeb | Ditiokarbamátok | 97 | 5 |
| Mankoceb | Ditiokarbamátok | 86 | 6 |
| Metiram | Ditiokarbamátok | 98 | 3 |
| Metiram | Ditiokarbamátok | 93 | 2 |
| Metiram | Ditiokarbamátok | 100 | 2 |
| Propineb | Ditiokarbamátok | 87 | 1 |
| Ziram | Ditiokarbamátok | 100 | 7 |
| Ziram | Ditiokarbamátok | 89 | 8 |
| Ziram | Ditiokarbamátok | 84 | 6 |
| Penkonazol | DMI | 97 | 3 |
| Penkonazol | DMI | 91 | 3 |
| Tebukonazol | DMI | 100 | 9 |
| Tebukonazol | DMI | 100 | 7 |
| Tebukonazol | DMI | 100 | 7 |
| Spiroxamin | Gyűrűs aminok | 64 | 3 |
| Spiroxamin | Gyűrűs aminok | 0 | 3 |

Major György

| | | | |
|---|---|---|---|
| Folpet | Ftálimidek | 26 | 3 |
| Folpet | Ftálimidek | 61 | 3 |
| Folpet | Ftálimidek | 92 | 2 |
| Fluazinam | Qil | 41 | 10 |
| Azoxistrobin | QoI | 97 | 9 |
| Azoxistrobin | QoI | 100 | 7 |
| Azoxistrobin | QoI | 97 | 6 |
| Azoxistrobin | QoI | 99 | 10 |
| Kresoxim-metil | QoI | 96 | 3 |
| Kresoxim-metil | QoI | 98 | 3 |
| Krezoxim-metil | QoI | 90 | 9 |
| Kresoxim-metil | QoI | 99 | 8 |
| Kresoxim-metil | QoI | 99 | 10 |
| Piraklostrobin | QoI | 100 | 7 |
| Trifloxistrobin | QoI | 98 | 3 |
| Trifloxistrobin | QoI | 100 | 3 |
| Trifloxistrobin | QoI | 98 | 9 |
| Trifloxistrobin | QoI | 99 | 7 |
| Ditianon | Kinolok | 32 | 3 |
| Ditianon | Kinolok | 67 | 3 |
| Kén | Kén | 89 | 1 |
| Kén | Kén | 66 | 2 |
| Kén | Kén | 47 | 2 |
| Kén | Kén | 73 | 2 |

1=teljes vegetációban használva 7-12 napos permetezési fordulóval 2=teljes vegetációban 11-12 permetezés 3=teljes vegetációban használva 12-14 naponta 4=teljes vegetációban használva 10-11 permetezés 5=teljes vegetációban használva 21 naponta 6=négyszer alkalmazva a legfogékonyabb időszakban (1996) 7=négyszer alkalmazva a legfogékonyabb időszakban (1999) 8=négyszer alkalmazva a legfogékonyabb időszakban (1997) 9= négyszer alkalmazva a legfogékonyabb időszakban (2000) 10=teljes vegetációban használva 10-14 napos permetezési fordulóval.

Major György

### 3.3.5. Védekezés ökológiai gazdálkodásban

Ökológiai gazdálkodásban a védekezés sokkal integráltabb szemléletet kell, hogy kövessen a hatékonyság érdekében, mint a konvencionális növényvédőszereket alkalmazó védekezés. A levélnedvesség idejének csökkentésével jelentős eredményeket lehet elérni. Ennek legfontosabb eleme a szellős lombfal kialakítás és főként a fürtzóna kilevelezése (Glits és Folk, 2000). Ez néhány évvel ezelőtt még remekül működő technika volt a feketerothadás elkerülésére. Az egyre erősebb UV sugázás miatt azonban visszaszorulóban van, mert a fürtzóna kilevelezése nélkül is gyakori, hogy a kilógó fürtrészek napégést szenvednek.

Ezen kívül fontos tényező a szőlősorok tájolása, és az uralkodó szélirány. Az ökológiai gazdálkodásban gyakran használt, takarónövények jelenléte viszont lassítja a levélfelület felszáradását, a levegő páratartalmának emelésével (Lőrincz *et al.*, 2015).

### 3.3.6. Réz és kén hatékonysága feketerothadás ellen

Az ökológiai gazdálkodásban használható szerek közül a réz biztosítja a legjobb védelmet a feketerothadás ellen. Persze mint a legtöbb kontakt készítmény ez is csak preventív védekezésre alkalmas. Normál betegségnyomás esetén megfelelő védelmet biztosít, a szintetikus fungicidekhez képest viszont alacsony hatékonyságú. A kísérletek alapján a réz-hidroxid és a réz-oktanoát rosszabb védelmet biztosít, mint az elemi réz (Molitor, és Beyer, 2014).

A leghatékonyabb védekezést ökológiai gazdálkodásban a réz és a kén kombinált alkalmazásával tudták elérni. A kombinációt heti rendszerességgel kellett alkalmazni a maximális védelem eléréséhez (Molitor, és Beyer, 2014). Ez problémás lehet, az ökológiai gazdálkodásban maximálisan kijuttatható rézmennyiség miatt. Ez a mennyiség hét év alatt nem haladhatja meg a hektáronkénti 28 kilogrammot réz ionra számítva (Internet2).

Ahhoz, hogy hatékonyan védekezzünk ökológiai növényvédelemben, szükséges, hogy a réz-szulfát rendszeres használata mellett a fajtaválasztásra és az agrotechnikára is odafigyeljünk. Járványos években mindezek mellett is számottevő károkat okozhat a feketerothadás (Jakab *et al.*, 2020).

### 3.3.7. Feketerothadás ellen használható, új, ökológiai növényvédő szerek

Magyarországon a Biocont kutatásai folynak a feketerothadás elleni hatékony védekezés kifejlesztésére ökológiai szőlőtermesztésben. Több termékük is fejt ki fungicid hatást, ha preventíven alkalmazzák. A SteriClean Plant nevű termékük a betegség megjelenését követően is meg tudta fékezni annak tovább terjedését. Ez a kálium tartalmú termék magas redoxpotenciállal rendelkezik és aktív oxigénformákat képez. A felületen megjelenő konídiumok sejtfalát károsítva fejti ki hatását. Preventíven és rövid ideig a fertőzés után is alkalmazható, de épp ezért csak akkor érhetünk el vele jó eredményt, ha ismerjük a kórokozó biológiáját. A VitiSan nevű termékük kálium-hidrogén-karbonátot tartalmaz, ezt csak preventíven ajánlják hatásfokozóval együtt kijuttatva. Új hatóanyagokkal is kísérleteznek melyek még nem publikusak, de annyit tudni lehet, hogy rézzel és kénnel kombinálva lesznek elérhetőek. Annyi tudható, hogy erős kórokozó nyomás esetén egyik sem ad kielégítő védelmet, ezért várható, hogy az erre irányuló kutatást folytatni fogják, új anyagokkal (Jakab *et al.*, 2020).

### 3.3.8. Biológiai növényvédelmi lehetőségek kutatása *Phyllosticta ampelicida* ellen

A feketerothadás elleni biológiai növényvédelmi módszerek még gyerekcipőben járnak. Találtak már olyan baktériumot, ami bizonyítottan *in vivo* körülmények között is csökkenti a feketerothadás kártételét, de a hatékonysága ennek sem volt kielégítő. Egy Németországban végzett kísérletben 33, potenciálisan antagonista, baktériumot és 18 gomba fajt teszteltek a feketerothadás ellen *in vitro* tenyészetben és üvegházban, tesztnövényeken. Ezek közül csak egy, a *Bacillus subtilis*, bizonyult hatékonynak (Loskill *et al.*, 2010).

Major György

Haggag és Elshahawy (2016) kutatásai alapján a feketerothadás megjelenésének gyakoriságát 50%-kal csökkentette a *Bacillus subtilis* alkalmazása, a *Trichoderma harzianum*-é pedig 53,3%-kal. A kutatásból az is kiderült, hogy ezek hatékonyságát nagymértékben befolyásolja a hőmérséklet és a páratartalom (Haggag és Elshahawy, 2016). Ez persze a biológiai növényvédelem többi szervezetére is igaz, ez sokszor elveszi a gazdák kedvét a további kísérletezéstől. A *Bacillus subtilis* és *Trichoderma harzianum* kombinációja 66,7%-kal csökkentette a feketerothadás előfordulását (Kucuk *et al*., 2014). Ez már megfelelő védelmet nyújthatna egy enyhe fertőzési nyomású évben. De a lisztharmat és peronoszpóra elleni védekezésre használt anyagok mellett valószínűleg teljesen hatástalanná válnak.

