Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Növényvédelmi Intézet

Kajszi fapusztulás a gönci termőtájon

Petres Martin
Növényorvos MSc, I. évfolyam

Belső konzulens: Dr. Körösi Katalin
egyetemi adjunktus, MKK, Növényvédelmi intézet

Külső konzulens: Dr. Szabó Zoltán
ügyvezető, Balaton Fruit Kft

Külső konzulens: Dr. Várallyay Éva
NAIK, MBK tudományos főmunkatárs

Külső konzulens: Czotter Nikoletta
NAIK, MBK, tudományos segédmunkatárs

Gödöllő
2016

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések 4
2. Irodalmi áttekintés 5
   2.1. A kajszibarack eredete 5
   2.2. A kajszibarack ökológiai igénye 5
      2.2.1. Fagytűrés 6
   2.3. A kajszibarack gazdasági jelentősége 7
   2.4. A kajszi hirtelen pusztulásának, gutaütésének okai 8
   2.5. A gutaütés tünettípusai 9
   2.6. A fitoplazmák felépítése és szerkezete 9
   2.7. A fitoplazmák fertőzés mechanizmusa és terjedése 10
   2.8. Védekezési lehetőségek a fitoplazmás betegségek ellen 11
3. Anyag és Módszer 12
   3.1. A mintavételi terület leírása 12
   3.2. A vizuális tünetmegfigyelés 12
   3.3. Növényi minták 13
   3.4. DNS kivonás 13
   3.5. Polimeráz láncreakció (PCR) 14
      3.5.1. Fitoplazma törzsek kimutatása nested PCR-rel 14
   3.6. A PCR termék tisztítása és szekvenálása 17
4. Eredmények 18
   4.1. A terepi diagnosztizálás eredményei 18
   4.2. A laboratóriumi vizsgálatok eredményei 22
      4.2.1. A DNS kivonás 22
      4.2.2. A 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák kimutatása 24
      4.2.3. Az aceF gén 28
5. Értékelés és következtetések 32
6. Összefoglalás 33
7. Köszönetnyilvánítás 35
8. Irodalomjegyzék 36

9. Mellékletek 38
10. Nyilatkozat 42

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A fitoplazma eredetű betegségek világszerte komoly növényvédelmi problémát jelentenek a gyümölcstermesztésben, szerepük különösen az utóbbi években nőtt ugrásszerűen. A kajszi gutaütés (apoplexia) bakteriális, illetve gombás eredetű kórokai mellett a fitoplazmás megbetegedések miatt bekövetkező pusztulások is egyre gyakoribbá váltak. A *Candidatus Phytoplasma prunorum* (*1. melléklet*), korábbi nevén: European Stone Fruit Yellows phytoplasma /ESFY/ jelentős károkat okoz a kajszitermesztőknek. Hazánkban általánosan elterjedt, következményeként a fertőzött fák néhány éven belül gutaütés-szerűen elpusztulnak. Napjainkban a gönci termőtájon is évről-évre gondot okoz a baktérium, illetve fitoplazma által kiváltott pusztulás, mely növeli a termesztés költségeit, rontva ezzel a termesztés gazdaságosságát. A pusztulás mértéke évenként és fajtánként is eltérő, átlagos évben 4-5%. 2015-ben azonban egyes termelőknél kiemelkedő, 35-40%-os pusztulás jelentkezett. Ez a jelenség évszázadok óta ismert, de az utóbbi években mértéke egyes termőhelyeken már veszélyezteti a kajszi termesztés fenntarthatóságát.

Dolgozatomban fiatal, ennek ellenére erősen pusztuló kajszi ültetvényből szedtem levélmintákat annak érdekében, hogy a vizuális diagnózist PCR alapú technikával erősíthessem meg, kimutatva, hogy a kórokozó valóban jelen van-e a beteg fákban. Továbbá célom volt megvizsgálni, hogy az ültetvényben tünetmentesnek tűnő fák esetében, valóban kizárható-e a csonthéjasok európai sárgasága fitoplazma jelenléte. Ennek érdekében nemcsak a jellegzetes szimptómákat mutató fákról, hanem a mintavétel időpontjában vizuális tünetektől mentes fákról is gyűjtöttem mintát. A mintákból DNS-t tisztítottam, és ezeket templátként használva fitoplazma specifikus primerekkel PCR reakciókat indítottam. A fitoplazmákat tartalmazó mintáimból a fitoplazmatörzsek elkülönítését specifikus primerek segítségével végeztem.

Eredményként a kajszi ültetvényen belül előforduló különböző fitoplazmatörzsek diagnosztizálását vártam.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A kajszibarack eredete

A kajszibarack (*Armeniaca vulgaris* syn*: Prunus armeniaca L.)* elsődleges géncentruma a mai Kína területén található, ahol termesztése több, mint 5000 évre nyúlik vissza. A kajszifajok természetes elterjedési területe főként a 38. és a 40. szélességi fokok között található. Az *Armeniaca* nemzetség legtöbb fajához hasonlóan ázsiai eredetű, kialakulásában nagymértékben szerepet játszottak az utolsó jégkorszak alatt is fagymentes hegyi területek, ahol a nemzetség tagjai sikeresen átvészelhették a jégkorszakot a tápanyagban gazdag vulkanikus talajokon. Természetes élőhelyük jellemzően a déli vagy délkeleti kitettségű hegyoldalak, ahol lombos erdők elegyfáiként vagy cserjések kisfáiként fordulnak elő (Pénzes és Szalay 2003). A kajszibarack természetes elterjedési területei jól mutatják az ökológiai igényét, mely alapján napjainkban az északi 25. és 50. szélességi fok között, míg a déli 20. és 35. szélességi fok között termesztett értékes gyümölcsfaj (Surányi 2011a).

2.2. A kajszibarack ökológiai igénye

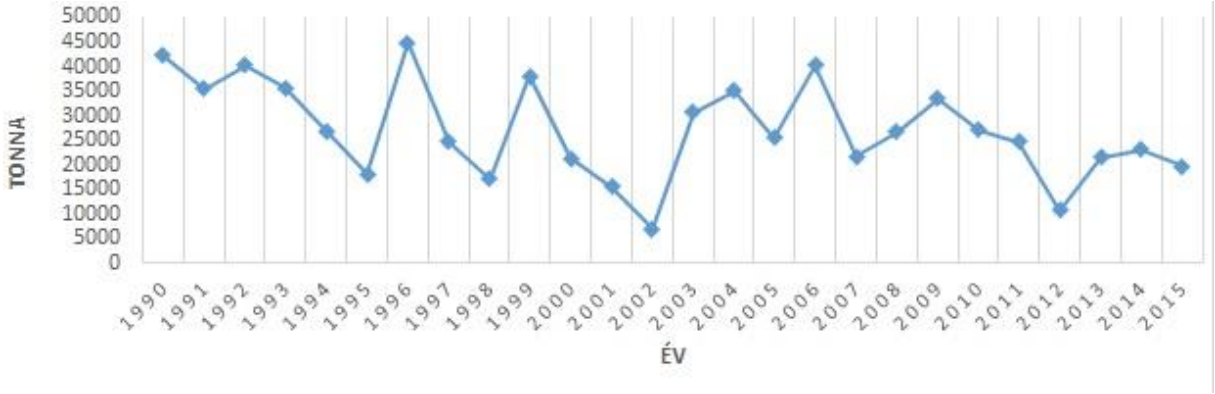
A kajszibarack a kontinentális klímájú, mérsékelt égövi hegyvidékek növénye, mérsékelt vízigényű, fény és melegigényes gyümölcsfaj. A termeszthetőségét leginkább korlátozó tényező a kedvezőtlen hőmérséklet, dél felé haladva a téli nyugalmi időszakban elmarad a szükséges téli hidegmennyiség, addig északi irányban a tenyészidőszakban rendelkezésre álló hőösszeg csökkenése fagyveszéllyel párosulva akadályozza a sikeres termeszthetőséget (Szalay 2003). Magyarország ennek megfelelően a sikeres kajszitermesztés északi határa, tőlünk északabbra fekvő országok közül Csehországban és Szlovákiában találhatunk még ültetvényeket. Az évi középhőmérséklet 10-13°C között optimális számára, azonban júliusban 18-21°C-ot meghaladó középhőmérsékletet igényel. Az áprilistól szeptemberig terjedő tenyészidőszak hossza 170-190 nap, mely alatt minimum 3000-3200°C hőösszeg szükséges annak érdekében, hogy színe, íze és zamata kialakulhasson. A kajszi fényigényes növény, minimum 1900 óra/év napfénytartamot igényel (Szalay 2003).

A közepes vízigényű kajszi a hazánkban termesztett gyümölcsfajok között az egyik legszárazságtűrőbb kultúra. A Magyarországra jellemző hőmérsékleti viszonyok között 510-600 mm csapadék minden termőhelyen kellően ki tudná elégíteni termesztéshez szükséges vízigényt, azonban a csapadék jellemzően egyenetlen eloszlású (Surányi és Nyujtó 2011).

Ez az egyenlőtlen csapadékeloszlás a fák vízigényes fenofázisaiban, így a csonthéjképződés időszakában, (május utolsó dekádjától június 3. dekádjáig), a gyümölcs hízásakor (június első fele), valamint a június közepén kezdődő virágrügy-differenciálódási szakaszban vízdeficitet okozhat, mely később kihat a termés mennyiségére. Jelentős környezeti stressz forrása lehet az időszakos csapadékhiánnyal párosuló magas napi középhőmérséklet a kritikus fenológiai stádiumokban (Surányi és Nyujtó 2011).

2.2.1. Fagytűrés

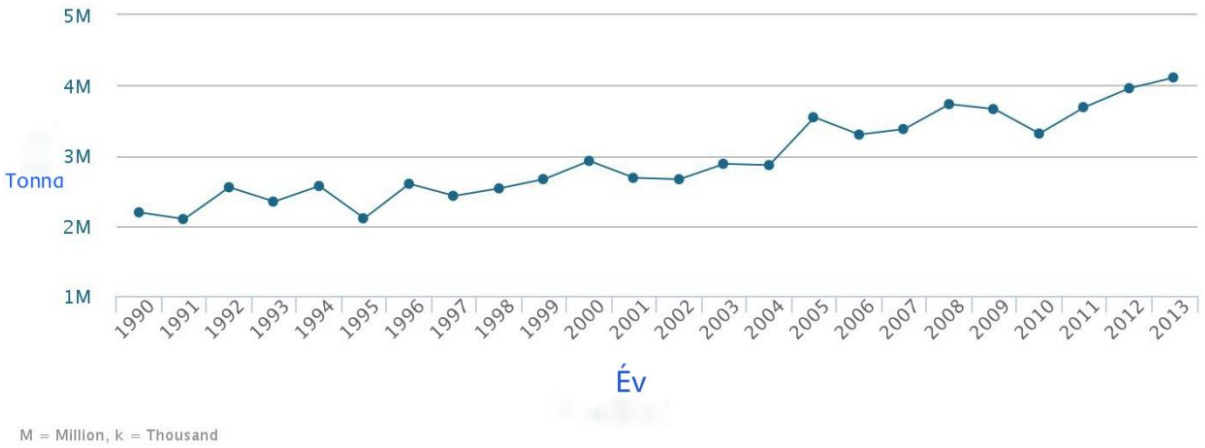
A magyar kajszitermesztők számára a különböző kórtani okok mellett a legnagyobb veszteséget jelentő abiotikus károsító a kora tavaszi fagykár. A kajszi ökológiai igénye sajnos hazánkban nem elégülhet ki maradéktalanul, mert nem őshonos növény a Kárpát-medencében. Ezek a tényezők közvetett módon járulnak hozzá az ingadozó éves termésmennyiséghez *(1. ábra*). A ma termesztett kajszifajták ősei Kínában a 38.-40. szélességi fokon fekvő területeken akklimatizálódtak. Ezekre a területekre hosszú, hideg tél és az európainál rövidebb, meleg nyár jellemző. A probléma oka a tavaszi felmelegedésben van, ugyanis őshazájában a kajszinak rövid tenyészidőszak áll rendelkezésére, így a fagyok elmúltával azonnal megkezdi a virág, illetve hajtásnevelést. Ellentétben hazánkkal, Kínában a tél végén, kora tavasszal nem jellemző az ingadozó hőmérséklet, nincsenek kora tavaszi fagyok az enyhülés után. A kajszi biológiai nullapontja 0°C körül van, ezért a rügyduzzadás, a tavaszi rügyfejlődés már 0°C-on is elkezdődhet (Molnár és Vágó 1999). A téli rügyfejlődés következtében csökken az áttelelő szervek fagyállósága, ami a jó kondícióban lévő fákat is veszélyezteti (Szalay 2012a). A növény különböző szöveteinek fagyállósága eltérő mértékű, legfagyérzékenyebbek a virág és hajtásrügyek. A fagytűrést a növény genetikailag öröklött tulajdonságai is befolyásolják, így a fajták fagyérzékenysége eltérő (Szalay 2003).



