



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék

Diplomamunka

Fitoplazma fertőzések vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel

Belső témavezető: Dr. Vértessy Beáta

Tanszékvezető egyetemi tanár

Külső témavezető: Dr. Várallyay Éva

Csoportvezető, tudományos tanácsadó

Konzulens: Nagyné Dr. Galbács Zsuzsanna

Tudományos munkatárs

Készítette: Vajda Zsófia

Budapest, 2020

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Célkitűzés	2
3. Irodalmi áttekintés	3
3.1. Fitoplazmák jellemzői	3
3.1.1. A fitoplazmák által okozott betegségek tünetei	3
3.1.2. A fitoplazmák előfordulása	4
3.1.3. A fitoplazmák terjedése	5
3.1.4. Felépítésük, rendszertani besorolásuk	7
3.1.5. X csoportba tartozó fitoplazmák	9
3.1.5.1. Candidatus- Phytoplasma prunorum	9
3.1.5.2. Candidatus- Phytoplasma mali	11
3.1.5.3. Candidatus- Phytoplasma pyri	12
3.1.6. A fitoplazmák elleni védekezés lehetőségei	13
3.1.7. A fitoplazmák kimutatására alkalmas módszerek	14
4. Anyagok és módszerek	17
4.1. Növényi minták	17
4.2. Alkalmazott módszerek	17
4.2.1. DNS tisztítás	17
4.2.2. DNS koncentráció mérése/meghatározása	18
4.2.3. PCR reakció	19
4.2.4. Nested PCR reakció	20
4.2.5. A PCR reakció eredmények vizsgálata (PCR termékek elválasztása agaróz gélen)	21
4.2.6. PCR termékek tisztítása	21
4.2.7. LAMP teszt	22
5. Eredmények és következtetések	24
5.1. Kajsziarack minták fitoplazma fertőzőtségének vizsgálata	24
5.1.1. Fitoplazma jelenlétének vizsgálata nested PCR reakcióval	26
5.1.2. Fitoplazmák jelenlétének vizsgálata LAMP teszttel	27
5.2. Alma minták fitoplazmafertőzőtségének vizsgálata	29
5.2.1. Fitoplazma jelenlétének vizsgálata nested PCR reakcióval	30
5.2.2. Fitoplazmák jelenlétének vizsgálata LAMP teszttel	31
5.3. Meggy minták fitoplazma fertőzőtségének vizsgálata	32
5.3.1. Fitoplazmák jelenlétének vizsgálata nested PCR reakcióval	32
5.3.2. Tisztított minták szekvenálása	36
6. Összefoglalás, konklúzió	42
7. Köszönetnyilvánítás	44
8. Irodalomjegyzék	45
8.1. Ábrajegyzék	50
8.2. Táblázatjegyzék	51

1. Bevezetés

Napjainkban gyümölcstermő ültetvényeinken a legnagyobb problémát azok a növényeket fertőző kórokozók jelentik, amelyek ellen nincs kidolgozott növényvédelmi technológia. Ilyen növényi kórokozók közé soroljuk a fitoplazmákat is. Magyarországon egyre nagyobb méretet ölt a kajszi pusztulás, amelyet a csonthéjasok európai sárgulás betegségnek (European Stone Fruit Yellows) tulajdonítanak. Az ESFY betegséget okozó fitoplazmát hazánkban 1992-ben azonosították. Gazdanövénye a kajsziarackon kívül a meggy, a cseresznye és a szilva is lehet. Az almafa-seprűsödés fitoplazma (Apple Proliferation) Magyarországon kisebb jelentőségű ugyan, de fennáll a veszély, hogy a jövőben fontos növényegészségügyi problémává válik (vektorok, ellenőrizetlen szaporító anyag). A fitoplazmás megbetegedések nagymértékű minőségi és mennyiségi, ezáltal pedig gazdasági károkat okoznak. A betegség kiemelkedő jelentőségű, mivel a gyümölcsfák életciklusa hosszú, a több éves, termő fák pusztulása súlyos termésvesztést okoz, vagy pedig a fertőzött, de tüneteket nem mutató gyümölcsfákban lappangva akár több évig jelenthetnek fertőzési forrást.