### 3.4. Növényi anyagok kutatása *Phyllosticta ampelicida* ellen

Az eddig vizsgált növényi anyagok közül a szaponinokkal végezték a legtöbb kísérletet. Ezeknek nagy hátrányuk a jó vízoldékonyságuk, mely következtében nem maradnak a levél felületén egy reális permetezési forduló idejéig (Loskill *et al*., 2010). A szaponinok alkalmasnak tűntek a laboratóriumi vizsgálatok alapján és nagy reményeket fűztek hozzájuk a kutatók annak tudatában, hogy a *Phyllosticta ampelicida* csírázásához nem kedvez a hidrofil felület, amit a szaponinok létrehoznak a levélen. Ezt a hatást azonban nem sikerült szabadföldön elérni. A szaponinok hatása jóval gyengébb volt, mint *in vitro* körülmények között és minimális csapadék is jelentősen csökkentette a hatékonyságát (Molitor és Beyer, 2014).

Szabadföldi körülmények között vizsgált szaponinok közül a mosódió (*Sapindus sp*.) kivonata bizonyult a leghatékonyabbnak. Ez kénnel kombinálva még jobb eredményeket hozott, de a réz-kén kombinációhoz adva is használható, így növelve a szokásos védekezés hatékonyságát. A kísérletek hatékonysága azonban sem a *Bacillus subtilisnél* sem a szaponin tartalmú anyagoknál nem érte el a réz-szulfát hatékonyágát (Loskill, 2010).

A szaponin tartalmú anyagokon kívül még két olyan növényt találtak, melyek kivonata erős antifungáis hatást mutatott a *Phyllosticta ampelicidával* szemben. A *Primula* fajok gyökerének kivonata és a *Hedera helix* kivonata *in vitro*, a metiramhoz hasonló hatást tudott elérni. A konídium csirázását a *Primula* gyökér kivonat a metirammal azonos mértékben tudta gátolni. A *Hedera helix* kivonata valamivel gyengébb hatékonyságot mutatott (Koch *et al*., 2013).

Üvegházi körülmények között is 90% fölötti védettséget adott a két növényi kivonat. A borostyán kivonatot ebben az esetben 1%-os, a kankalin gyökér kivonatát 0,5%-os töménységben kellett kijuttatni a kívánt hatás érdekében. A Primula gyökér kivonata bizonyult hatásosabbnak, mely ebben az esetben is a metiram hatóanyaggal azonos védelmet biztosított. A protektív védelmet 24 órával a fertőzés előtt végezték el ebben az esetben. A kutatás kuratív védelemre is kiterjedt, melyet 24 órával a fertőzés után hajtottak végre, ám erre egyik növényi kivonat sem volt alkalmas (Koch *et al*., 2013).

Egy 2020-ban folytatott vizsgálatban nyolc növényi kivonat antifungális hatását vizsgálták. Ez a nyolc növényfaj a *Ligustrum lucidum, Sophora japonica, Lonicera japonica, Isatis indigotica, Paeonia lactiflora, Artemisia argyi, Gardenia jasminoides* és a *Coptis chinensis* volt. Ezek a növények mind Kelet-Ázsiában őshonosak. Némi

Major György

antifungális hatást mind a nyolc növény kivonata mutatott, de közülük kettő bizonyult igazán hatékonynak, a *Phyllosticta ampelicida* ellen, *in vitro*, papírkorong diffúziós módszert alkalmazva. A fényes levelű fagyal (*Ligustrum lucidum*) és a japán akác (*Sophora japonica*) kivonata hozott kielégítő eredményt. A fényes levelű fagyal esetében az 50%-os hatás eléréséhez szükséges koncentráció ($EC_{50}$) 0,047 µg/ml volt. Így ez bizonyult a leghatásosabbnak. A japán akác kivonatának $EC_{50}$ értéke 0,108 µg/ml volt. Ez is erős antifungális hatásnak számít. A többi növény kivonata mérsékelt vagy gyenge hatást tudott csak kiváltani (Yang, 2020).

Az antifungális hatás erősségének méréséhez tudnunk kell, hogy mi a minimális koncentráció, amely már gátló hatást vált ki a micélium növekedésére. Ezt a minimum inhibitory concentration rövidítéséből MIC értéknek nevezik. Minél alacsonyabb a MIC értéke, az $EC_{50}$ és $EC_{90}$ értéke annál hatásosabb egy készítmény.

### 3.4.1. Antifungális hatású növényi kivonatok aktív komponensei

A japán akác és a fényes levelű fagyal gomba növekedésgátlásért felelős komponenseit sikerült azonosítania Yang (2020) kutatócsoportjának. A fényes levelű fagyal fő hatóanyaga a ligusztrazin, oleanolsav és az urzolsav volt. A japánakác esetében ezek az anyagok a *sophoraflavanone* G, *matrine*, és az *oxymatrine* voltak (Yang, 2020). A hatóanyagok meghatározása fontos eleme a növényi kivonatokkal való kísérletezésnek. Azokból tudunk következtetni, hogy mely növényeket érdemes kutatni, segít a kivonatok elkészítésében, ha tudjuk, hogy melyik komponens fontos és melyik felesleges a számunkra. Szintetikus növényvédőszerek komponenseit gyakran mintázzák természetes anyagokról, ezért létrehozásukban is elengedhetetlen a bioaktív hatóanyagok ismerete. A kutatások és a hatóanyag fejlesztés egyre specifikusabb növényvédőszerek felé orientálódik, (Sörös, 2019) ezért a természetes eredetű, félszintetikus fungicidek alkalmazásának tendenciája is egyre növekedhet a jövőben .

### 3.4.2. Magyarországon, nagy mennyiségben elérhető, antifungális hatású növények

A NÉBIH egyszerű anyagok listáján szerepel a mezei zsúrló, fűzfa kéreg, csalán, mustármag és a hagymaolaj. Ezek közül azok, amik nagy mennyiségben a többihez képest kifejezetten olcsón hozzáférhetők azok a hagyma és a csalán. A hagymaolaj nem gombaölő hatású, de a hagyma egyéb kivonatai mutattak ilyen hatást. Az egyszerű anyagként felsorolt növények közül a mezei zsúrlót és a fűzfa kérget javasolják szőlőben gombás betegségek ellen. A feketerothadásra azonban nem terjednek ki a leírások, vizsgálatuk. A mustármagnak és a csalánnak is van gombaölő hatása, azonban ezek közül szőlőben csak a csalán kivonatát alkalmazzák és azt sem a gombaölő hatása miatt (Internet3). Ez persze következhet abból, hogy az elsődleges kórokozókkal szemben (lisztharmat, peronoszpóra) nem mutat antifungális hatást. Ezért a feketerothadás ellen való alkalmazását érdemes megvizsgálni. A rézzel és kénnel való kombinált alkalmazásával megelőzhetjük a lisztharmat és a peronoszpóra felszaporodását és így alkalmazható lenne, amennyiben mutat antifungális hatást. Továbbá a kénnek és a csalánnak is van atka ritkító hatása így lehet, hogy a kombinált alkalmazás nagyobb kártevőnyomás mellett is hatásos lehetne.

Major György

### 3.4.3. Csalán

A nagy csalán (Urtica dioica) levelének fő komponensei a flavonoidok, fahéjsavak, szeves savak, illóolajok, szénhidrát-fehérje-polimerek, vitaminok és ásványi anyagok. Ezek közül a flavonoidok lesznek számomra érdekesek, mivel ezeknek a polifenoloknak tulajdonítható a csalán kivonatok antifungális hatása. A flavonoidok a levél korától függően, tömegének 0,7-1,8%-át teszik ki. A nagy csalán flavonoidjai a kempferol-3-O-glükozidot, kempferol-3-O-ramnoglükozidot, kvercetin-3-O-glükozidot, kvercetin-3-O-ramnoglükozidot, izoramnetin-3-O-glükozidot és az izoramnetin-3-O-neohesperidozidot. A flavonoidok bioaktivitása annak köszönhető, hogy ezek a szekunder metabolitok a csalán saját védelmi rendszerének elemei (Kőszegi, 2020).

A csalán antifungális hatása humán gyógyászatban is kutatott terület. *In vitro* és in vivo körülmények között is jó eredményeket értek el vele. Nagy pozitívuma, hogy a csalán kivonatos kezelésnek nem volt mellékhatása (Yongabi *et al*., 2000) A szakirodalmak szerint az antmikrobiális hatásért a rutin és a kvercetin tartalom felelős. Kőszegi (2020) kutatásai alapján azonban a rutin nem mutatott gátló hatást. A kvercetin gátló hatása bebizonyosodott, de fontos a kivonat elkészítésénél, hogy a hőmérséklet ne haladja meg jelentősen a 80 °C-os hőmérsékletet, mert a hatóanyag inaktiválódik magasabb hőmérsékleten.