1. ábra **A kajszi termésmennyisége Magyarországon 1990 és 2015 között** (*http1*)

2.3. A kajszibarack gazdasági jelentősége

A kajszibarack közkedvelt gyümölcs, magas ára miatt a fogyasztók jelentős része saját kertjében is ülteti fáját, ezt alátámasztják a magyar oltványvásárlási szokások is (Surányi 2011b). A sárgabarackot beltartalmi értékei, zamata és sajátos ízvilága teszi közkedvelt és egészséges gyümölcsfajunkká. A kajszi gyümölcse világszerte keresett termék, az utóbbi években folyamatosan növekszik az előállított mennyisége *(2. ábra*). Magas fehérje és rosttartalom jellemzi, gyümölcshúsa karotinban gazdag. Kiemelkedő B2 és C-vitamin, valamint magas makro- és mikroelem-tartalmának (kálium, cink) köszönhetően kiváló táplálkozás-élettani mutatókkal rendelkezik. A kajszibarack fogyasztási ideje meglehetősen rövid, ezért frissen csak rövid ideig fogyasztható. További lehetőségként a feldolgozás áll, mely során lekvár, dzsem, befőtt, aszalvány és ivólé készíthető gyümölcséből (Surányi 2011b, Radóczné 2012). A szeszipari feldolgozása is igen jelentős. A barackpálinka világszerte ismert és keresett gyümölcspárlat, 2014-ben 2315 tonna került hivatalosan pálinkafőzdei feldolgozásra, ami a 23087 tonna termés közel 10%-át tette ki *(http2)*.



2. ábra **A kajszi termésmennyisége a világon 1990 és 2013 között** (*http3*)

2.4. A kajszi hirtelen pusztulásának, gutaütésének okai

A gutaütés (apoplexia) alatt a fák hirtelen, néhány hét alatt bekövetkező részleges vagy teljes pusztulását értjük. A kiváltó okokról eltérnek a vélemények, ugyanis a fajtaérzékenység, termőhelyi adottságok, kórokozó mikroorganizmusok, fagyhatás, évjárat-hatás, az alannyal való rossz együttélés (alany-nemes inkompatibilitás), az előző évi termés mennyisége és a telepítés ideje (őszi-tavaszi) egyaránt befolyásolhatják a pusztulás mértékét. A betegség komplex jellegű, kialakulásáért egyszerre több tényező is felelős lehet. A kórtani vizsgálatok sokáig a *Pseudomonas syringae pv. syringae* baktérium és a *Cytospora rubescens* gomba kölcsönhatását nevezték meg okozójának, azonban az utóbbi évek tapasztalatai alapján ez az elmélet már nem ad kielégítő magyarázatot a pusztulásra. Az ezredforduló óta évről-évre a kajszifák 5-10%-a pusztul el, a kiváltó elsődleges kórokozó pedig molekuláris vizsgálatok eredményei alapján a csonthéjasok európai sárgulása fitoplazma (*Candidatus Phytoplasma prunorum*) (Süle 2014). A betegség Európában járványszerűen terjed, gazdaságilag jelentős kárt okoz minden kajszitermő vidéken. A kajszin kívül gazdanövénye a cseresznye, meggy, szilva és őszibarack egyaránt (Horváth 2013). A kórokozó másik köztudatban élő elnevezése: European Stone Fruit Yellows (*ESFY*). A fitoplazmák sejtfal nélküli baktériumok, életük a háncsszövethez kötött. A kajszi háncsszövetei télen sem pusztulnak el teljesen, így a fitoplazma nem csak a gyökerekben, hanem ezekben az el nem pusztuló szövetekben is képes áttelelni, majd tavasszal kolonizálni a frissen kialakuló föld feletti háncsszöveteket (Süle 2012, Mergenthaler et al. 2014). Pusztán a tünetek alapján nehéz elkülöníteni a fitoplazma által okozott pusztulást, a gutaütés-komplexumban résztvevő egyéb kórokozók által kiváltott, nagyon hasonló tünetek miatt. A szimptómák ráadásul az alanytól és a nemestől függően változatosak, tovább nehezítve a pontos diagnosztizálást (Németh et al. 2000). A fitoplazmával fertőzött fák fokozottan fagyérzékenyek, mivel a kórokozók a háncsszövetben felszaporodva akadályozzák a tápanyagszállítás folyamatát, csökkentik a sejtek cukortartalmát, valamint jelenlétükkel jégkristályok képződését idézik elő. A fagyállóságot tovább csökkenti a beteg fák hormonháztartási zavarából fakadó, enyhe teleken bekövetkező „korai fakadás” jelensége, mely során december végén-január elején elszórtan kivirágozhatnak a kajszifák. A jelenség ritka, főként fitoplazmával fertőzött egyedeknél fordul elő, magyar kutatók által végzett kísérlet alapján éppen ezért megkönnyítheti a vizuális diagnosztizálást azok számára, akik a költséges molekuláris vizsgálatokat nélkülözni kényszerülnek (Mergenthaler et al. 2014).

2.5. A gutaütés tünettípusai

Rákosodás és elhalás tünetcsoport:

Baktériumos rákosodás és elhalás (*Pseudomonas syringae pv. syringae),*

Citospórás rákosodás és elhalás (*Cytospora rubescens),*

Eutipás rákosodás és elhalás (*Eutypa lata),*

Moníliás hajtáselhalás *(Monilia/Monilinia spp).*

Rákosodás nélküli hervadás tünetcsoport:

Verticilliumos hervadás és elhalás *(Verticillium spp)*

Csonthéjasok európai sárgulása fitoplazma (European Stone Fruit Yellows ESFY, *Candidatus Phytoplasma prunorum)*

Rákosodás nélküli elhalás tünetcsoport:

Fitoftórás gyökérnyak rothadás *(Phytoptora spp)*

Armillarellás gyökérrothadás *(Armillariella mellea)* (Rozsnyay 2010)

2.6. A fitoplazmák felépítése és szerkezete

A fitoplazmák sejtfal nélküli, pleomorf (állandó alak nélküli), a szubvirális elemeket leszámítva a ma ismert legkisebb méretű növénypatogén szervezetek. Testüket szilárd sejtfal helyett háromrétegű membrán határolja. Obligát biotrófok, a növények háncsszövetében élnek és halmozódnak fel, mesterséges táptalajon nem tenyészthetőek. A fitoplazmák azon ritka baktériumok közé tartoznak, melyek egyaránt képesek növényi háncsszövetben, valamint rovarvektoraik hemolimfájában is szaporodni (Akiko 2012). Az, hogy alkalmazkodni tudnak két, ennyire eltérő közeghez több, még tisztázatlan kérdést vet fel. A fitoplazma genom lényegesen kevesebb anyagcsere-funkciót kódol, mint a többi baktérium génkészlete, ami parazita életmódjuk következménye lehet. Nem szorulnak rá, hogy saját ATP szintézisük legyen, a gazdaszervezetből nyerik ki életfunkciójukhoz szükséges metabolitok nagy részét, az élősködés során feleslegessé váló alkotórészeik redukálódtak (Kenro et al. 2013). Nehéz a morfológiai megkülönböztetésük, elektronmikroszkópos vizsgálatukhoz nagyon körülményes megfelelő méretű metszetet készíteni. A fitoplazmák azonosításának legkézenfekvőbb módja a PCR alapú detektálás, ami nagy bizonyossággal alkalmazható az egyes fitoplazmák elkülönítésére (Virányi 2010). Rendszertani besorolásukat tekintve egy átmeneti taxonómiai kategóriába sorolták őket.

A nevük előtt szereplő „*Candidatus*” (jelölt) szó utal arra, hogy származásuk még nem tisztázott kellő mértékben ahhoz, hogy fajokat különböztessenek meg a fitoplazmák között (Tibenszkyné 2015). A *Candidatus* előtag mindazon prokarióták nevébe belekerül, amelyek genomja ismert bár, de a Koch-féle posztulátumoknak nem tesznek eleget, jelen esetben nem hozhatók tiszta tenyészetbe. Jelenleg a következő rendszertan szerint sorolják be a *Ca. Phytoplasma prunorum* kórokozót:

- Ország: Bacteria
- Törzs: Firmicutes
- Osztály: Mollicutes
- Rend: Acholeplasmatales
- Család: Acholeplasmataceae
- Nemzetség: Phytoplasma
- Faj: Candidatus phytoplasma prunorum *(http4)*

2.7. A fitoplazmák fertőzés mechanizmusa és terjedése

Aktuális ismereteink alapján a gyümölcsfák pusztulását okozó fitoplazmák rovarvektorok, oltás, szemzés, aranka gyomnövény (*Cuscuta spp*) és fertőzött szaporítóanyag által, passzív módon terjedhetnek. A fitoplazmák mechanikai átvihetőségét bizonyítani kívánó kísérletek eredménytelenül zárultak, így nagy valószínűséggel kizárható a művelőeszközökkel történő terjedésük (Tibenszkyné 2015). A termő ültetvények beteg fáiról a szilva levélbolha (*Cacopsylla pruni*), mint a floémból szipókával táplálkozó rovar terjesztheti tovább a *Ca. phytoplasma prunorum*-ot. Az ültetvényben látensen fertőzött fák a fertőzés forrásai lehetnek. A szilva levélbolha általi fitoplazma átvitel főbb lépéseit röviden ismertetem. Egy nemzedékes, imágója telel át fenyőféléken, majd kora tavasszal visszarepül a csonthéjas ültetvények fáira peterakás céljából. A fitoplazma felvételi idő 2-4 nap, ennyi idő kell a kórokozónak a rovarba való tartós megtelepedéshez. A lappangási idő legalább 2-3 hét, ennyi idő után mutatták ki a mesterséges fertőzés után először a kórokozót PCR reakcióval. Az inokulációs idő minimum 24-48 óra, ennyi, táplálkozással eltöltött idő alatt fertőződött meg a leendő gazdanövény. A levélbolha perzisztens módon terjeszti tovább a kórokozót. Még a fitoplazmával fertőzött levélbolha által lerakott friss petékből is sikeresen kimutatták a kórokozó jelenlétét, ami a gamétákon keresztüli átvitel lehetőségét igazolja. Oligofág, kifejezetten a *Prunus* fajokon táplálkozik (Bozsik 2014).

A *Cuscuta* fajok *in vitro* képesek a fitoplazmák növényről-növényre terjesztésére, ugyanis parazita életmódjukból adódóan hausztóriumaikkal közvetlenül gazdanövényük szállítónyalábjaihoz képesek csatlakozni, így egyfajta hidat képeznek a két növény szállítónyalábjai között, lehetővé téve a fitoplazma szabad áramlását. Előszeretettel alkalmazzák az aranka fajokat laboratóriumokban vektorként, kihasználva azon tulajdonságát, hogy viszonylag gyorsan, hetek alatt képes átvinni a kórokozót nem rokon növényfajok között is. A fitoplazmákat terjesztő vektorok jelentősége eltérő mértékű a földrajzi adottságok függvényében, hazánkban a *Cacopsylla pruni*-t tartják a *Ca. phytoplasma prunorum*-ot terjesztő fő szervezetnek (Tibenszkyné 2015).