A NAIK Molekuláris Növénykórtan Csoportja termő kajsziarack és almaültetvényeken végez felmérést, mely során pusztulás tüneteit mutató és egészséges fák levélmintáit vizsgálják. Ezeket a növényeket pusztító kórokozók profiljának meghatározásával szeretnék megválaszolni azt a kérdést, hogy a fitoplazmák, ismert és újonnan leírt vírusok vagy ezek kombinációja, ami egy fa és így végül az ültetvény pusztulásához vezet. A vizsgálandó fák levélmintáit felhasználva kis RNS-ek nagy áteresztőképességű szekvenálásával diagnosztizálták a bennük megtalálható vírusokat. A csoport 2019-ben a NAIK Gyümölcs- és Dísnövénykutató intézetének génbankjában cseresznye és meggy fajták vírusdiagnosztikai felmérését is elvégezte. Ennek során az Újfehértói fürtös fajtán fitoplazma-szerű tüneteket figyeltek meg. Ebbe a kutatásba bekapcsolódva vizsgálataim során kajsziarack-, alma- és meggyfák leveleiből tisztítottam DNS-t hogy ezeket felhasználva molekuláris biológiai tesztekkel azonosítsam, a bennük esetlegesen megtalálható fitoplazmákat.

2. Célkitűzés

- Egészséges és tüneteket mutató, pusztuló kajszibarack- és almafákban esetlegesen jelenlévő fitoplazmák vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel.
- Az Érd Elviramajor génbankjában található Újfehértói fürtös fajtájú meggy egyedek vizsgálata fitoplazmák jelenlétére.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Fitoplazmák jellemzői

3.1.1. *A fitoplazmák által okozott betegségek tünetei*

A fitoplazmák önmagukban életképtelen paraziták, melyek a növényekből és rovarvektorokból nyerik fennmaradásukhoz szükséges táplálékukat (CONTALDO, et al., 2012). A növény háncsszöveteiben telepednek meg, így a rostasejtek pórusain keresztül az egész növényben szétterjednek, és ez okozza a látható vagy láthatatlan tüneteket. Az élősködő felborítja a gazdatest teljes anyagcseréjét, aminek következtében elpusztulnak a háncsszöveti edénynyalábok, amely a gazdanövény pusztulásához vezet (Süle, 2014).

A fitoplazma fertőzés által okozott tünet a Phyllody (ellevelesedés), azaz a virágok helyén levélszerű képletek jelennek meg, vagy a szükséges pigmentek hiányában zöld virágok képződnek, melyek sterilek (Lee, 2000).

A másik nagyon szembevető tünet a levelek sárgulása, amit okozhat a klorofil és karotinoidok együttes lebontása a bioszintézis gátlásával. Nemcsak a leveleken figyelhető meg a színváltozás, hanem a háncon is, ami kezdetben narancssárga később világosbarna színt vesz fel. A fagyok gyorsítják a hancs károsodását, így kihajtás után nagyvalószínűséggel kihal a fa.

Sok fertőzött növény levele bokros vagy boszorkányseprű megjelenést kölcsönöz, ugyanis a normál növekedési szokások megváltoznak.

Az sem mindegy, hogy a fa milyen idős korban kapja el a fitoplazma fertőzést. Fiatal korban (6-8 évesen) a legkockázatosabb, ugyanis akkor gutaütés szerű tünetekkel gyorsan elpusztulnak. Idősebb korban csak egy-egy ág fertőződik és hal el.

Vannak olyan esetek is, amikor a tünetek nem szembeötlők, amikor a fák gyors növekedési ütemben vannak.



1. ábra: Fitoplazma által okozott tünetek:
 A: Meggyfa sárguló levelei
 B: Meggyfa levelei a színük felé kanalasodnak
 C: Meggyfa levelei barnás elszíneződései
 D: Meggyfa részleges elhalása
 (Fotó: Baráth Dániel)

3.1.2. A fitoplazmák előfordulása

A fitoplazmák jelenlétével járó súlyos betegségjárványokat világszerte leírtak. Számos termesztett növény fitoplazma fertőzésnek van kitéve, mind azokban az országokban, ahol a mezőgazdaság nem fejlett és azokban az országokban is, ahol a mezőgazdaság erősen iparosodott. Növényfajok közül leírtak élelmiszer-, zöldség- és gyümölcsnövények, dísznövények, épületfák/fűrészárunak való fák esetében fertőzéseket (Bertaccini, 2007).

A stolbur (aster yellows) fitoplazma Észak-Amerikában és Európában jelentős gazdasági veszteségeket okoz zöldségfélék (saláta, sárgarépa, zeller) esetében és dísznövények körében (kardvirág, hortenzia, lila karikavirág). A 16 SrI csoporthoz tartozik a 16SrI-Q alcsoport tagjai is, mely fás szárú növényeket is fertőz, többek között őszibarackon („red leaf”) és cseresznyefákon írták le a betegséget (Lee, et al., 2004).

