

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Növényvédelmi Intézet

**Sherpa fajtájú kajszibarack fitoplazma és vírusfertőzöttségének vizsgálata
Boldogkőváralján**

Petres Martin
Növényorvos MSc, II. 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

2017

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. A kajszi hirtelen pusztulásának, gutaütésének okai	5
2.2. A fitoplazmák felépítése és szerkezete	6
2.3. A fitoplazmák fertőzés mechanizmusa és terjedése	7
2.4. Védekezési lehetőségek a fitoplazmás betegségek ellen	7
2.5. A növényeket fertőző vírusok	8
2.6. A vírusok fertőzés mechanizmusa és terjedése	9
2.7. A vírusok elleni védekezés	9
2.8. A dolgozatban vizsgált vírusok bemutatása	10
2.8.1. A Plum Pox Virus (PPV)	10
2.8.2. A Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV)	10
2.8.3. A Cherry Virus A (CVA)	11
2.8.4. A Little Cherry Virus 1 (LChV1)	12
3. Anyag és Módszer	13
3.1. A mintavételi terület leírása	13
3.2. A vizuális tünetmegfigyelés	13
3.3. Növényi minták	14
3.4. Fitoplazma kimutatását célzó vizsgálatok	15
3.4.1. DNS kivonás	15
3.4.2. Polimeráz láncreakció (PCR)	16
3.4.2.1. Fitoplazma törzsek kimutatása nested PCR-rel	16
3.5. Vírusok kimutatását célzó vizsgálatok	18
3.5.1. RNS kivonás	18
3.5.1.1. Több egyed RNS-ét tartalmazó keverék (Pool) készítése	19
3.5.2. cDNS készítése	20
3.5.3. Vírusok kimutatása RT-PCR-rel	20
3.5.3.1. Plum Pox Virus (PPV) kimutatása	21
3.5.3.2. Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV) kimutatása	22
3.5.3.3. Cherry Virus A (CVA) kimutatása	22
3.5.3.4. A Little Cherry Virus 1 (LChV1) kimutatása	23
4. EREDMÉNYEK	24
4.1. A kajszipusztulás mértéke Boldogkőváralján	24

4.2. A Sherpa fajtán tapasztalt tünetek	24
4.3. A pusztulás ültetvényen belüli terjedésének megfigyelése	26
4.4. A 2016. és 2017. évi vizsgálatok elemzése	28
4.5. További fitoplazma vizsgálatok eredménye 2016 és 2017 évben	32
4.5.1. Újra kihajtó fák vizsgálata	32
4.5.2. A 2015-ben tesztelt fák állapotának újrafelvételezése	33
4.6. Vírusfertőzöttség vizsgálata	34
4.6.1. A szilvahimlő vírus (PPV) kimutatása	35
4.6.2. A nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (PNRSV) kimutatása	36
4.6.3. A Cherry Virus A (CVA) kimutatása	37
4.6.4. A cseresznye aprógyümölcsűség vírus (LChV1) kimutatása	37
5. ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	39
6. ÖSSZEFOGLALÁS	41
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	43
8. IRODALOMJEGYZÉK	44
9. MELLÉKLETEK	46
10. NYILATKOZAT	49

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Napjainkban komoly növényvédelmi problémát jelentenek a gyümölcsstermesztésben azok a növényeket megbetegítő kórokozók, amelyek ellen nincs kidolgozott növényvédelmi technológia. Az utóbbi évtizedben számos olyan kártevő és kórokozó megjelenése okoz hatalmas károkat, melyek számára hazánk területén korábban kedvezőtlenek voltak a klimatikus viszonyok. Ilyen új károsítók a gyümölcsfákat és szőlőt károsító fitoplazmák is, melyek ismert vektorai a kabócák, illetve a fertőzött szaporítóanyag. A globális növénykereskedelem, bár szigorúan szabályozott, akaratlanul is hozzájárulhat egyes károsítók terjesztéséhez, országok illetve kontinensek között egyaránt, ugyanis a fitoplazmák és vírusok kimutathatósága sokszor korlátozott. A fogyasztói társadalmat kiszolgáló gyümölcsstermesztési ágazatban pedig további probléma, hogy elsősorban küllem alapján választanak gyümölcsöt a vásárlók, így a termesztésbe vont fajták különböző kórokozókkal szembeni fogékonysága egyre gyakrabban másodrendű kérdés a termelő számára a fajtaválasztáskor, pedig a kajszifajták fogékonysága között jelentős különbségek mutatkoznak a pusztulás tekintetében. A kajszibarackfák pusztulása nem újszerű jelenség, jelentős szakirodalom áll rendelkezésre a témában, ennek ellenére a tudomány jelen állása szerint nem tudjuk, mi okozza a gutaütést (apoplexia). Számos kórokozót azonosítottak már, melyek kajszi fapusztulást képesek előidézni, azonban ezidáig nem sikerült olyan növényvédelmi technológia kidolgozása és alkalmazása, amely mellett megszűnt volna a pusztulás az ültetvényekben, ami arra enged következtetni, hogy az eddig azonosított kórokok mellett szerepe lehet eddig figyelmen kívül hagyott tényezőknek is. A pusztulás mértéke évenként és fajtánként is eltérő, átlagos évben 4-5%, szerepet játszhat benne a kajszi fitoplazmás megbetegedése, de valódi oka máig ismeretlen.

Munkám során a pusztulás kiváltó okát kerestem, egy fitoplazma fertőzés jellegzetes tüneteit mutató, pusztuló kajszi ültetvény két egymást követő évben való vizuális megfigyelése mellett a fák vírus és fitoplazma fertőzöttségének korszerű molekuláris-diagnosztikai módszerekkel, való vizsgálatával.

Kutatásom célja a 2016 és 2017 évben tapasztalható pusztulás nyomon követése és elemzése, ültetvényen belüli terjedésének megfigyelése. A pusztuló és tünetmentes fákról gyűjtött levélmintákból négy vírus és a 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák jelenlétének vizsgálata PCR technikával. Eredményként arra szerettem volna választ kapni, hogy e karantén és kajszin nemrégiben azonosított kórokozók vajon jelen vannak-e, és szerepet játszanak-e a vizsgált ültetvény pusztulásában?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. 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 kajszipfák 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 kajszi-termő 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 hánccsszövethez kötött. A kajszi hánccsszöveti 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 hánccsszöveteket (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 (V. Németh et al. 2000). A fitoplazmával fertőzött fák fokozottan fagyérzékenyek, mivel a kórokozók a hánccsszövetben 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 kajszipfák. A jelenség ritka, főként fitoplazmával fertőzött egyedeknél fordul elő, éppen ezért megkönnyítheti a vizuális diagnosztizálást azok számára, akik a költséges molekuláris vizsgálatokat nélkülözni kényszerülnek (Mergenthaler et al. 2014).

2.2. A fitoplazmák felépítése és szerkezete

A fitoplazmák sejtfal nélküli, pleomorf (állandó alak nélküli), a vírusokat leszámítva a ma ismert legkisebb méretű növénypatogén szervezetek. Sejtjeiket szilárd sejtfal helyett háromrétegű membrán határolja. Obligát biotrófok, a növények háncsszövetében élnek és halmozódnak fel, mesterséges táptalajon nem tenyészthetők. A fitoplazmák azon ritka baktériumok közé tartoznak, melyek egyaránt képesek növényi háncsszövetben, valamint rovarvektoraik haemolimfájában is szaporodni (Suigo 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 (Oshima 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, Marcone et al. 2010). 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* (<http1>)

2.3. 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 látenszen fertőzött fák a fertőzés forrásai lehetnek. A szilva levélbolha általi fitoplazma átvitel főbb lépéseit röviden ismertetem. Egy nemzedékes, imágója telet 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. Oligofág, kifejezetten a *Prunus* fajokon táplálkozik (Bozsik 2014). Még a fitoplazmával fertőzött levélbolha által lerakott friss petékből is sikeresen kimutatták a kórokozó jelenlétét, ami a gamétákon keresztüli átvitel lehetőségét igazolja.

A *Cuscuta* fajok *in vitro* képesek a fitoplazmák növényről-növényre terjesztésére, ugyanis parazita életmódjukból adódóan hausztóriumokkal 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).

2.4. 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 látenszen, 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 kökényben felszaporodó fitoplazmát pedig átviheti a kajszi fákra is. A szilva levélbolha populációdinamikájának megfigyelése alapján méhkímélő inszekticidekkel indokolt védekezni a fenyőfélékről a kajsziültetvénybe visszatelepülő imágók ellen, ezzel egyidőben pedig célszerű eltávolítani az alanyсарjakat, melyek a vektor kedvelt búvóhelyének számítanak. Amennyiben fitoplazma fertőzött fákat találunk az ültetvényben, mihamarabb gyökerestől el kell távolítani azokat. A növénynemesítők feladata a rezisztencia-nemesítés, azonban évtizedek is eltelhetnek egy-egy kedvező tulajdonságú fajta előállításáig. A már fertőzött fák növényvédőszerrel 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).

2.5. A növényeket fertőző vírusok

A növényi vírusok obligát sejtparaziták, szaporodásuk a gazdasejthez kötött, ugyanis nem rendelkeznek saját anyagcsere funkcióval, hiányoznak örökítő anyagukból a fehérjeszintézisért és energiatermelésért felelős régiók. A vírusok kémiaiilag nukleoproteidek, a viriont nukleinsav és azt körülvevő - fehérjeköpeny, a kapszid alkotja. A genom egyszálú vagy kétszálú, osztatlan (egykomponensű) vagy osztott (többkomponensű) lehet. A genom méretét tekintve változatosak, átlagosan 5000-10.000 nukleotid hosszúak. A fitopatogén vírusok alakja legtöbbször ikozahedrális vagy helikális, de léteznek ovális, pálcika és fonalas formával rendelkezők is. A vírusok alakját a nukleinsavat védő fehérjeburok alakja határozza meg, az egyes vírusfajok alak és méretük alapján nem elkülöníthetők egymástól. Jelenleg több, mint 1000 fitopatogén vírus ismert, számuk pedig folyamatosan nő (Gáborjányi 2007, Salamon 2007).

2.6. A vírusok fertőzés mechanizmusa és terjedése

A növényi sejt vírussal való fertőzése minden esetben passzív módon történik. Sebzésre van szükség a gazdasejtbe való bejutáshoz, mert nem rendelkeznek olyan apparátussal, amely segítségével a gombákhoz hasonlóan aktív módon tudnának átjutni a növényi sejtfalon. A fitopatogén vírusok replikációja során a virion a gazdasejthez kötődik, a köpenyfehérje nem, csak a nukleinsav jut a sejtbe. A parazitált gazdasejt saját maga állítja elő a vírus nukleinsavat és fehérjét, amik virionokká épülnek össze és felhalmozódnak a gazdasejtben.

Terjedésének fő módjai a mechanikai átvitel, magátvitel, pollenátvitel, kertészeti oltással történő átvitel (oltás, szemzés), vegetatív szaporítószervekkel történő átvitel (gumó, rizóma, hagyma) és a vektorok útján történő átvitel (Pocsai 2016). Nagy távolságra általában fertőzött szaporítóanyaggal terjednek, ezért kiemelten fontos hatósági feladat a szaporítóanyag-előállítás szigorú szabályainak betartatása, az anyafák fertőzöttségének folyamatos ellenőrzése.

2.7. A vírusok elleni védekezés

A vírusok elleni egyetlen és legfontosabb védekezési lehetőség a prevenció. A vírusok kártétele minden vegetatívan szaporított gyümölcsfajnál, így a csonthéjas gyümölcsfáknál is kiemelt jelentőséggel bír, a vírusok fertőzésük következtében ugyanis a gazdanövény legyengítésével a termés elértéktelenedését, a fák élettartamának jelentős csökkenését, drasztikus esetben akár az egész fa pusztulását is okozhatják. A vírusok elleni védekezés az ültetvényekben a fajtaválasztással kezdődik, ugyanis legtöbbször a termelők rendelkezésére állnak vírusrezisztens és vírustoleráns fajták egyaránt. A rezisztencia nemesítés sajnos hosszú évekbe telik, és nem minden vírussal szemben lehetséges tolerancia/rezisztencia kialakítása. Mivel a fajtatulajdonság fenntartása érdekében vegetatívan állítják elő az oltványokat, fennáll a veszélye, hogy a vírusfertőzött anyafáról szemzett csemeték is fertőzöttek lesznek a kórokozóval (Gáborjányi 2007, Horváth és Gáborjányi 1999). Az ültetvénybe legtöbbször rovarvektorok segítségével jutnak be a vírusok, ezért kulcsfontosságú a potenciális vírusvektor rovarok elleni folyamatos preventív védelem. Az Európai és Mediterrán Növényvédelmi Szervezet (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) a karantén károsítókat az 1970-es évek óta A1 és A2 csoportba osztja. Az A1 csoportba tartozó kártevők nem fordulnak elő a szervezet által koordinált régiókban, az A2 csoportba pedig olyan károsítók tartoznak, melyek lokálisan előfordulnak a tagállamok területén. Az EPPO ajánlást tesz a károsítók elleni védelem kidolgozásával. Az A1 csoport tagjai ellen minden tagország köteles védekezni, de az A2-es csoport tagjai ellen az EPPO ajánlás figyelembe vételével a tagországok

saját hatáskörébe tartozik, milyen eszközökkel lépnek fel az adott kártevő, jelen esetben a vírussal szemben. A karantén köteles kórokozók között számos vírus is megtalálható, amennyiben ilyen vírussal fertőzött növényt találnak, annak érdekében, hogy megakadályozzák a továbbterjedését egészségügyi zárlat alá helyezik az érintett területet (<http2>).