2.8. Védekezési lehetőségek a fitoplazmás betegségek ellen

A termő ültetvényekben a legfontosabb, hogy megakadályozzuk a kórokozó szaporítóanyaggal történő behurcolását, hiszen a fertőzött szaporítóanyag már a telepítés időpontjában megpecsételi az ültetvény sorsát. A leendő ültetvény egészségi állapotát, a gutaütés elleni védekezés alapját tehát már az egészséges szaporítóanyag vásárlásával megkezdjük. A fajtaválasztás során kevésbé érzékeny fajták választására is lehetőség van. Az anyafák védelme a faiskolák feladata, azonban a fitoplazma látensen, vizuális tünet nélkül is jelen lehet a törzsültetvényben, így célszerű lenne minden egyedet tesztelni (PCR) a kórokozóra, mielőtt vegetatív úton szaporítanák azt. A termőhely megválasztása során a szilva levélbolha *Cacopsylla pruni* gazdanövényeinek (vad *Prunus* fajok, fenyőfélék, gyomok), valamint azok fertőzöttségének előzetes felmérése még a telepítés előtt fontos információt adhat a fertőzésforrást jelentő tényezőkről (Süle 2014). Célszerű eltávolítani a vadkökényt az ültetvény környezetében, ugyanis a szilva levélbolha előszeretettel felkeresi azt. A szilva levélbolha populációdinamikájának megfigyelése alapján méhkímélő inszekticidekkel indokolt védekezni a fenyőfélékről a kajsziültetvénybe visszatelepülő imágók ellen, ezzel egyidőben pedig célszerű eltávolítani az alanysarjakat, melyek a vektor kedvelt búvóhelyének számítanak. Amennyiben fitoplazma fertőzött fákat találunk az ültetvényben, mihamarabb gyökerestől el kell távoltani azokat. A növénynemesítők feladata a rezisztencia-nemesítés, azonban évtizedek is eltelhetnek egy-egy kedvező tulajdonságú fajta előállításáig. A már fertőzött fák növényvédőszerekkel történő tünetmentesítésére még nem volt publikált példa. A védekezés legerősebb eszköze a prevenció és az állomány kondíciójának javítását szolgáló beavatkozások (Bozsik 2014, Süle 2012, Süle 2014).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A mintavételi terület leírása

A vizsgált kajsziültetvény Boldogkőváralján, a gönci termőtáj szívében helyezkedik el (*3. ábra*). Az ültetvény közvetlen szomszédságában a Szerencs patak található, melynek hatása az ültetvény adottságiban is meglelhető. A kísérletet a North-Cot Kft területén végeztem, 2010-ben telepített Sherpa fajtán.

3. ábra **A kísérleti terület elhelyezkedése** *(http5*)

3.2. A vizuális tünetmegfigyelés

A vizuális tünetmegfigyeléseket két -három hetes időközönként végeztem, 2016. májustól. A pontos munka érdekében egyedi táblázatot készítettem, a vizsgálat tárgyát képező ültetvény bejárása közben így minden egyes fának egyedi diagnózist tudtam adni.

3.3. Növényi minták

A kísérletek elvégzéséhez szükséges levélmintákat 2016 júliusában, Boldogkőváralján gyűjtöttem Sherpa termőültetvényből. Igyekeztem a lehető legfiatalabb, hajtásvégeken elhelyezkedő leveleket használni, ugyanis a szakirodalom szerint ezekből a levelekből izolálható eredményesen a fitoplazma DNS. A mintavételkor nem random módon, hanem előre tervezett mintázat szerint gyűjtöttem a levélmintákat. A gyűjtést megelőző vizuális diagnosztizálás eredményeként érdekes megfigyelést tettünk, miszerint a pusztuló fák az ültetvényen belül nem véletlenszerűen, hanem „csoportosan", sajátos mintázatot alkotva helyezkednek el. Olyan mintázatot kerestem, ahol a gutaütött egyedek körül tünetmentes kajszifák vannak (*4. ábra*), majd a szomszédos fákról összesen 30 mintát szedtem. A fitoplazma okozta pusztulásra hosszú lappangási idő is jellemző lehet, így annak ellenére, hogy a kórokozó jelen van, a növényen nincsenek vizuális tünetek. A mintavételtől a felhasználásig -70°C-on tároltam a növényi mintákat.

1	6	11		16	21	26
2	7	12		17	22	27
3	8	13		18	23	28
4	9	14		19	24	29
5	10	15		20	25	30

4. ábra **A mintavételezett kajszifák elhelyezkedése, kiemelve a beteg fák**

3.4. DNS kivonás

A levélmintákat a DNS tisztítás előtt -70°C-on tároltam, majd a teszteléshez 0,1-0,15 g növényi szövetből tisztítottam DNS-t NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) kit segítségével. A következő protokoll szerint jártam el: (*2. melléklet*): dörzsmozsárban, folyékony nitrogénbe helyeztem a levélmintát, majd homogenizáltam azt. Az ily módon eldörzsölt mintára 400 µl PL1 puffert, továbbá 10 µl RNase A oldatot pipettáztam, majd alaposan elkevertem. Ezt követően 65°C-on inkubáltam 10 percen át. A termoblokkból való eltávolítás után a nyers izolátumot NucleoSpin® filterbe helyeztem át, majd centrifugáltam 11 000 rpm.-en 2 percen át. Az átfolyó folyadékkal dolgoztam tovább, amihez hozzáadtam 450 µl PC puffert, majd alaposan összekevertem vortex segítségével. Az így keletkezett oldatot pipettáztam át 2 ml-es NucleoSpin® Plant II szűrős eppendorf csőbe, majd 11 000 rpm-en 1 percig centrifugáltam. Ezt követően három lépcsőben eluáltam az oldatot. Elsőként 400 µl PW1 puffert pipettáztam a NucleoSpin® Plant II szűrőbe, majd centrifugába helyeztem 1 percre 11 000 rpm-en. Az átfolyót eltávolítottam.

Második lépésként 700 µl PW2 pufferrel mostam át, azonos ideig és fordulatszámon, mint az első mosás alkalmával. Az átfolyót szintén eltávolítottam. Harmadik lépésként újabb 200 µl PW2 pufferrel végeztem el a tisztítást, majd 2 percen át 11 000 rpm-en centrifugáltam a mintát. A három lépcsős eluálás után egy 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe helyeztem át a szűrőt, hozzáadtam 50 µl, 65°C-ra előmelegített PE puffert, ezt követően 5 percen át inkubáltam a mintát 65°C-on, majd 1 percig 11 000 rpm-en centrifugáltam azt. Az eljárás végén kapott oldat DNS koncentrációját és tisztaságát spektrofotométer segítségével, valamint a minták 1,2%-os agaróz gél-elektroforézissel történő szétválasztásával ellenőriztem. A NucleoSpin® Plant II kittel tisztított DNS alkalmas PCR, restrikciós analízis, illetve Southern Bloc módszerekkel történő további felhasználásra.

3.5. Polimeráz láncreakció (PCR)

A Polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction-PCR) *in vitro* körülmények között teszi lehetővé, bármilyen eredetű DNS tetszőleges szakaszának gyors, az eredetileg jelen levő mennyiség sok ezerszeresére történő amplifikálását (felszaporítását) mérettartománytól függetlenül. A módszer lényege, hogy egy már ismert szekvenciájú DNS mindkét szálára 18-24 bp. hosszúságú primert (oligonukleotid indítószekvenciát) terveznek, melyek pontosan kötődnek az amplifikálni kívánt DNS szakaszhoz. A primerek által határolt DNS szakasz akár több ezerszeresére amplifikálható a reakció során (Czotter et al. 2016).

3.5.1. Fitoplazma törzsek kimutatása nested PCR-rel

A 3.2. fejezetben részletezett módszer segítségével tisztított DNS-t nyertem, azonban ebben az oldatban nem csak az általam kimutatni kívánt fitoplazma DNS, hanem a homogenizált levélben található összes DNS is jelen volt. Ez nehezítheti a nagyon specifikus, kis különbségek kimutatására tervezett primerek használatát, ugyanis fennáll a veszélye annak, hogy az egyébként is alacsony koncentrációban jelen lévő kórokozó keresett DNS szakasza helyett az indítószekvencia nem a megfelelő helyre épül be. A kontamináció elkerülése érdekében két egymás után elvégzett PCR reakciót alkalmaztam, és két egymást követő ciklusban különböző indítószekvenciákat használtam (nested PCR). A nested PCR-t akkor indokolt használni, amikor nagyon nagy érzékenységre van szükség, ilyen esetben az első körben amplifikált terméken belülre tervezett indítószekvenciával megismételjük a PCR reakciót („szűkítjük a kört”), így extrém kis különbségeket is biztosabban ki tudunk mutatni.
A rendelkezésemre álló szakirodalom alapján az első PCR reakcióhoz univerzális, minden fitoplazma csoportot amplifikálni képes, P1 és P7 primerpárt választottam.

A nested PCR során templátként a P1-P7 primerekkel amplifikált termékből 1 µl mennyiséget használtam fel mintánként. Olyan, a 16SrX csoportra specifikus indítószekvenciákat kerestem, melyek a P1-P7 primerekkel felsokszorozott 16S riboszómális DNS terméken belül olyan szekvencia részre kötődnek, melyek csak a 16SrX csoportban található fitoplazmák kimutatását teszik lehetővé (Ahrens és Seemüller 1992). A különböző fitoplazmatörzsek elkülönítése az univerzális P1-P7 indítószekvenciával nem lehetséges, erre a célra olyan, a csoportspecifikus indítószekvenciáknál érzékenyebb, fajspecifikus primereket alkalmaztam, melyek nagyon kis különbségek kimutatására is alkalmasak, ezáltal lehetővé téve a mintákban jelenlévő fitoplazma fajok variánsainak elkülönítését. A 40 ciklus alatt jelentősen felszaporított termékből nyert templátban már eredményesen alkalmazhatóak specifikus primerek, ugyanis biztosabban tudnak kötődni a megfelelő helyre, így a nem specifikus primerkötődés elkerülhetővé válik (Jean et al. 2011). A rokonsági vizsgálatokhoz azonban a 16S rRNS génje nem a legjobb választás, hiszen még a különböző fitoplazma csoportok között is igen magas 98% feletti homológiát mutat. A rokonsági vizsgálatokhoz ezért a szakirodalomban olyan géneket kerestem, melyek variábilisebbek, így a rokonsági vizsgálatokra alkalmasabbak. Az erre a célra kiválasztott géneket, valamint a hozzájuk tervezett indítószekvenciákat táblázatban foglaltam össze (*1. táblázat).*

1. táblázat **Az egyes fitoplazmatörzsek elkülönítéséhez használt primerek**
(Jean et al. 2011, http6)

Gén	**Hossz (bp).**	**Cél**	**Primerek**	**Szekvencia (5' → 3')**
16Sr DNS	1784/1071	PCR	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT
			P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT
		Nested-PCR	f01	CGGAAACTTTTAGTTTCAGT
			r01	AAGTGCCCAACTAAATGAT
aceF	797	PCR	AceFf1	TAAAATTCGCTGATGTTGGCG
			AceFr1	CATCTTTCAATTAAAACTAG
		Nested-PCR	AceFf2	AGGTATTGAAGAAGGAACTG
			AceFr2	CAACCGCTTTCATAATAAAAG
pnp	549	PCR	Pnpf1	GAAGTTGGTATTACTGCTTTAC
			Pnpr1	GATAAATCTATTTGACCGCG
		Nested-PCR	Pnpf2	TACAATTAGATATTAAAGTTAAAGG
			Pnpr2	ATTAATTTTAATACATTTCGC
secY	664	PCR	SecYMalF1	TTAGGACGTAGTATACAAATCCCNTT
			SecYMalR1	ACAATAATTAAAAATCCTGTNCC
		Nested-PCR	SecYMalF2	AAGAATGGCGTGAACARGGNGA
			SecYMalR2	GCATCTTGTTTAGATAAATGTTC
imp Ca. P. prunorum'	673	PCR	IMPF1	CAAATGATAAAGCTGATCAA
			IMPR1	CCTTTAAGACCACATCCTTTG
		Nested-PCR	IMPF2	CAGTGTATTAAATTAACAATG
			IMPR2	CCATCATTACAACTAAAACAT

A PCR reakcióhoz a Thermo Scientific Phire Green Hot Start II DNS polimerázát használtam fel. A PCR csövekbe egyenként a következő oldatokat helyeztem el a felsorolás szerinti sorrendben:

1. MQ: 8,4 µl (steril desztillált víz)
2. 5X Phire Green Reaction Buffert (puffer): 3 µl
3. Forward primer**:**1 µl
   Reverz primer**:**1 µl
4. 10mM dNTP: 0,3 µl
5. Thermo Scientific Phire Green Hot Start II polimeráz (xU/1 µl): 0,3 µl
6. templát: 1 µl

A PCR csövekben lévő reakcióelegy végtérfogata mintánként 15 µl volt, melyből szükség esetén több nested PCR reakcióhoz elegendő templát is kinyerhető. Negatív mintaként steril desztillált vizet használtam.