A rizs sárgásodás (rice yellow dwarf, 'Ca. P. oryzae',) több helyen súlyos károkat okoz a rizs növényeken a délkelet-ázsiai régióban.

Az édes burgonya boszorkány seprűsödése (Sweet potato little leaf) Közép- és Dél-Amerikában okoz nagy gondokat.

A szőlő sárgulás (grapevine yellows) súlyosan érinti a szőlőtermelést Európában és Ausztráliában is (Bertaccini & Duduk, 2009)

Hüvelyeseket is támadó fitoplazma (Peanut witches' broom) elterjedése a szezám és a szójaféléket károsítja Ázsiában.

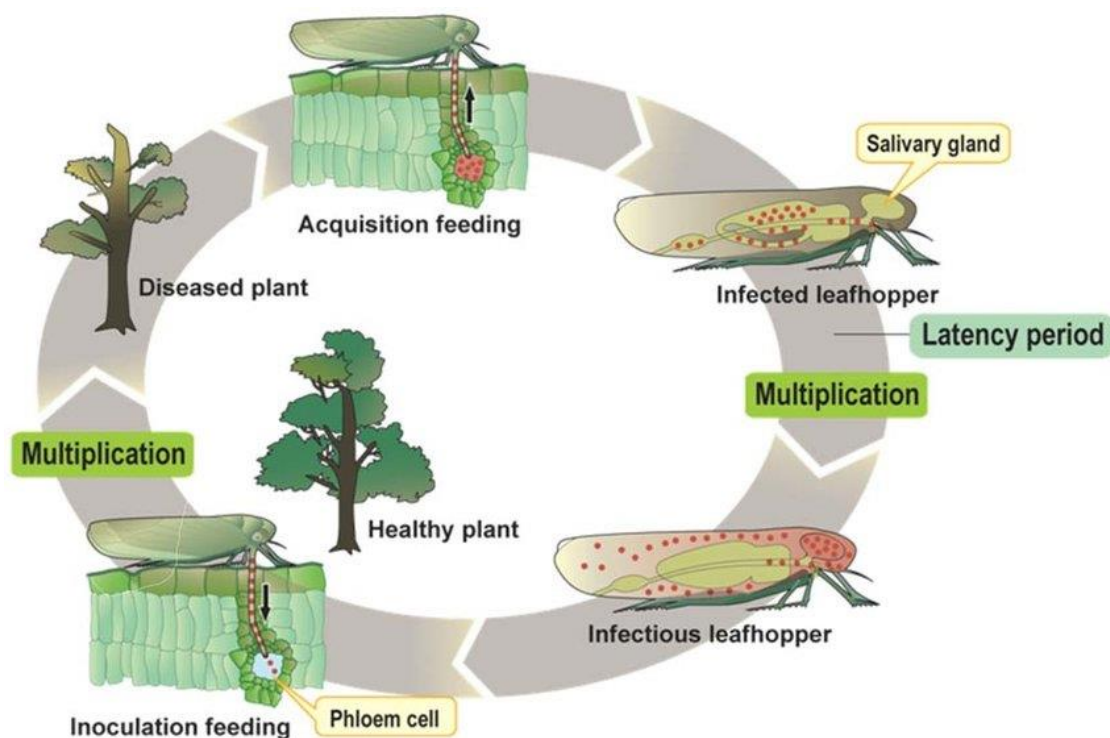
Az erdőket is súlyosan érintik a fitoplazmák által terjesztett betegségek. Példa erre a paulownia boszorkány seprűsödés (Paulownia witches' broom) kókuszdió halálos sárgulása (Coconut lethal yellowing) és az eperfákat sújtó törpeség (mulberry dwarf), amelyek több kontinensen elpusztítják az erdei fákat.

A körte, az alma és más csonthéjas gyümölcsökből csökkent a termés és romlott a friss gyümölcs minősége Európában az ESFY (European stone fruit yellows) fitoplazma miatt. Az X csoport betegségei (peach yellows) az 1990-es évek során súlyos veszteségeket okoztak az Egyesült Államokban az őszibarack - és cseresznyeültetvényeket érintő pusztulás miatt. A Közel-Kelet több régiójában citrusféléket is érintette a betegség Omán szultánságában és Iránban.