A szárított levélben a kvercetin-3-O-glükozid mennyisége meglehetősen nagy különbségeket mutat. A szárított levél egy grammjában 0,0024 mg-tól 1,08 mg-ig terjedt. A fiatal, tavasszal szedett levelek tartalmazták a legnagyobb mennyiségben (Kőszegi, 2020).

### 3.4.4. Fokhagyma

A fokhagymát, a csalánhoz hasonlóan, a népi gyógyászat is használja. Antifungális hatást mutat humánpatogén gombáknál, de a növényvédelemben is ismert. Kutatása nagyobbrészt az emberi szervezetre gyakorolt hatását vizsgálta, de egyre több növény patogénes vizsgálatot is folytatnak fokhagymával és különböző kivonataival. 2018-ban *in vitro* körülmények között vizsgálták *Fusarium* és *Rhizopus* fajokra kifejtett növekedés gátló hatását. Ebben a kutatásban az etil-alkoholos kivonatát és a vizes kivonatát hasonították össze. Mindkét kivonat mutatott fungicid hatást, de az alkoholos kivonaté erősebbnek bizonyult. Ennek MIC értéke a *Fusarium spp* esetében 2,5 mg/ml volt, a *Rhisopus spp* estében 5 mg/ml (Abdulaziz *et al*., 2018).

A fokhagyma legerősebb bioaktív komponense a diallil-tioszulfinát, ismertebb nevén az allicin. Az allicin nincs jelen a fokhagymában, csak annak felvágásakor, összezúzásakor keletkezik az allináz enzim hatására. A fokhagyma gerezd friss tömegének körülbelül 0,37%-át teszi ki a keletkező allicin. Emellett nagy mennyiségben van jelen alliin is, de ez a komponens nem mutat fungicid hatást önmagában. Hughes és Lawson (1991) kísérleteiben az összes vizsgált gombafaj érzékenységet mutatott a fokhagyma kivonatra és az allicinre is. A vizsgált baktériumok ellenállóbbnak bizonyultak a gombáknál. A fokhagyma fajtája nem befolyásolta jelentősen a kísérlet eredményét, de a fokhagyma vörös- vagy lilahagymával való helyettesítése viszont jelentős hatékonyság csökkenéssel járt.

Major György

Az allicin (diallil-tioszulfinát) MIC értéke volt a legalacsonyabb a bioaktív hatóanyagok közül. Ezt követte a metil-allil-tioszulfinát, melynek MIC értéke nagyjából a duplája volt. Ezzel azonos erősségűnek bizonyult az allil-metil-tioszulfinát, de csak gombák esetében. Az ajoén is mutatott némi fungicid hatást, baktériumokra azonban teljesen hatástalan volt. Az allicin MIC értéke gombáknál, a legtöbb esetben ≤10 µg/ml. A fokhagyma gerezd homogenizált formájának MIC értéke általában 1000 µg/ml körül volt (Hughes és Lawson, 1991).

Az allicin spóracsírázásra gyakorolt hatásának vizsgálatakor azt figyelték meg, hogy a csírázást már egészen alacsony (<5 µg/ml) koncentrációnál jelentős mértékben gátolja. A hatóanyag jelenlétében is csírázó spórák és azok a spórák, amik az allicin természetes bomlását követően kezdtek csírázni, nem tudtak életképes hífát létrehozni (Yamanda és Azuma, 1977).

## 3.5. *Phyllosticta ampelicida in vitro* tenyésztése

A *Phyllosticta ampelicida in vitro* tenyésztésére általában burgonya dextróz agart (PDA) használnak, melyet sztreptomicinnel, penicilinnel vagy egyéb antibakteriális anyagokkal kezelnek a bakteriális befertőződés megelőzése érdekében. A táptalajt autoklávban sterilizálják majd Petri-csészékbe töltik és lefedve hagyják megszilárdulni (Xu *et al*., 2020).

Az inokulumot, fertőzött levelek kaparékából vagy egyéb fertőzött növényi részekről kaparva, steril vízben eloszlatják. A konídium szuszpenziót szélesztő pálca segítségével elkenik a PDA táptalaj felületén. Ezután a Petri-csészéket 20-25°C-on sötétben inkubálják. A legjobb csírázási arányt a PDA táptalajokon figyelték meg. Ezután következett a zabpehely agar (OA) és a V8 agar (V8A). A V8 agaron és a kukoricadara agaron azonban nagyobb konídium termelés figyelhető meg, mint a PDA táptalajon. A spórák csírázásához ideális hőmérsékletnek 25°C bizonyult. A konídium képzés 20°C-on érte el a maximumot (Xu *et al*., 2020).

A Phyllosticta ampelicida növekedése lassú *in vitro* körülmények között, ezért más, agresszív növekedésű gombák könnyen elnyomhatják a tenyészetet. Az egy spórás tenyészet létrehozása ezért nehéz feladat. Ha a genetikai homogenitás fontos része a kísérletnek, akkor egyspórás tenyészet helyett szaporíthatjuk a hífa hegyének átoltásával is (Molitor és Beyer, 2014).

A pszeudotécium képzés a hőmérséklet és a fény változtatásával érhető el. A pszeudotécium fejlődése már a 25°C-on, sötétben végzett, micélium növekedési szakasz alatt is elkezdődik, de a kifejlődéséhez szükség van 4 hét alacsony (5-15°C) hőmérsékleten tartásra a sötétítés megszüntetése mellett (Jailloux, 1992).

### 3.5.1. *In vitro* fungicides vizsgálatok

A *Phyllosticta ampelicida* tenyészet gombaölő szerekre adott válaszát két féle képpen szokták vizsgálni *in vitro* körülmények között. Ez a két metódus a poisoned food method (mérgezett agar-lemezes módszer) és a filter paper disc method (papírkorong diffúziós módszer) (Zhang et al., 2021).

Major György

### Poisoned food method

Zhang és munkatársai (2021) ezzel a technikával tesztelte fungicidek *Phyllosticta ampelicida* elleni hatékonyságát. Ennél a módszernél a gombaölő szert a táptalajba, ebben az esetben burgonya dextróz agarhoz keverik, abban a koncentrációban, amiben növényvédőszerként alkalmazni szeretnék. Ezt követően a gomba konídiumait a táptalajra oltják. A Petri-csészéket, a micélium növekedéshez optimális körülmények között inkubálják. A gomba növekedését összehasonlítják a fungicid mentes táptalajokon növesztett kontrolléval (Zhang *et al*., 2021).

### Poisoned food method potenciális hibái

Ennél a módszernél mivel a hatóanyag a táptalajban egyenletesen kell jelen legyen, a hatóanyagot meleg táptalajba kell keverni. Ez két problémát vet fel. Az első, hogy magas hőmérsékleten könnyebben lép reakcióba a hatóanyag és a táptalaj valamely komponense. Ez által az anyag mennyisége nem csökken, de inaktívvá válik. A másik probléma, hogy ugyanebből az okból kifolyólag bomlékony anyagok tesztelésére nem alkalmas a módszer. A természetes anyagok pedig általában könnyen bomlanak. Ez problémát jelent a növényvédelmi alkalmazásukban is és jelen kísérletben is kizárja ennek a technikának az alkalmazását.

### Filter paper disc method

Ennél a technikánál az agar alapú, tiszta táptalajra oltjuk a gomba konídiumait. Ezt követően a fungicidet kívánt koncentrációra hígítjuk és bele áztatunk egy szűrőpapír korongot. A szűrőpapírt az inokulált táptalaj felszínére helyezzük és inkubáljuk a Petri-csészéket. A kontroll csészékbe is helyezünk papír korongot, de azt steril vízbe áztatjuk. Az inkubácós idő leteltével összehasonlítjuk a fungicides és a kontroll csészékben nőtt micéliumok méretét (Yang *et al*., 2020).

### Filter paper method potenciális hibái

A vizsgálati módszer valamivel közelebb áll szabadföldi kísérletekhez, abban a tekintetben, hogy a hatóanyag jelentős része a táptalaj felszínén marad. Persze bizonyos mennyiség diffúzióval bekerül a táptalajba, de ez által a koncentráció is csökken.