A PCR reakció a következő protokoll szerint futott le:

1. elő-denaturáció: 98°C – 30 s
2. denaturáció: 98°C – 10 s
3. annealing: 55°C – 10 s
4. elongáció: 72°C – 20 s
5. láncépítés: 72°C – 1 min

(2–4: 40X)

Az ily módon amplifikált termékeket 1,2%-os agaróz gélben választottam el, etídium-bromid (EtBr) festék jelenlétében, megközelítőleg 30 percen át, 120-125 Volt feszültség mellett.
Az első PCR reakció terméke szolgált a nested PCR reakció templátjaként, de az indítószekvenciák a megfelelő nested PCR-hez tervezettek voltak, az eredeti terméken belül egy kisebb termék felsokszorozását tették lehetővé.
A nested PCR reakció termékeit is 1,2%-os agaróz gélben választottam el, EtBr festék jelenlétében, megközelítőleg 30 percen át, 120-125 Volt feszültség mellett.
Az egyes fitoplazmatörzsek elkülönítését a rokonsági vizsgálatokhoz olyan génekre alapoztam, melyek különböznek az elkülöníteni kívánt törzsekben. Az *aceF, pnp, secY* és *imp* gének az irodalom alapján alkalmasnak tűntek a fitoplazmák elkülönítésére, a kimutatásuk érdekében elvégzett nested PCR során egységesen a következő beállítások szerint jártam el:

1. elő-denaturáció: 98°C – 30 s
2. denaturáció: 98°C – 10 s
3. annealing: 50°C – 10 s
4. elongáció: 72°C – 20 s
5. láncépítés: 72°C – 1 min

(2–4: 40X)

3.6. A PCR termék tisztítása és szekvenálása

Azokat a mintáimat, amelyekben a nested PCR után elvégzett gél-elektroforézis mintázata alapján a megfelelő méretű terméket kaptam, tehát feltételezhető volt a keresett kórokozó jelenléte, további vizsgálatnak vetettem alá. Meghatároztattam a termékek bázissorrendjét (szekvenáltattam) annak érdekében, hogy igazolni tudjam, hogy a fitoplazma-specifikus primerek valóban az általam keresett fitoplazmákat amplifikálták-e fel. A szekvenálás előtt a DNS mintáimat meg kellett tisztítani az enzimektől, nukleotidoktól, primerektől, illetve fehérje természetű anyagoktól, amik az eljárás során jelenlétükkel megzavarhatták volna a szekvenálás eredményét. Ezt a műveletet a Thermo Scientific által forgalmazott GeneJET Gel Extraction Kit segítségével végeztem el. A szekvenálásra kijelölt minták teljes térfogatát felhasználtam, ami 10 µl mennyiségnek felel meg. A GeneJET Gel Extraction Kit tisztítási protokoll szerint jártam el *(3. melléklet),* melyet a továbbiakban röviden ismertetek. Első lépésként az összes PCR terméket 1,2%-os agaróz gélben futtattam, majd UV lámpa alatt steril szikével kivágtam a megfelelő mérettartományú fragmentumokat a gélből, törekedve a minél pontosabb metszésre, annak érdekében, hogy kevés felesleges agaróz kerüljön tisztításra. A géldarabokhoz 1:1 arányban kötőpuffert pipettáztam, majd 10 percig 65°C-on inkubáltam addig, ameddig a gélszelet teljesen fel nem oldódott. A következő lépésnél mintánként maximum 800 µl oldatot pipettáztam át szűrős eppendorf csőbe, 1 perc centrifugálás után az átfolyót eltávolítottam, majd 100 µl kötő puffert adagoltam az oldathoz, 1 perc centrifugálás után az átfolyót ismét eltávolítottam. Ezután 700 µl mosópuffert mértem az oldatba, ismét centrifugáltam és eldobtam az átfolyót. A maradék etanol eltávolítása miatt megismételtem a centrifugálást, ugyanis az etanol gátolná a későbbi enzimatikus reakciókat. 50 µl eluáló puffer hozzáadása után 1 percig maximális fordulaton centrifugáltam, majd az átfolyót megtartva hagyományos Sanger szekvenálással határoztattam meg a termék bázissorrendjét.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A terepi diagnosztizálás eredményei

Az általam 2016-os évben végzett vizuális megfigyelések alatt mind a vessző csúcsszáradása, mind a levelek hervadása és végül elszáradása között nagyfokú változatosságot figyeltem meg. Bemutatom, hogy a gutaütött, láthatóan hamarosan pusztuló fák levelei mennyire különböző módon száradhatnak (*5. ábra)*. A száradás indulhat a levél szélétől: (5/A,D,G), vagy az egész levél hirtelen, egyszerre szárad el (5/E,H). Foltosan (5/ B,C,) illetve száradás nélkül sárgul, fonnyad, (5/F) vagy haragoszöld színű, a levél a színe felé kanalasodik (5/I). Természetesen ez csak a saját megfigyelésem, nem lehetséges a baktérium, gomba vagy fitoplazma által okozott pusztulást ez alapján elkülöníteni, azonban mindenképpen fontosnak tartom bemutatni a pusztuló fák levelei között tapasztalt különbségeket.

5. ábra **Pusztuló kajszibarackfák levelei, Boldogkőváralja 2016** (Fotó: Petres Martin)

A következő ábra a hajtásvégeket érintő száradásról készített összefoglalást szemlélteti (*6. ábra)*. Erős fagy miatt bekövetkező vesszőpusztulás (6/A). A *Pseudomonas syringae pv. syringae* baktérium fertőzésének hatására bekövetkező száradást mézgásodás kíséri (6/B,C), míg a fitoplazma eredetű pusztulás esetén nincs mézgásodás (6/D,E). A moníliás hajtásfertőződést kora tavasszal gyakran felismertem az ültetvényben (6/F). A fitoplazma fertőzött vesszők levelei haragoszöldek, színük felé kanalasodnak, seprűsödnek (6/E).

6. ábra **Tavaszi hajtáspusztulás tünetei Boldogkőváralján, 2016-ban** (Fotó: Petres Martin)

A *Monillia/Monillinia laxa.* virágon át fertőző gomba *(7. ábra)*. A kórokozó által előidézett lokális háncsnekrózis akár a termőnyársat is elpusztíthatja (Hluchỳ 2007).

7. ábra **Monilia okozta fertőzés mézgafolyással, Boldogkőváralja 2016**
(Fotó: Petres Martin)

A fertőzöttség mértékétől függően a leveleken és hajtásokon tapasztalható elváltozások különböznek a kezdeti és az előrehaladott állapotban *(8. ábra)*. A levelek kezdetben haragoszöldek, kúposan kanalasok, tapintásuk merev, törékeny (8/A,B), majd a vegetációs időszak előrehaladtával egyre lelógóbbak, fonnyadtak és sárgulnak (8/C,D). A fitoplazmával fertőzött fa kérgét lehántva világosbarna nekrózist tapasztalhatunk (8/E). A háncs körkörös pusztulása esetén az érintett ág hirtelen, a népnyelv által találóan: gutaütés-szerűen elhal. Ez a folyamat érinthet egy-egy vázágat, illetve a teljes fát egyaránt, a fertőzés helyétől függően. Megfigyeltem, hogy egy fa több ága pusztulhat egyszerre, de eltérő stádiumban. Ennek oka az, hogy a fertőzést követően a kórokozó fokozatosan kolonizálja a háncsszöveteket, és terjeszkedésének ütemében pusztítja el az ágakat és vesszőket, következményeként pedig egy törzsön egyszerre lehet teljesen kiszáradt, részlegesen elszáradt, és adott esetben még zöld ág egy időben (8/F). Ilyen esetben megpróbálják a vázágat teljesen lefűrészelve megállítani a kórokozó tovább terjedését, azonban a fertőzött fa menthetetlen, mihamarabb ki kell vágni, a gyökérzetét is eltávolítva (8/I), ugyanis a gutaütött kajszifák gyökérzete rendszerint nem pusztul el azonnal, az alany számos hajtást képes hozni a nemes pusztulása után is (8/G). Sarjhajtásain fennmarad a fitoplazma, majd rezervoárként szolgálhat a kórokozót terjesztő vektorok számára., melyek előszeretettel táplálkoznak a sűrű, védett helyet biztosító sarjak között. A sarjhajtások eltávolítása ezért is fontos feladat az ültetvényben (8/H).

8. ábra **A kajszi fapusztulás folyamatának állomásai, Boldogkőváralja 2016**
(Fotó: Petres Martin)

A következő összefoglalás a vizsgált ültetvényben tapasztalható egyéb tünetekről ad számot (*9. ábra).* Fagykárosodott gyümölcskezdemények (9/A), fiatal fa törzsén rákos seb utal a *Pseudomonas syringae pv syringae* baktérium fertőzésre (9/B). A legyengült fa védekező rendszerének elégtelensége miatt a szaprofita gombák képesek megtelepedni a kajszifák törzsén, tovább gyorsítva a pusztulást (9/C). Foltokban, egymás mellett pusztuló fiatal kajszibarackfák, fitoplazmafertőzés jellegzetes tüneteivel (9/D,E). Általában a repedés felett lévő ág kezd el pusztulni először (9/F,G). A kérgen megjelenő repedés a pusztuló fákon szinte mindig jelen van, de a repedés mélysége és mérete erősen fajtafüggő. A pusztuló vázág gyors eltávolításával nyerhetünk egy kis időt, de a fa, amint utolsó vázágát is elveszíti kivágásra kerül (9/F). A kéreg lehántása után láthatóvá válik az elszíneződött, pusztuló szövet (9/H).

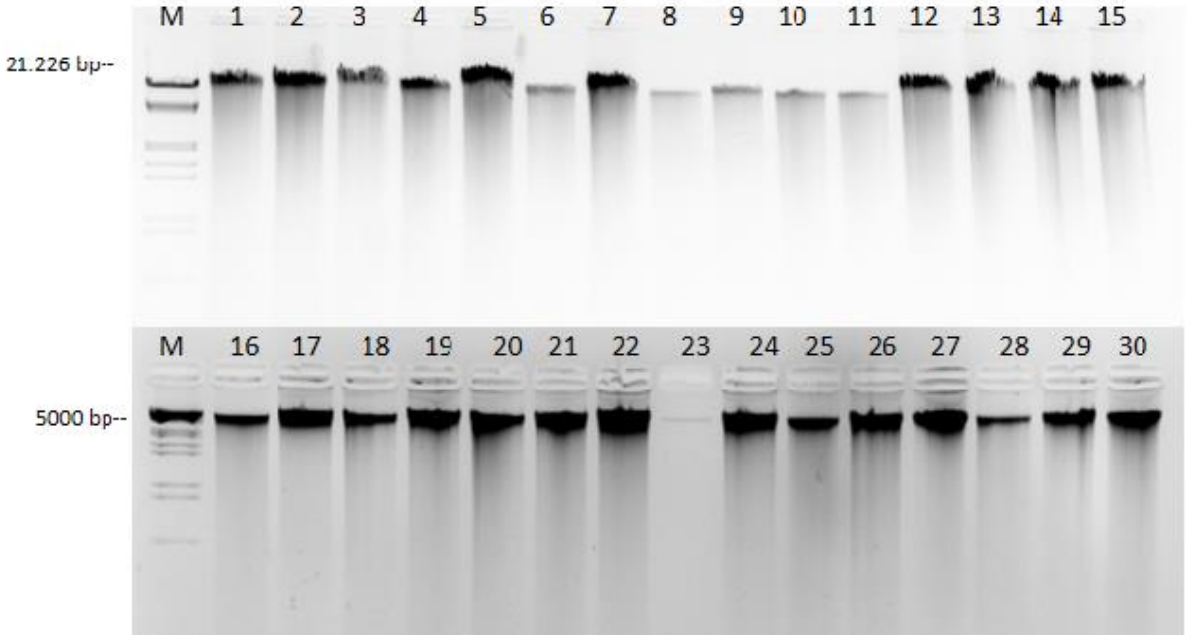
9. ábra **A fapusztuláshoz köthető egyéb tünetek, Boldogkőváralja 2016**
(Fotó: Petres Martin)

4.2. A laboratóriumi vizsgálatok eredményei

4.2.1. A DNS kivonás

A vizsgálni kívánt levélmintáimból NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) kitet használva izoláltam DNS-t, kajszibarackra optimalizálva. A North-Cot Kft. boldogkőváraljai termőültetvényéből származó Sherpa fajta mintáiból készült DNS kivonat EtBr-al festett gélképe látható, agaróz gélelektroforézissel elválasztva, UV fényben (*10. ábra)*. A tisztítás során 0,1-0.15g kajszilevélből átlagosan 221 ng/µl koncentrációjú DNS-t nyertem ki.

