Szent István Egyetem

Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar,

Növényvédelmi Intézet

FITOPLAZMA FERTŐZÖTTSÉG VIZSGÁLATA KAJSZI ÜLTETVÉNYEKEN

Készítette: Oláh Beatrix
Évfolyam: I. évfolyam

Belső konzulens: Dr. Turóczi György
Beosztása: Egyetemi docens, SZIE, Növényvédelmi Intézet

Külső konzulens: Dr. Várallyay Éva és Czotter Nikoletta
Beosztása: Tudományos főmunkatárs és tudományos segédmunkatárs
NAIK, mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, Diagnosztika csoport

Gödöllő

2016.

Tartalom

1. Bevezetés és célkitűzések 3
2. Irodalmi áttekintés 4
2.1 Fitoplazmák jellemzői 4
2.1.1 A fitoplazmák rendszertani besorolása 4
2.1.2 'Ca. Phytoplasma prunorum' jelentősége 5
2.1.3 Gazdasági jelentőségük 6
2.1.4 A betegség tünetei 7
2.2 Fertőzés kialakulása 8
2.2.1 Fitoplazmák terjedése – lehetséges vektorok 8
2.3 Fitoplazmák elleni védekezési lehetőségek 12
3. Anyag és módszer 15
3.1. Mintavétel 15
3.2. DNS tisztítás 21
3.3. Fitoplazma detektálás PCR-el 22
3.4. PCR termékek izolálása agaróz gélből és tisztítása 24
4. Eredmények 26
4.1 DNS kivonás 26
4.2 Izolátorház fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata 26
4.3 . Új törzsültetvény fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata 29
4.4 . Öreg törzsültetvény fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata 31
4.5 . Termőültetvény fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata 32
4.6 Tisztított minták szekvenálása 33
5. Következtetések, javaslatok 35
6. Összefoglalás 37
7. Köszönetnyilvánítás 38
8. Irodalomjegyzék 39
9. Mellékletek 43
10. Nyilatkozat 45

1. Bevezetés és célkitűzések

Napjainkban, a klímaváltozás hatására egyre több gondot okoznak azok a növényeket megbetegítő kórokozók, amelyek ellen nincs kidolgozott növényvédelmi technológia, vagy engedélyezett növényvédő szer. Ez azért nagy probléma, mert az adott régióra nem jellemző rovarkártevők jelentek meg, emellett a globalizáció hatására megnőtt a világpiaci értékesítés, így különböző országokba, így Magyarországra is, távoli helyekről kerültek szaporítóanyagok.

A fent említett kórokozók közé tartoznak a fitoplazmák is, amelyek alaposabb megismerésére már egy évszázada óta folynak kutatások. Azonosításuk és jelenleg is használt elnevezésük a XX. század végén történt meg, *'Candidatus phytoplasma'* (SEEMÜLLER AND SCHNEIDER, 2004).

A fitoplazmás betegségek mai ismereteink szerint több mint 300 növényfajt érintenek. A legsúlyosabb gazdasági károk a gyümölcstermesztésben jelentkeznek, hiszen több éves, termelésben lévő fákat pusztíthatnak el, vagy bennük lappangva szolgálhatnak fertőzési forrásként. A gyümölcsfák életciklusa hosszú, több 10 év is lehet, ezért kiemelkedően fontos azok megóvása a kórokozóktól.

A betegség súlyosságát az is jelzi, hogy Magyarországon csak a kajszi termesztésben egyes területeken a fertőzöttség arányát 70-80%-osra becsülik. Hazánkban a csonthéjasok európai fitoplazmás sárgulása (European Stone Fruit Yellows) mellett a legnagyobb fenyegetést a szőlő aranyszínű sárgasága (Flavescence Dorée) fitoplazmás betegség 2013-as felbukkanása jelenti (NÉBIH, 2016).

Kutatásaink célja:

1. Az Érdi Gyümölcstermesztési Kutatóintézet kajszi ültetvényeinek fitoplazma fertőzöttségének felmérése.
2. Az esetlegesen jelenlevő fitoplazák rendszertani csoportjának meghatározása csoport (16SrX) specifikus primerekkel.
3. A fertőzött mintákban jelenlevő fitoplazmák rokonsági viszonyainak vizsgálata filogenetikai elemzéssel.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Fitoplazmák jellemzői

A fitoplazmák sejtfal nélküli kórokozó baktériumok, amelyek jelentős mennyiségi és minőségi kárt okozhatnak számos termesztett kultúrában, így a gyümölcsfélék esetében is. Jelenlegi rendszertani besorolás szerint a Mollicutes osztályba tartoznak. Méretük 500 nm körüli, genomjuk 500 és 1000 kb között változik fajtól függően (BAI ET AL, 2006).

Egyetlen sejtből állnak, melyet háromrétegű citoplazma membrán határol. A fitoplazmák a növényekben kizárólag a floémben fordulnak elő, halmozódnak fel.

A fitoplazmák a növényen általában sárgulást, torzulást vagy burjánzást idéznek elő, ezen tünetek miatt korábban vírusnak vélték a kórokozót.

2.1.1 A fitoplazmák rendszertani besorolása

A fitoplazmák rendszertani elhelyezése még nem teljesen tisztázott. Az 1960-as évekig vírusként tartották számon a kórokozót (SAMUEL ET AL. 1933, SZIRMAI 1956), ez a besorolás azon alapult, hogy előfordulásukkor hasonló sárgulásos tüneteket tapasztaltak, mint a vírussokkal fertőzött növényeken. 1967-ben Doi és munkatársai a vírusfertőzöttnek hitt növények floémében változó alakú sejtfal nélküli egysejtűeket találtak (DOI ET AL., 1967). Immun- és genetikai vizsgálatok alapján megállapították (LEE ET AL., 1993, SEEMÜLLER ET AL., 1994), hogy a kórokozók a Mollicutes osztályba tartoznak, legközelebbi rokonai az Acheloplasma-k, ezért is javasolták 1994-ben a fitoplazma (*'Candidatus phytoplasma*) elnevezést (SEARS ET AL., 1994).

Napjainkban a fitoplazmák kimutatására és azonosítása alkalmazott módszer a 16S rDNS szekvenciája alapján készített PCR analízis, amely segítségével pontosan megállapíthatjuk a fitoplazma jelenlétét az adott növényben. További vizsgálatokkal megállapítható, hogy a jelenlevő kórokozó melyik fitoplazma csoportba tartozik, illetve a pontos faj meghatározására is lehetőség nyílik.

Az univerzális primerek minden fitoplazma kimutatására alkalmasak (KIRKPATRIK ET AL. 1994), míg a csoportspecifikusak az adott fitoplazma csoportba tartozó összes fajt amplifikálják (LEE ET AL., 1992, AHRENS & SEEMÜLLER, 1992).

A szekvenciák analízise alapján 14 csoportot (16S csoportot) és 32 alcsoportot különítettek el, mely az 1. mellékletben található. A 16S csoportból a 16SrX almafa boszorkányseprűsödése csoport legjelentősebb tagjait szemléltetem (1. táblázat).

1. táblázat. A 16 SrX Almafa boszorkányseprűsödése csoport legjelentősebb tagjai.

X.	16S almafa boszorlányseprűsödése csoport	AP (apple ploriferation, almafa boszorkányseprűsödés)	’Ca. Phytoplasma mali'
		PD (pear decline/Italy, körte leromlás)	’Ca. Phytoplasma pyri'
		ESFY (European stone fruit yellows, csonthéjasok európai sárgulása)	**’Ca. Phytoplasma prunorum'**

A közeli rokonsági kapcsolat következményeként a három fitoplazma csoport DNS szekvenciája kevés különbséget mutat (LORENZ ET AL., 1994).

2.1.2 ’Ca. Phytoplasma prunorum’ jelentősége

A csonthéjasok európai fitoplazmás sárgulása (European stone fruit yellows, ESFY) Európában általánosan elterjedt. Gazdaságilag jelentős károkat főleg a mediterrán övezetben (Görögország, Franciaország, Spanyolország Olaszország) okoz, de az északabbra található országokban is, mint Németország és Csehország is azonosítottak már a kórokozót. Ezt a fitoplazmás megbetegedését régóta ismerik, a kajszi gutaütés részének tekinteték (LORENZ ET AL., 1994) és a csonthéjasok európai sárgulásának (European stone fruit yellows phytoplasma, ESFY-nek) nevezték el, de jelenleg *’Candidatus Phytoplasma prunorum’* a tudományos neve.

Rendszertani besorolása (CABI, 2016):

Domén: Bacteria
- Törzs: Firmicutes/Tenericutes
  - Osztály: Mollicutes
    - Rend: Acholeplasmatales
      - Család: Acholeplasmataceae
        - Nemzetség: Phytoplasma
          - Faj: Phytoplasma prunorum

2.1.3 Gazdasági jelentőségük

A betegség terjedése és előretörése Európában és Magyarországon az utóbbi tíz évben nagyon jelentős, ami sok esetben először csak gyenge termésminőséget, termésveszteséget, a fák élettartamának csökkenését, majd tömeges fapusztulást, sőt egész gyümölcsösök kipusztulást okozta. A megbetegedett fák kezelése és a kórokozó terjedésének megállítása kétséges (SÜLE, 2003; CARRERO ET AL., 2001).

Magyarországon a betegséget először SÜLE ET AL. (1997) azonosították 1992-ben. Azóta egyre több helyről számolnak be valószínűleg fitoplamák okozta kajszi gyümölcsfák tömeges pusztulásáról. Előfordult már a betegség Pest, Fejér, Somogy, Borsod-Abaúj-Zemplén, és Bács-Kiskun megyében, de legnagyobb károkról a Gönci Kajszi-termesztő régióból számoltak be (KÖVICS-TARCALI, 2015, HORVÁTH, 2015).