Major György

# 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

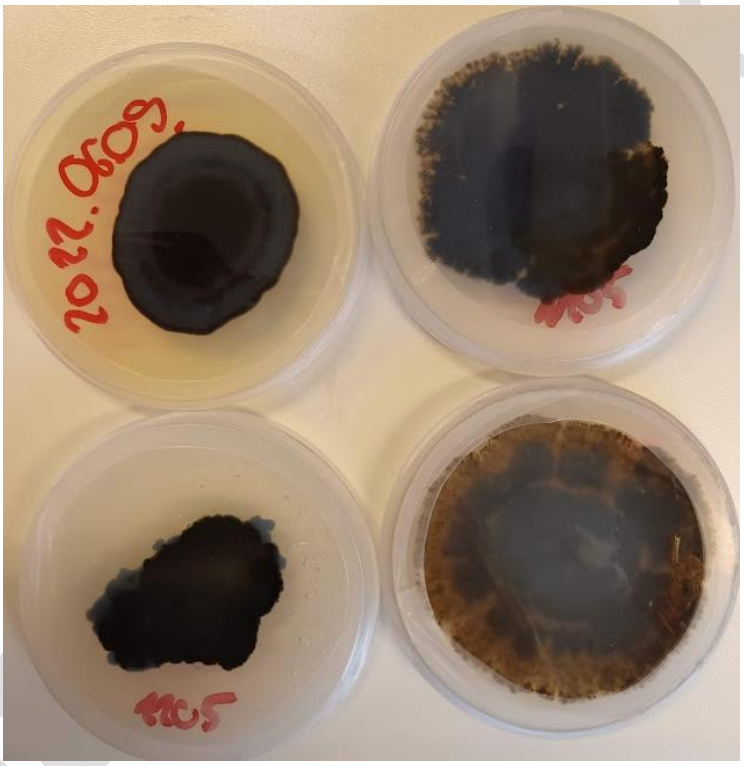
## 4.1. A vizsgálat helye és ideje

A kísérletet a MATE Budai Campusán végeztem, a Növényvédelmi intézet, Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában, 2023.03.02.-2023.04.18. között.

## 4.2. A vizsgálat anyaga

### 4.2.1. A kísérlet során használt izolátum

A vizsgálatokhoz a PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetéből származó *Phyllosticta ampelicida* izolátumot használtam fel (2. ábra). Az izolátumot ifj. Dr. Kozma Páltól kaptam.




2. ábra: A felhasznált *Phyllosticta ampelicida* izolátumok

### 4.2.2. Felhasznált eszközök

Vizsgálatainkhoz az általános laboratóriumi üveg- és fémeszközöket és 85 mm átmérőjű steril műanyag Petri-csészéket használtunk. Az *in vitro* kísérleteket Thermo Scientific MSC 1.2 lamináris fülke alatt végeztük. A tenyészetek inkubálásához Sanyo MLR-351 fitotront használtunk.

### 4.2.3. Táptalaj

Vizsgálataink során burgonya-dextróz agar (PDA, Biolab) táptalajt (19,5 g PDA, 500 ml végtérfogatra növelve desztillált vízzel) használtunk.

### 4.2.4. Felhasznált anyagok

A felhasznált anyagok kiválasztásánál a fő szempontjaim azok voltak, hogy a készítmények minél kevesebb adalék anyagot tartalmazzanak, könnyen homogenizálható formában legyen bennük a hatóanyag és ne tartalmazzanak tartósító szert, mivel az a gombákra valószínűleg jelentős hatást gyakorolna. A legtisztább formában mindkét anyagot tápálékkiegészítőben találtam meg növényi kapszulában. A kapszula tartalma meghatározott hatóanyag mennyiségű és adalékanyagként kizárólag csomósodásgátlót tartalmaz. Ennek ellenére is nagy eltérés volt a hatóanyag koncentrációjában, ami a kimért, szükséges mennyiségeknél mutatkozik meg (4. táblázat). Az allicin esetében olyan készítményt kerestem, amiben az allicin stabilizált formában van jelen, a gyors bomlás elkerülése érdekében.

- Kvercetin: Quercetin kapszula (GymBeam)
- Allicin: Allimax kapszula (Allicin international limited)
- Réz-szulfát: Cuproxat FW (Nufarm)

4. táblázat: A különböző hatóanyag dózisokhoz szükséges mennyiség a felhasznált készítményekből

| | 1 µg/ml | 10 µg/ml | 100 µg/ml | 1000 µg/ml |
|---|---|---|---|---|
| Quercetin kapszula | 12,2 µg | 122 µg | 1220 µg | 12200 µg |
| Allimax kapszula | 33,33 mg | 333,33 mg | 3333,33 mg | - |
| Cuproxat FW | $2{,}86 \times 10^{-5}$ ml | $2{,}86 \times 10^{-4}$ ml | $2{,}86 \times 10^{-3}$ ml | $2{,}86 \times 10^{-2}$ ml |

### 4.2.5. Számítások

<u>Kvercetin</u>

2 db (kapszula) → 475 mg (hatóanyag)

1 db (kapszula) → 237,5 mg (hatóanyag)

1 db (kapszula) → 290 mg (töltőanyag)

290 mg (töltőanyag) → 237,5 mg (hatóanyag)

1,22 mg (töltőanyag) → 1 mg (hatóanyag)

1,22 µg (töltőanyag) → 1 µg (hatóanyag)

12,2 µg (töltőanyag) → 10 µg (hatóanyag)

122 µg (töltőanyag) → 100 µg (hatóanyag)

1220 µg (töltőanyag) → 1000 µg (hatóanyag)

<u>Allicin</u>

1 db (kapszula) → 180 mg (töltőanyag)

180 mg (töltőanyag) → 54 µg (hatóanyag)

333,33 mg (töltőanyag) → 100 µg (hatóanyag)

3,33 mg (töltőanyag) → 1 µg (hatóanyag)

Major György

33,33 mg (töltőanyag) → 10 µg (hatóanyag)

333,33 mg (töltőanyag) → 100 µg (hatóanyag)

3333,33 mg (töltőanyag) → 1000 µg (hatóanyag)

<u>Réz-szulfát</u>

1000 ml (növényvédőszer) → 350 g (hatóanyag)

1 ml (növényvédőszer) → 350 000 µg (hatóanyag)

$2{,}86 \times 10^{-6}$ ml (növényvédőszer) → 1 µg (hatóanyag)

$2{,}86 \times 10^{-5}$ ml (növényvédőszer) → 10 µg (hatóanyag)

$2{,}86 \times 10^{-4}$ ml (növényvédőszer) → 100 µg (hatóanyag)

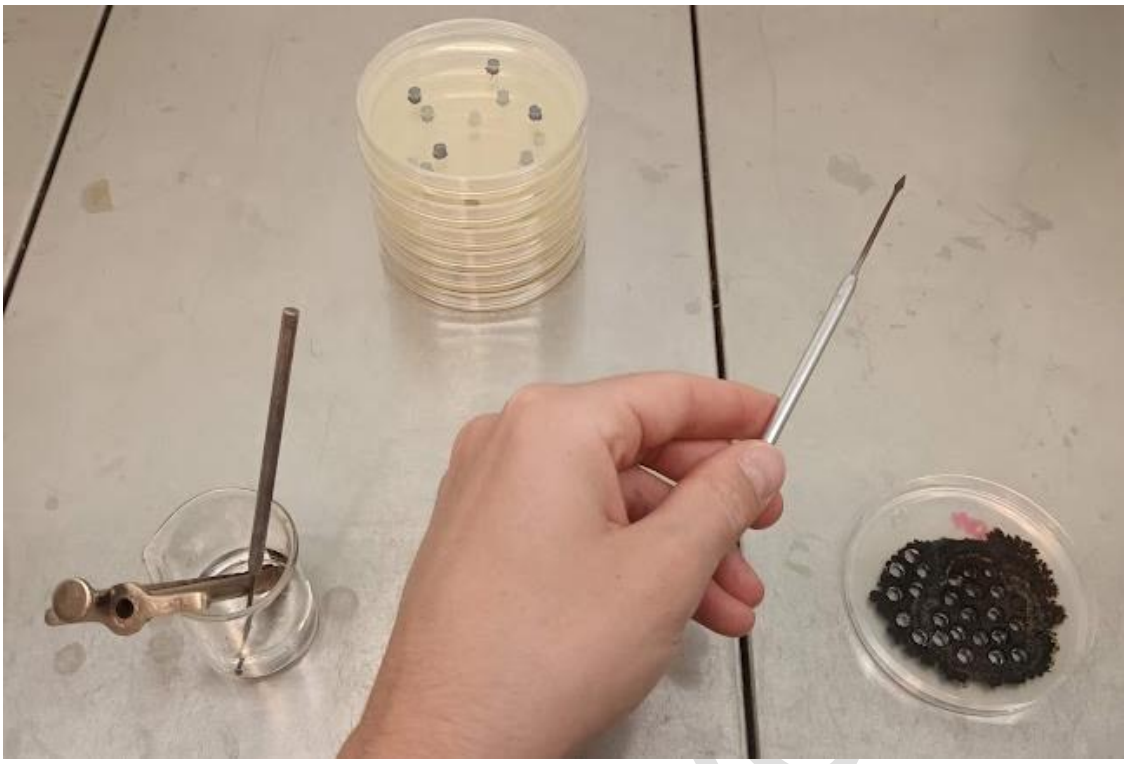
$2{,}86 \times 10^{-3}$ ml (növényvédőszer) → 1000 µg (hatóanyag)