2.8. A dolgozatban vizsgált vírusok bemutatása

2.8.1. A Plum Pox Virus (PPV)

A szilvahimlő vírus az egyik legveszélyesebb, legnagyobb károkat okozó csonthéjasokat fertőző vírus. 1932-ben, szilván írták le először Bulgáriában (Atanasoff 1932). Gazdanövényköre széles, vad és termesztett *Prunus* fajokat egyaránt fertőz. Rendszertanilag a *Potyviridae* család *Potyvirus* nemzetségébe tartozik. A fák hasznos élettartamát lerövidíti, fertőzésének következtében fapusztulás is bekövetkezhet. A vírus hat törzse ismert: PPV-D, PPV-M, PPV-EA, PPV-C valamint PPV Rec. és PPV-W. (Pocsa 2016). A kajsziarackot, szilvát és őszibarackot az M és D törzs fertőzi. Magyarországon 1948-ban, kajsziarackot írták le a vírus jelenlétét először (Szirmai 1948). A levélen jellegzetes klorotikus foltok és gyűrűk, a magon pedig barna színű leopárdfoltok jelennek meg. A gyümölcs héján gyűrű alakú elszíneződést okozhat, fertőzésének következtében a gyümölcs idő előtt lehullik a fáról. Érzékeny szilvafajtáknál a gyümölchullás mértéke akár 100% is lehet. Jelentős minőségi kárt okoz, ugyanis a gyümölcs savtartalmának emelkedésével párhuzamosan csökkenti a cukortartalmat, ami értéktelenné teszi a megmaradt termést (Pocsa 2016). A vírus törzsei ültetvényen belül nem perzisztens módon, levéltetvekkel, pollennel, maggal, míg nagyobb távolságra vegetatív szaporítóanyaggal terjedhetnek. A szilvahimlő vírus kajsziarack karantén kórokozó a faiskolai anyafákat megfelelő érzékenységgű diagnosztikai módszerekkel tesztelik, (ELISA, PCR) mielőtt szaporítóanyagot nyernének róluk (Süle 2011).

2.8.2. A Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV)

A nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (PNRSV) minden csonthéjas fajt képes fertőzni. Kiemelt jelentősége a kajsziarack, cseresznye és meggy gyümölcsfákon van, ahol karantén kórokozóként van nyilvántartva. Rendszertanát tekintve a *Bromoviridae* család *Ilarvirus* nemzetségébe tartozik. 1941-ben őszibarackon írták le először az USA-ban (Cochran és Hutchins 1941). Az 1970-es években még a kajszi legelterjedtebb vírusbetegsége volt, olyannyira, hogy a központi törzsültetvényekben is komoly károkat okozott, ezért

visszaszorítása érdekében 1974-től mentesítési program indult állami támogatással, mely során több ezer anyafa fertőzöttségét vizsgálták, a fertőzött egyedeket pedig megsemmisítették. Mindössze 3 év alatt sikerült az anyafák 16%-os fertőzöttségét 0.1%-ra csökkenteni (Pocsai 2017). A vírusfertőzés következtében csökken a fák élettartama, fagytűrő képessége, gyengül a hajtásnövekedés, satnyulás, klorózis és a vírusfertőzés kezdeti stádiumban nekrosis is bekövetkezik. A vírus hatékonyan terjed a fertőzött fák virágporával.

2.8.3. A Cherry Virus A (CVA)

A Cherry Virus A rendszertanilag a *Flexiviridae* család *Capillovirus* nemzetségébe tartozó, csonthéjas gyümölcsökben előforduló vírus. 1995-ben mutatták ki először jelenlétét Németországban cseresznyén, de jelen van kajszin és őszibarackban, japán szilván, cseresznyén és meggyen egyaránt (Grimová et. al. 2010). Széles körben elterjedt Észak-Amerikában, Európában, Japánban és Kínában. A vírus önmagában nem okoz tünetet a fertőzött fán, azonban más vírusokkal való együttes előfordulása gyengíti a gazdanövényt, rajta általános virustünetként klorotikus levelek jelzik a vírus jelenlétét. A tudomány jelen állása szerint rovarvektora nem ismert, terjedése fertőzött szaporítóanyaggal történik. Az EPPO területén számos országban megtalálták (*1.ábra*). A CVA hazai előfordulását csoportunk írta le (Czotter et al. 2017, Balássy et al. 2016).



1. ábra A Cherry Virus A európai elterjedése (http3)

2.8.4. A Little Cherry Virus 1 (LChV1)

A vírus rendszertanilag a *Closteroviridae* családon belül a *Velarivirus* nemzetségbe tartozik. A kórokozót 1996-ban írták le először. A Little Cherry Virus 1-re legfogékonyabb a cseresznye és meggy, de egyéb csonthéjasokon is kimutatták már: őszibarackon, mandulán, szilván, Japán díszcseresznyén, és sajmeggyen is. Fertőzésének jellemző tünete a növény törpülése, a levelek fodrosodása, valamint a klorózis. A gyümölcs értéktelen lesz, íztelen, deformált és kicsi marad (http4). Kajszi- és őszibarackon 2016-ban cseh kutatók mutatták ki jelenlétét (Šafářová 2017). 21 különböző kajszi- és őszibarackfajtát vizsgáltak RT-PCR vizsgálattal. A NAIK Diagnosztika csoportja kisRNS-ek új generációs szekvenálásával (NGS) azonosította a vírus jelenlétét kajszi- és őszibarackon (Czotter et al. 2017).

3. Anyag és Módszer

3.1. A mintavételi terület leírása

A vizsgált kajsziültetvény Boldogkőváralján, a gönci termőtáj szívében helyezkedik el (2. ábra). Az ültetvény közvetlen szomszédságában a Szerencs patak található, melynek hatása az ültetvény adottságában is megfigyelhető. A kísérletet a North-Cot Kft területén végeztem, 2010-ben telepített Sherpa fajtán.



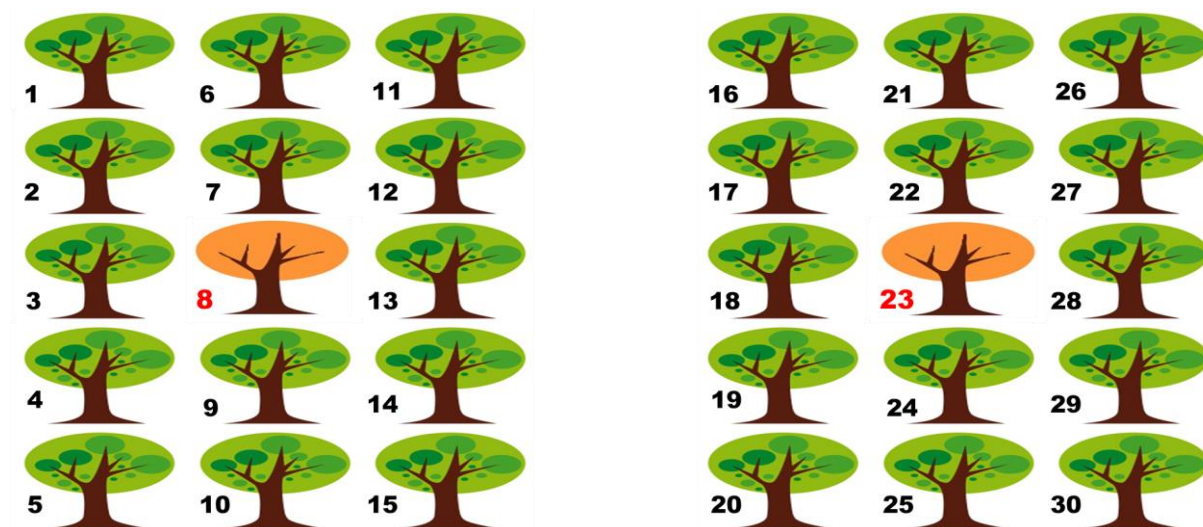
2. ábra A kísérleti terület elhelyezkedése (http5)

3.2. A vizuális tünetmegfigyelés

A vizuális tünetmegfigyeléseket két-három hetes időközönként végeztem 2016-ban és megismételve 2017 évben. A pontos munka érdekében egyedi táblázatot készítettem, a vizsgálat tárgyát képező ültetvény bejárása közben, így minden egyes fához egyedi diagnózist tudtam rendelni. Rögzítettem a törzsön, vázágon, ágakon lévő száradást és rákos sebeket, amennyiben észleltem ilyen elváltozásokat, feljegyeztem a törzsrepedést, mézgásodást is.

3.3. Növényi minták

A kísérletek elvégzéséhez szükséges levélmintákat először 2016 júliusában, Boldogkőváralján gyűjtöttem Sherpa termőültetvényből, majd egy év múlva megismételtem azt. A mintavétel során idősebb és fiatalabb, hajtásvégeken elhelyezkedő leveleket vegyesen gyűjtöttem, mert nem tudhattam előre, milyen korú levélből tudom sikeresen kivonni a DNS-t, illetve RNS-t, ami a fitoplazma, valamint a kajszit fertőző vírusok kimutatásához szükséges. A mintavételkor nem random módon, hanem előre tervezett mintázat szerint gyűjtöttem a levélmintákat. A gyűjtést megelőző vizuális diagnosztizálás eredményeként érdekes megfigyelést tettünk 2016-ban, miszerint a pusztuló fák az ültetvényen belül nem véletlenszerűen, hanem „csoportosan”, sajátos mintázatot alkotva helyezkednek el. Ezért olyan mintázatot kerestem, ahol a gutaütött egyedek körül tünetmentes kajszifák vannak (3. ábra), majd összesen 30 fáról mintát szedtem. A fitoplazma okozta pusztulásra hosszú lappangási idő is jellemző lehet, így annak ellenére, hogy a kórokozó jelen van, a növényen nem láthatóak vizuális tünetek. A mintavételtől a felhasználásig -70°C -on tároltam a növényi mintákat.



3. ábra A mintavételezett kajszifák elhelyezkedése, kiemelve a beteg fák

2017 júliusában ismételt felvételezés és vizsgálat céljára újból elvégeztem a mintagyűjtést, ugyanazon egyedekről. A 2016 évben központi, 8-as és 23-as jelű egyedek pusztulása miatt ezekről a fákról nem állt módomban újabb levélmintát gyűjteni. A 10-es jelű fa esetében bár elpusztult a teljes korona, sarjhajtást mégis tudtam gyűjteni.

A mintavételt magam végeztem el mindkét évben, így ez a nagyon fontos feladat azonos módon történt meg a két vegetációs időszakban.

3.4. Fitoplazma kimutatását célzó vizsgálatok

3.4.1. DNS kivonás

A levélmintákat a DNS tisztítás előtt -70°C -on tároltam, majd a teszteléshez 0,1-0,15 g növényi levélszövetből tisztítottam DNS-t NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) kit segítségével a gyártó utasításainak megfelelően. A DNS izolálást a vizsgálat mindkét évében azonos feltételek mellett végeztem el a következő protokoll szerint: dörzsmozsárban, folyékony nitrogénbe helyeztem a 0,1-0,15g 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, 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 mostam 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, majd az átfolyót szintén eltávolítottam. Harmadik lépésként újabb 200 μl PW2 pufferrel végeztem el a mosást, majd 2 percen át 11 000 rpm-en centrifugáltam a mintát. A szűrőt 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőbe helyeztem át, hozzáadtam 30-50 μl , 65°C -ra előmelegített PE eluáló puffert, ezt követően 5 percig inkubáltam a mintát 65°C -on, majd 1 percig 11 000 rpm-en centrifugáltam, hogy leoldjam a tiszta DNS-t a filterről. Az eljárás végén kapott oldat DNS koncentrációját és tisztaságát spektrofotométer segítségével, valamint a minták 1,2%-os agaróz gél-elektroforézissel történő szétválasztásával ellenőriztem.

3.4.2. Polimeráz láncreakció (PCR)

A Polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction-PCR) *in vitro* körülmények között teszi lehetővé, bármilyen eredetű DNS, cDNS 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 indítoszekvenciát) terveznek, melyek pontosan kötődnek az amplifikálni kívánt DNS szakaszhoz. A primerek által határolt DNS szakasz akár több ezerszeresére amplifikálható a reakció során

3.4.2.1. Fitoplazma törzsek kimutatása nested PCR-rel

A 3.4.1. 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 indítoszekvencia nem a megfelelő helyre épül be. A kontamináció elkerülése érdekében két egymás után elvégzett PCR reakciót alkalmaztam, és két egymást követő ciklusban különböző indítoszekvenciákat 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 indítoszekvenciával 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 (Danet et al. 2011).

A nested PCR során templátként a P1-P7 primerekkel amplifikált terméket húszszorosan hígítottam, majd 1 µl mennyiséget használtam fel belőle mintánként. A 16SrX csoportra specifikus, az EPPO által ajánlott (fo1, ro1) indítószekvenciákat használtam, 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) (1. táblázat).

1. táblázat **A *Ca. Phytoplasma prunorum* kimutatásához használt primerek**
(Danet et al. 2011, http6)

Gén	Hossz (bp).	Cél	Primerek	Szekvencia (5' → 3')
16S <i>rDNS</i>	1784/1071	PCR	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT
			P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT
		Nested-PCR	f01	CGGAAACTTTTAGTTTCAGT
			r01	AAGTGCCCAACTAAATGAT

A PCR reakcióhoz a Thermo Scientific Phire Green Hot Start II DNS polimerázát használtam fel. A PCR reakciók a következőket tartalmazták egy mintára vonatkoztatva:

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. Negatív mintaként steril desztillált vizet használtam.

A PCR reakció a következő protokoll szerint futott le minden esetben:

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. végső elongáció: 72°C – 1 min
- } 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 1:40-szeres hígítás után szolgált a nested PCR reakció templátjaként. 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.