2.1.4 A betegség tünetei

1. ábra. Tünetek (forrás[1])

1. Boszorkányseprűsödés
2-3. Kanalasodás
4-5. Háncsszövet sárgulása

A fitoplazma a növény háncsszöveteiben él, a gyökerekben telel át. Tavasszal az új hácsszövet képződésekor indul meg a terjedése a fák további részeibe. Ez viszonylag lassú folyamat, nyár végére, ősz elejére éri el a fa minden részét. A fertőzés a megbetegedett fa körül körkörösen terjed tovább. Fiatalon megfertőzött fákban a kórokozó szisztemikusan terjed. Leveleken a tipikus tünetek, mint a kúpszerű kanalasodás május környékén jelennek meg. Általában a zöld főereket világoszöld zónák veszik körül, ennek következménye, hogy a megtámadott ágak lombozata sárgászöld lesz. A háncs kezdetben narancssárga, később világosbarna színezetűvé válik. Jellemző tünete a *Pseudomonas syringae* baktériumos és gombás betegségekkel ellentétben, hogy nem jár mézgaképződéssel (SÜLE, 2014a).

1 http://ujkarositok.weebly.com/european-stone-fruit-yellows-phytoplasma-esfy-csontheacutejasok-eruoacutepai-saacutergulaacutesa-fitoplazma.html

A fitoplazma fertőzés gyakori tünete az ellevelesedés, azaz a virágok helyén levélszerű képletek alakulnak ki, emellett előfordul, hogy a párta sejtjeiből hiányzó pigmentek miatt zöld virágok fejlődnek ki.

A fagyok gyorsítják a háncs károsodását, mivel kihajtás után részben vagy egészben elhal a fertőzött fa. Enyhébb teleken a beteg fák ősz végén kivirágozhatnak, majd később a következő fagyok után elpusztulnak. Ez a tünet a délebben fekvő országokban igen gyakori (1. ábra).

A fiatal korban megfertőzött fák fertőzése jár a legnagyobb kockázattal, mivel 6-8 év elteltével gutaütésre jellemző tünetekkel elpusztulnak. Az idősebb korban lévő fák fertőzése esetén, csak az egyes ágai fertőződnek, pusztulnak el. Amikor a fák gyors növekedési üteműek, abban az esetben a tünetek gyakran nem láthatóak.

2.2 Fertőzés kialakulása

A fitoplazmák önmagukban életképtelenek, a természetben a növények háncsszöveteiben, illetve rovarvektorokban élnek (CONTALDO ET AL, 2012).

A háncsszövet rostasejtjeinek pórusain keresztül az egész növényben szétterjednek, az asszimiláták felélése a levelek sárgulását és torzulását okozza, a felbomlott anyagcsere következtében elpusztulnak a háncsszöveti edénynyalábok, ami végül a gazdanövény pusztulásához vezet (SÜLE, 2014b).

A fitoplazmák növényen belüli terjedési módja még nem tisztázott. Néhány rostaelem több száz fitoplazma sejtet tartalmazhat, mások egyet sem. Feltételezhető, hogy a rostapórusoknak fontos szerepük van a kórokozó sejtek közötti vándorlásban, bár egyes megfigyelések szerint a vándorlását, olyan sejtek között is megfigyelték, amely sejtek között nem volt ilyen pórus (DAVIS & WHITCOM, 1981), így feltételezhető, hogy a plazmodezmákon keresztül is képesek terjedni.

2.2.1 Fitoplazmák terjedése – lehetséges vektorok

A betegség terjedésében a rovar vektorok szerepe meghatározó. Hazánkban először kabócákra gondoltak (DÉR ET AL., 2003), mint lehetséges fitoplazma vektorok, de vizsgálatokból kiderült (melyben egész Európából gyűjtöttek), hogy a *'Ca. P. prunorum'*-ot hordozó kabócák aránya igen alacsony (CARRARO ET AL., 2001).

Későbbi kutatások alkalmával, egyértelműen a szilva-levélbolhát (*Cacopsylla pruni*) nevezték meg, mint a betegség természetben előforduló elsődleges vektora, viszont nem zárható ki a növénytetvek, és poloskák vektorszerepe sem.

Emellett nem lehet figyelmen kívül hagyni az élősködő gyomnövényekkel történő terjedésüket sem. Kiemelendő az arankák (*Cuscuta spp.*) vektor szerepe a fitoplazmák terjedésénél (2. ábra).

2. ábra. Vektorok (1. Cacopshylla pruni 2. Psammotettix alienus 3. Cuscuta campestris, 4. Myzus persicae (forrás[2])

A fitoplazmák és vektoraik közötti kapcsolatokat számos tényező befolyásolja, mint pl. a gazdanövény, a vektorok fiziológiai állapota, fejlődési fokozata, neme, a hőmérséklet, a fény és a szél. A fitoplazma gazdanövény kapcsolatát, terjedését jelentősen befolyásolja az azt átvivő rovarvektor táplálkozási szokása (mono-, oligo- vagy polifág) és biológiája.

A fitoplazmák áttelelhetnek a rovarban vagy évelő növényekben.

[2] http://www.potatovirus.com/index.cfm/page/pvyinfo/aphidinfo.htm
http://www.flickriver.com/photos/34878947@N04/14082599766/
http://macroid.ru/showphoto.php?photo=158552&lang=en
http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Cuscuta_campestris_(Golden_Dodder).htm

2.2.1.1 Kabócák

A kabócákkal átvihető vírusok és fitoplazmák nem perzisztens, szemiperzisztens, cirkulatív perzisztens és propagatívak is lehetnek.

A nőstényvektorok hét generáción keresztül képesek a vírust átvinni. A propagatív vírusok replikációjának kezdeti helye az emésztőcsatornában van. A kórokozó később kimutatható a hemolimfából, a nyálmirigyekből és a petefészekből is. A sárgaság típusú betegségek kórokozói a rovar tojásával is terjedhetnek. Elsősorban a zsírtestecskékben és a sejtmagban okoznak kóros elváltozásokat. A kabócák élettartama gyakran megrövidül a fertőzést követően.

Előfordulnak polifág vektorok, de a legtöbb kabóca táplálkozása során csak egy vagy két növényfajra vagy nemzetségre szorítkozik (NICKEL, 2003), amely behatárolja azon fitoplazmák körét, amelyeknek vektorai lehetnek. Az eltérő fejlődési fokozatban lévő kabócák kórokozó-átvivő képessége eltérő. Számos kórokozót a kabócák csak lárva állapotban képesek felvenni, emellett az átvitel valószínűsége nagyobb, ha a felvételi szívást a vektor lárvaállapotban végezte (SINHA, 1960). A nemek kórokozó-átviteli képességében is különböznek, jellemzően a nőstényeké jobb, mint a hímeké. Egymástól távoli fitoplazma csoportokhoz tartozó kórokozók azonos növényfajokat is képesek fertőzni különböző helyeken. Vannak példák a rovarvektoroknál is kevert fertőzésre, mivel kutatások bizonyítják, hogy ugyanabban a rovarban két különböző fitoplazma törzs is előfordulhat (PALMANO & FIRRAO, 2000).

Az is előfordul, hogy az egymással szoros rokonságban lévő fitoplazmákat taxonómiailag közel álló rovarfajok terjesztik. Ezen megfigyelésekből arra következtettek, hogy a fitoplazmák az evolúció szempontjából inkább kötődnek a rovarokhoz, mint a növényekhez (BOUDON-PADIEU & MAIXNER, 1998).

A *'Ca. Phytoplasma prunorum'*-ot hordozó kabócák aránya igen alacsony (CARRARO ET AL., 2001).

2.2.1.2 Levélbolha

CARRARO ET AL., (2001a) Olaszországban begyűjtött *Cacopsylla pruni* egyedek segítségével meghatározták a fitoplazma átvitel legfontosabb tulajdonságait:

A legrövidebb kórokozó felvételi idő 2-4 nap. Így a levélbolhának a fertőzött növényen 2-4 napig kell táplálkoznia, hogy képes legyen a kórokozót továbbadni.

A legrövidebb lappangási idő 2-3 hét. Az átviteleket követően, mennyi idő elteltével tudták a kórokozót kimutatni a fertőzött növényekben.

A legrövidebb fertőzési idő 1-2 nap. Ennyi időre van szükség, hogy a fertőzött levélbolha egészséges fogékony növényeket megfertőzzön. A fertőzött levélbolhák fertőzőképességüket életük végéig megtartják.

Ezek alapján a levélbolha átvitel tipikusan perzisztens jellegű. CARRARO ET AL., (2001b) minden egyes növény és levélbolha esetében molekuláris biológiai eljárásokkal (PCR/RFLP) kimutatták a kórokozó jelenlétét. A fitoplazma átvitele lehetséges a gaméták útján is, mert a *'Ca. P. prunorum'*-ot petékből, lárvákból és frissen kelt imágókból is sikerült kimutatniuk (Tedeschi et al., 2006). Számos esetben igazolták, hogy a fitoplazma képes áttelelni a vektorszervezetben (KISS ET AL.. 2015, DAVIES & SINCLAIR, 1998, TEDESCHI ET AL., 2003, CERRATO ET AL. 2001c).

SÜLE ET AL. 2005-2007 vizsgálták a levélbolhák megjelenését az ültetvényeken, azt figyelték meg, hogy az áttelelő levélbolhák február végén jelentek meg a gyümölcsfák rügyein és vesszőin. Az ilyenkor befogott imágók 30-40 %-ban voltak fitoplazmával fertőzöttek. A második, világosabb színű egyedek viszont szinte teljesen mentesek voltak fitoplazmától (0-1 % a fertőzött egyeded száma), megjegyezték viszont, hogy az olajos és abamektin hatóanyagú inszekticidek hatására jelentősen lecsökkent a *Cacopsylla pruni* egyedszáma. Áprilistól szeptemberig 5-10 %-ra emelkedett a fitoplazmával fertőzött egyedek száma. Szeptembertől, a levélbolhák száma megnőtt, ezzel párhuzamosan növekedett a fertőzött egyedek száma is (15-20%), ezt a változást annak tulajdonították, hogy a gyümölcsök betakarítása előtt már nem alkalmaztak rovarölő szereket. Október közepén az egyedek már 17-25 %-os fertőzöttséget mutattak (JENSER ET AL., 2009, SÜLE, 2007).

A szilva-levélbolha még nem vált széleskörűen elterjedté Magyarországon, de jelen van Budapest környékén, Vas megyében és Borsod-Abaúj-Zemplém megyében is (Kövics-Tarcali 2015b).