## 4.3. A vizsgálat módszere

### 4.3.1. A kórokozó átoltása

A Pécsről származó tiszta tenyészetekből átoltást végeztünk az alábbi módon:
A tiszta tenyészetekből 7 mm átmérőjű steril dugófúróval azonos méretű micélium korongokat vágtam ki lamináris fülkében. Ezt követően steril lándzsatűvel áthelyeztem a korongokat, antibiotikummal kezelt PDA táptalajra, felszínükkel lefelé (3. ábra). Egy Petri-csészébe 4 korongot helyeztem úgy, hogy a csésze falától való távolsága körülbelül fele legyen a mellette lévő korongtól mért távolságnak, ez által a lehető legnagyobb helyet biztosítsam azok növekedéséhez. 44 Petri-csészébe végeztem az átoltást, így összesen 176 micélium koronggal indítottam a kísérletet.

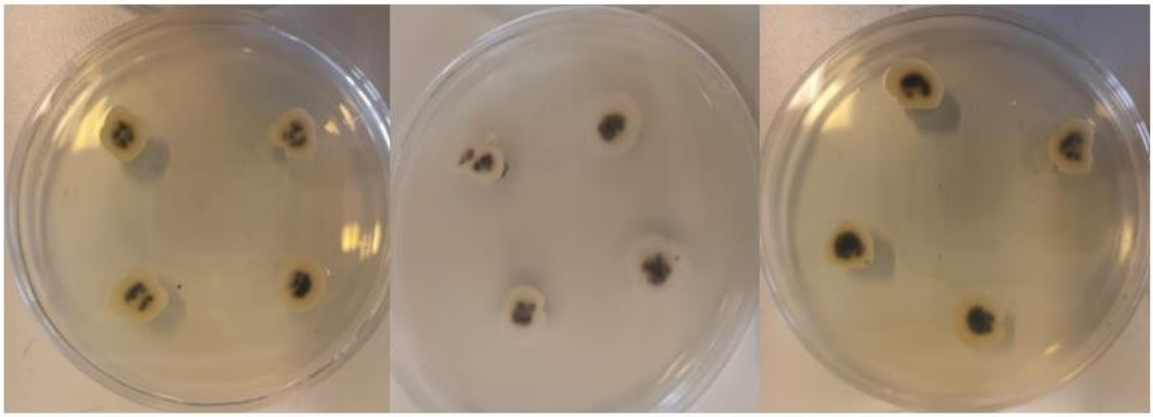
Major György

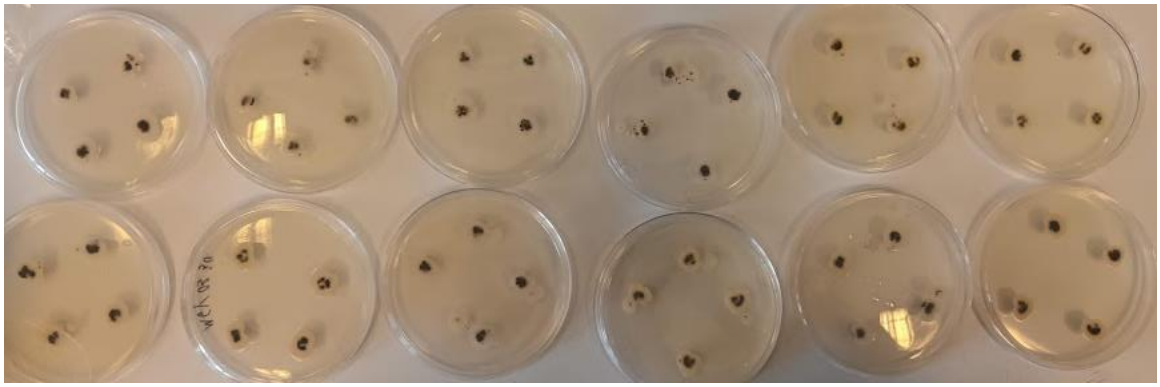


3. ábra: Az átoltás folyamata (Fotó: Major, 2023)

### 4.3.2. Az allicin és a kvercetin hatásának vizsgálata a micélium növekedésére

A vizsgálatok során a papírkorong diffúziós módszert alkalmaztam. A szűrőpapír korongot egy héttel az átoltás után helyeztem a növekedésnek indult micéliumkorongok (4. ábra) mellé közvetlenül. A hatóanyagokkal átitatott papírt azért nem rögtön az átoltás után helyeztem a csészébe, hogy a kísérletben csak olyan telepek szerepeljenek melyek növekedési erélye azonos.





4. ábra: A *Phyllosticta ampelicida* tenyészetek egy héttel az átoltást követően (Fotó: Major, 2023)

### 4.3.3. A vizsgált koncentrációk beállítása

Próbáltam úgy meghatározni a koncentrációt, hogy ne csak a MIC de az $EC_{50}$ értékre vonatkozóan is tudjak következtetéseket levonni. Az irodalmi adatok meglehetősen alacsony koncentrációkat jelöltek meg MIC értékként és a két növényi metabolit MIC értéke között egy nagyságrend különbség is volt. Úgy döntöttem, hogy nagyon alacsony koncentrációról indulva, négy hatóanyag mennyiséggel végzem el a kísérletet. A beállított koncentrációk így lettek minden hatóanyag esetében: 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml és 1000 µg/ml.

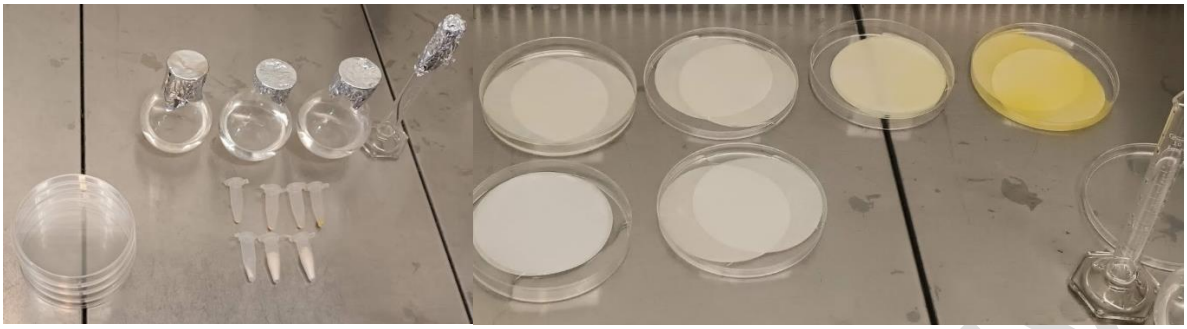
Azokban az esetekben, ha nagyon alacsony hatóanyagkoncentrációra volt szükség, hígítási sort készítettem. A réz-szulfát esetében, mivel térfogatra volt megadva a hatóanyag mennyiség, csak hígítási sorral mértem ki a szükséges hatóanyag mennyiséget (5. ábra).