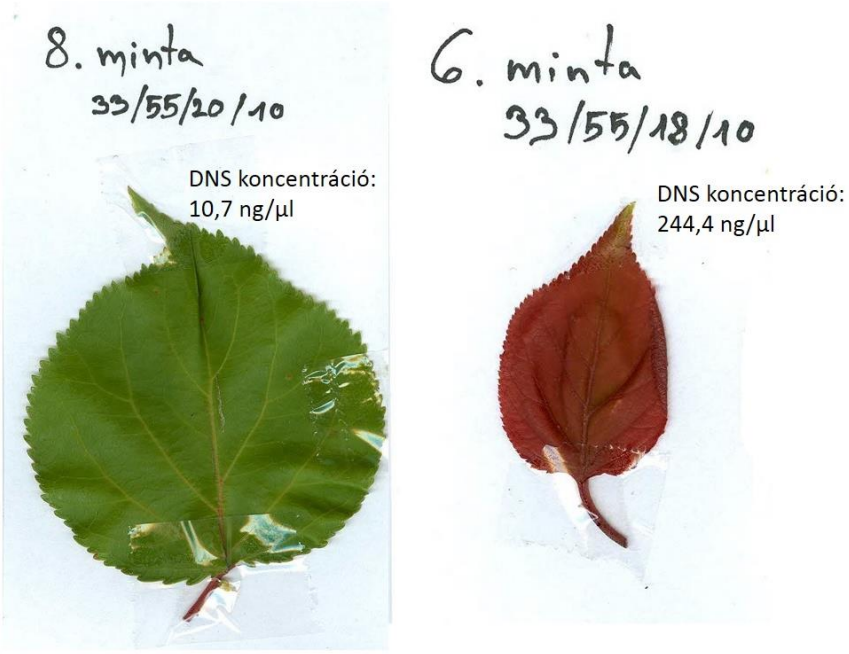
A DNS koncentráció összefüggést mutatott a levél korával, az idősebb levelekből kisebb koncentrációban tudtam kinyerni, mint a fiatal, hajtáscsúcs közeliekből, azonban a PCR reakció érzékenységéből fakadóan nagyon kis mennyiségű izolált DNS is elegendő volt a fitoplazma



10. ábra **A tisztított DNS kivonatok gélelektroforetikus képe 1,2% agaróz gélen történő szétválasztás után (M=marker)**

kimutatásához.

A DNS kivonás sikeressége már a mintavételkor, az ültetvényben eldől. A nem megfelelő korú, idős levélből lényegesen kevesebb DNS nyerhető ki, mint a fiatalabb levelekből (*11. ábra*).

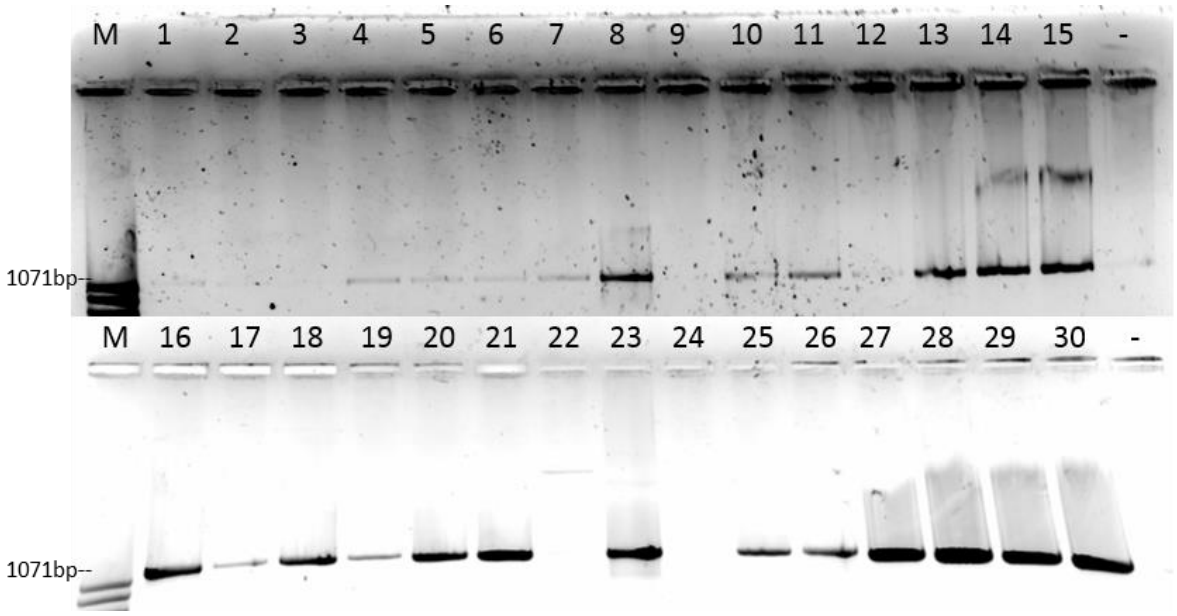


11. ábra **A levélminták DNS tartalma összefügg fejlettségükkel**
(jegyzőkönyv részlet, Petres Martin**)**

4.2.2. A 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák kimutatása

A 16SrX csoportba tartozó *Candidatus Phytoplasma prunorum, Ca. Phytoplasma pyri* és *Ca. Phytoplasma mali* 16SrDNS génjeinek szekvenciája 98,5-99%-os egyezést mutat a fitoplazmák kimutatása során leggyakrabban vizsgált konzervatív 16S rDNS gént vizsgálva (*http6*). A 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák gazdanövényköre eltérő, ezért korábban a gazdanövényeken okozott tünetek alapján nevezték el őket: *Ca. P. prunorum* (ESFY, csonthéjasok európai sárgulása fitoplazma), *Ca. P. pyri* (*Pear decline*-körte leromlás) és *Ca. P. mali* (*Apple proliferation*-Alma seprűsödés).

A 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák kimutatását univerzális P1-P7 primerekkel, majd az erről a termékről csoportspecifikus fO1-rO1 primerekkel lefuttatott nested PCR-rel végeztem *(10. ábra)*. A P1-P7 indítószekvenciák 1784 bázispár hosszú terméket amplifikáltak az első reakció során, majd az fO1-rO1 primerek ezen a terméken belül egy rövidebb, 1071 bázispár hosszú DNS szakaszt sokszoroztak meg. Az általam használt primereket az ausztrál NDP (National Diagnostic Protocol) ajánlása alapján használtam, mint univerzális fitoplazma indítószekvenciákat, ugyanis az EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation) nem publikált még a *Ca. P. prunorum* ellen elfogadott protokollt.



12. ábra **16SrX csoportspecifikus indítószekvenciákkal (fO1/frO1) amplifikált DNS szakaszok mintázata 1,2%-os agaróz gélen**

4.2.3.1. A 16SrX csoport szekvencia analízise

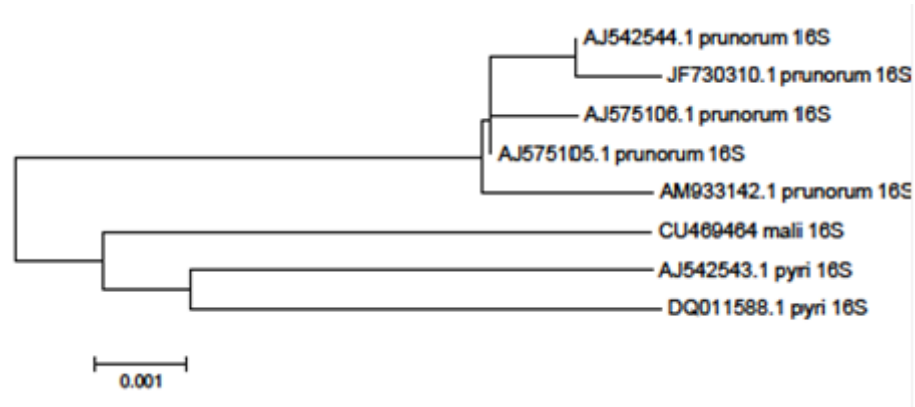
A 10. ábrán látható, hogy a nested PCR-nél alkalmazott belső primerek jó helyre kötődtek, mert a keresett mérettartományban (1071 bp) amplifikáltak fel termékeket több mintában is, ami a 16SrX csoportba tartozó fitoplazma jelenlétére utal. A 16SrX csoport tagjai közül a *Ca. P. mali* teljes szekvenciája ismert, az fO1-rO1 primerek szekvenciáját ráillesztve a *mali* genom 16S RNS génszakaszára, NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) program alkalmazásával összevetettük a génbanki adatbázissal, ahol azt az eredményt kaptuk, hogy a legnagyobb mértékű hasonlóság a 16SrDNS génben (98-99%) a *prunorum, pyri* és *mali* szekvenciái között van. A Clustal Omega illesztő program segítségével megállapítható, hogy az összehasonlítani kívánt szekvenciák bázissorrendjei mennyire hasonlítanak egymáshoz, bázispárra lebontva láthatóvá teszi az összehasonlítani kívánt szakaszokat *(13. ábra).*

```
AM933142.1_prunorum      GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
AJ575105.1_prunorum      GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
AJ575106.1_prunorum      GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
AJ542544.1_prunorum      GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
JF730310.1_prunorum      GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
DQ011588.1_pyri          GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
AJ542543.1_pyri          GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
CU469464_mali            GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
                         ************************************************************

AM933142.1_prunorum      TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ575105.1_prunorum      TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ575106.1_prunorum      TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ542544.1_prunorum      TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
JF730310.1_prunorum      TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
DQ011588.1_pyri          TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ542543.1_pyri          TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTCTAAGTTCAACGCT
CU469464_mali            TTTATTGGGCGTAAAGGGTGTGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
                         ******************** ********** ************** *************
```

13. ábra **Részlet a 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák 16SrDNS gén szakaszának szekvenciabeli egyezőségeiről. A szekvenciák közti különbségek sárga színnel jelölve**

A Clustal Omega programba való illesztés eredményeként csak minimális eltérést találtunk az összehasonlított szekvenciákban, ami jól szemlélteti, miért alkalmas az univerzális P1-P7 konzervatív primerpár a 16SrX csoport minden tagjának kimutatására. Azonban éppen ebből a nagyfokú hasonlóságból következik, hogy nem tudunk a 16SrRNS gén szekvenciabeli eltéréseire alapozva különbséget tenni az azonos csoportba tartozó, de eltérő fajú fitoplazmák között. A hasonlóság jól látható a filogenetikai törzsfán is (*14. ábra)*. E célra kellett keresni egy másik gént, ami szekvenciáját tekintve az egyes fitoplazma fajtákban nagyobb diverzitást mutat.