Terjedésének szempontjából fontos szerepe van az ültetvény körüli toleráns fajoknak, mint a kökény (*Prunus spinosa*), cseresznyeszilva (*Prunus cerasifera*), elvadult szilva (*Prunus*

domestica), mivel ezek áttelő helyként szolgálnak a levélbolháknak (JARAUSCH ET AL., 2000).

2.2.1.3 Cuscuta fajok

A *Cuscuta* nemzetségbe tartozó fajok levél nélküli, megnyúlt, fonalszerű szárral rendelkező gyomnövények. Klorofillban szegények, ennek következtében más növényeken élősködnek. Az arankák a száron kifejlődő szívógyökerek, azaz hausztóriumaik segítségével veszik fel a gazdanövényből a táplálékot, és ezzel egy időben gyakran a vírusokat, fitoplazmákat is. A kórokozó átvitele passzívan történik, a parazita és a növény között zajló táplálék áramlása következtében. A tápanyagok a szívógyökér keresztül mind a fertőzött, mind az egészséges növény edénynyaláb-rendszeréből az aranka floémjébe jutnak, és itt keverednek egymással. A legtöbb aranka faj alkalmas az átvitelre, de a hatékonyság fajonként különböző lehet. Legjelentősebbek a *Cuscuta subinclusa* és a *Cuscuta campestris* fajok Olyan növényekre is átvihető a kórokozó arankával, amelyek a szövet-inkompatibilitás miatt nem mutatják az átvitelt sem oltással, sem szemzéssel (HORVÁTH & GÁBORJÁNYI, 1999), viszont a Cuscuta fajokkal történő fitoplazma terjedésnek csak lágyszárú kultúrákban lehet jelentősége, gyümölcsösökben nem mutatták ki jelentőségüket fitoplazma vektorként.

2.3 Fitoplazmák elleni védekezési lehetőségek

A már fertőzött, érzékeny fák a legtöbb esetben elpusztulnak (60-80%), spontán tünetmentességet csak ritkán tapasztaltak (MARCONE ET AL., 2010a). Mivel a fertőzött fák a legtöbb esetben elpusztulnak, nincs a védekezés ellen kidolgozott növényvédelmi technológia, így a védekezés tehát csak a megelőzés lehet.

Ehhez ismerni kellene a fertőzés forrásait és terjedési lehetőségeit. A fertőzés forrásai a beteg növények és a kórokozót hordozó tünetmentes fák, cserjék, melyek vektorok közvetítésével terjednek.

Ezért a szaporítóanyag egészségessége kiemelten fontos, csak ellenőrzött forrásból származó szaporító anyag választása telepítéskor. A másik védekezési megoldás a vektorok korlátozása. Jövőbeni lehetőség lenne a rezisztencia-nemesítés, de annak még számos nehézsége van (AUDERGON, 1997, SÜLE 2014).

A kórokozó vektora a szilva-levélbolha (CARRARO ET AL., 2001d, FIALOVÁ ET AL., 2007, TEDESCHI ET AL., 2006, TORRES ET AL., 2004) elleni célzott védekezés.

A hatásos védekezés kidolgozásához ismernünk kell a levélbolha kórokozó terjesztését meghatározó tulajdonságát, illetve populációdinamikáját (egyedszám, vándorlás iránya, fontosabb populációs és fejlődési időpontok) (BOZSIK, 2014a).

Ezeket az európai országok többségében már pontosan meghatározták (CARRARO ET AL., 2001e, TEDESCHI ET AL., 2006, FIALOVÁ ET AL., 2007, MARCONE ET AL., 2010b). Hazánkban még erről pontos adatokat eddig senki se közölt.

A védekezést már kora tavasszal az imágók ellen meg kellene kezdeni, majd a peterakás idején kell megakadályozni elszaporodásukat. Virágzáskor valamint késő tavasszal és nyáron szelektív beavatkozásra van szükség a méhek és a természetes ellenségek védelme érdekében (MARCONE ET AL., 2010c).

Az alanyok általában *Prunus domestica, P. cerasifera* és *P. salicina*. Ezen fajták többnyire nagyszámú sarjat hoznak, amelyek a *Cacopsylla pruni* kedvelt tápnövényei. Ezért a levélbolhák visszavándorlását megelőzően gondoskodjunk az alanysarjak eltávolításáról (LABONNE AND LICHOU, 2004 IN MARCONE ET AL., 2010).

Emellett a fertőzött fák eltávolítása az ültetvényből nagyon fontos, mivel fertőzési forrásként szolgálhatnak a kórokozó terjesztéséhez.

A vadon előforduló *Prunus* fajok a kórokozó fennmaradásában fontos szerepet játszanak, ezért az ültetvények közelében ezek vizsgálata és a fertőzött egyedek eltávolítása indokolt (MARCONE AT AL., 2010d).

Mind az alanyok, mind a nemes részt illetően is szükség van rezisztens fajtákra. Ezek érzékenysége a fitoplazmával szemben különböző ellenállóságot mutatnak. Eddig a gyakorlatban felhasználható rezisztens szaporító anyagot nem találtak. A legnagyobb ellenállóképességet több keresztezett ringlófajta esetén találták, de ezek sem mutattak száz százalékos ellenállóságot (JARAUSCH ET AL., 2000).

A korábbi években voltak kísérletek avirulens vagy gyenge fertőzőképességű kórokozótörzsek felhasználásával történő keresztvédettség kialakítására (MORVAN ET AL., 1986 IN MARCONE ET AL., 2010), de az ezekkel kapcsolatos adatok még hiányosak.

A célzott védekezés érdekében az ültetvények termesztési körzeteiben folyamatosan meg kell figyelni a *Carcopsylla pruni* népességváltozását: egyedszám (ivararány is), a vándorlás iránya (érkezés az ültevényekbe, párosodási, peterakási időszak, az új nemzedék megjelenése, a

vándorlás kezdete, érkezés a telelőhelyre), fontosabb populációs és fejlődési időpontok (érkezés az ültevényekbe, párosodási, peterakási időszak, az új nemzedék megjelenése, a vándorlás kezdete, érkezés a telelőhelyre) (BOZSIK, 2014b).

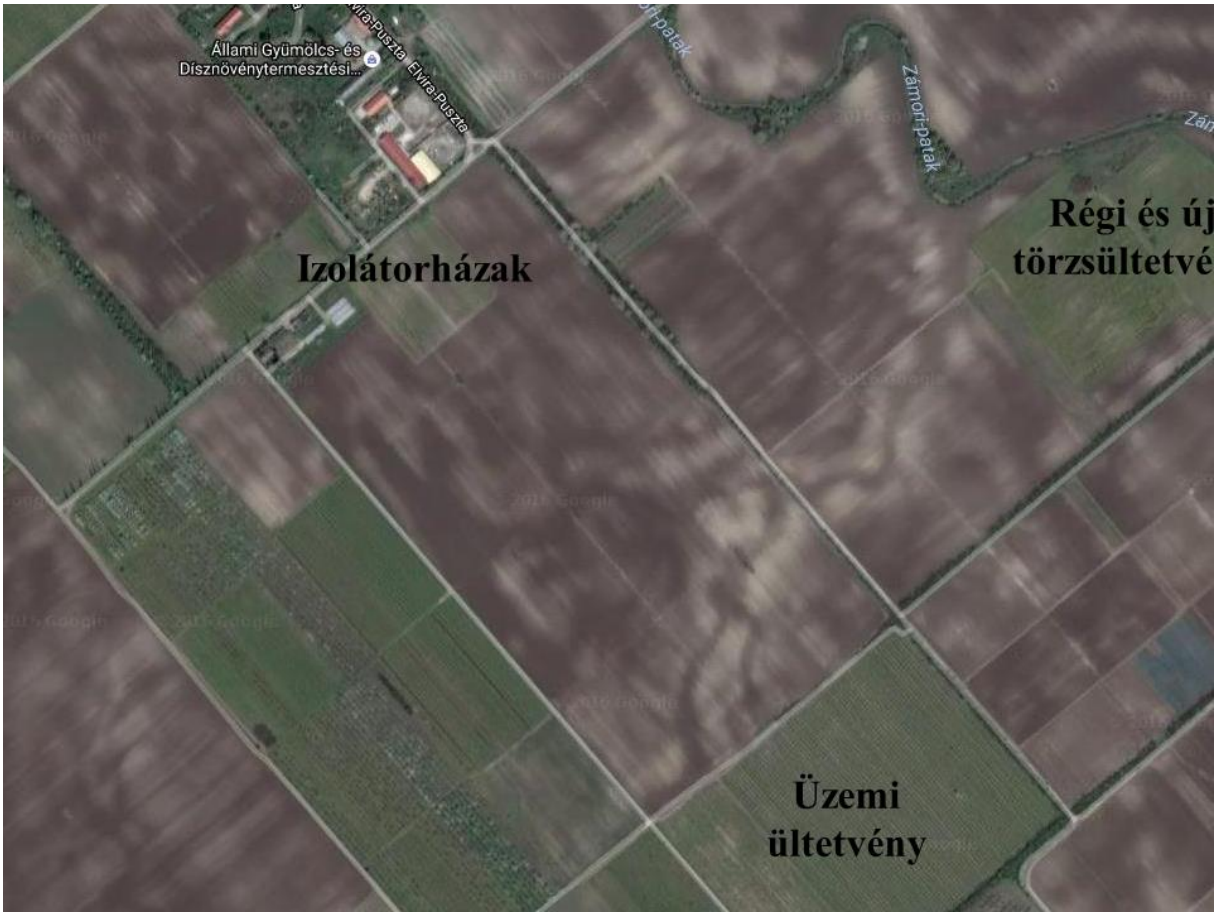
Erre épülhet a *'Ca. P. prunorum'* természetben előforduló gazdanövényeinek helyi felderítése és azok fertőzöttségének megállapítása, és erre alapozva olyan növényvédelmi technológia használata, amely figyelembe veszi a környezeti és fenntarthatósági szempontokat egyaránt.

3. Anyag és módszer

3.1. Mintavétel

Kutatásomhoz az Érdi Gyümölcstermesztési Kutatóintézet izolátorházából, régi és új törzsültetvényéről, illetve termő ültetvényről különböző kajszibarack fajtákról gyűjtöttünk mintákat (3. ábra).