3.1.3. A fitoplazmák terjedése

A fitoplazmákat természetes úton a rovarok terjesztik, amelyek a következő családokba tartoznak: Cicadellidae, Cixidae, Psyllidae, Delphacidae és Derbidae (Weintraub & Beanland, 2006). A terjedés egyéb útjai: oltás, szemzés és fertőzött szaporítóanyag által történhet. Az ESFY terjesztéséért Magyarországon először a kabócák jöttek szóba, mint elsődleges fitoplazma vektorok, de vizsgálatok alapján kiderült, hogy nagyon kicsi a hordozók aránya (Carraro, et al., 2001). Később viszont beteg növényekről gyűjtött szilva levélbolháról (*Cacopsylla pruni*) egyértelműen kimutatták, hogy hordozói az ESFY betegséget okozó fitoplazmának (*Candidatus Phytoplasma prunorum*).

A levéltetvek a szipókájukkal táplálkoznak a növény floémjéből, így kerül a fitoplazma a rovarba. Az állatban 2-4 nap alatt megtelepszik a kórokozó, de 2-3 hét után mutatható ki, az eddigi mesterséges fertőzések után. Miután biztosan az állatban van a patogén 1-2 nap is elég a további növények megfertőzéséhez. Ezt az életciklust mutatja a 2. ábra. A levélbolhában élete végéig benne marad a fertőzés, és kimutatták, hogy képes áttelelni benne (Kiss, et al., 2015), (Davis & Sinclair, 1998), (Tedeschi, et al., 2003).



2. ábra: Levélbolhák életciklusa (<http1>)

Egy nemzedékes, imágója áttelel fenyőféléken, majd tavasszal visszarepül csonthéjas növények fáira és a fitoplazma utána is kimutatható a rovar szervezetében. Sikeresen kimutatták már a fertőzött levélbolha által lerakott petékben is a fitoplazmát, ami igazolja az ivarsejten keresztüli átvitelének lehetőségét.

A levélbolha hazánkban jelen van Budapest környékén, Borsod-Abaúj-Zemplén megyében és Vas megyében is (Kövics & Tarcali, 2015).

A rovarokon kívül említést kell tennünk az élősködő növényekről, melyekkel szintén terjed a fitoplazma fertőzés. Hazánkban az aranka félék (*Cuscuta*) emelkednek ki a betegség növényről-növényekre való terjesztésében, de az általam vizsgált, fásszárúakon előforduló fitoplazmák esetében ez nem fordul elő a természetben. Ezek a növények hausztóriumaiakkal képesek a gazdanövény szállítónyalábjaihoz közvetlenül kapcsolódni és hidat képezni a floémek között, ezzel szabad utat adva a fitoplazmák áramlásának szervezetről-szervezetre. Laboratóriumi vizsgálatok során sokszor kihasználják az arankák tulajdonságát, hogy hetek alatt képesek átvinni a kórokozót egymással nem rokonságban lévő szervezetek között is.



3. ábra: Aranka (*Cuscuta*) (<http2>)

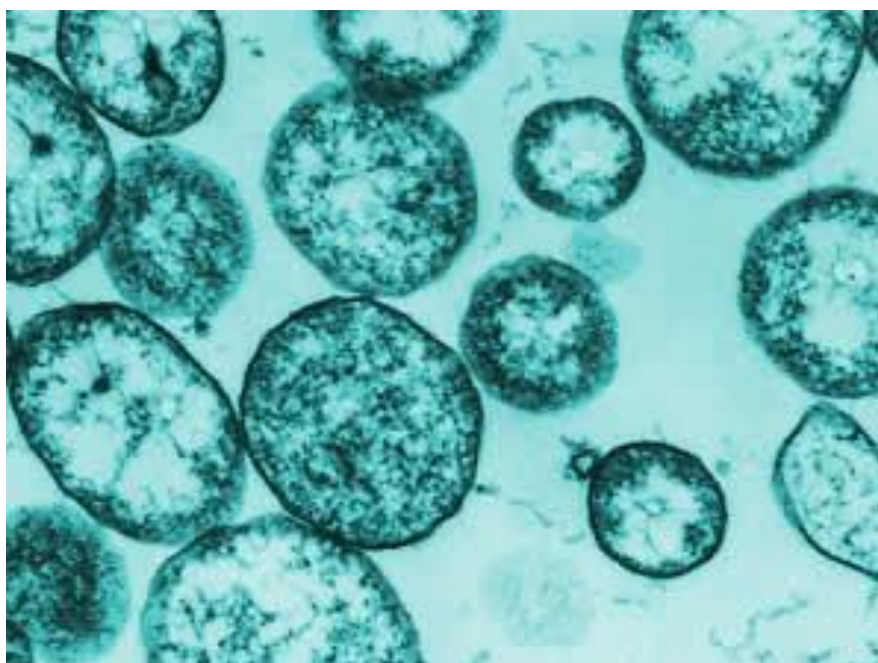
3.1.4. *Felépítésük, rendszertani besorolásuk*