14. ábra **A 16SrX csoportba tartozó izolátumok filogenetikai törzsfája, adatbanki hivatkozási számmal**

Az fO1 és rO1 primerekkel végzett PCR eredménye alapján (*10. ábra*) meghatároztattuk a 8. és 23. minta szekvencia sorrendjét Sanger szekvenálással. Az eredményt összevetve az adatbázisban található adatokkal 99%-os egyezést találtunk a saját mintáim és a *Candidatus Phytoplasma prunorum* adatbázisban levő izolátum szekvenciája között. Feltételeztük, hogy valóban a *Ca. P. prunorum* van jelen a mintáimban, azonban a 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák 16SrDNS gén szekvenciái között nem lehet molekuláris különbséget találni a csoportspecifikus primerpár által amplifkált régió bázissorrendjén belül (*15. ábra*). Éppen a kis eltérések miatt alkalmas a 16SrX csoport tagjainak kimutatására, a csoporton belüli elkülönítésre tehát nem használhatjuk.

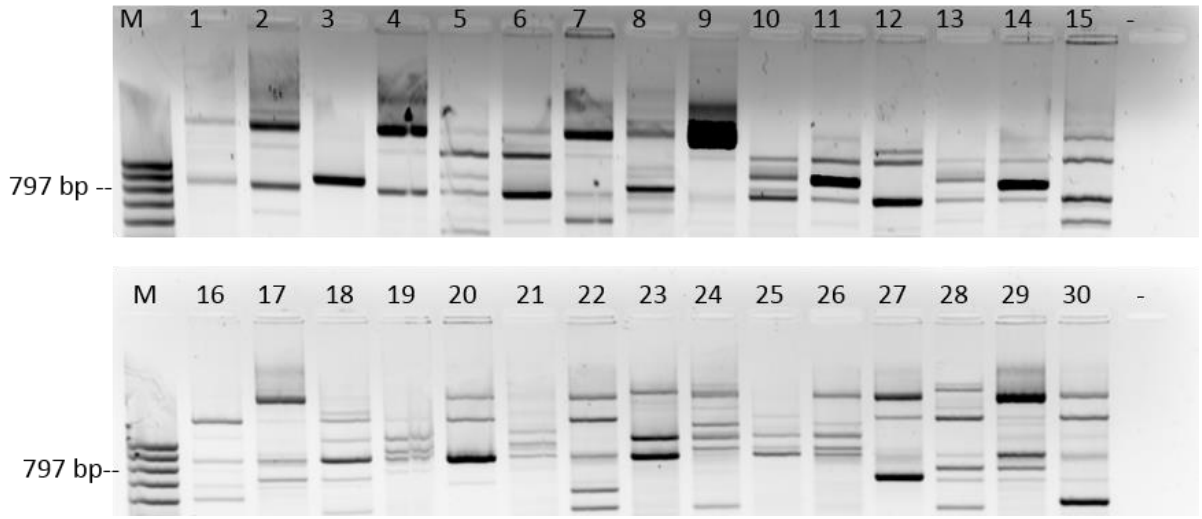
```
DQ011588.1_pyri_16S          GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
AJ542543.1_pyri_16S          GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
CU469464 mali 16S            GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
Sherpa8 16S                  GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
Sherpa23 16S                 GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
AM933142.1_prunorum_16S      GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
AJ575105.1_prunorum_16S      GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
AJ575106.1_prunorum_16S      GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
AJ542544.1_prunorum_16S      GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
JF730310.1_prunorum_16S      GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGA
                             ************************************************************

DQ011588.1_pyri_16S          TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ542543.1_pyri_16S          TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTCTAAGTTCAACGCT
CU469464 mali 16S            TTTATTGGGCGTAAAGGGTGTGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
Sherpa8 16S                  TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
Sherpa23 16S                 TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AM933142.1_prunorum_16S      TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ575105.1_prunorum_16S      TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ575106.1_prunorum_16S      TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ542544.1_prunorum_16S      TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
JF730310.1_prunorum_16S      TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
                             ******************** ********** ************** *************
```

15. ábra **Részlet a 8. és 23. minták szekvenciáinak adatbanki szekvenciákkal történő összehasonlításának eredményéről**

4.2.3. Az *aceF* gén

A szakirodalomban végzett kutatásaink során több olyan primerpár leírásával találkoztunk, amelyek által amplifikált termékek szekvenciájukban változatosabbak voltak a 16SrDNS génnél. Ilyen tulajdonágúak többek között az immunodomináns membrán fehérjéket kódoló *imp* és *secY,* valamint a cukor és nukleotid metabolizmusban szerepet játszó *aceF* és *pnp* gének (Jean et al. 2011, http6). Ezen gének sokkal nagyobb változékonyságot mutatnak, mint a 16SrRNS gén, ezáltal alkalmasabbak lehetnek rokonsági kapcsolatok kimutatására és genetikai változékonyságok jellemzésére a 16SrX csoporton belül. Az *aceF* génre tervezett indítószekvenciákkal sikerült a megfelelő mérettartományba eső terméket nyernünk *(16. ábra).*



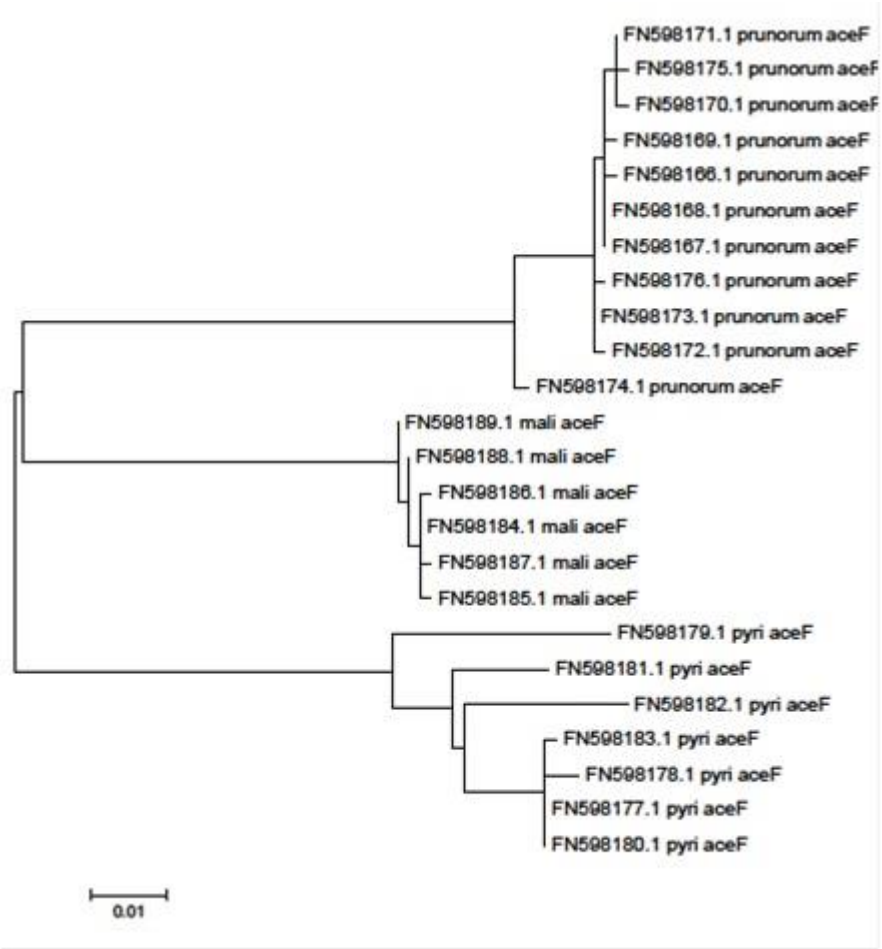
16. ábra **aceFf2 és aceFr2 indítószekvenciákkal amplifikált DNS szakaszok gélelektroforetikus mintázata 1,2%-os agaróz gélen**

Az aceF gén kimutatását célzó nested PCR termékének gélelektroforetikus képén sok aspecifikus jelet is kaptunk, így nem volt egyértelműen elkülöníthető az általunk keresett termék. Néhány esetben ugyan a keresett mérettartományban kaptunk jelet, azonban biztos eredményt csak a 8-as és 23-as minta Sanger szekvenálását követő elemzés adott.

4.2.3.1. Az *aceF* gén szekvencia analízise

A 16SrX csoportból teljes genomja csak a *Ca. P. mali*-nak ismert, ezért ezen a genomon kerestük meg az *aceF* gént kódoló régiót. Adatbanki hivatkozási számuk alapján megtaláltuk a forrás cikkben szereplő *prunorum, pyri* és *mali* szekvenciákat, majd elvégeztük az összehasonlításukat az *aceF* génre vonatkozóan.

A filogenetikai fa alapján jól látható, ahogy a 16SrX fitoplazma csoporton belül elkülönül a három fajta fitoplazma *aceF* gén szekvenciája *(17. ábra).*



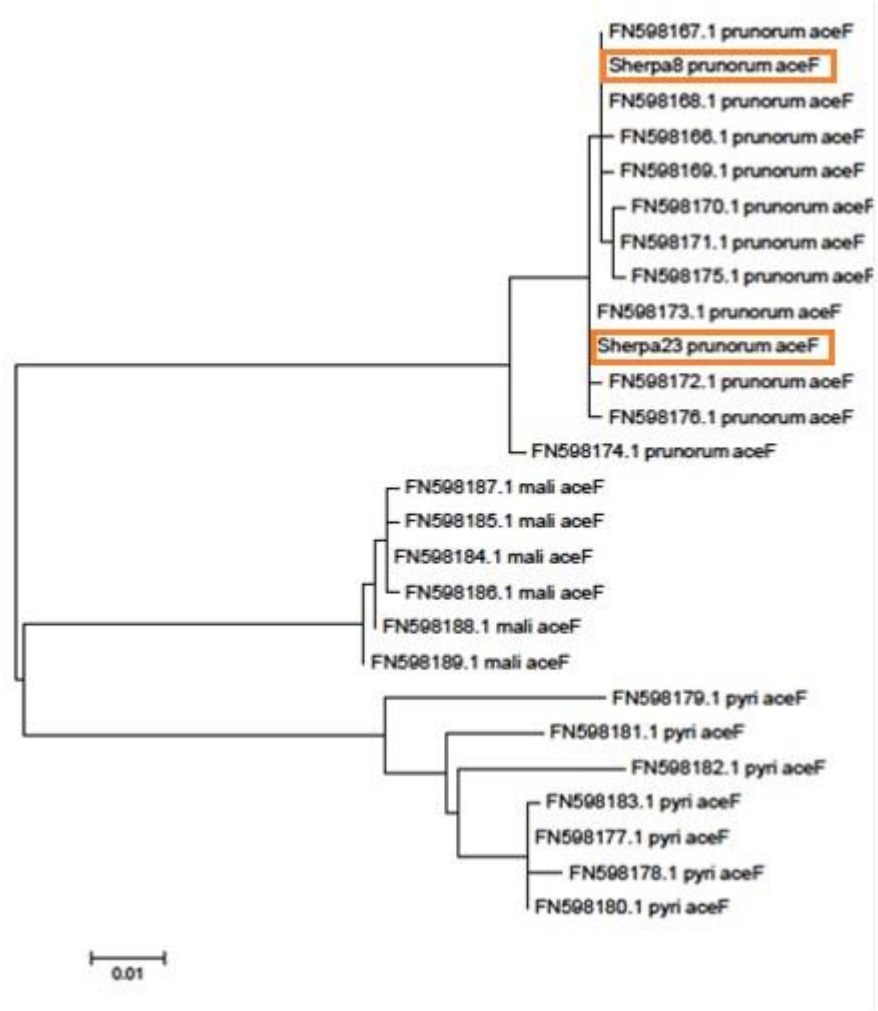
17. ábra **A 16SrX csoport filogenetkai törzsfája *aceF* gén szekvenciák alapján, adatbanki hivatkozási számmal**