A mintául szolgáló leveleket 2016. május 11-én az érdi Elvira majorból gyűjtöttük, négy különböző helyszínről, egy izolátorházból, öreg törzsültetvényből, új törzsültetvényből és termőültetvényből. A leveleket a felhasználásig -70 °C-on tároltuk.



3. ábra. Területi elhelyezkedés (forrás: Google Maps)

Mintavételezés során gyűjtött mintákat a 2. táblázatban szemléltetem.

2. táblázat: Gyűjtött minták

Izolátorház		Új törzsültetvény		Öreg törzsültetvény	
1	Ceglédi óriás	1	Ligeti óriás	1	Budapest
2	Ceglédi bíbor	2	Ceglédi bíbor	2	Gönci magyar
3	Bergeron	3	Bergeron	3	Ceglédi bíbor
4	Budapest	4	Budapest	4	Ceglédi bíbor
5	Ceglédi arany	5	Ceglédi arany	5	Cseresznye Rita
6	Ceglédi óriás	6	Ceglédi óriás	6	Harmat
7	Ceglédi piroska	7	Ceglédi óriás	7	Korai piros
8	Ceglédi bíbor	8	Ceglédi arany	8	Korai piros
9	Gönci magyar	9	Ceglédi óriás	9	MK132
10	Harcot	10	Gönci magyar	10	Magyar kajszi
11	Harmat	11	Harcot	11	Pannónia
12	Harmat	12	Harcot	12	Pannónia
13	Korai piros	13	Harcot	**Termőültetvény**	
14	Ligeti óriás	14	Harmat	1	Beteg
15	Magyar kajszi	15	Korai piros	2	elpusztult
16	Maliga kajszi	16	Magyar kajszi	3	Fiatal gyanús
17	Mandula kajszi	17	Magyar kajszi	4	Flavorcot
18	OrangeRed	18	Maliga kajszi	5	Flavorcot
19	Pannónia	19	Mandula kajszi	6	Flavorcot
20	Rakovszky	20	Orange red	7	Gönci magyar
21	Rózskajszi	21	Pannónia	8	Sweetcot
22	Velcot	22	Pannónia	9	Sweetcot
		23	Rakovszky		

Izolátorház

Izolátor alatt a Sharka (PPV) gazda csonthéjasok elit egyedeit tartják, külön háló alatt a kajszit, őszit és szilvát.

Így azt steril, vektormentes környezet jellemzi, kizárólag magyar fajták nőnek az izolátoházakban (4. ábra).

4. ábra. Izolátorházak (forrás: Google Maps)

Mintavétel során a mintázott egyedekről fényképeket készítettünk. A szemle során a különböző fajták egészségesnek tűntek.

5. ábra. Izolátorházban található kajszi gyümölcsfák (forrás: saját felvételek)

Új törzsültetvény

Az új törzsültetvényt néhány éve telepítették az izolátorházakból származó magyar fajtákkal. Az állomány nagy része egészségesnek tűnt a mintavételezés során, de nagyon sok rovarkártétel volt megfigyelhető számos fán (6. ábra).

6. ábra. Új termőültetvénynél található kajszi gyümölcsfák (forrás: saját felvételek)

Öreg törzsültetvény

Főleg magyar kajszifajták, illetve mintavételre került egy jellemző „boszorkányseprűsödés” tünettel rendelkező cseresznyefajta is.

Az öreg törzsültetvényben különböző állapotú fákkal találkoztunk. Voltak betegnek, és egészségesnek látszó egyedek is (7. ábra).

7. ábra. Öreg törzsültetvénynél található kajszi gyümölcsfák (forrás: saját felvételek)

Termőültetvény

A termő ültetvényen főleg francia fajtákat termesztenek, de magyar fajták is megtalálhatóak. A fajtaválasztása piaci igényeknek megfelelő, a termelt gyümölcs értékesítése a Gyümölcsért TÉSZ keretein belül történik.. Az itt mintázott egyedek nagy része fitoplazma fertőzésre jellemző tüneteket: sárgulás, levélsodródás mutatott (8. ábra).

8. ábra. Termőültetvénynél található kajszi gyümölcsfák (forrás: saját felvételek)

3.2. DNS tisztítás

A fitoplazma DNS legnagyobb mennyiségben az erekből, levélnyelekből, és a floémből vonható ki. Az összegyűjtött levélmintákból NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) kit segítségével DNS-t vontunk ki. Az izolátorházból 22 db mintát, az öreg törzsültetvényből 12 db, az új törzsültetvényből 23 db, illetve a termőültetvényből, 9 db mintát vizsgáltunk, összesen 66 db minta állt a rendelkezésünkre.

A DNS tisztítás menete:

1. A minta homogenizálása
2. A sejtek lízise (sejtfeltárás)

   A mintához 400 µl PL1 Buffert és 10 µl RNase A-t adunk, majd összekeverjük a mintával.

   Ezt követően 10 percig, 65 °C-on tartjuk.
3. A minta tisztítása a törmelékektől

   NukleoSpin szűrőre helyezzük a feltárt sejteket, majd két percig centrifugáljuk.

   Az átfolyóhoz hozzáadunk 450 µl PC Buffert, majd vortexeljük.
4. DNS kötése az oszlophoz

   A törmelékektől megtisztított, feltárt sejteket NukleoSpin Plan II. oszlopra helyezzük, majd egy percig centrifugáljuk. A minta DNS taralma ekkor az oszlophoz kötve marad.
5. Mosás

   Az oszlophoz kötött DNS-t 3 lépésben mossuk, ekkor az esetlegesen megkötött szennyező anyagok az oldatba kerülnek, a mosás végén már csak a tiszta DNS marad az oszlophoz kötve.

   1. Mosás: 400 µl PW1 Buffert mérünk az oszlopra, majd egy percig centrifugáljuk.
   2. Mosás: 700 µl PW2 Buffert mérünk az oszlopra, majd egy percig centrifugáljuk.
   3. Mosás: 200 µl PW2 Buffert mérünk az oszlopra, majd egy percig centrifugáljuk.
6. DNS elúciója az oszlopról

   Az oszlopra 50µl PE Buffert mérünk, majd 65 °C-on 5 percig tartjuk, ezt követően egy percre centrifugáljuk maximális fordulaton, majd ezt a lépést megismételjük.

Az így nyert tisztított DNS minőségét és mennyiségét 1,2% agaróz gélen való elválasztás után vizualizálva illetve Nanodrop spektrofotométeren mérve állapítottuk meg. Tisztított DNS

mintáink általában megfelelő koncentrációval rendelkeztek a további vizsgálatokhoz. Pozitív kontrolként Aster Yellows fitoplazmával fertőzött Tagetes-t használtunk.

3.3. Fitoplazma detektálás PCR-el

A PCR reakcióhoz univerzális (P1 és P7) és 16SrX csoportspecifikus (fO1 és rO1) indítószekvenciákat használtunk (DANET ET AL., 2011).

A reakcióelegy az alábbi összetevőkből állt 1 PCR reakcióra:

MQ:	8,4 µl
5×Buffer:	3 µl
10mM dNTP:	0,3 µl
Primerek: forward → :	1µl
reverz ← :	1µl
Phire enzim:	0,3 µl
Templát	1 µl

A fitoplazma DNS fragmenteket negyven ciklusban szaporítottuk fel a következő paraméterek mellett:

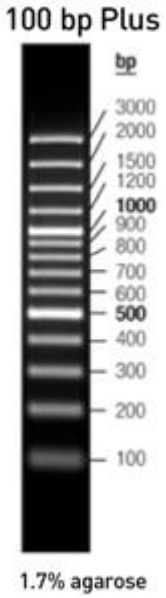
1. Denaturáció: A kettős szálú DNS-t 98 °C-ra hevíti, hogy a szálak szétváljanak. A két DNS – szálat összekötő hidrogénkötések felbomlanak. Időtartam: 10 sec.
2. Annealing: A DNS szálak szétválása után a hőmérséklet csökken, így a primerek hozzá tudnak kapcsolódni a DNS-szálakhoz. Ennek a hőmérséklete a primerektől függ, esetünkben: 55 °C. Időtartam: 10 sec.
3. Lánchosszabítás: a DNS-polimeráz létrehozza a hiányzó szálat. A kapcsolódott primerrel kezdi, és végigmegy a DNS szálon. A szintetizálás során a szülő nukleinsavszál szolgál templátként a leány lánc szintetizálásához. A hosszabbítás hőmérséklete a DNS polimeráztól függ. A lépés időigénye egyrészt függ magától a DNS-polimeráztól, másrészt az amplifikálandó DNS-szakasz hosszától. Ebben az esetben 72°C- on, melynek időtartama: 20 sec.

A mintákat először univerzális (P1-P7), 1784 bp méretű terméket amplifikáló primerekkel vizsgáltuk. Ezekkel a primerekkel minden eddig ismert fitoplazmát ki lehet mutatni. Használatukkal azt tudjuk megállapítani, hogy az adott minta fertőzött fitoplazmával.

Nested PCR

Az fO1-rO1 primerekkel, az első PCR reakcióban termékként kapott DNS használva templátként, egy 1071 bp nagyságú DNS terméket kapunk, abban az esetben, ha az általunk vizsgált fitoplazma a (16SrX) almafa boszorkányseprűsödése csoportba tartozik. Ez a módszer a kimutatás érzékenységét jelentősen növeli. A Nested PCR-t ugyanazokkal a paraméterekkel végeztük el, mint az egyszerű PCR esetében.

A fragmentek méretének becslésére a mintákkal egy gélen elválasztott GeneRuler DNA Ladders markert használtam.



Az első PCR-nél, melyet univerzális primerekkel végeztünk el 1784 bp-os terméket vártunk, míg második PCR-nél specifikus primerek hazsnálatával 1071 bp terméket kerestünk, ami igazolja, hogy az adott minta fitoplazma fertőzött, vagy sem.

3.4. PCR termékek izolálása agaróz gélből és tisztítása

A kiválasztott minták PCR termékeit 12% agaróz gélen elválasztottuk, majd a megfelelő méretű terméket kivágtuk az agaróz gélből. A termék láthatóvá tételére UV fényt, a kivágáshoz steril szikét használtunk.