3.5. Vírusok kimutatását célzó vizsgálatok

3.5.1. RNS kivonás

Az RNS tisztításhoz a 2016-ban gyűjtött, -70°C-on tárolt levélmintákat használtam fel 2017-ben. Dörzsmozsárban eldörzsöltem 0,15-0,2 g növényi szövetet folyékony nitrogénben, majd az így homogenizált mintához 850 µl, 65°C hőmérsékletre előmelegített extrakciós puffert (2% CTAB, 2,5% PVP, 100 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 2 M NaCl) és 17 µl β-merkaptoetanolt pipettáztam. Az így nyert folyadékot 2 ml-es Eppendorf csövekbe öntöttem és Vortex segítségével alaposan kevertettem. A mintákat 65°C-on 10 percen át rázattam vízfürdőben, közben többször kézzel megforgattam. 850µl kloroform:izoamilalkoholt (24:1) pipettáztam a mintákra, óvatosan döntögetve kevertem, majd 4°C-on, 10 000 rpm fordulaton 10 percen át centrifugáltam azt. A felülúszót, pipetta segítségével új Eppendorf csövekbe pipettáztam át, melyekbe előzőleg 800µl kloroform:izoamilalkoholt (24:1) mértem. Óvatos keverés után az előbbi beállításokkal megismételtem a centrifugálást. 1,5 ml-es Eppendorf csöveket készítettem elő, melyekbe 250µl 9M-os LiCl-ot és 450µl felülúszót mértem a már lefugált mintákból. 30 percen át jégén tartottam, ezt követően 13 000 rpm fordulaton 20 percen át, 4°C-on centrifugáltam azt. Ezúttal a felülúszót öntöttem le, a csapadékra pedig 450µl 65°C-os SSE (0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), 1 M NaCl) oldatot mértem, majd vortex segítségével kevertem. 450µl kloroform:izoamilalkohol hozzáadását követően 10 000 rpm, 10 perc beállítás mellett, 4°C-on centrifugáltam. Új 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe mértem mintánként 280µl izopropanolt és 30µl 4M-os NaAcetátot, amelyre maximum 400µl felülúszót pipettáztam, ezt követően 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam a mintákat. 20 percig tartó, 13 000 rpm és 4°C hőmérsékleten végzett centrifugálás után a keletkezett felülúszót leöntöttem, majd hozzámértem mintánként 1 ml hideg, 70%-os etanolt. Újabb 5 perc centrifugálást követően leöntöttem az alkoholt, alaposan kicsepegtetve a

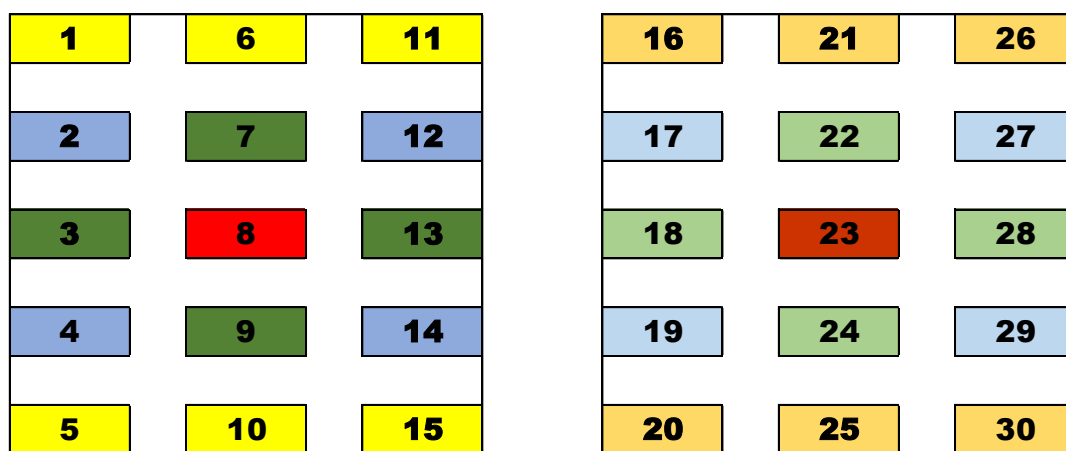
csöveket, majd a tökéletes száradás elősegítése érdekében 10 percig speed-vac eszközbe helyeztem a mintákat, ahol a maradék alkohol is elpárolgott. 25 μ l MQ (ultratiszta vízben) visszaoldottam a kicsapott RNS-t.

Az eljárás végén nyert oldat RNS koncentrációját és tisztaságát Nanodrop készüléken, valamint a minták 1,2%-os agaróz gél-elektroforézissel történő szétválasztásával ellenőriztem.

3.5.1.1. Több egyed RNS-ét tartalmazó keverék (Pool) készítése

A vírusfertőzöttség felmérésekor annak érdekében, hogy redukáljam, ezáltal kezelhetőbbé tegyem a mintaszámot, több egyed RNS-ét tartalmazó keveréket, poolt készítettem. Így 30 egyedi minta helyett 8 mintával tudtam tovább dolgozni. A minták mindegyike több egyed, a 3.5.1. pontban ismertetett módon kivont RNS-ének keverékét tartalmazta, 1 μ g mennyiségben.

A poolozás során a központi beteg fától azonos távolságban lévő egyedekről származó minták kerültek összevonásra (4. ábra). A fák pozícióját a számok, a poolokat a színek jelölik.



4. ábra Az egyes poolokba tartozó fák elhelyezkedése a mintavételi területen

Az 1-es számú pool tehát a 3, 7, 9 és 13-as fákról származó minták keveréke,

A 2-es számú pool a 2, 4, 12 és 14 minták keveréke,

A 3-as számú pool tartalmazza az 1, 6, 11, 5, 10, 15-ös fákról származó mintákat,

A 4-es számú poolba a 18, 22, 24, és 28-as minták kerültek,

Az 5-ös számú poolba a 17, 19, 27, 29-es minták kerültek,

A 6-os számú pool pedig a 16, 21, 26, 20, 25, és 30-as minták keveréke.

A központi, pusztuló 8-as és 23-as jelű fákat egyedileg kezeltem, így összesen 8 db mintával tudtam tovább dolgozni.

Amennyiben az egyik poolban kimutatható a keresett kórokozó a PCR reakció eredményeként, és pontosan szeretnénk tudni, mely egyed volt fertőzött, ki lehet bontani az érintett poolt, mert ismerjük, mely fákat tartalmazza. Az adott poolba tartozó egyedek RNS kivonataiból egyesével kell új cDNS-t készíteni és azt kell az adott vírusra tesztelni.

3.5.2. cDNS készítése

A kópia DNS (cDNS) olyan DNS szál, ami az mRNA –ról reverz transzkriptáz enzimmel szintetizálódik, bázissorrendje éppen komplementere a mRNA bázissorrendjének.

A RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)-et használva random primerek segítségével reverz transzkripcióval cDNS-t készítettem a poolozott RNS mintáimból. A 8 darab pool koncentrációját Nanodrop készüléken mértem meg, majd mintánként 0,5 mikrogramm RNS-t használtam templátként a reakcióhoz. Mintánként 0,25µl random primer hozzáadása után 3µl végtérfogatra egészítettem ki MQ víz hozzáadásával a reakciót. Vortexelést követően 65°C-ra előmelegített vízfürdőben denaturáltam a mintáimat 5 percig, majd jégen tartottam azokat. 1µl 5X reakciós pufferből, 0,5µl 10mM dNTP-ből, 0,25µl Revertaid reverz transzkriptáz enzimből és 0,25 µl Ribolock RNáz inhibitorból MIX-et mértem össze, amiből a jégen lévő mintákba 2µl oldatot pipettáztam. A reakció a következő protokoll szerint zajlott le:

- 25 °C 10 perc
- 42 °C 60 perc
- 45 °C 10 perc
- 70 °C 10 perc

Az elkészített cDNS-t 10X hígítás után PCR reakciókban templátként használtam fel a mintáimban jelenlevő vírusok kimutatására.

3.5.3. Vírusok kimutatása RT-PCR-rel

A vizsgálatainkba bevont vírusok kimutatására specifikus primer szekvenciákat alkalmaztam. A tervezett indítószekvenciákat a 2. táblázat-ban foglaltam össze.

2. táblázat A vírusok kimutatásához használt primerek

Vírus	Méret	Primer név	Szekvencia (5'-3')
PPV	242	PPV_P1(9292)F PPV_P2(9534)R	CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC
CVA	1391	CVAMP-Fm(5400) CVAMP-Rm(6791)	ATG TCG ATC ATA CCA GTY AAG TTA CCT GCA CCA ACY AC
LChV1	796	LChV1-F(9493) LChV1-R(10288)	GTT GTT AGA TTC CGT CAT TAR CAG TCG AAC TAC CAA GCG TTC
PNRSV	425	PNcpinF(1396) PNcpR (1821)	GAG-TAT-TGA-CTT-CAC-GAC-CAC CTT-TCC-ATT-CGG-AGA-AAT-TCG

3.5.3.1. Plum Pox Virus (PPV) kimutatása

A szilvahimlő vírus (PPV) kimutatása során a PCR reakcióhoz az alábbi keveréket állítottam össze:

- MQ: (steril desztillált víz) 9,4 µl
- 5X Phire Green Reaction Buffert (puffer): 3 µl
- Forward primer: 0,75 µl (PPV_P1 9534)
Reverz primer: 0,75 µl (PPV_P2 9292)
- 10mM dNTP: 0,3 µl
- Thermo Scientific Phire Green Hot Start II polimeráz (xU/1 µl): 0,3 µl
- templát: 0,5 µl 10x higított cDNS

Végtérfogat: 15 µl

A PPV kimutatását az alábbi PCR beállítások mellett végeztem:

1. elő-denaturáció: 98°C – 30 s
2. denaturáció: 98°C – 10 s
3. annealláció: 62°C – 10 s
4. elongáció: 72°C – 20 s
5. végső elongáció: 72°C – 1 min

40X

3.5.3.2. Prunus Necrotic Ringspot Virus (PNRSV) kimutatása

A Nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (PNRSV) kimutatása során a PCR reakcióhoz az alábbi keveréket állítottam össze:

- MQ: (steril desztillált víz) 9,4 µl
 - 5X Phire Green Reaction Buffert (puffer): 3 µl
 - Forward primer: 0,75 µl (LChV1_9493 F)
Reverz primer: 0,75 µl (LChV1_10288 R)
 - 10mM dNTP: 0,3 µl
 - Thermo Scientific Phire Green Hot Start II polimeráz (xU/1 µl): 0,3 µl
 - templát: 0,5 µl 10x hígított cDNS
- Végtérfogat: 15 µl

A PNRSV kimutatását az alábbi PCR beállítások mellett végeztem:

- | | | |
|----|-------------------------------|---|
| 1. | elő-denaturáció: 98°C – 30 s | |
| 2. | denaturáció: 98°C – 10 s | } <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px; display: inline-block;">40X</div> |
| 3. | annealláció: 56°C – 70 s | |
| 4. | elongáció: 72°C – 20 s | |
| 5. | végső elongáció: 72°C – 1 min | |

3.5.3.3. Cherry Virus A (CVA) kimutatása

A PCR reakcióhoz az alábbi keveréket állítottam össze:

- MQ: (steril desztillált víz) 9,4 µl
 - 5X Phire Green Reaction Buffert (puffer): 3 µl
 - Forward primer: 0,75 µl (CVAMP_Fm 5400)
Reverz primer: 0,75 µl (CVAMP_Rm 6791)
 - 10mM dNTP: 0,3 µl
 - Thermo Scientific Phire Green Hot Start II polimeráz (xU/1 µl): 0,3 µl
 - templát: 0,5 µl 10x hígított cDNS
- Végtérfogat: 15 µl

A CVA kimutatását az alábbi PCR beállítások mellett végeztem:

1. elő-denaturáció: 98°C – 30 s
 2. denaturáció: 98°C – 10 s
 3. annealláció: 62°C – 10 s
 4. elongáció: 72°C – 20 s
 5. végső elongáció: 72°C – 1 min
- } 40X

3.5.3.4. A Little Cherry Virus 1 (LChV1) kimutatása

A Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 (LChV1) kimutatása során a PCR reakcióhoz az alábbi keveréket állítottam össze:

- MQ: (steril desztillált víz) 9,4 µl
 - 5X Phire Green Reaction Buffert (puffer): 3 µl
 - Forward primer: 0,75 µl (LChV1_9493 F)
Reverz primer: 0,75 µl (LChV1_10288 R)
 - 10mM dNTP: 0,3 µl
 - Thermo Scientific Phire Green Hot Start II polimeráz (xU/1 µl): 0,3 µl
 - templát: 0,5 µl 10x hígított cDNS
- Végtérfogat: 15 µl

A LChV1 kimutatását az alábbi PCR beállítások mellett végeztem:

1. elő-denaturáció: 98°C – 30 s
 2. denaturáció: 98°C – 10 s
 3. annealláció: 51°C – 70 s
 4. elongáció: 72°C – 20 s
 5. végső elongáció: 72°C – 1 min
- } 40X

A kapott PCR termékeket minden esetben agaróz gélen (1,2%) méret szerinti elválasztással, gél-elektroforézissel ellenőriztük, etídium-bromid (EtBr) festék jelenlétében.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A kajszipusztulás mértéke Boldogkőváralján

A Boldogkőváralján tapasztalt fapusztulás mértéke akkora, hogy egyértelműen meghatározza a látképet (5. ábra). A hiányos, foghíjas ültetvények látványa a laikus szemlélődő számára is világossá teszi a fapusztulás súlyosságát, megoldásának égető szükségét.



5. ábra Tájkép részlet a Boldogkői várból, 2017 (Fotó: Petres Martin)

4.2. A Sherpa fajtán tapasztalt tünetek

2016 májusában felvételeztem először a pusztuló ültetvényben, ahol a jellegzetes tünetek alapján úgy tűnt, hogy a fapusztulás fő kiváltó oka a csonthéjasok európai sárgulása fitoplazma, *Candidatus Phytoplasma prunorum* syn. European stone fruit yellows phytoplasma (ESFY) lehet.