Az *aceF* génre elkésztettem a nested PCR-t, a terméket gélből visszaizoláltam, majd hagyományos Sanger szekvenálással meghatároztattuk a 8-as és 23-as minták szekvenciáját. Ezen szekvenciákat BLAST programmal ellenőriztük az NCBI adatbázishoz hasonlítás során, ezután a cikkben szereplő *prunorum, pyri, mali* és a saját szekvenciáimat összehasonlítottuk a Clustal Omega program segítségével *(18. ábra).*

```
FN598174.1_prunorum_aceF      AAATTAATGAAAAAACTAATTTGAATA---TGAAAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAAT
FN598170.1_prunorum_aceF      AAATTAATGAAAAAACTAATTTGAATA---TGAAAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAAT
FN598171.1_prunorum_aceF      AAATTAATGAAAAAACTAATTTGAATA---TGAAAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAAT
FN598175.1_prunorum_aceF      AAATTAATGAAAAAACTAATTTGAATA---TGAAAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAAT
FN598167.1_prunorum_aceF      AAATTAATGAAAAAACTAATTTGAATA---TGAAATTATCTAATGAAAATGAATCGCAAT
FN598169.1_prunorum_aceF      AAATTAATGAAAAAACTAATTTGAATA---TGAAAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAAT
FN598166.1_prunorum_aceF      AAATTAATGAAAAAACTAATTTGAATA---TGAAAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAAT
FN598168.1_prunorum_aceF      AAATTAATGAAAAAACTAATTTGAATA---TGAAAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAAT
FN598172.1_prunorum_aceF      AAATTAATGAAAAAACTAATTTGAATA---TGAAAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAAT
FN598176.1_prunorum_aceF      AAATTAATGAAAAAACTAATTTGAATA---TGAAAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAAT
FN598173.1_prunorum_aceF      AAATTAATGAAAAAACTAATTTGAATA---TGAAAGTATCTAATGAAAATGAATCGCAAT
FN598186.1_mali_aceF          AAATTCATGAAA-------------------------------------CTGAATTAAAAA
FN598189.1_mali_aceF          AAATTCATGAAA-------------------------------------CTGAATTAAAAA
FN598185.1_mali_aceF          AAATTCATGAAA-------------------------------------CTGAATTAAAAA
FN598187.1_mali_aceF          AAATTCATGAAA-------------------------------------CTGAATTAAAAA
FN598184.1_mali_aceF          AAATTCATGAAA-------------------------------------CTGAATTAAAAA
FN598188.1_mali_aceF          AAATTCATGAAA-------------------------------------CTGAATTAAAAA
FN598179.1_pyri_aceF          AAATTAATGAAACAAATAATTTAAATA---CGAAATTATCTAATGAAAATGAATTAAAAC
FN598182.1_pyri_aceF          AAATTAATAAAAAAACTAATTTAAATA---CTAAATTATCTGATGAAAATGAATTAAAAC
FN598181.1_pyri_aceF          GAATTAATGAAAAAACTAATTTAAATA---CTAAATTATCTGATGAAAATGAATTAAAAC
FN598178.1_pyri_aceF          AAATTAATGAAAAAACTAATTTAAATAATAATAAATTATCTGATGAAAATGAATTAAAAC
FN598180.1_pyri_aceF          AAATTAATGAAAAAACTAATTTAAATAATAATAAATTATCTGATGAAGATGAATTAAAAC
FN598183.1_pyri_aceF          AAATTAATGAAAAAACTAATTTAAATAATAATAAATTATCTGATGAAAATGAATTAAAAC
FN598177.1_pyri_aceF          AAATTAATGAAAAAACTAATTTAAATAATAATAAATTATCTGATGAAAATGAATTAAAAC
                               **** ** ***                                  *****   **
```

18. ábra **A 16SrX csoportba tartozó *prunorum, pyri* és *mali* fajok aceF gén szekvenciája közötti különbségek révén alkalmas az elkülönítésre.**

Az azonos, 16SrX csoportba tartozó *prunorum, pyri* és *mali* fajok között a gén valóban alkalmas lehet arra, hogy az elkülönítés alapja legyen. Az illesztésből látszik, hogy a szekvenciák elég eltérőek az egyes fitoplazma csoportok között. Ezután megint illesztéseket csináltunk, a forráscikkben szereplő *prunorum, pyri, mali* és a saját szekvenciáimat illesztettem össze a Clustal Omega program segítségével (*19.ábra)*. A filogenetikai törzsfán jól látható, ahogy a három fitoplazma faj a csoporton belül elkülönül egymástól, a saját mintáim is a prunorum fajhoz klasztereződnek.



19. ábra ***Candidatus phytoplasma prunorum*** **izolátumok filogenetikai törzsfája** ***aceF*** **gén szekvenciái alapján, adatbanki hivatkozási számmal. (kiemelve a saját mintáim)**

5. ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A kapott eredményeim alapján korszerű molekuláris diagnosztikai módszerekkel sikerült igazolnom, hogy a *Candidatus phytoplasma prunorum* valóban jelen van az ültetvényben. A tünetmentesnek látszó 28 fa mintáiról készült PCR reakció termékeinek gélelektroforetikus képén a várt mérettartományban egyértelműen kivehető a fitoplazma specifikus fO1/frO1 primerek által amplifikált termék, ami a kórokozó látens fertőzésére utal 21 fában is. Ez egyrészt alátámasztja a vizuális megfigyelések eredményét, miszerint a pusztuló fák fitoplazmatikus fertőzésre jellemző tünetekkel rendelkeztek, másrészt további új, izgalmas kérdéseket vet fel a látensen fertőzött fák nagy aránya miatt. Véleményem szerint fontos, hogy a mintavételezést az a személy végezze, aki később a laboratóriumban feldolgozza azt. A nem megfelelő helyről vett minta rontja a kimutathatóságot.

A kórokozó fitoplazma genomban már több olyan gént felfedeztek, melyek szekvenciabeli különbségeire alapozva lehetséges rokonsági vizsgálatokat végezni, nem csak a 16SrX csoporton belül, hanem az ESFY többi törzse között egyaránt (Marcone et al. 2010, Jean et al. 2011). Munkánkat a továbbiakban ilyen gének vizsgálatával tervezzük folytatni, ugyanis az így elvégzett rokonsági vizsgálatok alapján következtethetünk arra, hogy a vizsgált termő ültetvényben jelen lévő ESFY törzs a magyar, vagy inkább a külföldi variánsok szekvenciájával mutat-e nagyobb hasonlóságot. Ezen kísérletünk még jelenleg is folyamatban van, így eredményét még nincs lehetőségem ebben a dolgozatomban közölni, azonban reményeink szerint egy későbbi munkában be tudom mutatni.

Ez az elemzés alapja lehet egy nagyszabású végső konklúziónak, mely választ adhat arra, hogy a vizsgált ültetvényben ilyen nagy arányban, 28 egészségesnek látszó fából 21-ben jelen lévő *Candidatus Phytoplasma prunorum* variáns, vajon már a külföldről származó, nem megfelelően ellenőrzött anyafa látens fertőzése okán, a szaporítóanyaggal, vagy természetes vektora, a szilva levélbolha *(Cacopsylla pruni)* közvetítésével kerülhetett-e be az ültetvény pusztuló és látensen már fertőzött egyedeibe.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A gönci termőtájon, mely az ország egyik legjelentősebb kajszitermő vidéke, évről évre 5-10 %-os pusztulásról számolnak be a termelők. A kajszibarack termesztése sok kézi munkát igényel, a kedvező exportlehetőségeknek köszönhetően biztos munkahelyeket teremteni képes ágazat a kistérség lakosai számára, ezért is fontos, hogy a kajszitermesztés rizikófaktorait minimalizálni tudjuk. A kajszitermesztés legköltségigényesebb szegmensét a növényvédelem és a hozzá kapcsolódó kiadások teszik ki. Tovább nehezíti a gyümölcsfák védelmét az olyan károsítók térnyerése, melyek ellen a védekezés még nem megoldott, mint a fitoplazma eredetű kajszipusztulás. A pusztulás kórtani okait évtizedek óta nem sikerült egyértelműen tisztázni, a kajszigutaütés kártétele minden kajszitermesztő országban aktuális probléma.

Tüneti megfigyeléseket végeztem a 2016-os vegetációs időszakban Boldogkőváralján, a North-Cot Kft. fiatal, de ennek ellenére erősen pusztuló Sherpa fajtájú kajsziültetvényében, ahol a jellegzetes vizuális tünetek alapján felmerült, hogy a pusztulásért a csonthéjasok európai sárgulása fitoplazma *(Candidatus. Phytoplasma. prunorum)* lehet a felelős. Annak érdekében, hogy a kajszi pusztulását kiváltó kórokozót meg tudjam határozni, két kísérleti kvadrátot jelöltem ki, majd mintavételi területenként 15-15 fáról gyűjtöttem levélmintákat 2016 júliusában. Mindkét kvadrátot egy erősen pusztuló fa köré vettem fel, a szomszédos fák pedig teljesen tünetmentesek voltak a mintavétel időpontjában. A levélmintákból DNS-t tisztítottam NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) kit segítségével, majd univerzális fitoplazma primerek segítségével amplifikáltam a 16SrX csoportba tartozó fitoplazma törzsek konzervatív 16SrDNS gén által kódolt régióit. A kapott termék gélelektroforetikus képe, valamint szekvenciájának elemzése alapján a beteg egyedekből tisztított DNS tartalmazta a keresett szekvenciát, ami 99%-os homológiát mutatott a *Candidatus phytoplasma prunorum* 16SrDNS gént kódoló génbanki szekvenciákkal. Az univerzális primerek, melyekkel a fitoplazma jelenlétét kimutattam, olyan DNS szakaszt kódolnak, melyek között csak jelentéktelen, 1-2 bázispár különbséget találhatunk a 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák szekvenciáiban, ami alapján nem lehet elkülöníteni az egyes fajokat a csoporton belül. A rokonsági vizsgálatok elvégzésére a szakirodalom alapján olyan, a 16SrDNS génnél változatosabb szekvenciával rendelkező géneket kerestem, amelyek már alkalmasak arra, hogy kimutassák a különbségeket a 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák között. Erre a célra az *aceF* gén egy darabját amplifikáltam az erre a szakaszra tervezett specifikus indítószekvenciákkal, majd nested PCR reakciót indítottam. Az *aceF* gén vizsgált szekvenciájában tapasztalt variabilitás alapján már el tudtam készíteni a rokonsági vizsgálatokat.

Eredményeim azt igazolják, hogy a vizsgált fák, még a látszólag tünetmentes egyedek egy része is, valóban tartalmazzák a *Candidatus phytoplasma prunorum* kórokozót.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni a témaválasztásban nyújtott segítségét Dr. Nyéki Józsefnek. Állhatatos témavezetői munkáját Dr. Szabó Zoltánnak. Dr Várallyay Évának és Czotter Nikolettának, akik időt és energiát nem kímélve segítettek. Köszönetet szeretnék mondani Körösi Katalin tanárnőnek, aki gyakorlatvezetőként és később konzulensként megszerettette velem a növénykórtan tudományát. Hálás vagyok Dr. Süle Sándor professzor úrnak, aki bevezetett a tüneti diagnosztika alapjaiba. Külön köszönetet szeretnék mondani a Kosáry Domokos Könyvtár és Levéltár dolgozói számára, akik segítőkész munkájukkal közvetve támogatták jelen dolgozat létrejöttét. Végül, de nem utolsó sorban szeretném hálámat kifejezni baráti bírálóim számára, akik formai tanácsokkal segítették munkámat.

Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP 2016-2017-I/5 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Ahrens U, és Seemüller, E. (1992). Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. Phytopathology (*82)*. 828–832 p.

Akiko S.-Saskia A.H. (2012) The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects.-Microbiology (15). 247-254 p.

Bozsik A. (2014) Gondolatok a csonthéjasok fitoplazmás pusztulásáról-rovarász szemmel. - Agrártudományi Közlemények-Acta Agraria Debreceniensis.(62). 30-33 p.

Czotter N. és Czakó K. és Várallyay É. és Szegedi E. (2016) Molekuláris diagnosztikai módszerek a szőlő szaporítóanyaggal terjedő károsítóinak kimutatására. Kertgazdaság-Horticulture 48 (2) 37-38 p.