Következő lépésként a Thermo Scientific GeneJET Extraction Kit segítségével izoláltam és tisztítottam a fragmentet az agaróz gélből:

1. A mintákhoz 100 µl kötő-puffert (Binding Buffert) adtunk

2. Az így kapott elegyet 65 °C-on melegítettük 10 percig
3. A feloldott terméketGeneJet tisztítóoszlopra helyeztük, majd 1 percig, maximális fordulaton centrifugáltuk.
4. Az átfolyót eldobtuk, és az oszlopra 100 µl kötő-puffert (Binding Buffer) pipettáztunk, majd 1 percig, maximális fordulaton centrifugáltuk.
5. Az átfolyót eldobtuk, és az oszlopra 700 µl mosó puffert (Washing Buffer) pipettáztunk, majd 1 percig maximális fordulaton centrifugáltuk.
6. Az átfolyót eldobtuk, és az oszlopot még egy percig maximális fordulaton centrifugáltuk, hogy biztosan megtisztuljon az alkoholt tartalmazó mosó puffertől
7. A tiszta DNS-t az oszlopról 50µl Elúciós pufferrel (Elution Buffer) eluáltuk: a puffert az oszlopra pipettáztuk, majd az oszlopot tiszta csőbe helyezve egy percig maximális fordulaton centrifugáltuk.

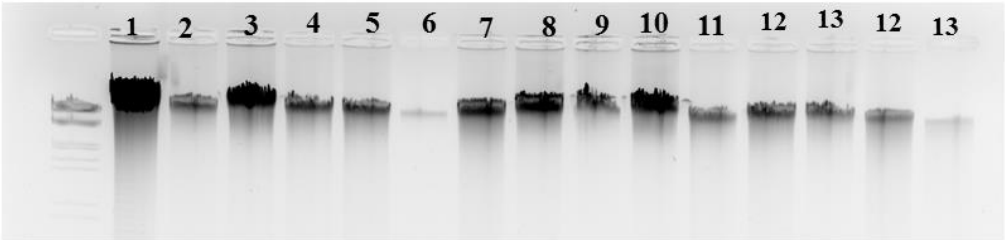
Az így kapott tiszta termék mennyiségét 1,2% agaróz gélen való elválasztással ellenőriztük, majd megfelelő indítószekvenciák segítségével a BIOMI Kft-vel megszekvenáltattuk.

4. Eredmények

4.1 DNS kivonás

A DNS kivonáshoz NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) kit-et használtunk. Az így kapott minták megfelelő koncentrációval rendelkeztek a további vizsgálatokhoz.

A módszer jól működött a csonthéjas mintákon (9. ábra), segítségével egy levélből 150-500 ng/µl DNS-t nyertünk ki.



9. ábra. Az izolátozházból származó minták DNS kivonatainak képe 1,2% agaróz gélen való elválasztás után.

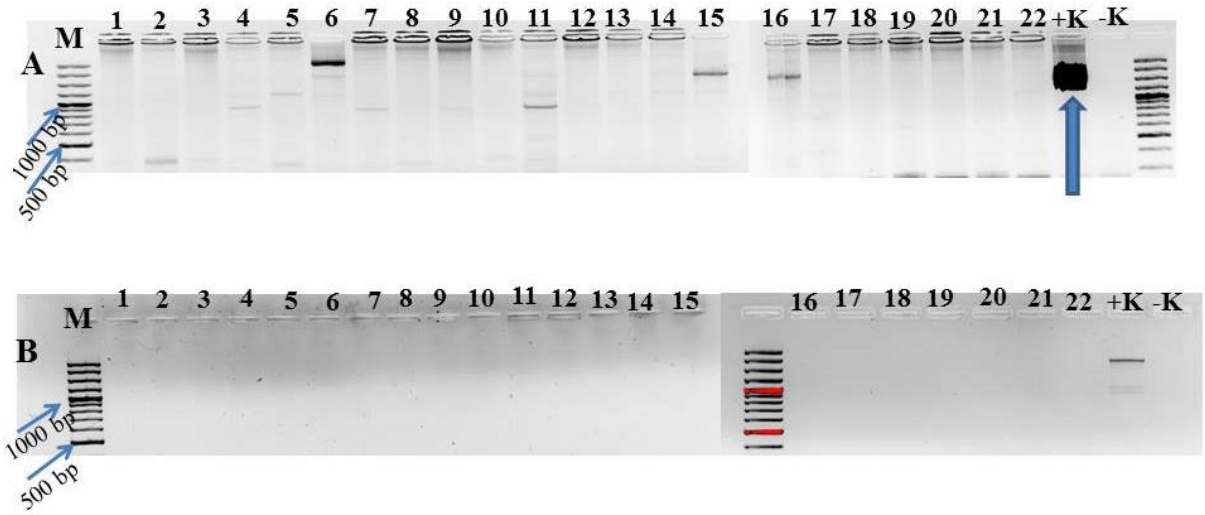
4.2 Izolátorház fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

Kutatásom során 22 darab minta fitoplazma fertőzöttségét szerettem volna megállapítani.

A minták DNS kivonatairól először univerzális (P1-P7), 1784 bp-os terméket amplifikáló primerekkel végeztem PCR reakciót.

A PCR eredményeképpen kapott termékeket templátként használva nested PRC reakciókat indítottunk, melyhez 16SrX csoport specifikus (fO1 és rO1) indítószekvenciákat használtunk.

A PCR reakciók eredményeképpen az alábbi eredményeket kaptuk (10. ábra).



10. ábra. Az izolátorháznál gyűjtött minták DNS kivonásainak nested PCR analízise A/P1/P7 általános fitoplazma specifikus B/fO1/rO1 16SrX csoportspecifikus indítószekvenciákat használva. Az fO1/rO1 primerekkel végzett PCR reakcióhoz a P1/P7 primerekkel amplifikált termékek szolgáltak templátként.
M: Marker: 100 bp Plus
+K: *Aster Yellow* fitoplazmával fertőzött *Tagetes* DNS kivonatát használtuk.
-K: templát helyett desztillált vizet használtunk.

Vizsgálatunkból az derült ki, hogy az izolátorházból gyűjtött minták fitoplazma mentesnek tekinthetőek.

Összegezve a kapott eredményeket a 3. táblázatban szemléltetem.

3. táblázat: Izolátorházból származó mintákból kapott eredmények összegzése

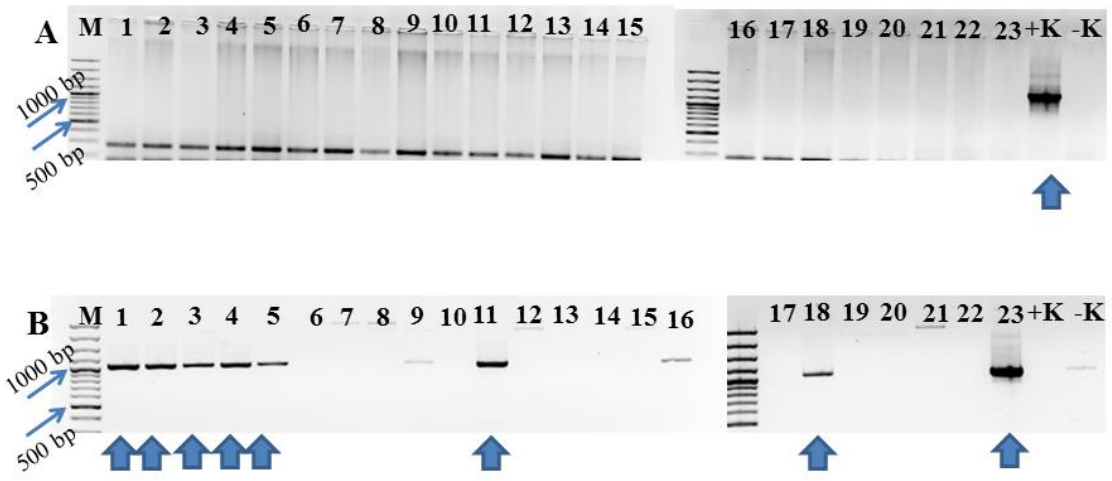
	Izolátorház	fitoplazma	ESFY
1	Ceglédi óriás 1/1	-	-
2	Bergeron 1/5	-	-
3	Ceglédi óriás 1/9	-	-
4	Ceglédi arany 1/13	-	-
5	Harcot 1/17	-	-
6	Ceglédi bíbor 1/21	-	-
7	Ceglédi bíbor 1/23 T	-	-
8	Gönci magyar 1/25	-	-
9	Rakovszky 1/30	-	-
10	Maliga kajszi MK132 2/1	-	-
11	Budapest 2/5	-	-
12	Pannónia 2/9	-	-
13	Ceglédi piroska 2/13	-	-
14	OrangeRed 2/17	-	-
15	Harmat 2/21	(+)	-
16	Harmat 2/22 T	(+)	-
17	Mandula kajszi 2/25	-	-
18	Velcot 2/29	-	-
19	Ligeti óriás 3/1	-	-
20	Rózskajszi 3/5	-	-
21	Korai piros 3/9	-	-
22	Magyar kajszi 3/13	-	-

4.3 . Új törzsültetvény fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

Az új törzsültetvénynél gyűjtött mintákból is először DNS-t vontunk ki. Ezt követően univerzális (P1-P7), 1784 bp-os terméket amplifikáló primerekkel végeztünk PCR reakciókat.

Ezt követően a PCR-ből kapott terméket használva templátkéntújabb nested PRC reakciókat mértünk össze, melyhez 16SrX csoportspecifikus (fO1 és rO1) indítószekvenciákat használtunk.

A PCR reakciók eredményeképpen az alábbi eredményeket kaptuk (11. ábra).



11. ábra. A termőültetvényen gyűjtött minták DNS kivonásainak nested PCR analízise A/P1/P7 általános fitoplazma specifikus B/fO1/rO1 16SrX csoportspecifikus indítószekvenciákat használva. Az fO1/rO1 primerekkel végzett PCR reakcióhoz a P1/P7 primerekkel amplifikált termékek szolgáltak templátként.
M: Marker: 100 bp Plus
+K: *Aster Yellow* fitoplazmával fertőzött *Tagetes* DNS kivonatát használtuk.
-K: templát helyett desztillált vizet használtunk.