Az érintett fákon teljes, vagy részleges pusztulás volt megfigyelhető (6. ábra). Teljes pusztulás esetén a kórokozó feltehetően az egész fát kolonizálta a háncsszövetben terjedve, ezzel világosbarna háncs nekrozist, majd a fertőzött vázág száradását okozva. Gyakran megfigyeltem, ahogy egy fán az egyes vázágak egymáshoz képest időben jól látható módon eltérően pusztulnak. A fa egyik oldali vázága már teljesen levél nélküli, száraz, a mellette lévő vázág sem él már, de még fent maradnak rajta az összeaszott gyümölcsök és levelek. A következő vázágon még csak fonnyadnak a levelek, az utolsó vázág pedig tünetmentesen élni látszik. Ez alapján látszik, merre halad a kórokozó a háncsszöveten belül.



6. ábra **Teljes és részleges pusztulás** (Fotó: Petres Martin)

Rendszerint azok az egyedek, melyeken már szemmel látható, hogy nem egészségesek, néhány hét, nyári kánikulában néhány nap leforgása alatt kiszáradnak, a folyamatot nem lehet befolyásolni. A pusztulás előjele lehet kora tavasszal a gyengült hajtásnövekedés, gyenge virágrügyképződés, különösen a fa alsó harmadában. A gutaütés-tünetcsoportba tartozó számos kórokozóról bizonyítást nyert, hogy a fapusztulásban elsődleges szerepük lehet. A fitoplazma kiváltotta pusztulást megkülönbözteti a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* baktérium fertőzésétől, hogy soha nem kíséri mézgásodás (Szalay 2012). Mivel a mézgásodás feltűnő, megkönnyítette a felvételezések során a diagnózist egy-egy pusztuló fa esetén (7. ábra). Általános jelenség, hogy a törzsrepedés feletti vágat érinti először a száradás.



7. ábra **Mézgásodó és mézga nélküli kajszi törzsek, 2016** (Fotó: Petres Martin)

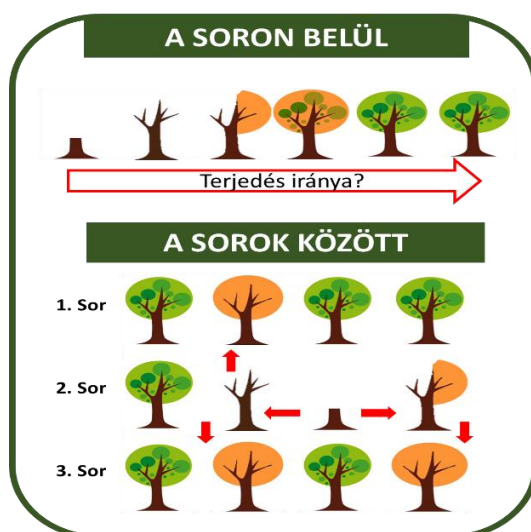
A myrobalán alany a nemes pusztulása után sem pusztul el, erős sarjhajtás-képzés figyelhető meg. A pusztuló fák levelei kezdetben haragoszöldek, színük felé kanalasodnak, tapintásuk merev, majd a turgor vesztes következtében fonnyadnak, sárgulni majd száradni kezdenek, a teljes száradást követően sem hullanak le a fáról (8. ábra).



8. ábra A pusztuló fák levelei sokáig a fán maradnak (Fotó: Petres Martin)

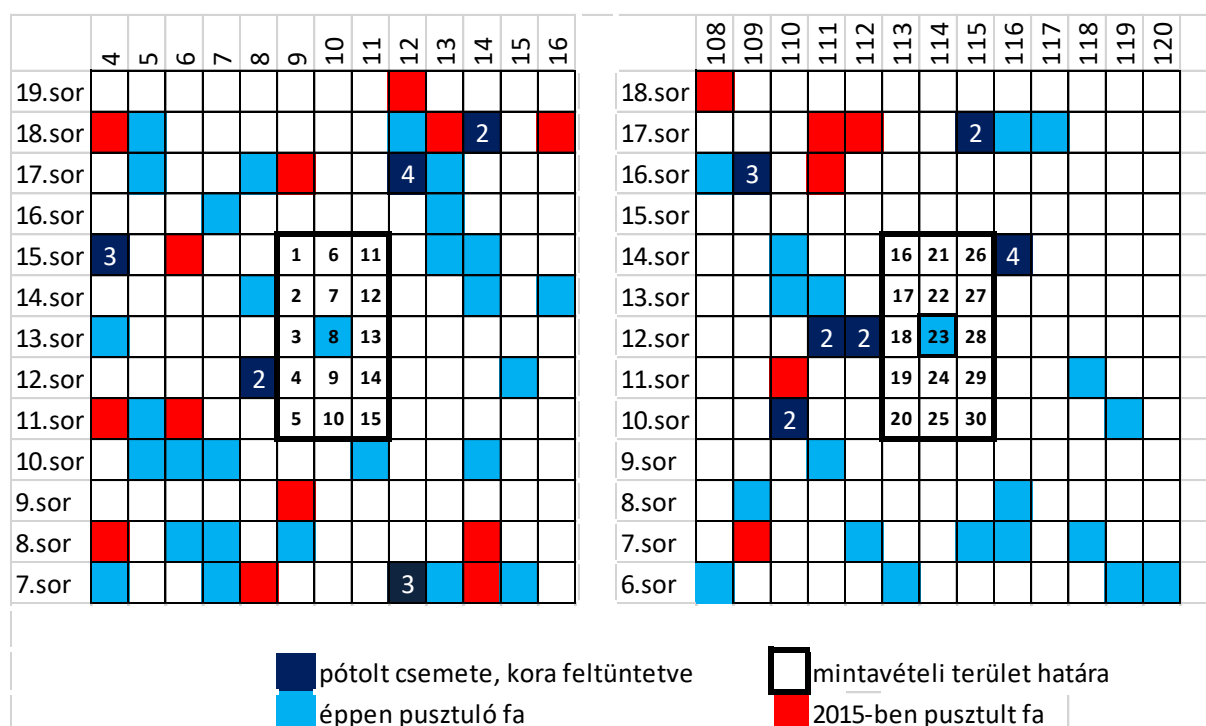
4.3. A pusztulás ültetvényen belüli terjedésének megfigyelése

Az ültetvényben úgy tűnt, hogy ha megvizsgáljuk egy pusztuló fa közvetlen környezetét, a terjedés iránya térben és időben egyaránt nyomon követhető, egyfajta útvonal feltételezhető, a kórokozó terjedésének útvonala. Látszólag minden pusztuló fa közvetlen környezetében volt vagy egy korábban kivágott szomszéd, vagy beteg egyed. Az 9. ábrán az látható vázlatosan, ami felkeltette érdeklődésünket, miszerint az egymás mellett, eltérő állapotban pusztuló fák pillanatnyi állapota alapján tudtunk terjedési útvonalat feltételezni.



9. ábra A pusztulás foltokban jelentkezik

2016-ban bejártam a kertet, és elkészítettem az ültetvény térképét felülnézetben. Excel táblázatban színekkel láttam el minden fát, a felméréskor tapasztalt pillanatnyi állapota alapján (pusztuló, pótol, üres hely, vágagát veszett csonk). A térképen vízszintesen a 19 sor, függőlegesen pedig a fa, soron belüli pontos helye látható. Egy sorban 133 db fa, a térképen pedig összesen mintegy 2010 db fa szerepel. Mivel a térképen feltüntettem a már évekkorábban kipusztult egyedek helyére telepített csemeték korát is, így vissza tudtam következtetni, hogy melyik évben mekkora pusztulás történt, és évekre visszamenően el tudtam készíteni egy viszonylag pontos becslést, valamint a pusztulás mintázatát ábrázoló térképet (1. melléklet). A 10. ábrán bemutatom a kiválasztott 15-15 fa helyzetét, valamint közvetlen környezetük felmérésekor tapasztalt állapotát.

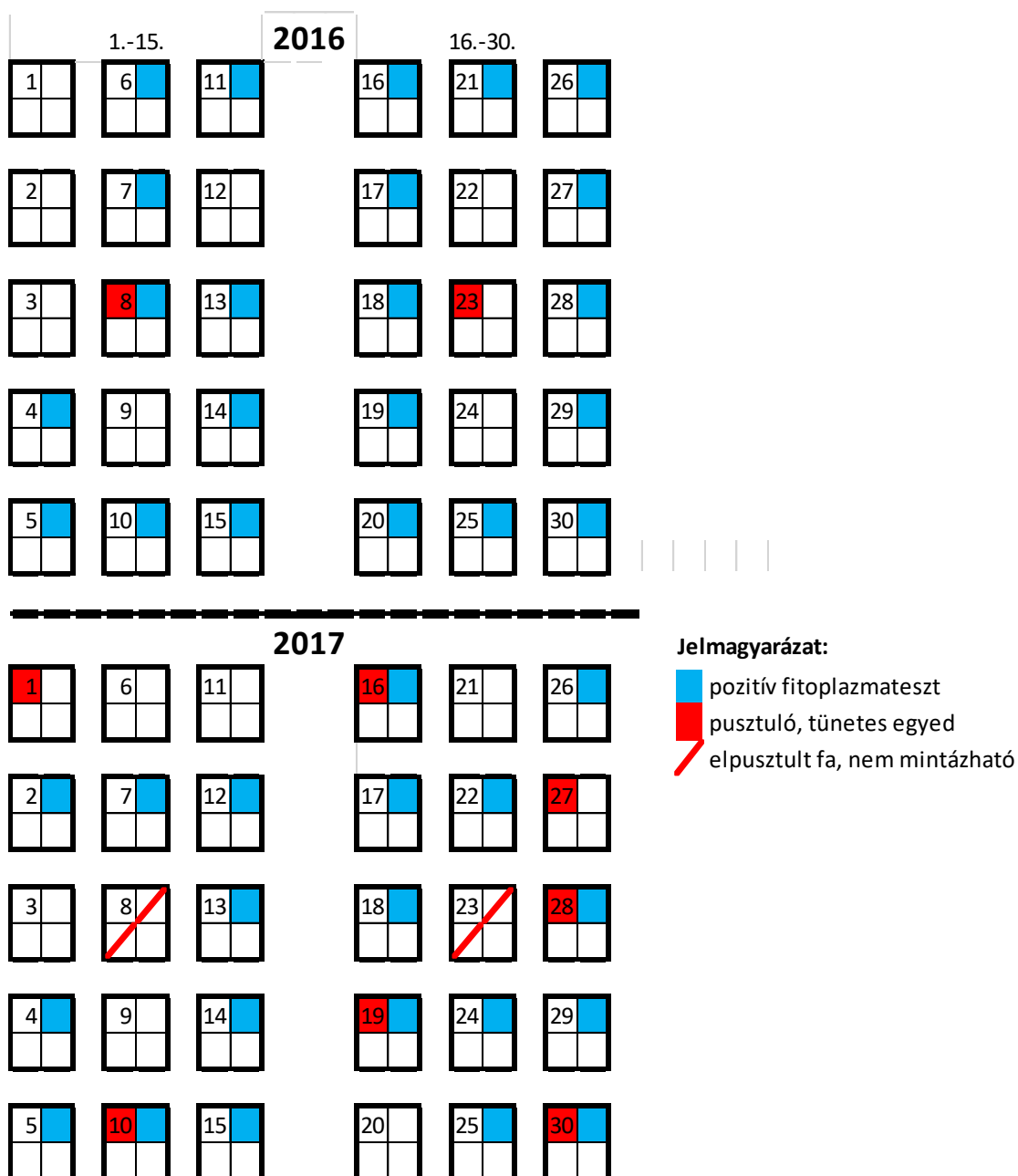


10. ábra Térkép részlet a két kvadrát környezetéről (2016.07.20.)

Az volt a tézisünk a felvételezéskor, hogy ha valóban a szomszédos fák között terjed inkább a pusztulás, akkor a legegyszerűbben úgy mutathatjuk ki a terjedés mintázatát, hogy ha egy központi, magányosan álló pusztuló fáról, és annak teljesen tünetmentes szomszédairól veszünk levélmintát, és megpróbáljuk a még tünetmentes egyedekben kimutatni a *Ca. phytoplasma prunorum* kórokozó jelenlétét, Nested PCR technikával. Ha a közvetlen szomszédokban megtaláljuk a kórokozót, de a távolabb állókban nem tudjuk kimutatni, akkor az igazolhatja, hogy fáról fára terjed a pusztulás, gócpontok alakulnak ki egy-egy fertőzött fa körül.

4.4. A 2016. és 2017. évi vizsgálatok elemzése

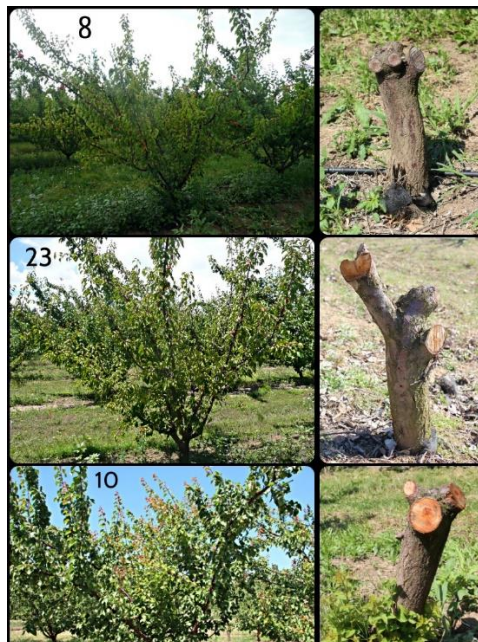
A levélmintákból DNS-t izoláltam, majd a 16SrX csoporton belül konzervatív 16S rRNS génre tervezett P1-P7, második körben pedig fO1-rO1 indítószekvenciákkal Nested PCR vizsgálatot végeztem, majd a kapott terméket agaróz (1,2%) gél-elektroforézissel történő szétválasztásával ellenőriztem. A vizsgálatot mindkét évben azonos időben gyűjtött levélmintából elvégeztem, a kapott eredményt a 11. ábrán mutatom be. Korábbi vizsgálataink alkalmával faj szinten azonosítottuk a *Ca. phytoplasma prunorum* kórokozót ezekben a fákban, így tudjuk, hogy a 16SrX csoporton belül valóban ez a faj van jelen a mintákban.