A fitoplazmák egysejtű, sejtfal nélküli, pleomorf, azaz állandó alak nélküli növény paraziták. Mai ismeretünk szerint a legkisebb növény patogének, 60-110 nm nagyságúak. Sejtfaluk helyett 3 rétegű membrán borítja sejtjeiket. Különlegességük abban is megnyilvánul, hogy képesek növényi háncsszövetekben és rovarok haemolimfájában is szaporodni (Suigo & Hogenhout, 2012). Obligált biotrófok, tehát mesterséges táptalajon nem tenyészthetők.

A fitoplazmákról szóló legfrissebb adatok jelentős betekintést nyújtottak molekuláris és genetikai sokféleségükbe.

Rendszertani besorolása még a mai napig sem teljesen tisztázott, ugyanis sok jellemzőjük a baktériumokéhoz hasonlít, de vannak tulajdonságok, amik eltérnek ezektől. A fitoplazmákat 60 évvel ezelőttig vírusként tartották számon.

Nagy áttörést a témában Doi és munkatársai 1967-ben értek el, amikor is a beteg növények szöveteiben (floém) fedezték fel a mikoplazma szerű egysejtű élőlényeket (Doi, et al., 1967). 90-es évek folyamán immun- és genetikai vizsgálatok alapján megállapították, hogy a kártevők a Mollicutes osztályba tartoznak, és rokonai az Acheloplasma-k, így 1993-ban ez a különálló csoport a fitoplazma nevet kapta (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group, 2004) (Gundersen, et al., 1994). A nevük elé kerül a „Candidatus” (jelölt) szó, ami arra utal, hogy mivel a gazdaszervezetből nem izolálhatóak, tiszta tenyészetek belőlük nem készíthetőek, nem tisztázott teljes mértékben a származásuk, ezért fajok megkülönböztetése sem egyértelmű (Tibenszky KISS, 2015), (Marcone & Gáborjányi, 1999). Minden olyan prokarióta melynek genomja ismert, de nem tesz eleget a Koch-féle alapfeltételeknek pl. nem tenyészthetőek mesterséges táptalajon, azok nevébe belekerül a Candidatus előtag.



4. ábra: Fitoplazma mikroszkópikus képe (<http3>)

A szekvenciák analízise alapján 14 csoportot és 32 alcsoportot különböztetnek meg. A csoportosítást a különböző fitoplazmák 16S rDNS összehasonlításával végezte több kutatócsoport is. A közös munka eredményeképpen körülbelül 30 szinte teljes hosszúságú 16S rDNS szekvencia bázissorendjét állapították meg (Namba, et al., 1993); (Gundersen, et al., 1994) (Kirkpatrick, 1992), (Seemüller, et al., 1994).

Jelenleg a következő rendszertan szerint sorolják be például a *Candidatus Phytoplasma prunorum* kórokozót (ld 3.1.5.1.):

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

A kajszibarack- és almafák fitoplazmás megbetegedését elsősorban a 16 SrX Almafa boszorkányseprűsödése csoport tagjai okozzák. E csoport képviselői (Lee, et al., 1998):

- *Candidatus Phytoplasma mali*, AP (apple proliferation, almafa boszorkányseprűsödés)
- *Candidatus Phytoplasma pyri*, PD (pear decline/Italy, körte leromlás)
- *Candidatus Phytoplasma prunorum*, ESFY (European stone fruit yellows, csonthéjasok európai sárgulása)