5. ábra: Balról a réz hígítási sora, Középen a kvercetin kimért mennyiségei a hígítás előtt, jobbról pedig az allicin kimért mennyiségei hígítás előtt (Fotó: Major, 2023)

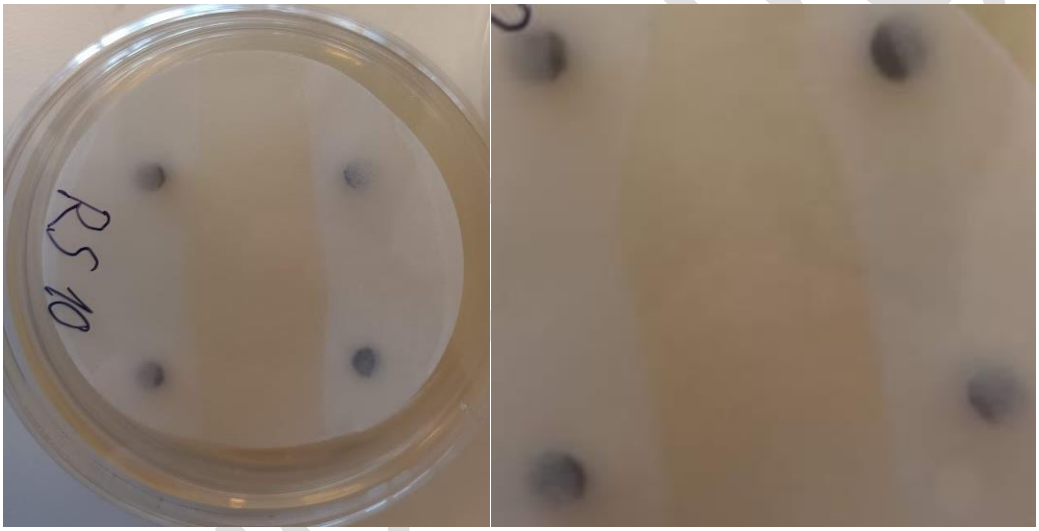
A számításokból kapott mennyiségeknek a tízszeresét mértem ki, mert 10 ml steril vízben lettek homogenizálva vortex-szel. A homogenizált szuszpenziókat Petri-csészébe öntöttem, majd a sterilizált szűrőpapírkorongokat felszívattam benne (6. ábra). Ezt követően a felszívatott papírkorongokat a gombatelepek közé helyeztem úgy, hogy a papír minél közelebb legyen a gombatelepekhez, de ne érjen hozzájuk (7. ábra). Minden koncentrációval és a steril vizes kontrollal is 8 ismétlést állítottam be. Az allicin esetében az 1000 µg/ml

Major György

koncentrációt sajnos nem tudtam beállítani, mert nem tudtam az Allimax kapszula töltőanyagát feloldani ehhez szükséges koncentrációban. A kísérletet összesen 104 gombateleppel végeztem el.



6. ábra: A kvercetin és az allicin dozírozása, szűrőpapírkorongok felszívatása (Fotó: Major, 2023)




7. ábra: A micélium korongok közé helyezett, hatóanyag szuszpenzióba áztatott papírkorongok (Fotó: Major, 2023)

A papírkorongok felhelyezését követően a Petri-csészéket visszahelyeztem a fitotronba, majd két héten keresztül figyeltem a micéliumok növekedését, a gomba lassú növekedése miatt. A számításokhoz felhasznált adatokat a két hét után, a micélium korongok növekedésének mérésével nyertem. Egy micéliumkorong két, egymásra merőleges átmérőjét mértem meg. Minden hatóanyag egy adott dózisával kezelt micéliumok növekedése közül négyet mértem meg. Azért nem mindet mértem meg, mert volt olyan telep, ami több pontból indult növekedésnek vagy befertőződött. Azoknál a dózisoknál, ahol akár mind a 8 telep megfelelő lett volna, ott a legkisebb és legnagyobb kettőt nem használtam fel a számítások során. A kapott adatokat ezután Excel táblába írtam majd a szemléltetéshez kiválasztottam a doboz diagramot, ami ebben az esetben szerintem a leghitelesebben adja vissza a valós eltéréseket (9. ábra, 10. ábra, 11. ábra).

# 5. EREDMÉNYEK, DISZKUSSZIÓ

A kísérletben a kvercetin, az allicin és a réz-szulfát *Phyllosticta ampelicidára* gyakorolt micélium növekedésgátló hatását vizsgáltam. A tesztelt dózisokat az alapján állítottam be, hogy más gombákra mekkora koncentrációnál mutattak gátló hatást.

Azt tapasztaltam az első hét után, hogy várakozásaim ellenére a micéliumkorongok továbbra is egyöntetűen növekednek mind a kvercetinnel mind az allicinnel kezelt Petri-csészékben. Az egyedüli eltérést a réz-szulfáttal kezelt csészékben tapasztaltam a legmagasabb (1000 µg/ml) dózisnál. A második hét elteltével már a 100 µg/ml-es dózisú réz-szulfátos Petri-csészékben is lehetett látni némi eltérést (8. ábra). A növényi anyagok közül az allicin esetében volt enyhe hatás tapasztalható.

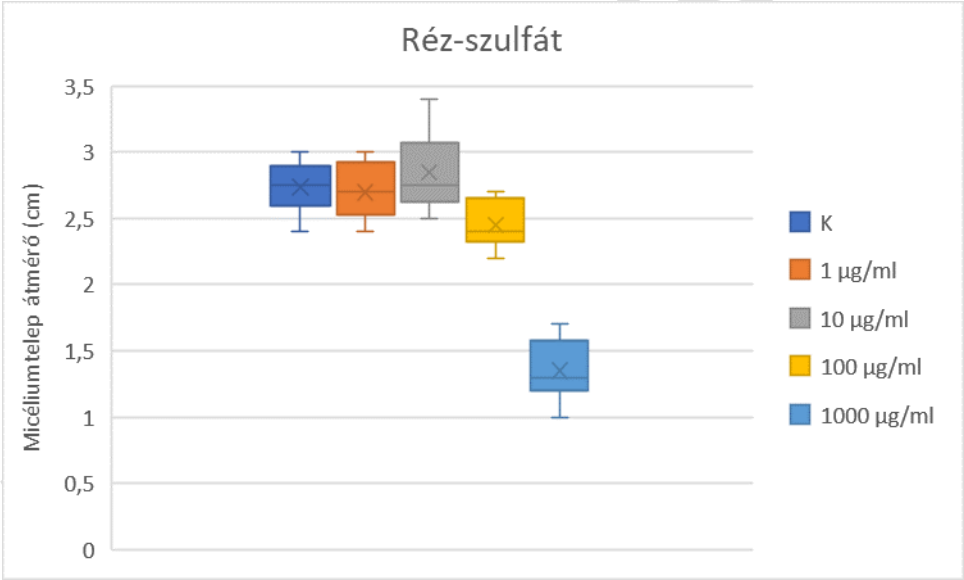
8. ábra: A réz-szulfáttal kezelt micélium korongok, két héttel a kezelés után (Fotó: Major, 2023)

Major Gyöngy

## 5.1. A réz-szulfát hatása a micéliumnövekedésre

A mérések eredménye alapján a réz-szulfát váltott ki növekedésgátló hatást a *Phyllosticta ampelicida* gombával szemben (9. ábra). MIC értéke 10 µg/ml és 100 µg/ml között van a papírkorong diffúziós módszer alkalmazása mellett. $EC_{50}$ értéke ezzel a módszerrel 100 µg/ml és 1000 µg/ml közötti koncentrációnál van.

| Réz-szulfáttal kezelt micéliumok átmérője (cm) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| K | 3 | 2,9 | 2,9 | 2,7 | 2,4 | 2,6 | 2,8 | 2,6 |
| 1 µg/ml | 2,7 | 2,6 | 3 | 2,5 | 2,7 | 2,4 | 2,7 | 3 |
| 10 µg/ml | 2,5 | 2,7 | 2,7 | 3,4 | 2,8 | 3 | 2,6 | 3,1 |
| 100 µg/ml | 2,4 | 2,3 | 2,7 | 2,4 | 2,7 | 2,4 | 2,2 | 2,5 |
| 1000 µg/ml | 1,6 | 1,5 | 1,2 | 1,7 | 1 | 1,2 | 1,2 | 1,4 |

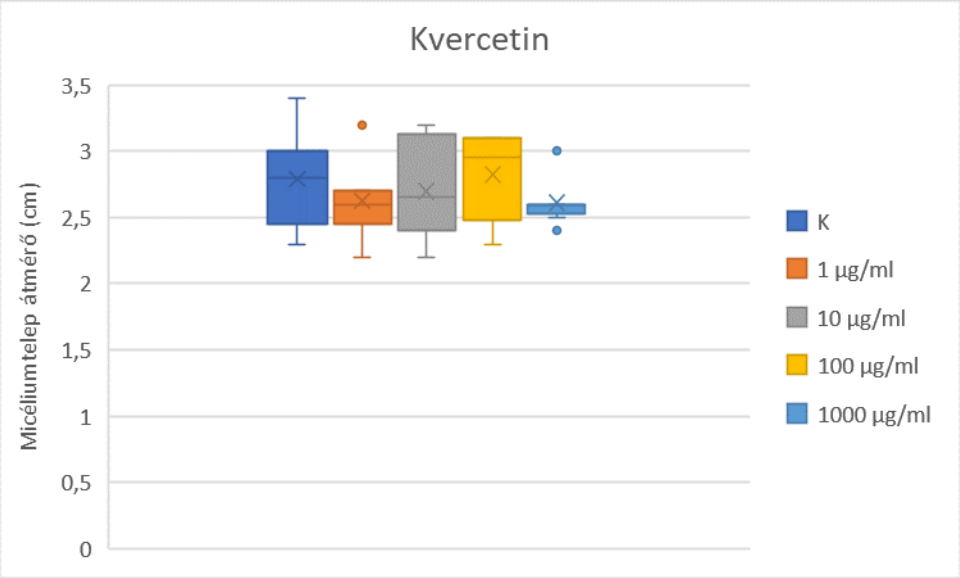



9. ábra: A réz-szulfát hatása a *Phyllosticta ampelicida* micéliumának átmérőjére.
X= az értékek átlaga, vízszintes vonal= medián, négyzet (doboz)= az értékek középső 50%-a, függőleges szakasz= összes érték tartománya