Az ábra jól szemlélteti, hogy az első körben használt univerzális primerekkel (P1/P7) nem sikerült kimutatni a fitoplazma jelenlétét a mintákból.

Az érzékenyebb primereket (fO1/rO1) használva viszont már találtunk fitoplazmát a mintákban. Megfigyelhető, hogy a 23 db mintából 8 db fertőzött fitoplazmával az új törzsültetvények esetében (4. táblázat)

4. táblázat: Új törzsültetvényből származó mintákból kapott eredmények összegzése

	Új törzsültetvény (ÚT)	fitoplazma	ESFY
1	Ligeti óriás 11/22	-	+
2	Gönci magyar 8/1	-	+
3	Bergeron 8/25	-	+
4	Ceglédi arany 9/1 (gyanús)	-	+
5	Ceglédi bíbor 9/26	-	+
6	Orangered 11/17	-	-
7	Harmat 11/8	-	-
8	Budapest 11/2	-	-
9	Ceglédi arany 9/19	-	-
10	Magyar kajszi 11/24	-	-
11	Harcot 10/40	-	+
12	Magyar kajszi 11/33	-	-
13	Harcot 10/31	-	-
14	Ceglédi óriás 10/20	-	-
15	Rakovszky 8/43	-	-
16	Mandula kajszi 11/39	-	+
17	Korai piros 10/42	-	-
18	Pannónia 12/2	-	+
19	Ceglédi óriás 10/1	-	-
20	Ceglédi óriás 10/24	-	-
21	Maliga kajszi 9/42	-	-
22	Pannónia 12/8	-	-
23	Harcot (gyanús)10/40	-	+

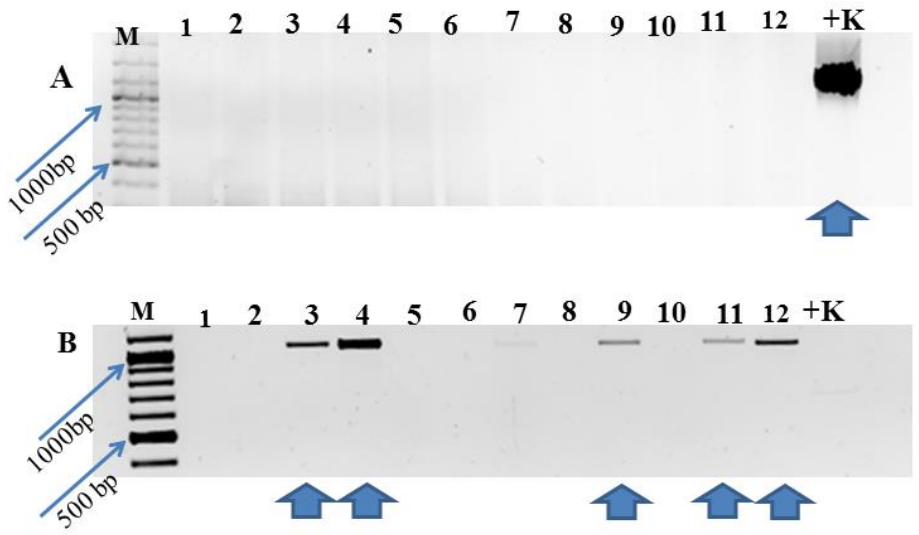
4.4 . Öreg törzsültetvény fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

Kutatásomhoz az öreg törzsültetvényről 12 darab mintát vizsgáltam.

A minták DNS kivonatairól először univerzális (P1-P7), 1784 bp-os terméket amplifikáló primerekkel végeztem PCR reakciót.

Ezt követően a PCR eredményeképpen kapott termékeket templátként használva nested PRC reakciókat indítottunk, melyhez 16SrX csoportspecifikus (fO1 és rO1) indítószekvenciákat használtunk.

A PCR reakciók eredményeképpen az alábbi eredményeket kaptuk (12. ábra).



12. ábra. Az törzsültetvénynél gyűjtött minták DNS kivonásainak nested PCR analízise A/P1/P7 általános fitoplazma specifikus B/fO1/rO1 16SrX csoportspecifikus indítószekvenciákat használva. Az fO1/rO1 primerekkel végzett PCR reakcióhoz a P1/P7 primerekkel amplifikált termékek szolgáltak templátként.
M: Marker: 100 bp Plus
+K: *Aster Yellow* fitoplazmával fertőzött *Tagetes* DNS kivonatát használtuk.
-K: templát helyett desztilállt vizet használtunk.

PCR eredményeink azt mutatják, hogy amíg az univerzális primerek használatával (A) csak a pozitív kontrollban volt kimutatható a fitoplazma, az érzékenyebb csoport specifikus primerek használatával (fO1/rO1) már a 12 db mintából, 5 db minta fertőzött 16SrX csoportba tartozó fitoplazmával.

Eredményeinket az 5. táblázatban szemléltetem.

5. táblázat: Öreg törzsültetvényből származó mintákból kapott eredmények összegzése

	Öreg törzsültetvény (ÖT)	fitoplazma	ESFY
1	beteg	-	-
2	Pannónia	-	-
3	Pannónia 17/40	-	+
4	Ceglédi bíbor 18/45	-	+
5	Ceglédi bíbor 18/42	-	-
6	Gönci magyar 19/40	-	-
7	Budapest 23/42-45	-	-
8	Korai piros 27/38-40	-	-
9	Mk132 29/27-40	-	+
10	Harmat 30/37	-	-
11	Cseresznye rita 29/35	-	+
12	Korai piros 27/36-40	-	+

4.5 . Termőültetvény fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

Az termőtörzsültetvénynél gyűjtött mintákból DNS kivonást követően univerzális (P1-P7), 1784 bp-os terméket amplifikáló primerekkel vizsgáltuk a mintákat első lépésben.

Ezt követően – a korábbi gyakorlattal megegyezően - a PCR-ből kapott termékeket tovább vizsgáltuk nested PCR-rel, melyhez 16SrX csoportspecifikus (fO1 és rO1) indítószekvenciákat használtunk.

Az fO1 és rO1 primerekkel vizsgált PCR reakció az alábbi eredményeket adta. (13. ábra)

13. ábra. FO1/rO1 16SrX csoportspecifikus indítószekvenciákat használva. Az fO1/rO1 primerekkel végzett PCR reakcióhoz a P1/P7 primerekkel amplifikált termékek szolgáltak templátként.
M: Marker: 100 bp Plus
+K: *Aster Yellow* fitoplazmával fertőzött *Tagetes* DNS kivonatát használtuk.
-K: templát helyett desztilállt vizet használtunk.

Az eredmények azt mutatják, hogy a termőültetvénynél gyűjtött 9 db mintából, 8 db fertőzött fitoplazmával, ez nagyon erős fertőzési rátát mutat.

Összegzésképpen a 6. táblázatban szemléltetem a termőültetvény mintáiból kapott eredményeket.

6. táblázat: Termőültetvényből származó mintákból kapott eredmények összegzése

Termőültetvény	fitoplazmaPCR	16SrX	Sanger szekvenálás
T 2/1 beteg	(+)	+	+
T/2 Sweetcot	+	+	
T/3 Sweetcot	+	+	
T/4 Gönci magyar	-	+	
T/5 Flavorcot	+	+	+
T/5 sarj			
T/6 Flavorcot	+	-	
T/7 elpusztult	+	+	
T/8 Flavorcot	+	+	
T/9 fiatal gyanús	+	+	+

4.6 Tisztított minták szekvenálása

További analízisre 3 db mintát választottunk ki, melyek fO1/rO1 16SrX csoportspecifikus primerekekel lettek amplifikálva. A PCR termékeket gélből kivágtuk, tisztítottuk és szekvenáltattuk.

16SrX csoportból csak a *'Ca. Phytoplasma mali'* teljes genomja ismert, ezért megkerestük ezen a szekvencián az fO1/rO1 primerekkel határolt génszakaszt.

Ezt a *'Ca. Phytoplasma mali'* spcifikus 16S rRNS génszakaszt hasonlítottuk össze az NCBI BLAST program segítségével az NCBI adatbázisában található szekvenciákkal. Az összehasonlítás azt mutatta, hogy ez a DNS szakasz legjobban *'Ca Phytoplasma prunorum' 'Ca. Phytoplasma pyri'* és *'Ca. Phytoplasma mali'* 16SrRNS szekvenciákhoz hasonlít.

A Clustal Omega illesztő program segítségével meg lehet állapítani, hogy bizonyos szekvenciák, mennyire hasonlítanak, mennyire térnek el egymástól, illetve bázisbárra lebontva látható hol van az eltérés a szekvenciákban.

Tehát a BLAST program segítségével kigyűjtött szekvenciákat bemásoltuk a Clustal Omega programba, amely elkészítette az illesztéseket. A csillaggal jelölt részek teljes egyezést

jelentenek a szekvenciák között, ahol nincs csillag ott bázispár eltérés van, egy vagy több szekvenciában is.

Az szekvencia illesztéshez nemcsak az adatbázisból kigyűjtött szekvencia darabokat használtuk fel, hanem a termőültetvényről származó mintáinkról (T1, T5, T9), általunk amplifikált fO1 és rO1 primerekkel készített PCR termékek szekvenciáját is. A szekvenálás eredménye alapján egyértelmű, hogy *'Ca Phytoplasma prunorum'* van a mintánkban, mivel 99%-os egyezést mutat az adatbázisban található izolátum szekvenciájával (14. ábra).

```
T9_16S                      TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
T5_16S                      TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
DQ011588.1_pyri_16S         TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
AJ542543.1_pyri_16S         TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
CU469464_mali_16S           TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
T1_16S                      TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
AM933142.1_prunorum_16S     TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
AJ575105.1_prunorum_16S     TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
AJ575106.1_prunorum_16S     TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
AJ542544.1_prunorum_16S     TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
JF730310.1_prunorum_16S     TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
                            ************************************************************

T9_16S                      TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
T5_16S                      TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
DQ011588.1_pyri_16S         TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ542543.1_pyri_16S         TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTCTAAGTTCAACGCT
CU469464_mali_16S           TTTATTGGGCGTAAAGGGTGTGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
T1_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
                            ******************** ********** ************** *************

T9_16S                      ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
T5_16S                      ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
DQ011588.1_pyri_16S         ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
AJ542543.1_pyri_16S         ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
CU469464_mali_16S           ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
T1_16S                      ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
AM933142.1_prunorum_16S     ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
AJ575105.1_prunorum_16S     ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
AJ575106.1_prunorum_16S     ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
AJ542544.1_prunorum_16S     ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
JF730310.1_prunorum_16S     ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
                            ************************ ************************************
```

14. ábra. Az NCBI adatbázisban megtalálható *'Ca Phytoplasma prunorum', 'Ca Phytoplasma pyri'* és *'Ca Phytoplasma mali'* és az érdi termőültetvényről származó minták szekvenciáinak illesztése Clustal Omega programmal.