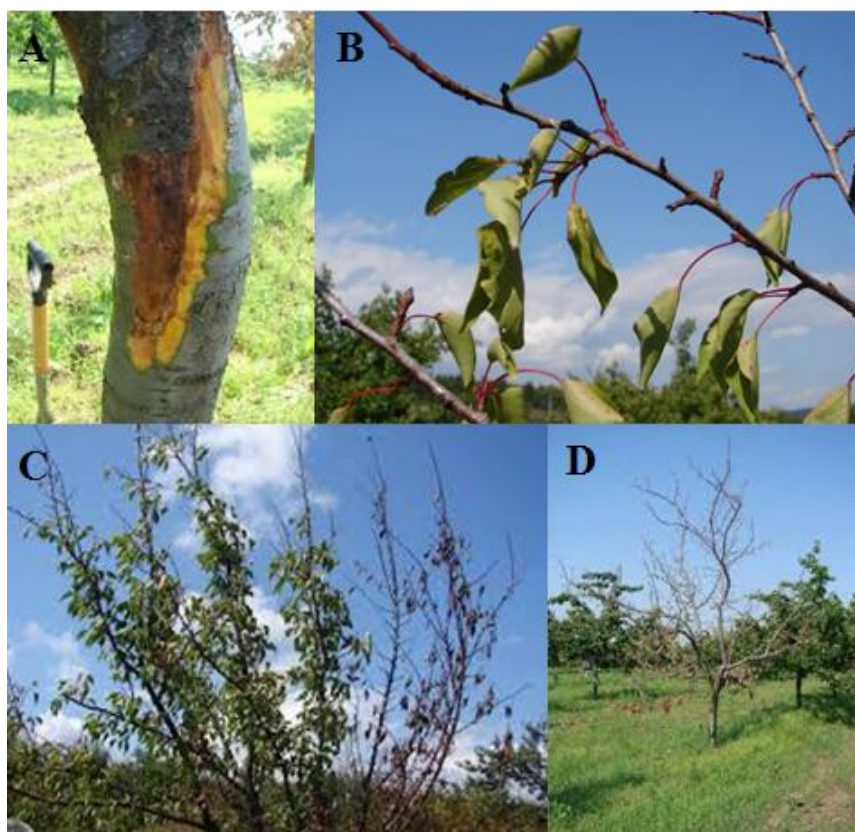
3.1.5. X csoportba tartozó fitoplazmák

3.1.5.1. *Candidatus*- Phytoplasma prunorum

Magyarországon is jelentős károkat okozó fitoplazma a *Candidatus*- Phytoplasma prunorum, ami a csonthéjasok európai sárgulása (European Stone Fruit Yellows, ESFY) nevű betegséget okozza. Napjainkra már valószínűsíthetően Európa minden területén jelen van, illetve Európán kívül eső mediterrán térségekben is, ahol csonthéjasokat termesztnek (Seemüller & Foster, 1995), (Jarausch, et al., 2000), (Danet, et al., 2007). Európában először Franciaországban 1924-ben számoltak be először komolyabb kajszi pusztulásról (Chabrolin, 1924). Morvan és munkatársai 1973-ban elektronmikroszkóp segítségével a mikoplazmákhoz hasonló szervezeteket fedezett fel a gyümölcsfák

floémjában. Morvanék felfedezése előtt gomba, illetve baktérium fertőzésnek tudták be a kajszi pusztulást (Klement, 1977), de a molekuláris diagnosztikai módszerek elterjedésével bizonyították, hogy a betegség mögött a fitoplazmák állnak (Süle, 2012a). A *Candidatus- Phytoplasma prunorum* gazdanövénye a kajszin kívül, a cseresznye, meggy, szilva és őszibarack is (Horváth, 2013). Hazánkban a kajszibarack legfőbb kórokozójaként tartják számon. Sok gondot okoz: Budapest környékén, Pest, Fejér, Somogy, Bács-Kiskun és Borsod-Abaúj-Zemplén megyében.

Tünetei közül a legszembetűnőbbek: a virágok torzulnak, 5 szíromlevél helyett 6-8 is megjelenhet, a fiatal levelek kúpszerűen felfelé kanalasodnak, egyes ágak vagy az egész fa lombozata sárgulni kezd, vagy ha nem, akkor a levelek vesznek fel haragoszöld színt, és törékenyek lesznek. A háncsszövet is színt vált, narancssárga és barnás elszíneződés figyelhető meg (5. ábra). Amikor a háncsszövet teljesen elhalt, a fa hirtelen gutaütésszerűen elpusztul.



5. ábra: *Candidatus Phytoplasma prunorum* fitoplazma által okozott tünetek:

- A: Kajszi háncs narancssárga-barna elszíneződése
- B: A beteg kajszi sárguló levelei, a színük felé kanalasodnak
- C: Kajszi fa részleges ágelhalása
- D: A teljes fapusztulás

A fitoplazma ősszel a fa gyökereibe húzódik és ott képes áttelelni (Marcone, et al., 2010). A kórokozó fő vektora a szilvalevélbolha/ *Cacopsylla pruni* Scopoli (Carraro, et al., 1998) (Jarausch, et al., 1999) (Carraro, et al., 2001) (Weintraub & Beanland, 2006) (Fialová, et al., 2007).