11. ábra 2016 és 2017 évben fitoplazmára tesztelt fák laboratóriumi eredményeinek és vizuális állapotának összehasonlítása (2017. július)

A vizuális felvételezést 2017 júliusában megismételtem:

- A 2016-ban tünetmentesnek ítélt fák közül az 1, 16, 19, 27, 28 és 30-as jelű fák pusztultak 2017-ben.
- **Az 1-es és 27-es fa 2017-ben mentesnek bizonyult a fitoplazma fertőzéstől, ennek ellenére pusztult.** A 27-es fa 2016-ban még erős pozitív eredményt adott a Nested PCR során, míg az 1-es mintákban egyik évben sem sikerült kimutatni kórokozó jelenlétét. Nem találtam azoktól a fáktól eltérő tünetet rajta, mint amikben sikerült kimutatnom a fitoplazma fertőzést.
- 2016-ban a 28 tünetmentes fából 21-ben jelen volt a *Ca. phytoplasma prunorum* kórokozó, de nem okozott tünetet a vizsgálat idején.
- 2017-ben 20 fából sikerült kimutatnom jelenlétét, de a teszt eredménye nem állt szoros kapcsolatban az előző évben tapasztalt fertőzöttséggel, ugyanis:
 - 2016-ban pozitív eredményt kaptam a 6, 11, 20, 21 és 27-es fákban, de az egy év múlva megismételt vizsgálat során nem bizonyult fertőzöttnek ez az 5 egyed.
 - A 2, 12, 22 és 24-es fákban 2016-ban még nem sikerült kimutatni a kórokozó jelenlétét, 2017-ben azonban ezekben a fákban is megjelent.
- Azt tapasztaltam, hogy a 8, 10 és 23-as jelű fa nem élte túl a telet, csak a törzs maradt a helyén (12. ábra). Pusztulása után a 10-es jelű fa sarjhajtásából sikerült kimutatnom a fitoplazma fertőzést.



12. ábra Kivágásra került a 8-as, 23-as és 10-es jelű fa, 2017 július (Fotó:Petres Martin)

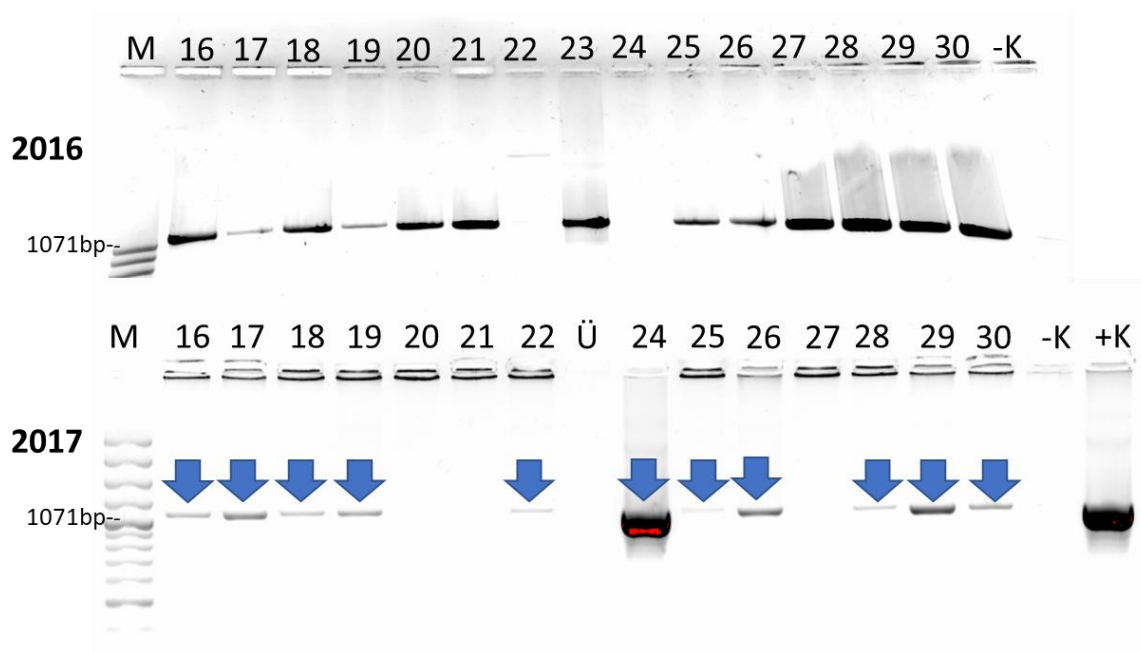
A 2010 db fából 2016 évben 372 db egyed, 2017-ben további 149 fa veszteség következett be, ami 26%-os pusztulást jelent 2016 tavasztól 2017 júliusáig tartó időszakban.

A 13. és 14. ábra alapján a *Candidatus phytoplasma prunorum* jelen van az ültetvény pusztuló és tünetmentes fáiban, de két évnyi vizuális felvételezés és molekuláris diagnosztikai eredményeit alapul véve megállapítható, hogy jelenléte nem áll egyértelmű és kizárólagos kapcsolatban a pusztulással. A pusztuló fák közül van, amelyikben nem sikerült kimutatni egyik évben sem jelenlétét (1. fa), és olyan is előfordult, hogy egy év után mentesnek bizonyult a kórokozótól a már egyszer fertőzöttnek diagnosztizált fa (27. fa).



13. ábra 16SrX csoportspecifikus primerekkel (fO1-rO1) amplifikált DNS szakaszok mintázata 1,2%-os agaróz gélen, 2016 és 2017 évben, az első kvadrátot (1-15 fa) vizsgálva

M=GeneRuler 100 bp. DNS marker, -K: steril MQ víz, +K: ESFY fertőzött kajszi



14. ábra 16SrX csoportspecifikus primerekkel (fO1-rO1) amplifikált DNS szakaszok mintázata 1,2%-os agaróz gélen, 2016 és 2017 évben, a második kvadrátot (16-30 fa) vizsgálva

M= GeneRuler 100 bp. DNS marker, -K: steril MQ víz, +K: ESFY fertőzött Sherpa kajszi

4.5. További fitoplazma vizsgálatok eredménye 2016 és 2017 évben

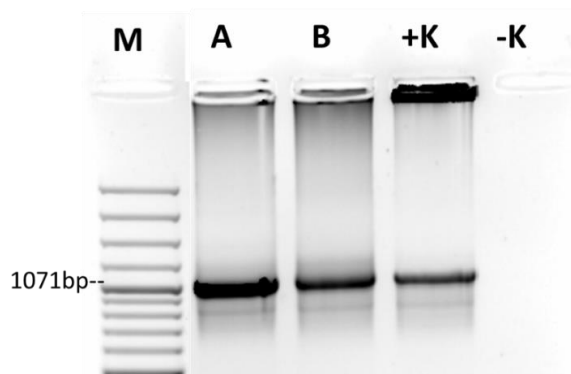
4.5.1. Újra kihajtó fák vizsgálata

Az ültetvényben több esetben előfordult, hogy a vágását vesztett törzs újra kihajt annak ellenére, hogy korábban teljes pusztulás következett be. Habitusát tekintve feltűnően egészséges, jó kondícióban lévő a hajtásokról beszélhetünk, haragoszöld, nem kanalasodó, egészséges levelekkel (15. ábra).



15. ábra A két újra kihajtott Sherpa kajsziarack fa (Fotó: Petres Martin)

Mintát gyűjtöttem két, egymás mellett álló fáról, majd a levélmintából DNS-t tisztítottam, és 16SrX csoportspecifikus primerekkel nested PCR-t készítettem. Mindkét fa fertőzött volt 16SrX csoportba tartozó fitoplazmával, a fertőzés azonban nem okozott tünetet (16. ábra).



16. ábra fO1-rO1 primerekkel amplifikált DNS szakaszok mintázata 1,2%-os agaróz gélen, „kigyógyult” fákról gyűjtött mintákból

M= GeneRuler 100bp Plus DNS marker, -K: steril MQ víz, +K: ESFY fertőzött Sherpa kajszi

4.5.2. A 2015-ben tesztelt fák állapotának újrafelvételezése

2015.07.08-án a Fair Fruit Kft. megbízásából a Genlogs Biodiagnosztika Kft 48 db kajszibarack mintát vizsgált Nested PCR és RFLP analízis alkalmazásával Boldogkőváralján, Tom Cot és Bergerouge fajtákon. **Jómagam nem vettem részt sem a mintagyűjtésben, sem a feldolgozásban.** A jegyzőkönyv alapján azonban felkerestem 2016. 07.20.-án a vizsgált fákat, és felmértem állapotukat. A laboratóriumi vizsgálati jegyzőkönyv tartalmával utólag egybevetettem a látottakat, amit röviden ismertetek.

A vizsgálat során 24 db tünetmentes és 24 db tünetes fát vizsgáltak.

A 24 tünetmentes fa közül

- 1 db pozitív teszt született. Az érintett fa egy év elteltével már kezdeti pusztulás jeleit mutatta.
- A maradék 23 db tünetmentes, negatív laboreredményt mutató fa közül 5 db pusztuló kajszifát, valamint 18 db 2016-ban is tünetmentes egyedet találtam.

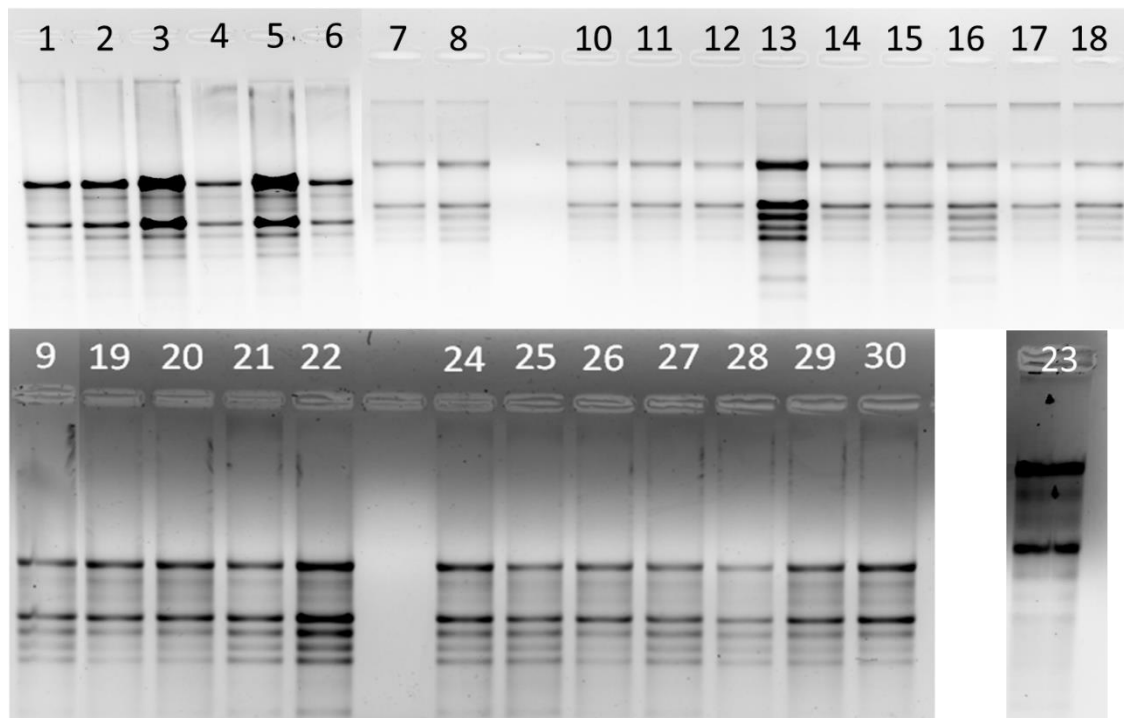
A 24 db tünetes kajszifáról gyűjtött minták feldolgozása során 12 db pozitív, további 3 db gyengén pozitív, valamint 9 db negatív eredmény született.

- 12 db pusztuló, laboreredménye alapján fitoplazmafertőzött egyed közül 11 db gutaütött fát találtam. Egy fa azonban, bár 2015-ben betegnek látszott, és ki is mutatták benne a fitoplazma fertőzöttséget, egészségesnek ítéltam.
- 3 db gyengén pozitív értékelésű fa közül 2 db vágást vesztett csonkot és 1 db egészséges egyedet találtam.
- 9 db tünetes, de negatív laboreredményt mutató fa közül 6 db gutaütött, és 3 db egészséges egyedet találtam.

A Sherpa fajtában végzett vizuális tünetfelvételzés laboratóriumi eredményekkel történő összehasonlítása, valamint a 2015-ben Tom Cot és Bergerouge fajtákon végzett hasonló összehasonlítás alapján felmerült, hogy célszerű lenne kiterjeszteni vizsgálatainkat további, a kajszit fertőző kórokozók vizsgálatával, mert eredményeink alapján a fitoplazma fertőzés nem feltétlenül okozója a pusztulásnak.