5. Következtetések, javaslatok

A fitoplazmák okozta megbetegedések egyre jelentősebb károkat okoznak a gyümölcstermesztésben, de legjelentősebb veszteségekről a kajszi ültetvények esetében számolnak be a kutatások. Mint Európában, mint Magyarországon egyre inkább teret nyer magának a kórokozó.

Kutatásainkból kiderült, hogy a fitoplazma jelen van az általunk vizsgált, érdi kajszi ültetvények egy részében. Legmagasabb fertőzöttséget a termőültetvényben találtunk. Az ültetvényre jellemző, hogy a piaci igényeknek megfelelő volt a fajtaválasztás, a keresett francia fajtákat választották. Ezen az ültetvényen már az univerzális primerek használatával is kimutatható volt a kórokozó, míg a többi területen csak az érzékenyebb, specifikusabb primerekkel tudtunk a fitoplazma jelenlétét kimutatni.

Fontos kiemelni még azt a tényt is, hogy az izolátorházban gyűjtött minták 100 %-ban egészségesnek bizonyultak, ez azt jelenti, hogy az új törzsültetvénybe kizárólag egészséges szaporító anyag került a magyar fajtákból, így a törzsültetvények fertőzöttsége feltételezhetőleg vektoroknak köszönhető. Ezért a továbbiakban célszerű lenne felmérni a lehetséges vektorokat, azok populációdinamikáját megfigyelni, emellett célszerű lenne kutatni a lehetséges fertőző forrásokat is a területek körzetében. Továbbá ajánlott lenne meghatározni a fertőzött fákat, ezek eltávolítása sajnos nélkülözhetetlen a kórokozó megállításában.

A szekvenált eredményeinkből az látható, hogy a szekvenciák nagyon hasonlóak. Ezekből az adatokból arra következtethetünk, a 16S gén alapján, a rá tervezett primerekkel nem lehet különbséget tenni az azonos csoportba tartozó, de eltérő fajtájú fitoplazmák között, mivel szekvenciáik minimális eltérést mutatnak. A továbbiakban azt tervezzük, hogy más fitoplazma géneket amplifikálunk mintáinkból, melyek alapján egyértelműen megállapítható lesz majd, hogy a 16SrX csoportból valóban a *'Ca. Phytoplasma prunorum'* fertőzte az általunk vizsgált kajszi fákat. Amennyiben kellően variábilis gént sikerül találnunk az összehasonlításra, az ültetvény különböző területeiről származó mintáink szekvencia analízise majd lehetővé teszi olyan rokonsági vizsgálatot elvégzését, mely alapján a kórokozó származási helyére illetve terjedési módjára is következtethetünk.

Hazánkban nagy gazdasági jelentőséggel bír a mezőgazdaságon belül a gyümölcstermesztés, ezért kiemelkedően fontos lenne hatóságilag szabályozni a szaporító anyagok árusítását, illetve az import szaporító anyagok ellenőrzése is elengedhetetlen feladatnak kellene lennie,

mivel csak egészséges szaporító anyag használatával lehet hosszú távon minőségileg és mennyiségileg is megfelelő terméket előállítani.

Emellett a növényvédelmi szakemberekre, illetve a gazdákra is fontos feladat hárul. Folyamatosan ellenőrizni kellene az ültetvények állapotát. Emellett fel kellene mérni a lehetséges vektorokat, ellenük kidolgozni az integrált növényvédelmi technológiát.

6. Összefoglalás

Dolgozatomban áttekintettem a fitoplazmákról, különös figyelmet fordítva a *'Ca. Phytoplasma prunorum'*-ra írt legfontosabb magyar és külföldi szakirodalmakat.

A szakirodalmak azt mutatják, hogy az ESFY egyre nagyobb területen terjed el, és egyre nagyobb károkat okoz szerte Európában, és Magyarországon is. Ezt igazolták az eredményeink is, hiszen az izolátorházban gyűjtött mintákon kívül, minden területen megtaláltuk a fitoplazma jelenlétét. Legnagyobb mennyiségben a Franciaországból származó, import gyümölcsfákon található meg a *'Ca. Phytoplasma prunorum'*, de az új telepítésű törzsültetvény is veszélyben van.

A szaporító anyag ellenőrzése elengedhetetlen feladatnak kellene lennie az új ültetvények létrehozásakor. Emellett a vektorok szerepét is fel kellene mérni az adott ültetvényeken. Ajánlott lenne tanulmányozni a különböző vektorok populációdinamikáját, és ellenük ki kellene dolgozni egy integrált növényvédelmi technológiát. Továbbá javasolt lenne az ültetvények környezetében felmérni a különböző lehetséges fertőzőforrásokat is.

A szakirodalmak és a saját eredményeink is azt mutatják, hogy a 16SrX fitoplazma csoportba tartozó fajok (*'Ca. Phytoplasma mali', 'Ca. Phytoplasma pyri'* és *'Ca. Phytoplasma prunorum'*) nagyon hasonló 16SrRNS génnel rendelkeznek, így biztosan csak az állapítható meg hogy az általunk vizsgált fitoplazmát tartalmazó mintáink e csoportba tartozó kórokozóval fertőzöttek.

Összegezve, nem szabad figyelmen kívül hagyni a fitoplazmák terjedését Magyarországon. Ennek érdekében javasolt lenne hatóságilag szabályozni az országba érkező, és jelenlévő szaporítóanyagok ellenőrzését, emellett a termelőknek is ajánlott lenne ültetvényeik folyamatos ellenőrzése, és ha megjelenik a kórokozó, azonnali beavatkozás javasolt.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni külső témavezetőimnek, Dr. Várallyay Évának és Czotter Nikolettának. Köszönöm nekik, hogy részt vehettem ezen érdekes és új területen folytatott kutatásaikban, köszönöm nekik azt a sok segítséget, melyet ez idő alatt kaptam tőlük. Emellett szeretnék köszönetet mondani a NAIK, mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, Diagnosztika csoportjának is.

Továbbá köszönettel tartozom Dr. Turóczi György Tanár Úrnak támogatásáért, a Szent István Egyetem Növényvédelmi Intézetének.

Illetve nem utolsó sorban családomnak, barátaimnak, továbbá mindenkinek, akik közvetlen vagy közvetett módon támogattak.

8. Irodalomjegyzék

Folyóiratban megjelent közlemény, és egyéb közlemények:

AUDERGON, J. M. (1997): Prospects for breeding apricot for resistance to diseases: sharka, bacteria and apricot chlorotic leafroll. Italus Hortus, 4, 24-28.

BAI, X., ZHANG, J.H., EWING, A., MILLER, S.A., RADEK, A.J., SHEVCHENKO, D.V., TSUKERMAN, K., WALUNAS, T., LAPIDUS, A., CAMPBELL, J.W. AND HOGENHOUT, S.A. (2006): Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. J. Bacteriol., 188: 3682-3696.

BOUDON-PADIEU, E. and MAIXNER, M. (1998): Grapevine yellows: current knowledge and control methods. Bulletin de l'O.I.V., 71(809-810): 572-607.

BOZSIK ANDRÁS Gondolatok a csonthéjasok fitoplazmás pusztulásáról – rovarász szemmel AGRÁRTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEK, (2014) 2014/62.: 30-34.

CARRARO, L., LOI, N., ERMACORA, P. (2001): Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector Cacopsylla pruni. Eur. J. Plant Pathology, 107.: 695-700.

DOI, Y., TERANAKA, M., YORA, K. AND ASUYAMA, H. (1967): Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches-broom, aster yellows, or paulownia witches-broom. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn, 33: 259-266.

CONTALDO, N., BERTACCINI, A., PALTRINIERI ,S., WINDSOR, H.M., AND WINDSOR, D. (2012): Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. Phytopathologia Mediterranea 51.: 607−617.

DAVIS, M. J., & WHITCOMB, R.F. (1981): Fastidious bacteria of plant vascular tissue and invertebrates (including so called rickettsia-like bacteria). The Prokaryotes: A Handbook on Habits, Isolation, and Identification of Bacteria. Heidelberg, Springer-Verlag, 2172-2188.

DAVIS, R.E. & SINCLAIR, W.A. (1998): Phytoplasma identity and disease etiology. Phytopathology, 88 (12): 1372-1376.

DÉR ZS., PÉNZES B., OROSZ A. (2003): Kajsziültetvényben előforduló kabócák.

FIALOVÁ, R., NAVRÁTIL, M., LAUTERER, P., NAVRKALOVÁ, V. (2007): 'Candidatus Phytoplasma prunorum': the phytoplasma infection of Cacopsylla pruni from apricot orchards and from overwintering habitats in Moravia (Czech Republic). Bulletin of Insectology, 60.: 183-184.

HORVÁTH CS., A gönci kajszi megmentése, Kertészet és Szőlészet (2015) 44. szám)

JARAUSCH, W., EYQUARD, J.P., LANSAC, M., MOHNS, M, DOSBA, F. (2000): Susceptibility and tolerance of new French Prunus domestica cultivars to European stone fruit yellows phytoplasma. J. Phytopathol., 148, 489-493.