A 16S rRNS gén vizsgálata alapján a bizonyították, hogy a *Candidatus*- Phytoplasma prunorum a 16SrX csoportba tartozik (Schneider & Seemüller, 1994b) (Seemüller, et al., 1994) (Seemüller, et al., 1998) (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group, 2004).

3.1.5.2. *Candidatus*- Phytoplasma mali

A hazánkat is érintő illetve Nyugat-Európában almafákon az egyik legjelentősebb gazdasági károkat okozó fitoplazmás fertőzésért felelős kártevő a *Candidatus*-Phytoplasma mali. Először Észak-Olaszországban izolálták a kórokozót (Rui, et al., 1950), de napjainkra már a kontinensünk összes országában megtalálható. Az említett fitoplazma által terjesztett betegség az alma boszorkányseprűsödése fitoplazma (Apple proliferation, AP), melynek fő tünetei megfigyelhetők az almafa hajtásain, levelein, termésein, valamint a gyökerein is.

Az AP terjedéséért a levélbolhák tehetők felelőssé, melyek a növény floémnedvével táplálkoznak. A két levélbolha, amely összefüggésbe hozható az almafákat pusztító fitoplazmával az a nyári almafalevélbolha (*Cacopsylla picta* Forster) és a galagonyalevélbolha (*Cacopsylla melanoneura* Forster) (Jarausch, et al., 2003). A két állat, életmódjában és elterjedésében, nem nagyon különbözik egymástól, így a legtöbb AP által erősen fertőzött területen mindkét levélbolha megtalálható (Carraro, et al., 2001) (Jarausch, et al., 2003) (Mattedi, et al., 2007).

Látható tünetetek, ahogy az 6. ábra is mutatja: levélpirosodás, „boszorkányseprűhöz” hasonló elváltozások, a gyengébb hajtásokon levélrozetták és a fák legtöbb levelén megnagyobbodott, sűrűn fogazott pálhalevelek jelennek meg (Seemüller, 1990) (Bertaccini, 2007) (Seemüller, et al., 2010). Európa különböző országaiból származó *Candidatus- Phytoplasma mali* izolátumok a 16S rRNS-t kódoló szakasz 99,9 és 100%-ban megegyezett egymással (Seemüller & Schneider, 2004).



6. ábra: *Candidatus Phytoplasma* legjellemzőbb tünetei:

A: Alma „boszorkányseprűsödés”, kisebb gyümölcs

B: Kanalasodó levelek

C: Pállhalevelek

D: Kontrollálatlan virágzás

(Fotó: Molekuláris Növénykórtan csoport)

3.1.5.3. *Candidatus- Phytoplasma pyri*

Harmadikként említendő X csoportba tartozó fitoplazma a *Candidatus- Phytoplasma pyri*, mely a körte leromlás (Pear Disease, PD) betegségért felelős. Ez a betegség Észak-Amerikában a legjelentősebb, de világszerte előfordul, így Európában is, ahol nemes körtét (*Pyrus communis* L.) természetnek (Seemüller, et al., 1992).

Tünetei hasonlóak a többi fitoplazma fertőzéshez: hirtelen pusztulás, levelek vörösre színeződése, és hullámosodása. A tünetek először ősszel figyelhetők meg, amikor vörösre színeződnek az átlagnál kisebb levelek, és a megszokottnál hamarabb hullnak le (Del Serrone, et al., 1998). Előfordul, hogy a szezonján kívül is virágzik, és termést hoz a

fa, illetve alkalmanként boszorkányseprűsödés is megfigyelhető (Osler & Loi, 1986) (Osler, et al., 1996). Több megfigyelés azt igazolja, hogy az említett fitoplazma az összes *Pyrus* nemzetségbe tartozó fajt képes megfertőzni.

A PD terjedéséért a levélbolhák a felelősök (Jensen, et al., 1964) (Carraro, et al., 1998) (Frisinghelli, et al., 2000) (Tedeschi, et al., 2002). Európában három levélbolha található meg a körtén: *Cacospylla pyri*, *pyricola* és a *pyrisuga*. Az említett állatok a körtefán, vagy a környező növényeken telelnek át (Blomquist & Kirkpatrick, 1218-1226) (Carraro, et al., 2001).

3.1.6. A fitoplazmák elleni védekezés lehetőségei

Legjobb védekezés itt is, mint a legtöbb fertőzés esetében, a megelőzés. Többek között azért is, mert a fitoplazma fertőzött növények 60-80 %-ban elpusztulnak, és a kezelésükre nincs kidolgozott technológia.