4.6. Vírusfertőzöttség vizsgálata

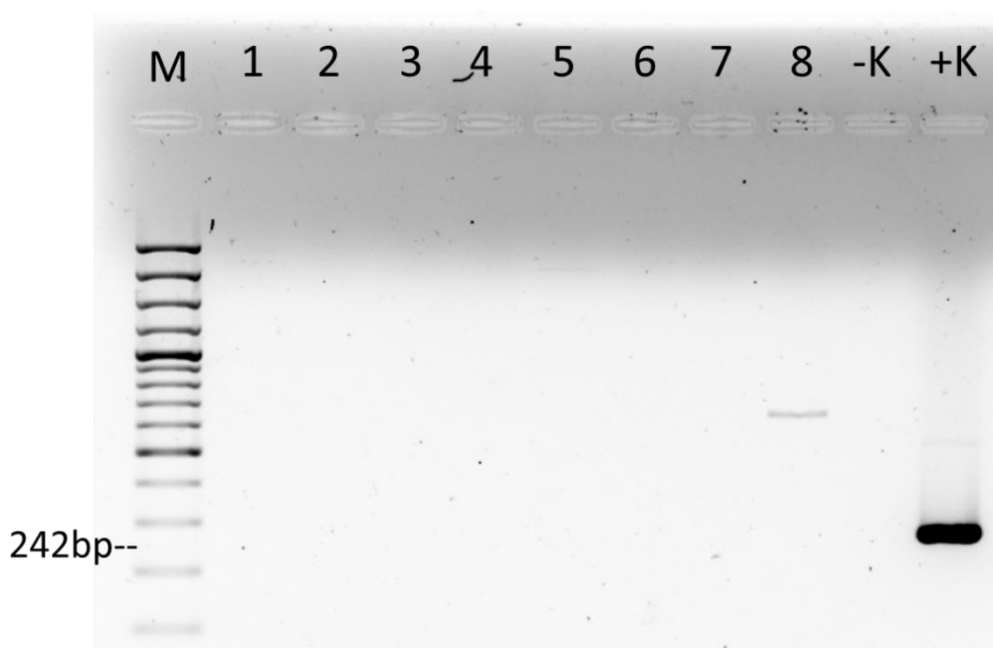
Mivel a kajsziarackot a fitoplazmán kívül számos vírus is fertőzheti, megvizsgáltuk a két mintavételi terület fáiban a vírusfertőzöttséget is. Teszteltem a kajszi szaporítóanyag vizsgálatnál karantén kórokozónak minősülő szilvahimlő vírus (Plum Pox Virus, PPV) és a nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (Prunus Necrotic ringspot virus, PNRSV) jelenlétét. Vizsgáltam továbbá a cseresznyén karantén vírusnak számító Cseresznye aprógyümölcsűség vírust (Little Cherry Virus 1, LChV1) melynek kajszin való előfordulását először 2016-ban a NAIK Diagnosztika csoportja, 2017-ben pedig cseh kutatók írták le, így érdekesnek gondoltuk megvizsgálni, előfordul-e az általam vizsgált ültetvényben ez a vírus. A Cherry Virus A (CVA) tünetet nem okozva, látensan fertőz *Prunus* fajokat. A NAIK Diagnosztika csoportja korábban ezt a kórokozót is kimutatta kajsziarackon. A vírus más kórokozókkal előfordulva feltételezhetően elveszíti látens mivoltát és tüneteket okozhat, ezért szeretnénk volna jelenlétét vizsgálni a pusztuló Sherpa ültetvényben. Levélmintákból RNS-t izoláltam (17. ábra), majd az RNS kivonatokból poolokat készítettem. A leveleket, amelyekből RNS-t kivontam, a mintavételtől a felhasználásig -70°C-on tároltam. A 2016-ban gyűjtött mintákkal dolgoztam, így az időközben elpusztult fákat is meg tudtam vizsgálni.



17. ábra A kajszi levélminták RNS kivonatainak képe 1,2% agaróz gélen való elválasztás után, 2017

4.6.1. A szilvahimlő vírus (PPV) kimutatása

A 18. ábrán bemutatom a PPV kimutatása során kapott eredményt. PCR reakciót készítettem, PPV_P1 és PPV_P2 primerek használatával. Templátként a poolozott RNS-ről készített, tízszeresen hígított cDNS-t használtam. Az amplifikálandó termék mérete 242bp. A GeneRuler 100bp Plus marker alapján becsült mérettartományban egyedül a pozitív kontrollként használt Tuleu gras szilva fajtáról származó izolátumban kaptam a várt mérettartományban terméket, a poolokban nem, ezért a gélkép alapján elmondható hogy a mintákban PPV nincs jelen.

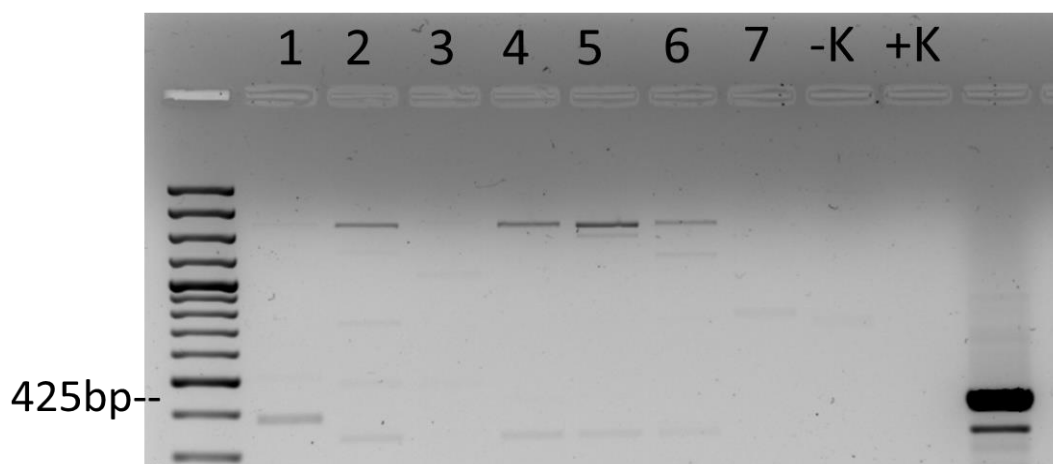


18. ábra *A szilvahimlő vírus (PPV) jelenlétének vizsgálata RT-PCR-rel*

M=GeneRuler 100bp Plus DNS marker, -K: steril MQ víz, +K: PPV fertőzött Tuleu gras szilva fajta

4.6.2. A nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (PNRSV) kimutatása

A PNRSV kimutatásához 425 bp hosszú terméket amplifikáltam, PNcpinF és PNcpR primerekkel 40 ciklusban. Templátként a poolokból készített, tízszeresen hígított cDNS-t, pozitív kontrollként pedig PNRSV-vel fertőzött kajszi mintát használtam. A 2, 4, 5 és 6 számú poolban aspecifikus jelet kaptam, de ezek a jelek a várt mérettől jelentősen nagyobb méretben jelentek meg. Az 1-es poolban kapott aspecifikus jel a várt mérettartomány alatt helyezkedik el, így megállapítható, hogy a minták nem fertőzöttek a PNRSV vírussal (19. ábra).



19. ábra A **Prunus Necrotic ringspot Virus (PNRSV)** jelenlétének vizsgálata RT-PCR-rel
M=GeneRuler 100bp Plus DNS marker, -K: steril MQ víz, +K: PNRSV fertőzött kajszi

4.6.3. A Cherry Virus A (CVA) kimutatása

A Cherry Virus A kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai alapján kajszin elterjedt. Nem ismert, hogy önmagában tünetet okozna, azonban más vírusok jelenléte felerősítheti fertőzésének hatását, ezért vizsgáltuk jelenlétét. Mivel nem sikerült a CVAMP-Fm, CVAMP-Rm primerekkel amplifikálni az 1391 bp hosszú terméket, ezért kapott eredmények alapján a vizsgált fák CVA kórokozótól mentesnek tekinthetők (20. ábra).

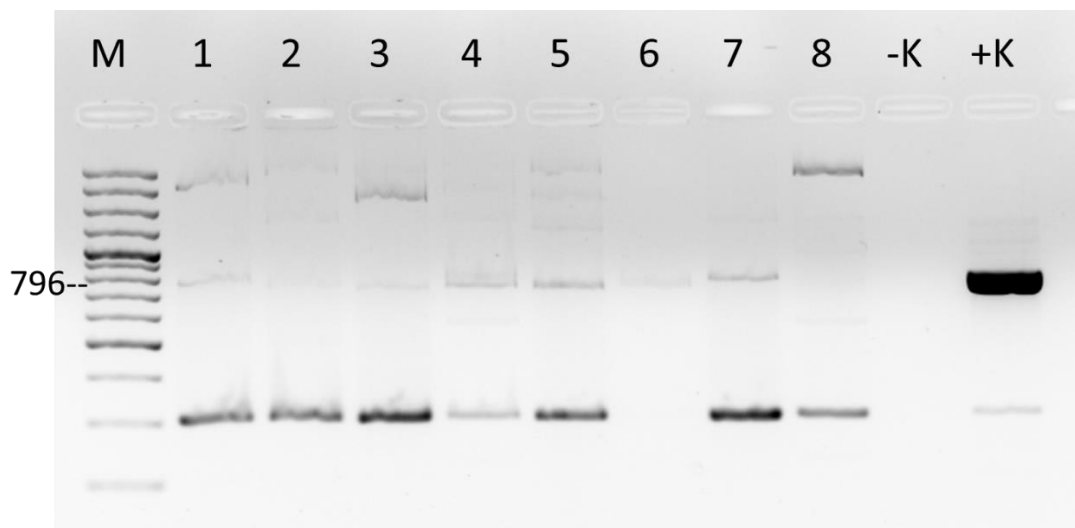


20. ábra A Cherry Virus A (CVA) jelenlétének vizsgálata RT-PCR-rel

M=GeneRuler 100bp Plus DNS marker, -K: steril MQ víz, +K: CVA fertőzött Pannónia kajszi fajta

4.6.4. A cseresznye aprógyümölcsűség vírus (LChV1) kimutatása

A cseresznye aprógyümölcsűség vírus kajszibarackon való előfordulása nem volt ismert, azonban 2017-ben, egymástól függetlenül két kutatócsoport is kimutatta jelenlétét kajszibarackban. A NAIK Diagnosztika csoportja illetve cseh kutatók is bizonyították a kórokozó kajszin való elfordulását (Šafařová, 2017) (Czotter et al. 2017). Ez alapján vizsgáltuk meg a vírus jelenlétét mintáimban, hiszen a kajszi pusztulásban betöltött szerepe nem tisztázott. A 21. ábra szemlélteti a LChV1 kimutatása során kapott eredményt. Az LChV1_F és LChV1_R indítószekvenciák 796 bp méretű terméket határolnak. Az 1, 3, 4, 5, 6 és 7 poolokban a gélkép alapján nem dönthető el biztosan, hogy aspecifikus jelek, vagy a LChV1 vírus van-e jelen a mintákban. A poolokat kibontva, egyedi PCR tesztek elvégzésére van szükség, hogy a vírus jelenlétét bizonyítani tudjuk, mert a gélképen a kérdéses poolokban több méretben is jelentkeznek aspecifikus jelek.



21. ábra A cseresznye aprógyümölcsűség vírus (LChV1) jelenlétének vizsgálata RT-PCR-rel

M=GeneRuler 100bp Plus DNS marker, -K: steril MQ víz, +K: LChV1 fertőzött Magyar kajszi fajta

A vizsgált Sherpa kajszifákban PPV, PNRSV és CVA nincs jelen a gélek alapján, mert a kapott eredmények alapján a vizsgált poolokban nem jelent meg termék a várt mérettartományban. PCR eredményeim alapján a LChV1 vírus esetén, bár több, kisebb és nagyobb méretű aspecifikus termék is keletkezett, a várt mérettartományhoz közel is kaptam ilyen jelet több poolban is. Annak tisztázására, hogy valóban ez a kórokozó van-e jelen a mintáimban, egyedi PCR elvégzésére van szükség az érintett poolokba tartozó fák esetén. A vírusfertőzöttség vizsgálatok eredménye azt mutatja, hogy a két mintavételi terület fáiban a vizsgált vírusok közül nincsenek jelen a PPV, a PNRSV és a CVA kórokozók. A LChV1 vírus jelenlétének egyértelmű igazolásához további vizsgálatok szükségesek.

5. ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásom során két fő irányból közelítettem meg a kajszi fapusztulás kérdését: egyfelől vizuálisan követtem nyomon az ültetvényben lejátszódó változásokat, másrészt korszerű molekuláris-diagnosztikai módszerekkel kerestem a választ az ültetvényben tapasztalt megválaszolatlan kérdésekre. Mivel a kajszi fapusztulás összetett jelenség, ehhez mérten komplex megközelítést igényel vizsgálata. Eredményeim azt igazolják legfőképpen, hogy az elvégzett laborvizsgálatok, akkor igazán hasznosak, ha a kutatómunka eredményeinek értékelésekor rendelkezésre állnak a kutatás tárgyát képező növények megfigyeléséről, állapotuk nyomon követéséről a vizsgálat egész ideje alatt gyűjtött információk, és nem csak a mintavételkor tapasztalt állapotok alapján vonjuk le a konklúziót a fapusztulásról, mert néhány hét alatt is bekövetkezhetnek olyan változások, amelyek megváltoztathatják látásmódunkat az adott problémáról.

Még nem tudjuk, mitől pusztul a kajszi, de a hazánkban általánosan elterjedt, csonthéjasokat megbetegítő *Candidatus Phytoplasma prunorum* látens fertőzését kimutattam mindkét évben, igen jelentős arányban a tünetmentes fákban is, ami megegyezett a vizuális tünet felvételezés során megállapított diagnózissal. Mivel a fitoplazmára tesztelt fák egy része még két év után sem mutatta pusztulás jeleit, továbbá a mentesnek hitt egyedek is, ugyanolyan tünetek lefolyása mellett pusztultak, mint a fitoplazma fertőzött fák, így feltételezzük, hogy más kórokozók együttes fertőzése eredményezheti a fitoplazma fertőzéssel párhuzamosan a nagyarányú fapusztulást. Eredményeim alapján az általam vizsgált ültetvényben a PPV, CVA és PNRSV vírusoknak valószínűleg nincs szerepe a vizsgált ültetvényben bekövetkező pusztulás kiváltásában, mert nem sikerült jelenlétüket kimutatnom mintáimban. A LChV1 vírus jelenlétének igazolásához további vizsgálatok szükségesek, mert a gélképeken a várt mérettartományhoz igen közel kaptam terméket az RT-PCR során. Annak megállapítására, hogy aspecifikus jelről vagy valóban a kórokozó jelenlétéről van szó, további vizsgálatok szükségesek.