Hluchỹ M. és Ackermann P. és Zaharda M. és Laŝtuvka Z. és Bagar M. és Jetmarová E. és Vanek G. és Szőke L. és Plísek B. (2007) A gyümölcsfák és a szőlő betegségei és kártevői, a gyümölcsfák és a szőlő védelme az ökológiai és integrált növénytermesztésben. FINIDR, Ostrava, CZ (498) 112-113 p.

Horváth Cs. (2013) Csonthéjasokat veszélyeztet a fitoplazma- Kertészet és Szőlészet (62). 2. 16-17 p.

Jean L. D. és Gulnara B. és Agnes C. és Nicolas S. és Véronique M-J. és Gérard L. és Amparo L. és Assumpcio B. és Ivana K. és Diana Š. és Paolo E. és Cigdem U.S. és Kadriye C. és Wolfgang J. és Xavier F. (2011) Multicus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination. - Microbiology 438-450 p.

Kenro O., Kensuka M. és Shigetou N (2013) Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas- Frontiers in Microbiology (4) 230 1-8 p.

Marcone, C., Jarausch, B. and Jarausch, W. (2010): 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agent of european stone fruit yellows: an overview. Journal of Plant Pathology, (92). 19-34 p.

Mergenthaler E., Kiss E. és Süle S. (2014) A kajszi téli kivirágzása és a fitoplazmafertőzés- Kertészet és Szőlészet (63). 6. 13-14 p.

Molnár L.-Vágó E. (1999) Kajszitermesztés képekben Magyar Gyümölcsszövetség Délalföldi Tagozata, ACRUX BT, Kecskemét 70-75p 258 p.

Pénzes B.-Szalay L. (2003) Kajszi. Mezőgazda Kiadó, Budapest 400 p.

Radóczné K. T. (2012) A kajszitermesztés helyzete Magyarországon-Agrofórum (23.) 7. 93 96 p.

Rozsnyay Zs. (2010) A kajszibarackfák hirtelen pusztulásának, gutaütésének okai (21). Extra 33. 60-66 p.

Surányi D (2011b) A sárgabarack Magyarország kultúrflórája. II. kötet 9. füzet, Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 294 p. 241 p.

Surányi D. (2011a) A sárgabarack. Magyarország kultúrflórája. II. kötet 9. füzet, Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 294 p. 31 p.

Surányi D.-Nyujtó F. (2011) A sárgabarack. Magyarország kultúrflórája. II. kötet 9. füzet, Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 294 p. 168-175 p.

Süle S. (2012) A kajszibarack fitoplazmás pusztulása-Kertészet és Szőlészet (61.) 26.12-13 p.

Süle S. (2014) Kajszipusztulás és az ellene való védekezés-Növényvédelem (50). 1. 23-26 p.

Szalay L (2012a) Miért pusztulnak a kajszibarackfák?-Agrofórum (23.) 12. 80-82 p.

Szalay L. (2003) A kajszi ökológiai igényei- In: Kajszi. Mezőgazda Kiadó, Budapest 41-51 p.

Tibenszkyné Kiss E. (2015) Eltérő virulenciájú fitoplazma törzsek kölcsönhatásának szerepe a keresztvédettség kialakulásában.-Doktori értekezés MTA ATK Növényvédelmi Intézet, Budapest

V. Németh M. és Kölber M. és Hangyál R. és Süle S. és Viczián O. és Mergenthaler E. és Fodor M. (2000) Csonthéjasok fitoplazmás pusztulása Magyarországon-Gyakorlati agrofórum (11). 13. 26-32 p.

Virányi F. (2010) Általános növénykórtan-Szent István Egyetemi Jegyzet, Gödöllő 22-24 p.

Internetes források:

http1: KSH http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_omn009.html (2016 okt.)

http2: KSH http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_omn006c.html (2016 szept.)

http3: FAOSTAT http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E (2016 szept.)

http4: CABI http://www.cabi.org/isc/datasheet/34065 (2016 okt.)

http5: MEPAR: https://www.mepar.hu/mepar/ (2016 okt.)

http6: NDP http://plantbiosecuritydiagnostics.net.au/resource-hub/priority-pest-diagnostic-resources/ (2016 szept)

9. MELLÉKLETEK

1. melléklet

A *Phytoplasma prunorum* leggyakoribb szakirodalmi elnevezései

Identity

Preferred Scientific Name

- Phytoplasma prunorum Seemüller és Schneider, 2004

Preferred Common Name

- apricot chlorotic leafroll

Other Scientific Names

- Apricot chlorotic leafroll phytoplasma
- Candidatus Phytoplasma prunorum
- European stone fruit yellows phytoplasma
- Phytoplasma prunorum [Candidatus] Seemüller és Schneider, 2004

International Common Names

- **English:** apricot dieback; cherry Molières disease; decline of Japanese plum; nectarine chlorotic leafroll; peach decline; peach rosette (Italian); peach vein clearing; peach vein enlargement; peach yellows (European); plum leptonecrosis
- **Spanish:** desarreglos vegetativos del albaricoquero; enrollamiento clorótico del albaricoquero
- **French:** dépérissement de Molières; enroulement chlorotique de l'abricotier

Local Common Names

- **Germany:** Chlorotisches Blattrollen (Steinobst)
- **Italy:** accartocciamento clorotico dell'albicocco

EPPO code

- PHYPPR (Phytoplasma prunorum)

Forrás: (http4)

2. melléklet: NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) kit használati útmutató

Genomic DNA from plant

Protocol-at-a-glance (Rev. 09)

NucleoSpin® Plant II	Mini	Midi	Maxi
1 Homogenize samples	100 mg	400 mg	1500 mg
2 Cell lysis	400 µL PL1 10 µL RNase A 65°C, 10 min *ALTERNATIVELY* 300 µL PL2 10 µL RNase A 65°C, 10 min 75 µL PL3 on ice, 5 min	1.7 mL PL1 25 µL RNase A 65°C, 15 min *ALTERNATIVELY* 1.5 mL PL2 25 µL RNase A 65°C, 15 min 200 µL PL3 on ice, 5 min	6 mL PL1 100 µL RNase A 65°C , 20 min *ALTERNATIVELY* 5.3 mL PL2 100 µL RNase A 65°C, 20 min 700 µL PL3 on ice, 5 min
3 Filtration / Clarification of lysate	≥11,000 x *g*, 2 min	4,500 x *g*, 10 min	4,500 x *g*, 10 min
4 Adjust DNA binding conditions	450 µL PC	2.3 mL PC	10 mL PC
5 Bind DNA	≥11,000 x *g*, 1 min	4,500 x *g*, 2 min	4,500 x *g*, 2 min
6 Wash and dry silica membrane	1st 400 µL PW1 ≥11,000 x *g*, 1 min 2nd 700 µL PW2 ≥11,000 x *g*, 1 min 3rd 200 µL PW2 ≥11,000 x *g*, 2 min	1st 1 mL PW1 4,500 x *g*, 2 min 2nd 3 mL PW2 4,500 x *g*, 2 min 3rd 1 mL PW2 4,500 x *g*, 10 min	1st 4 mL PW1 4,500 x *g*, 2 min 2nd 10 mL PW2 4,500 x *g*, 2 min 3rd 2 mL PW2 4,500 x *g*, 10 min
7 Elute DNA	50 µL PE 65°C, 5 min ≥11,000 x *g*, 1 min Repeat elution step	200 µL PE 65°C, 5 min 4,500 x *g*, 2 min Repeat elution step	1000 µL PE 65°C, 5 min 4,500 x *g*, 2 min Repeat elution step

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Neumann-Neander-Str. 6–8 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-270 · Fax: +49 24 21 969-199 · tech-bio@mn-net.com · *www.mn-net.com*

3. melléklet: GeneJET Gel Extraction Kit (THERMO SCIENTIFIC) használati útmutató

PURIFICATION PROTOCOLS

Note

- Read IMPORTANT NOTES on p. 3 before starting.
- All purification steps should be carried out at **room temperature**.
- All centrifugations should be carried out in a table-top microcentrifuge at **>12000 × g** (10 000-14 000 rpm, depending on the rotor type).

Protocol A. DNA extraction from the gel using centrifuge

Step	Procedure
1	Excise gel slice containing the DNA fragment using a clean scalpel or razor blade. Cut as close to the DNA as possible to minimize the gel volume. Place the gel slice into a pre-weighed 1.5 mL tube and weigh. Record the weight of the gel slice. **Note.** If the purified fragment will be used for cloning reactions, avoid damaging the DNA through UV light exposure. Minimize UV exposure to a few seconds or keep the gel slice on a glass or plastic plate during UV illumination.
2	Add **1:1 volume** of **Binding Buffer** to the gel slice (volume: weight) (e.g., add 100 µL of Binding Buffer for every 100 mg of agarose gel). **Note.** For gels with an agarose content greater than 2%, add 2:1 volumes of Binding Buffer to the gel slice.
3	Incubate the gel mixture at **50-60 °C** for **10 min** or until the gel slice is completely dissolved. Mix the tube by inversion every few minutes to facilitate the melting process. Ensure that the gel is completely dissolved. Vortex the gel mixture briefly before loading on the column. Check the color of the solution. A yellow color indicates an optimal pH for DNA binding. If the color of the solution is orange or violet, add 10 µL of 3 M sodium acetate, pH 5.2 solution and mix. The color of the mix will become yellow.
4 for ≤500 bp and >10 kb DNA fragments	*Optional:* use this step only when DNA fragment is ≤500 bp or >10 kb long. • If the DNA fragment is ≤500 bp, add 1 gel volume of 100% isopropanol to the solubilized gel solution (e.g. 100 µL of isopropanol should be added to 100 mg gel slice solubilized in 100 µL of Binding Buffer). Mix thoroughly. • If the DNA fragment is >10 kb, add 1 gel volume of water to the solubilized gel solution (e.g. 100 µL of water should be added to 100 mg gel slice solubilized in 100 µL of Binding Buffer). Mix thoroughly.
5	Transfer up to 800 µL of the solubilized gel solution (from step 3 or 4) to the GeneJET purification column. Centrifuge for 1 min. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube. **Note.** • If the total volume exceeds 800 µL, the solution can be added to the column in stages. After each application, centrifuge the column for 30-60 s and discard the flow-through after each spin. Repeat until the entire volume has been applied to the column membrane. Do not exceed 1 g of total agarose gel per column. • **Close the bag with GeneJET Purification Columns tightly after each use!**

4

Step	Procedure
6	*Optional:* use this additional binding step only if the purified DNA will be used for sequencing. Add **100 µL** of **Binding Buffer** to the GeneJET purification column. Centrifuge for 1 min. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.
7	Add **700 µL** of **Wash Buffer** (diluted with ethanol as described on p. 3) to the GeneJET purification column. Centrifuge for 1 min. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.
8	Centrifuge the empty GeneJET purification column for an additional 1 min to completely remove residual wash buffer. **Note.** This step is essential to avoid residual ethanol in the purified DNA solution. The presence of ethanol in the DNA sample may inhibit downstream enzymatic reactions.
9	Transfer the GeneJET purification column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not included). Add **50 µL** of **Elution Buffer** to the center of the purification column membrane. Centrifuge for 1 min. **Note.** • For low DNA amounts the elution volumes can be reduced to increase DNA concentration. An elution volume between 20-50 µL does not significantly reduce the DNA yield. However, elution volumes less than 10 µL are not recommended. • If DNA fragment is >10 kb, prewarm Elution Buffer to 65 °C before applying to column. • If the elution volume is 10 µL and DNA amount is ≤ 5 µg, incubate column for 1 min at room temperature before centrifugation.
10	Discard the GeneJET purification column and store the purified DNA at -20 °C.

10. NYILATKOZAT

Alulírott Petres Martin, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar növényorvos szakos, nappali tagozatos hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy TDK dolgozatom felkerüljön a Kar/Intézet/Tanszék honlapjára. A digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető intézetben, illetve a kialakításra kerülő Kari központi nyilvántartásban, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: **nem**

Gödöllő, 2016. október 29.

Petres Martin