## 5.2. A kvercetin hatása a micéliumnövekedésre

A mérések eredménye alapján a kvercetin MIC értéke 1000 µg/ml fölött van a *Phyllosticta ampelicida* gombával szemben, papírkorong diffúziós módszer alkalmazásával (10. ábra).

| Kvercetinnel kezelt micéliumok átmérője (cm) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| K | 2,6 | 3 | 3,4 | 2,3 | 2,7 | 2,4 | 3 | 2,9 |
| 1 µg/ml | 2,7 | 2,2 | 2,6 | 2,6 | 2,6 | 2,7 | 3,2 | 2,4 |
| 10 µg/ml | 2,9 | 2,2 | 2,7 | 2,4 | 3,2 | 2,4 | 2,6 | 3,2 |
| 100 µg/ml | 3,1 | 3,1 | 2,4 | 2,3 | 3,1 | 2,7 | 2,9 | 3 |
| 1000 µg/ml | 2,6 | 2,6 | 3 | 2,6 | 2,4 | 2,6 | 2,5 | 2,6 |

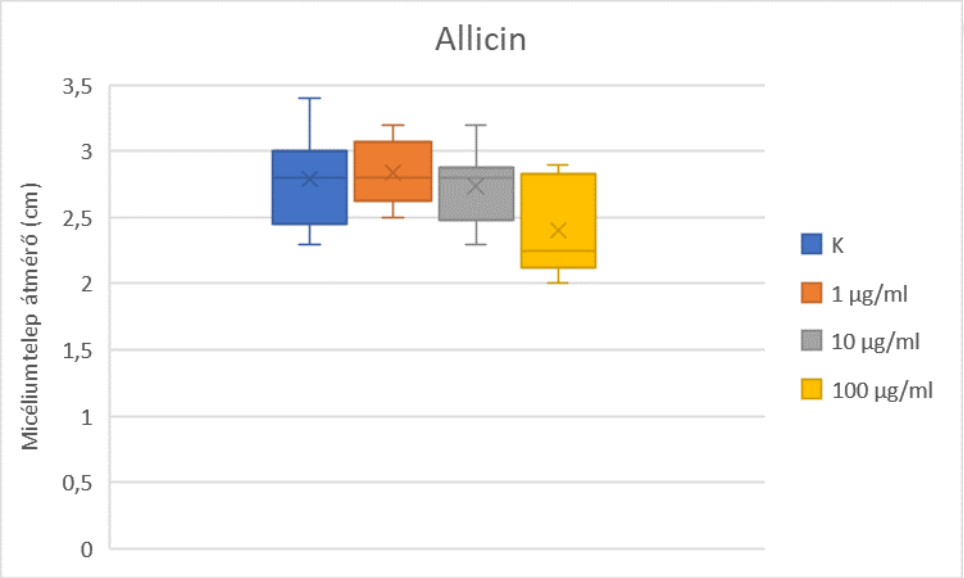



10. ábra: A kvercetin hatása a *Phyllosticta ampelicida* micéliumának átmérőjére.
X= az értékek átlaga, vízszintes vonal= medián, négyzet (doboz)= az értékek középső 50%-a, függőleges szakasz= összes érték tartománya (kivéve a kiugró értékek), pont= kiugró értékek

## 5.3. Az allicin hatása a micéliumnövekedésre

A mért adatok alapján, az allicin *Phyllosticta ampelicida* növekedésével szemben mutatott MIC értéke 10 µg/ml és 100 µg/ml között van (11. ábra).

| Allicinnel kezelt micélium átmérője (cm) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| K | 2,6 | 3 | 3,4 | 2,3 | 2,7 | 2,4 | 3 | 2,9 |
| 1 µg/ml | 2,6 | 2,5 | 2,8 | 3,2 | 2,8 | 3,1 | 2,7 | 3 |
| 10 µg/ml | 2,4 | 2,8 | 3,2 | 2,3 | 2,8 | 2,8 | 2,9 | 2,7 |
| 100 µg/ml | 2,6 | 2,2 | 2,3 | 2,2 | 2 | 2,9 | 2,9 | 2,1 |




11. ábra: Az allicin hatása a *Phyllosticta ampelicida* micéliumának átmérőjére.
X= az értékek átlaga, vízszintes vonal= medián, négyzet (doboz)= az értékek középső 50%-a, függőleges szakasz= összes érték tartománya

## 5.4. Következtetések

Összegezve, a réz-szulfát MIC értéke >10 µg/ml és ≤100 µg/ml, $EC_{50}$ értéke pedig >100 µg/ml és <1000 µg/ml. Az allicin MIC értéke >10 µg/ml és ≤100 µg/ml, a kvercetin MIC értéke pedig >1000 µg/ml a *Phyllosticta ampelicida* micéliumnövekedése esetében, papírkorong diffúziós módszerrel végzett kísérlet alapján.

A kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy ezek a növényi anyagok nem alkalmasak az ökológiai termesztésben átvenni a réz hatóanyagú növényvédőszerek helyét. Kombinált kijuttatása sem indokolt, mert a lisztharmat és peronoszpóra ellen kijuttatott réz és kén annak ellenére, hogy sokszor nem biztosít kellő védelmet a feketerothadás ellen, még így is jobb hatékonysággal bír, mint az allicin vagy a kvercetin. Még ha a réz-szulfáttal azonos hatékonyságot mutattak volna, se lenne megoldva a probléma mivel az sem biztosít kellő védelmet és ezek a természetes anyagok ráadásul gyors bomlásúak. Gyakorlatban hasznuk csak akkor lehetne, ha a hatékonyságuk jelentősen meghaladná a réz-szulfátét.

A kísérlet eredményét befolyásoló tényezők közül szeretnék néhányat kiemelni. Úgy gondolom, hogy minél kisebb kezdeti micéliumkoronggal végezzük a kísérletet annál erősebb hatást tudunk kiváltani. Ez nem változtat a kapott eredményeken mivel a kezdeti micéliumok mérete egyöntetű volt, csak magyarázhatja miért volt szükség ilyen magas dózisra a hatás eléréséhez. Az agresszív növekedésű „edzett" szaporítóanyag is hasonló hatással lehetett és akár az anyagok eltérő diffundálása is befolyásolhatta az eredményt. Mindemellett úgy gondolom, hogy a kísérlet tükrözi ezeknek az anyagoknak a hatékonyságát és legfőképp az azok közti különbségeket.

Major György

# 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az ökológiai szőlőtermesztők a réz és kén alkalmazása mellett is küzdenek a feketerothadás okozta károkkal. Ennek a problémának a megoldásához fontos a növényi anyagok antifungális hatásának vizsgálata, mely ennek a dolgozatnak a célja. Elkészítése közben és a kísérlet megtervezésénél számításba vettem a temérdek különféle antifungális hatású növényi anyag mellett azt is, hogy ezek közül melyek gyakorlati alkalmazása reális. Így esett a választásom a kvercetinre és az allicinra. Ennek a két anyagnak a hatását hasonlítottam össze a réz-szulfát *Phyllosticta ampelicida* micélium növekedésére gyakorolt hatásával. A kísérletet papírkorong diffúziós módszerrel végeztem, mivel az *in vitro* technikák közül ez hasonlít jobban a gyakorlati alkalmazáshoz és ezt a módszert lehet ezekkel a könnyen bomló anyagokkal hatóanyagcsökkenés nélkül elvégezni. A kísérlet beállításánál megvizsgáltam az irodalmi adatok alapján valószínűsíthető szükséges hatóanyag koncentrációkat, és mindhárom anyagnál azonos koncentrációkon vizsgáltam meg azok micéliumnövekedésre gyakorolt hatását. A kapott eredmények alapján a réz-szulfát hatása egyértelműen látszott. Az allicin hatása ránézésre kevésbé volt látványos, de a mérések alapján úgy tűnt, hogy mutat antifungális hatást. A kvercetinnek nem volt kimutatható hatása a vizsgált koncentrációkban a *Phyllosticta ampelicida* ellen. A kapott eredményekből arra a következtetésre jutottam, hogy ezek a növényi anyagok nem alkalmasak a réz-szulfáttal kezelt szőlőben csökkenteni a feketerothadás kártételét. Érdemes lenne a konídiumcsírázásra gyakorolt hatását is megvizsgálni ezeknek az anyagoknak. Jelen vizsgálat során nem állt rendelkezésre megfelelő mennyiségű konídium ennek a vizsgálatnak az elvégzéséhez.