A fitoplazmafertőzött, elpusztult gyümölcsfákon tapasztaltam a „recovery” jelenségét, mely során a már előzőleg elpusztult fa új, tünetmentes, egészséges hajtásokat hoz. Leveleiből kimutattam a fitoplazma jelenlétét.

A vizuális tünett felvételezés során azt a megállapítást tettem 2016 évben, hogy a pusztuló fák sajátos mintázatot alkotnak, foltokban történik a pusztulás. A fitoplazma specifikus primerekkel végzett molekuláris vizsgálatokkal azonban csak egyes kórokozók jelenlétét

tudtam megállapítani. A jövőben célszerű lenne metagenomikai módszerekkel feltérképezni a pusztuló fákban egyszerre jelen lévő kórokozókat, hogy esetleges együttes fertőzésük kimutatásával közelebb kerüljünk a kajszi pusztulás okának pontos feltárásához és megoldásához.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során felmértem egy Sherpa fajtájú, erősen pusztuló kajsziarack ültetvényben a pusztulás vizuális tüneteit, majd 3 hetes időközönként nyomon követtem a kajsziarackon tapasztalt tünetek változását. Az ültetvényben pusztuló fákon tapasztalt szimptómák alapján a csonthéjasok európai sárgulása fitoplazma (*Candidatus Phytoplasma prunorum*, syn ESFY) fertőzésnek tulajdonítottuk a pusztulást. A terepi diagnosztika során megállapítottam, hogy a pusztulás foltokban történik, ezért egy-egy fa változásának nyomon követése mellett célszerű lenne a terjedés mintázatát is felmérni az ültetvényben.

2016. júliusban felmértem mintegy 2000 db Sherpa kajsziarack pillanatnyi vizuális állapotát, majd táblázatban színkódot használva megjelenítettem azt. A térképen feltüntetett színkódok alapján megjelenítettem pótoló, a felvételezés során pusztuló, és korábban kipusztult kategóriákat, melybe a gyökerestől eltávolított üres fák helye, illetve a vázágát veszített csonkok is feltüntetésre kerültek. A felmérést 2017. évben is elvégeztem, a térképet egy év elteltével újra elkészítettem, és a két év változásai alapján megállapítottam, hogy a pusztulás rendkívül gyors ütemben terjed az ültetvényben.

A foltokban történő pusztulás további vizsgálatának érdekében két mintavételi területet jelöltem ki a már elkészült térkép alapján 2016-ban. Egy-egy közepén álló, fitoplazma fertőzés jellegzetes tüneteivel rendelkező fa körül 14-14 teljesen egészséges fáról gyűjtöttem levélmintát. A terjedésről tett megfigyeléseim alapján azt az eredményt vártam, hogy a központi pusztuló fa közvetlen szomszédjában nagyobb eséllyel fogom tudni kimutatni a 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák jelenlétét, mint a pusztuló fától távolabb álló egyedekben. A levélmintákból 16SrX fitoplazma csoportra specifikus primerekkel nested PCR-t készítettem. A fitoplazma tesztet is megismételtam 2017-ben, majd a két év laboratóriumi eredményét összehasonlítottam a mintavételi terület fái tapasztalt vizuális változásokkal a vizsgálat ideje alatt. Annak ellenére, hogy egészségesnek tűntek, mindkét évben igen sok fában jelen volt a fitoplazma. Összesen 30 fát vizsgáltam 2016-ban, a két központi, pusztuló fa mutatott egyedül tünetet, pedig a 28 tünetmentes fa közül 21 fitoplazmával fertőzött volt. 2017-ben a 28 fa közül 7 mutatott tünetet és 20 fában tudtam kimutatni fitoplazma fertőzöttséget.

További megválaszolandó kérdéseket vetett fel, hogy a vizuális felvételezések eredménye nem állt korrelációban a laboratóriumi eredményekkel:

- a fertőzött fák nem minden esetben mutattak tünetet még egy év után sem
- olyan fa is pusztult, amelyben egyik évben sem sikerült kimutatni a kórokozó fitoplazma jelenlétét.
- az első évben fertőzött fából egy év után már nem lehetett kimutatni a kórokozó jelenlétét
- teljesen elpusztult fák tünetmentesen újrahajtottak, pedig fitoplazma fertőzöttségüket nested PCR eljárással igazoltam.

Egy korábbi, 2015-ben végzett fitoplazma vizsgálat laboratóriumi vizsgálati jegyzőkönyve alapján vizuálisan felmértem a teszt tárgyát képező 48 kajszifa állapotát a mintavétel után egy évvel, és nagyon hasonló eredményt kaptam.

A kajsziarackfákat a fitoplazmákon kívül betegíthetik gombák, baktériumok és vírusok is, melyek gyengíthetik a fákat, azok pusztulását okozhatják. Ezért kiterjesztettük vizsgálatainkat a kajszit fertőző vírusok vizsgálatára. Arra szerettünk volna választ kapni, hogy jelen vannak-e ezen vírusok az ültetvény fáiban, és amennyiben igen, jelenlétük magyarázza-e a fitoplazma fertőzés vizsgálata során kapott megválaszolatlan kérdéseket. Levélmintákból RNS-t tisztítottam, cDNS-t szintetizáltam, majd RT-PCR reakcióban teszteltem a Szilvahimlő vírus (Plum Pox Virus, PPV), a Nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (Prunus Necrotic ringspot virus, PNRSV), a Cseresznye aprógyümölcsűség vírus (Little Cherry Virus 1, LChV1), és a Cherry Virus A (CVA) vírusok jelenlétét a két mintavételi terület fáiban. A vizsgált Sherpa kajszifákban PPV, PNRSV és CVA nincs jelen a géleképek alapján, a LChV1 vírus jelenlétének egyértelmű igazolásához további vizsgálatok szükségesek.

Eredményeim azt igazolják, hogy a látszólag tünetmentes egyedek nagy része tartalmazza a 16SrX csoportba tartozó fitoplazmákat, azonban a pusztulásban betöltött szerepe valószínűleg nem kizárólagos a vizsgált ültetvényen belül.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni a témaválasztásban nyújtott segítségét Dr. Nyéki Józsefnek. Állhatatos témavezetői munkáját Dr. Szabó Zoltánnak, Dr. Várallyay Évának és Czotter Nikolettának. Továbbá szeretném megköszönni Baráth Dánielnek, Mikita Tamásnak és Poldán Erzsébetnek, hogy időt és energiát nem kímélve segítették munkámat. Köszönetet szeretnék mondani Dr. 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.

Kutatásomhoz támogatást nyújtott a Béres Alapítvány a Teljes Életért Közhasznú Szervezet.

Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-2 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.
- Atanasoff. D.** (1932) Plum pox. A new virus disease. Yearbook University of Sofia, Faculty of Agriculture and Silviculture (11.) 49- 69 p.
- Balássy J. és Varga T. és Czotter N. és Molnár J. és Kirilla Z. és Tusnádi E. G. és Preininger É. és Várallyay É.** (2016) Csonthéjas gyümölcsfák vírusfertőzöttségének vizsgálata metagenomikai módszerekkel. FIBOK 2016, Gödöllő, 2016. márc. 21-22
- Bozsik A.** (2014) Gondolatok a csonthéjasok fitoplazmás pusztulásáról-rovarász szemmel. - *Agrártudományi Közlemények-Acta Agraria Debreceniensis*.(62.) 30-33 p.
- Czotter N. és Varga T. és Baráth D. és Molnár J. és Balássy J. és Deák T. és Tusnádi G.E. és Kocsis L. és Preininger É. és Burgyán J. és Várallyay É.** (2017) NGS studies on fruit tree screenhouses and stock collections in Hungary. 24th International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Thessaloniki, 2017. jun. 5-9.
- Cochran L. C. és Hutchins L.M.** (1941) A severe ringspot virus on peach. *Phytopatology* (31.) 860 p
- Danet L.J. és Balakishiyeva G. és Cimerman A. és Sauvion N. és Marie-Jeanne V. és Labonne G. és Lavina A. és Batlle A. és Križanek I. és Škoric D. és Ermacora P. és Serce U.C. és Çağlayan K. és Jarausch W. és Fossiac X.** (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.
- Gáborjányi R. és Király Z.** (2007) Molekuláris növénykórtan. Agroinform Kiadó, 25 p.
- Grimová L. és Zouhar M. és Rysanek P. és Drabegova J. és Mazakova J. és Paprgtejn F.** (2010) First occurrence of Cherry virus a (CVA) in the Czech Republic. *Julius Kühn-Archiv* 427, 275-277p.
- Horváth Cs.** (2013) Csonthéjasokat veszélyeztet a fitoplazma. *Kertészet és Szőlészet* (62.) 2. 16-17 p.
- Horváth J. és Gáborjányi R.** (1999) Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek, Mezőgazda Kiadó, 15-25 p.
- Marccone C. és Jarausch B. és 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. és Kiss E. és Süle S.** (2014) A kajszi téli kivirágzása és a fitoplazmafertőzés-Kertészet és Szőlészet (63). 6. 13-14 p.
- Oshima K. és Maejim K. és Namba S.** (2013) Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas- *Frontiers in Microbiology* (4.) 230 1-8 p.
- Pocsai E.** (2016) A csonthéjas gyümölcsfák vírus- és vírusszerű betegségei (1.)-Agrárágazat, (17.) Szőlő és gyümölcsültetvények különszám 72-74 p.
- Pocsai E.** (2017) A csonthéjas gyümölcsfák vírus- és vírusszerű betegségei (2.) Agrárágazat, (18.) 1. 82 p

- Šafářová D. és Faure C. és Candresse T. és Navrátil M. és Marais A.** (2017) First Report of Little cherry virus 1 Infecting Apricot in the Czech Republic
<http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-09-16-1289-PDN> (2017. szept.)
- Salamon P.** (2007) Növényvírusok, viroidok és szatellitek. Agroinform kiadó, 147 p.
- Suigo A. és Hogenhout A.S.** (2012) The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects.-Microbiology (15.) 247-254 p.
- Süle S.** (2011) A sárgabarack betegségei. A sárgabarack. Magyarország kultúrflórája. II. kötet 9. füzet, Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő, 178p.
- Süle S.** (2012) A kajszipusztulás 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.** (2012) Miért pusztulnak a kajszipusztulófák? Agrofórum (23.) 12. 80-82 p.
- Szirmai J.** (1948) A kajszi vírusbetegsége. Magyar Bor és Gyümölcs (3) 7
- Tibenszky E. Kiss E.** (2015) Eltérő virulenciájú fitoplazma törzsek kölcsönhatásának szerepe a keresztvédetség 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.

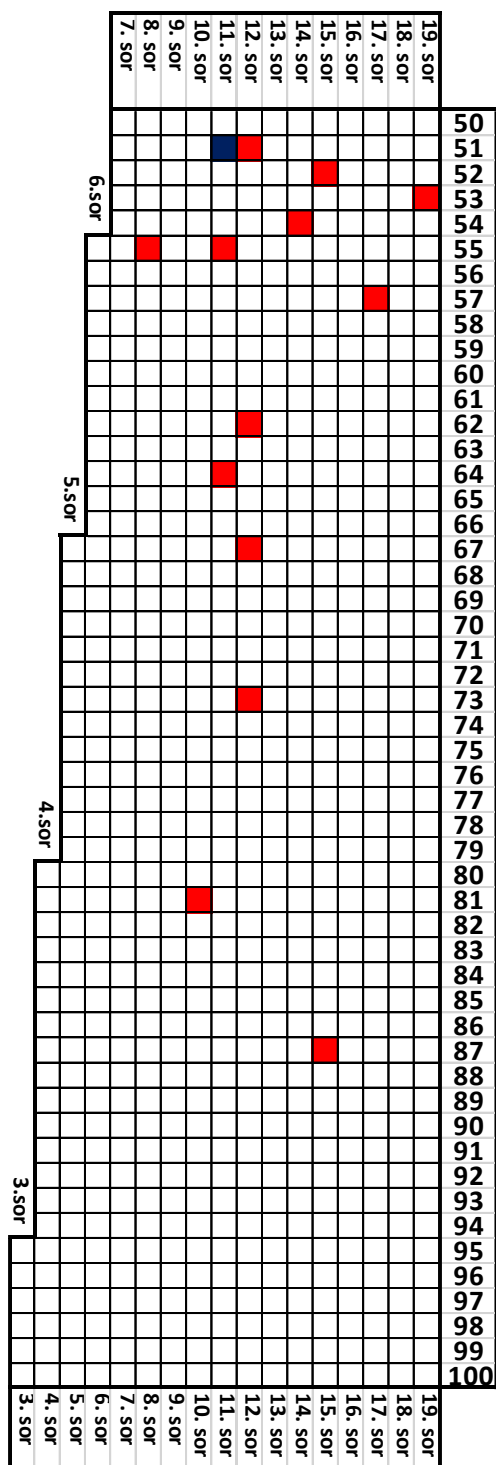
Internetes források:

- http1: CABI: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/34065> (2016 okt.)
- http2: EPPO: https://www.eppo.int/QUARANTINE/EPPO_Pest_Lists_%20introduction.pdf (2017. szept.)
- http3: PLANTWISE: <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=44379> (2017.szept.)
- http4: PLANTWISE: <http://www.plantwise.org/knowledgebank/datasheet.aspx?dsid=16072> (2017.szept.)
- http5: MEPAR: <https://www.mepar.hu/mepar/> (2016 okt.)
- http6: NDP: <http://plantbiosecuritydiagnostics.net.au/resource-hub/priority-pest-diagnostic-resources/> (2016 szept)