DANET J. L., BALAKISHIYEVA G., CIMERMAN A., SAUVION N., MARIE-JEANNE V., LABONNE G., LAVINA A., BATLLE A., KRIZANAC I., SKORIC´D., ERMACORA P., JARAUSCH W. AND FOISSAC X. (2011): Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination Microbiology, 157: 438–450

JENSER G., SÜLE S., SZITA É. ÉS TARJÁN V.J. (2009) A füstösszárnyú körte-levélbolha (Cacopsylla pyri Linnaeus) elleni védekezés újabb követelményei és lehetőségei. Növényvédelem 45: 595-603.

KIRKPATRICK, B.C., SMART, C., GARDNER, S., GAO, J.L., AHRENS, U., MAURER, R., SCHNEIDER, B., LORENZ, K.H., SEEMÜLLER, E., HARRISON, N., NAMBA, S., AND DAIRE, X. (1994): Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. IOM Letters, 3: 228-229.

KISS, E., MERGENTHALER, E., KISS, B. ÉS VICZIÁN, O. (2015): A csonthéjasok európai sárgulása (ESFY) magyarországi terjedésének hátterében álló okok. In: Horváth, J., Haltrich, A., Molnár, J. 61. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2015. február 17-18., p. 60.

KÖVICS GY. & TARCALI G. (2015): A csonthéjasok növekvő veszélyben? 2015. 01. 20.

LEE, I-M., GUNDERSEN, D.E., DAVIS, R.E., AND CHIYKOWSKI, L.N. (1992): Identification and analysis of a genomic strain cluster of mycoplasmalike organisms associated with canadian peach (eastern) X-disease, Western X-disease and clover yellow edge. J. Bacteriol., 174: 6694-6698.

LEE, I-M., HAMMOND, R.W., DAVIS, R.E., AND GUNDERSEN, D.E. (1993): Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. Phytopathol., 83: 834-842.

LORENZ, K-H., DOSBA, F., POGGI-POLLINI, C., LLACER, G. AND SEEMÜLLER, E. (1994): Phytoplasma diseases on Prunus species in Europe are caused by genetically similar organisms. Z. Pflanzenk. Pflanzen., 101: 567-575.

MARCONE, C., JARAUSCH, B. AND JARAUSCH, W. (2010): Candidatus Phytoplasma prunorum, the causal agent of European stone fruit yellows: an owerview. Journal of Plant Pathology (2010), 92.: 19-34.

NICKEL, H. (2003): The leafhoppers and Planthoppers of Germany (Hemiptera, Auchenorrhyncha): Patterns and strategies in a highly diverse group of phytophagous insects. Pensoft Publishers, Sofia – Pensoft Publishers, Sofia-Moscow.: 460

PALMANO, S. & FIRRAO, G. (2000): Diversity of phytoplasmas isolated from insects, determined by a DNA heteroduplex mobility assay and a length poly 16S-23S rDNA spacer region analysis. J. Appl. Microbiol. 89(5): 744-50.

SAMUEL, G., BALD, J.G. AND EARDLEY, C.M. (1933): Big bud, a virus disease of the tomato. Phytopathology, 23: 641-653.

SEARS, R., BAND, B., AND KIRKPATRICK, C. (1994): Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms. American Society for Microbiology News, 60: 307-312.

SEEMÜLLER, E., SCHNEIDER, B., MAURER, R., AHRENS, U., DAIRE, X., KISON, H., LORENZ, K.H., FIRRAO, G., AVINENT, L., SEARS, B.B., AND STACKEBRANDT, E. (1994): Phylogenetic classification of phytopathogenic Mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. Int. J. Syst. Bacteriol., 44: 440-446.

SEEMÜLLER E., MARCONE C., LAUER U., RAGOZZINO A. AND GÖSCHL M. (1998) Current status of molecular classification of the phytoplasmas Journal of Plant Pathology (1998), 80 (1), 3-26

SEEMÜLLER E, SCHNEIDER B, (2004) 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(4):1217-1266.

SINHA, R. C. (1960): Comparison of ability nymph and adult Delphacodes pellucida ricius, to tran n wheat st saic virus. Virology 10: 344-352.

SÜLE, S., VICZIÁN, O. ÉS PÉNZES, B. (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása. Kertészet és Szőlészet, 45.: 8-11.

SÜLE, S. (2003): A kajszi baktériumos és fitoplazmás betegségei. pp. 282-291. In: Kajszi. (Eds.) Pénzes, B. - Szalay, L. Mezőgazda Kiadó, Budapest

SÜLE, S., JENSER, G., AND SZITA, É. (2007): Management of pear decline caused by Candidatus Phytoplasma pyri in Hungary. Bulletin of Insectology 60: 319-320.

SÜLE, S. (2014): Kajszipusztulás és az ellene való védekezés. Növényvédelem, 50 (1): 23-25.

SZIRMAI, J. (1956): Új vírusbetegség hazánkban. Agrártudomány, 8: 351-354.

TEDESCHI, R., VISENTIN, C., ALMA, A. AND BOSCO, D. (2003): Epidemiology of apple proliferation (AP) in northwestern Italy: evaluation of the frequency of AP-positive psyllids in naturally infected populations of Cacopsylla melanoneura (Homoptera: Psyllidae). Ann. Appl. Biol., 142: 285-290.

TEDESCHI R., FERRATO V., ROSSI J., ALMA A. (2006): Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids Cacopsylla melanoneura and Cacopsylla pruni. Plant Pathology 55:18-24.

TORRES, E., MARTIN, M. P., PALTRINIERI, S., VILA, A., MASALLES, R., BERTACCINI, A. (2004): Spreading of EFSY phytoplasmas in stone fruit in Catalonia (Spain). J. Phytopathology, 152: 32-437.

Könyv, könyvrészlet:

HORVÁTH J. & GÁBORJÁNYI R. (1999) Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek, Mezőgazda Kiadó, 74.

Egyéb források:

http://www.cabi.org/isc/FullTextPDF/2012/20123408581.pdf

http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/pclass/pclass_phytoplasmaclassification_system2.html

http://agroforum.hu/hirek/csonthejasok-novekvo-veszelyben

https://www.nebih.gov.hu/szakteruletek/szakteruletek/noveny_talajvedelmi_ig/szakteruletek/nov_eg/neukarositok/neu_karositok_fd.html

http://www.cabi.org/isc/datasheet/34065

Protokolok:

www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17462

https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0691

9. Mellékletek

7. táblázat: 16S rDNS alapján megállapított csoportokba tartozó fitoplazmák csoportosítása (SEEMÜLLER, 1998)

16S rDNS alapján megállapított csoportok		Csoportba tartozó fitoplazmák
I.	16S - őszirózsa sárgulás csoport	SAY (Western severe aster yellows, nyugati súlyos őszirózsa sárgulás)
		AAY (American aster yellow, amerikai őszirózsa sárgulás)
		AY1 (Maryland aster yellows, Maryland őszirózsa sárgulás)
		OAY (Oenothera aster yellows, ligetszépe őszirózsa sárgulás)
		MIAY (Michigan aster yellows, Michigan őszirózsa sárgulás)
		BB (tomato big bud, paradicsom óriásrügy betegség)
		CPh (clover phyllody, herevirág ellevelesedése)
II.	16S - bab virágzöldülés csoport	PnWB (peanut witches'-broom, földimogyoró boszorkánykeprűsödés)
		SPWB (sweet potato witches'-broom, édesburgonya boszorkánykeprűsödés)
		SUNHP (sunn hemp witches'-broom, bengáliai kender boszorkánykeprűsödés)
		WBDL (lime witches'-broom, len boszorkánykeprűsödés)
		FBP (faba bean phyllody, bab virágzöldülés
III.	16S - "X" betegség csoport	CX (Canada peach X-disease, kanadai őszibarack X-betegség)
		WX (Western X-disease, nyugati X betegség)
		TWB (Tsuwabuki witches'-broom, Tsuwabuki boszorkánykeprűsödés)
		VAC (vaccinium witches'-broom, áfonya boszorkánykeprűsödés)
		CYE (clover yellows edge, here levél sárgaszélűség)
IV.	16S - kókusz letális sárgulása csoport	LY (coconut lethal yellowing, kókusz letális sárgulás)
		LDY (Yucatan coconut lethal decline, yucatani kókusz letális sárgulása)
		LDT (Tanzanian coconut lethal decline, tanzániai kókusz letális pusztulása)
V.	16S - szilfa sárgulás csoport	EY1 (American elm yellow, amerikai szilfa sárgulás)
		ULW (French elm yellows, francia szilfa sárgulás)
		FD (Flavescece dorée, szőlő sárgaság)
		CLY (cherry lethal yellowing, cseresznye letális sárgulás)
		JWB (jujube witches'-broom, zsidótövis boszorkánykeprűsödés)
VI.	16S - here seprűsödés csoport	CP (clover proliferation, here seprűsödés)
VII.	16S - kőrisfa sárgulás csoport	AshY (ash yellows, kőrisfa sárgulás)
VIII.	16S - szivacstök bonyorkánykeprűsödése csoport	LFWB (loof witches'-broom, szivacstök boszorkánykeprűsödés
IX.	16S kajánban boszorkánykeprűsödése csoport	PPWB (pigeon pea witches'-broom, kajánbab boszorkánykeprűsödés)
X.	**16S almafa boszorkánykeprűsödése csoport**	AP (apple ploriferation, almafa boszorkánykeprűsödés)
		PD (pear decline/Italy, körte leromlás)
		PPER (peach decline, őszibarack leromlás)
		ESFY (European stone fruit yellows, csonthéjasok európai sárgulása)
		BAWB (buckthorn witches'-broom, benge boszorkánykeprűsödés)

XI.	16S - cukornád fehérlevelűsége csoport	RYD (rice yellow dwarf, rizs sárgulásos törpülés)
		BVK (leaf hopper borne)
		SCWL (sugarcane whiteleaf, cukornád fehérlevelűség)
XII.	16S - sztolbur csoport	STOL (stolbur of pepper, sztolbur)
		VK (vergilbungskrankheit-grapevine yellows, szőlősárgulás)
		AUSGY (Australian grapevine yellows, ausztáliai szőlősárgulás)
		PYL (phormium yellows leaf, új-zélandi kender sárgulás)

10. Nyilatkozat

Alulírott, Oláh Beatrix, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Növényorvos szak nappali tagozat hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem.

Gödöllő, 2016 év November hó 02. nap

_____

hallgató aláírása