Összességében a kísérletet és az abból szerzett információkat hasznosnak gondolom. A kísérlet üvegházi vagy szabadföldi körülmények közti folytatását nem érzem indokoltnak, abból az általános tapasztalatból kifolyólag, hogy egy kísérlet minél közelebb kerül a gyakorlathoz annak hatékonysága egyre csökken.

Major György

# 7. KÖSZÖNET NYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni a dolgozat elkészítésében és a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségét Dr. Tóth Annamáriának és Szendrei Lillának!

Major György

# 8. IRODALOMJEGYZÉK


1. Abdulaziz B. K., Musa D. D., Aisha H., (2018) antifungal activity of garlic (*Allium Sativum*) extract on some selected fungi, 12-13
2. Andreu, V., Levert, A., Amiot, A. et al. (2018) Chemical composition and antifungal activity of plant extracts traditionally used in organic and biodynamic farming. Environ Sci Pollut Res 25, 29971–29982
3. Bettinelli, P., Nicolini, D., Costantini, L., Stefanini, M., Hausmann, L., Vezzulli, S., (2023) Towards Marker-Assisted Breeding for Black Rot Bunch Resistance: Identification of a Major QTL in the Grapevine Cultivar 'Merzling'. Int. J. Mol. Sci. (2.fig)
4. CHARLES S. C. (1909) Bordeaux mixture, 5-6
5. Donkó Á., Hajdu E., Kenyéri Z., Németh K., Horváth H., Szőke L., (2018) Bioszőlő, biobor, 137-287
6. Ferrin, D.M., Ramsdell, D.C. (1978) Influence of conidia dispersal and environment on infection of grape by *Guignardia bidwellii*. Phytopathology, 68:892-895
7. Glits M. és Folk Gy. (szerk.), (2000) Kertészeti Növénykórtan. Budapest: Mezőgazda Kiadó.
8. Haggag, W. M. and Elshahawy, I. E. (2016) Evaluation of some biocontrol agents for controlling grapevine black rot caused by *Guignardia bidwellii*. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 49(7-8), 363-374
9. Hughes, B. G. és Lawson, L. D., (1991) Antimicrobial Effects of *Allium sativum* L. (Garlic), -. *Allium ampeloprasum* L. (Elephant Garlic), and *Allium cepa* L. (Onion), Garlic Compounds and Commercial Garlic Supplement Products 154-158
10. Jailloux, F., (1992) *In vitro* production of the teleomorph of *Guignardia bidwellii*, causal agent of black rot of grapevine. Canadian Journal of Botany. 70(2): 254-257
11. Jakab M., Kozma P., Tóth Á., (2020) Biológiai növényvédelem a szőlő feketerothadás ellen, Kertészet és Szőlészet 2020/42, 20-21
12. Koch, E., Enders, M., Ullrich, C. (2013) Effect of *Primula* root and other plant extracts on infection structure formation of *Phyllosticta ampelicida* (asexual stage of *Guignardia bidwellii*) and on black rot disease of grapevine in the greenhouse. J Plant Dis Prot 120, 26–33
13. Kőszegi L., (2020) A nagy csalán (*Urtica dioica* L.) extraktumainak és bioaktív komponenseinek vizsgálata, Doktori (Ph.D.) értekezés 21-84
14. Kucuk, C., Kivanc, M., Akkopru, A., and Uysal, H. (2014) The efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma spp*. for the control of black rot disease (*Guignardia bidwellii*) in grapevine. Journal of Plant Diseases and Protection, 121(3), 98-105
15. Loskill, B., Kortekamp, A., Harms, M., Koch, E., Berkelmann-Löhnertz, B., Molitor, D., Maixner, M., (2010) Black rot (*Guignardia bidwellii*) of vine - infection prevention and disease regulation in organic viticulture, 80


Major György

16. Loskill, B., Molitor, D., Koch, E., Kortekamp, A., Berkelmann-Löhnertz, B., Harms, M., Hoffmann, C., Maixner, M. (2010) Control strategies for black rot (*Guignardia bidwellii*) in organic viticulture. No.428 375-376
17. Lőrincz A., Sz. Nagy L., Zanathy G. (2015) Szőlőtermesztés, 490-492
18. Molitor, D., és Beyer, M., (2014) Epidemiology, identification and disease management of grape black rot and potentially useful metabolites of black rot pathogens for industrial applications – a review, 308-314
19. Molitor, D., Fruehauf, C., Baus, O., and Berkelmann-Loehnertz, B. (2012) A cumulative degree-day-based model to calculate the duration of the incubation period of *Guignardia bidwellii*. Plant Dis. 96:1054
20. Monchiero, M., Gullino, M. L., Garibaldi, A., (2016) Efficacy of different strategies to control *Guignardia bidwellii*: results of two years trials in Piemonte, Italy. 21-27
21. Pirrello C, Mizzotti C, Tomazetti TC, Colombo M, Bettinelli P, Prodorutti D, Peressotti E, Zulini L, Stefanini M, Angeli G, Masiero S, Welter LJ, Hausmann L and Vezzulli S (2019) Emergent *Ascomycetes* in Viticulture: An Interdisciplinary Overview. Front. Plant Sci. 10:1394
22. Ranjitham, M. T., Khan, S. H. A., Sriramulu, M., & Sreeramulu, M. S. S. (2018) Integrated management of grape diseases using conventional and biological methods: a review. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 51(1-2), 1-23
23. Roznik D. (2019) A feketerothadás (*Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala et Ravaz) elleni rezisztencia források azonosítása és felhasználhatósága a szőlő rezisztencia nemesítésében 21
24. Šernaitė, L., (2017) Plant extracts: antimicrobial and antifungal activity and appliance in plant protection (Review), 58-64
25. Sörös Cs., (2019) Növényvédelmi kémia és toxikológia, 14-24
26. Willer, H. és Zanoli, R. (2000) Organic Viticulture in Europe, 28
27. Xu, X., Wang, X., Ren, J., Liu, J., Li, S., Zhang, L., & Xu, Y. (2020) Effects of media and incubation temperature on *in vitro* spore germination and conidiation of *Guignardia bidwellii*, a grapevine pathogenic fungus. Plant Disease, 104(7), 1928-1935
28. Yamanda, Y., és Azuma, K., (1977) Evaluation of the *In Vitro* Antifungal Activity of Allicin 744-746
29. Yang, X., Liu, X., Wang, J., Liu, Q., & Wang, L. (2020) Antifungal activity and active ingredients of extracts from eight plant species against grapevine pathogen *Guignardia bidwellii*, 15
30. Yongabi, K. A., Dukku, U. H., Agho, O., Chindo, I. Y., (2000) Studies On The Antifungal Properties Of *Urtica Dioica; Urticaceae* (Stinging Nettle), 40
31. Zhang, J., Cao, Y., Zhang, Y., Li, Y., & Li, Y. (2021) Evaluation of fungicides against *Guignardia bidwellii*, causal agent of grape black rot, *in vitro* and *in vivo*. Crop Protection, 143

Major György

**Internetes források:**


1. Internet1: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi (Felkeresve: 2023.04.03.)
2. Internet2: https://portal.nebih.gov.hu/-/okologiai-gazdalkodasban-hasznalhato-egyszeru-anyagok (Felkeresve: 2023.03.01.)
3. Internet3: https://www.biokontroll.hu/az-okologiai-gazdalkodasban-engedelyezett-reztartalmu-szerek-tenyleges-rezcuion-tartalma/ (Felkeresve: 2023.03.18.)


Major György

# NYILATKOZAT

**A diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről**

A hallgató neve: Major György

A Hallgató Neptun kódja: SA2Z92

A dolgozat címe: AZ ALLICIN ÉS A KVERCETIN HATÁSA A *PHYLLOSTICTA AMPELICIDA* MICÉLIUMNÖVEKEDÉSÉRE, *IN VITRO*

A megjelenés éve: 2023

A konzulens tanszék neve: Növénykórtani tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlant állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemitulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: 2023.05.02

Hallgató aláírása

**KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT**

A MAJOR GYÖRGY (név) (hallgató Neptun azonosítója: SA2Z92) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfólió[1] áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom[2].

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*[3]

Kelt: 2023 év 05 hó 02. nap

Tóth Anna

Belső konzulens

[1] A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.
[2] A megfelelő aláhúzandó.
[3] A megfelelő aláhúzandó.