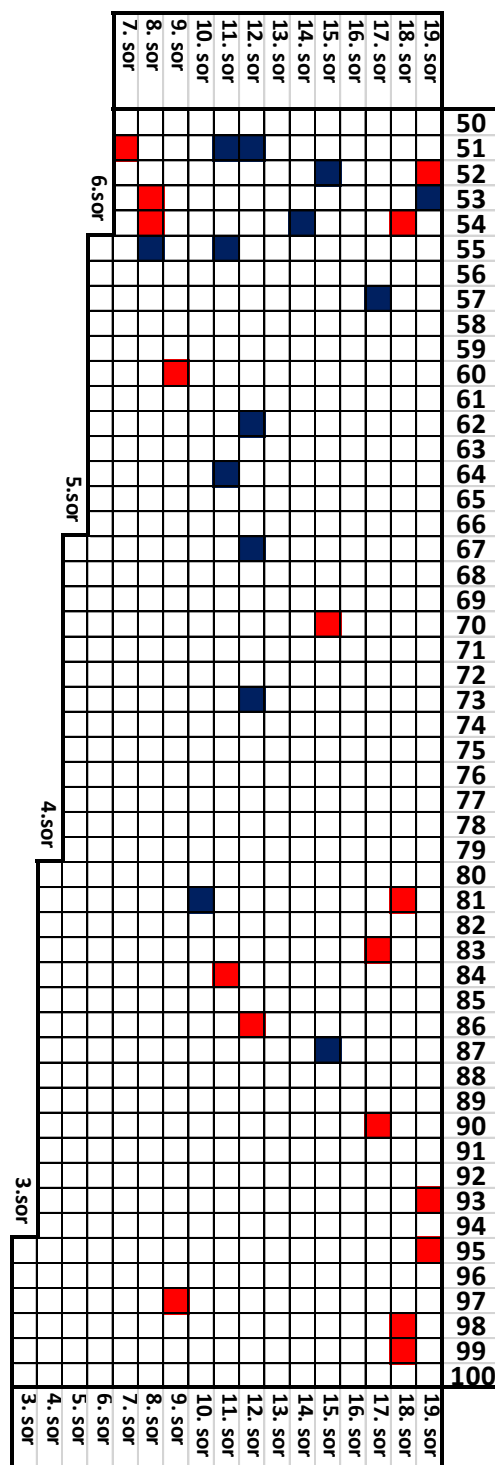
9. MELLÉKLETEK

1. melléklet: A pusztulás pótoló csemeték kora alapján becsült terjedésének mintázata az ültetvényben 2012 és 2017 július között. (Minden négyzet egy-egy fát szimbolizál. A Sherpa ültetvényről készült térkép részlete, Petres Martin)

2012



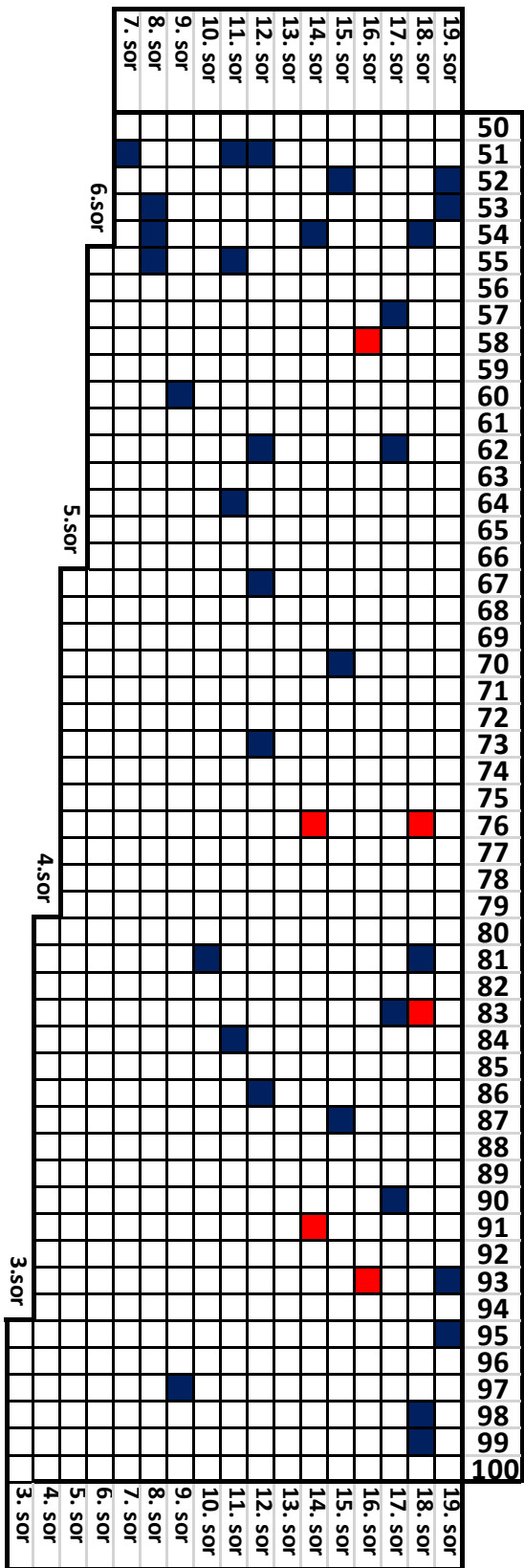
2013



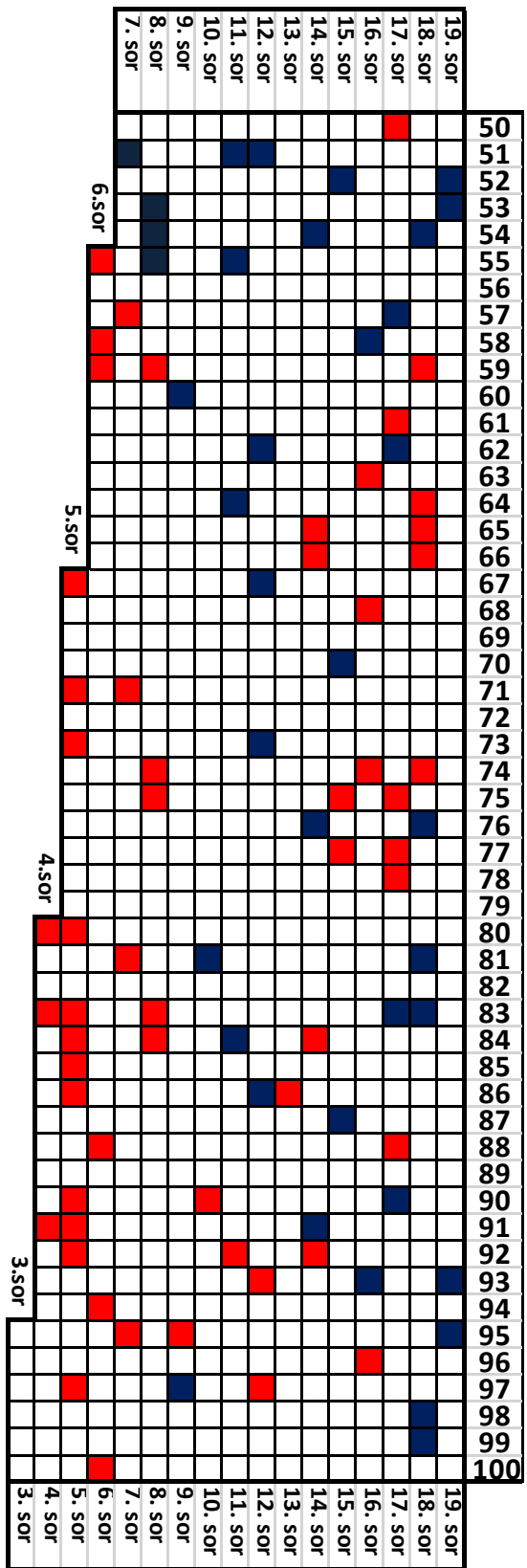
 pusztuló fa

 korábbi években pusztult

2014



2015



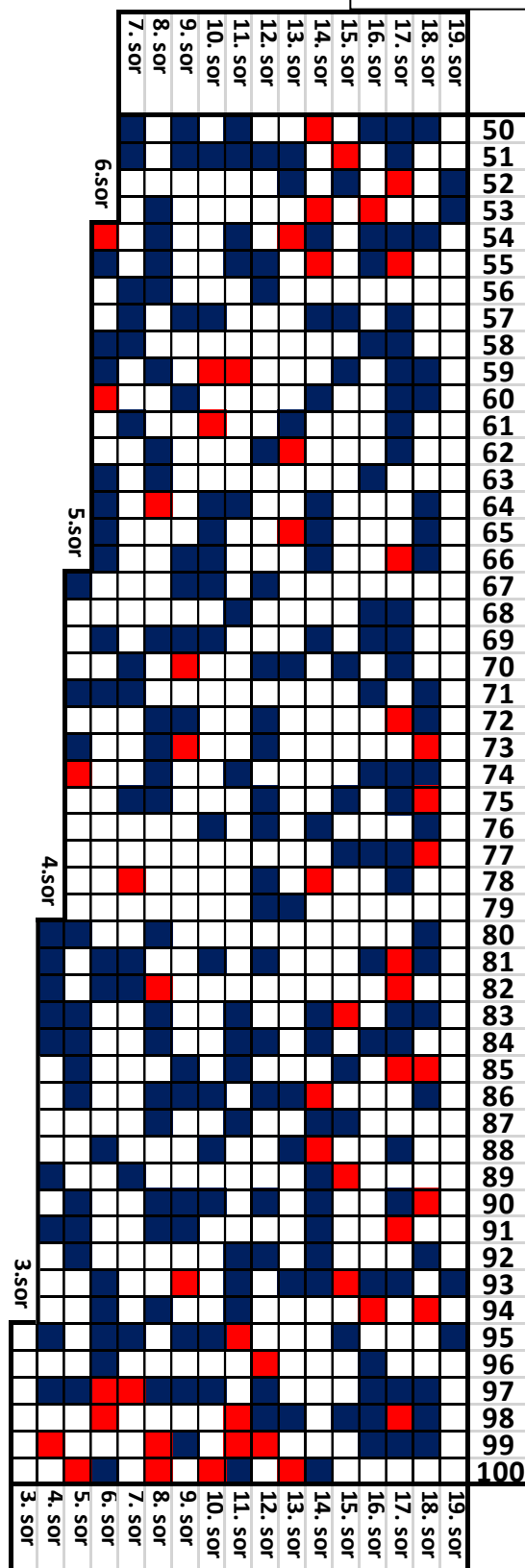
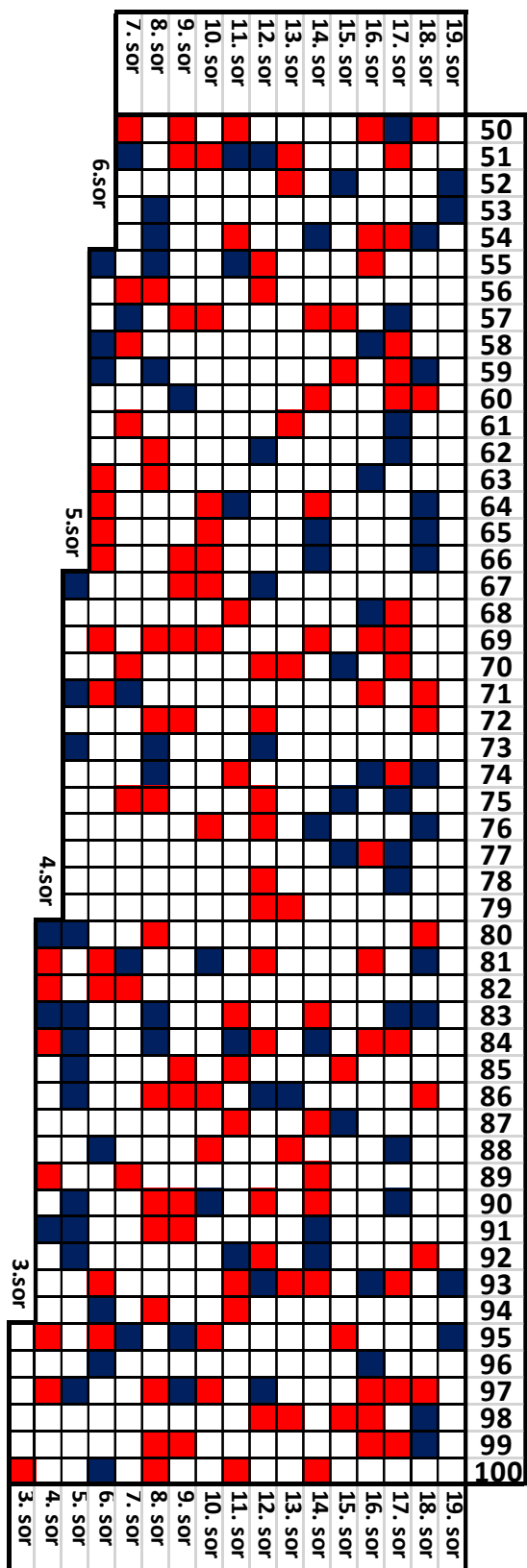
pusztuló fa

korábbi években pusztult

2016

2017

(Júliusi állapot)



 pusztuló fa

 korábbi években pusztult

10.NYILATKOZAT

Alulírott Petrus Martin, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar növényorvos szak nappali/levelező tagozat 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 a digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető tanszéken/intézetben, illetve a kialakításra kerülő Kari központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 2017. év november hó 3. nap

Petrus Martin
hallgató aláírása