A megelőzés szempontjából a legfontosabb kritérium az egészséges szaporítóanyag. Szaporítás esetén az anyafát érdemes megvizsgálni, hiszen sok esetben vizuálisan tünetmentesnek tűnő növényben is ott lehet a kórokozó.

A kórokozó elsődleges vektora a levélbolha, így kiemelten fontos lenne a rovar elleni védekezés (Carraro, et al., 2001) (Fialová, et al., 2007) (Tedeschi & Alma, 2006) (Torres, et al., 2004). A célzott védekezéshez, ismernünk kell a rovar minden tulajdonságát, ami a vektor terjesztésével kapcsolatos például egyedszám, fejlődési időpontok, vándorlási irány (Bozsik, 2017). A termőhely kiválasztása is egy jó szempont a védekezés terén. Célszerű olyan helyszínt kiválasztani, ahol a *Cacopsylla pruni* gazdanövényei (főleg fenyőfélék és kökényfélék) nincsenek az ültetvény közelében. A levélbolha ellen javasolt lehet méhkímélő inszekticidekkel való védekezés. A beavatkozást már tavasszal meg kell kezdeni az imágók ellen, illetve a peterakáskor, meggátolva ezzel az elszaporodásukat (Marccone, et al., 2010).

Érdemes továbbá az ültetvényből eltávolítani a fitoplazma fertőzött fákat, lehetőség szerint gyökerestül és megsemmisíteni, hogy ne terjesszék tovább a betegséget.

A vektorokat figyelembe véve nem csak a rovarok ellen kell védekezni, hanem a vad *Prunus* fajok ellen is, így ezeket is érdemes kiirtani az ültetvények körül (Marccone, et al., 2010).

Ugyan folynak kísérletek rezisztens fajták előállítására, illetve avirulens vagy gyenge fertőzőképességű fajok felhasználásával a fák ellenálló képességének növelésére, de ezek

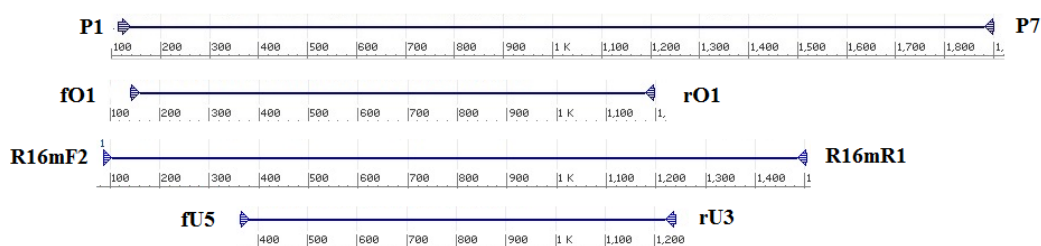
a próbálkozások még nem bizonyultak sikeresnek (Audergon, 1997) (Süle, 2014) (Morvan, et al., 1986) (Marcone, et al., 2010).

3.1.7. *A fitoplazmák kimutatására alkalmas módszerek*

A fitoplazmákat kezdetben nehéz volt felismerni, mert alacsony koncentrációban vannak jelen eltérő eloszlásban a fertőzött növények szitacsőveiben (Berges, et al., 2000). Ezért először elektronmikroszkópos vizsgálattal és különböző festési módokkal próbálkoztak, de nehéz a morfológiai megkülönböztetésük, és nagyon körülményes volt a megfelelő metszet készítése.

Próbálkoztak fitoplazma specifikus antigének fejlesztésével is, szerológiai kimutatáshoz, de ezek sem bizonyultak könnyen alkalmazhatónak, hiszen ehhez „tisztá” fitoplazma fehérjét kell tisztítani, vagy termeltetni.

Napjainkban a fitoplazmák kimutatására alkalmazott módszerek a polimeráz láncreakción (PCR) alapulnak, amelyekkel pontosan megállapíthatjuk a fitoplazma jelenlétét az adott növényben (Virányi, 2010). Az elmúlt több mint 20 évben kifejlesztett technikák, melyek univerzális primerek használatát követelik meg alkalmasnak bizonyultak mind növényekből, mind állati vektorokból való kimutatásra. Léteznek azonban csoport specifikus primerek is, melyek adott fitoplazma csoportba tartozó fajokat amplifikálják (Lee, et al., 1992) (Ahrens & Seemüller, 1992). A 7. ábra mutatja az általam is használt oligonukleotid primereket.



7. ábra: A fitoplazma 16rRNS operonjának grafikus ábrázolása, a PCR kimutatáshoz használt oligonukleotid primerek feltüntetésével

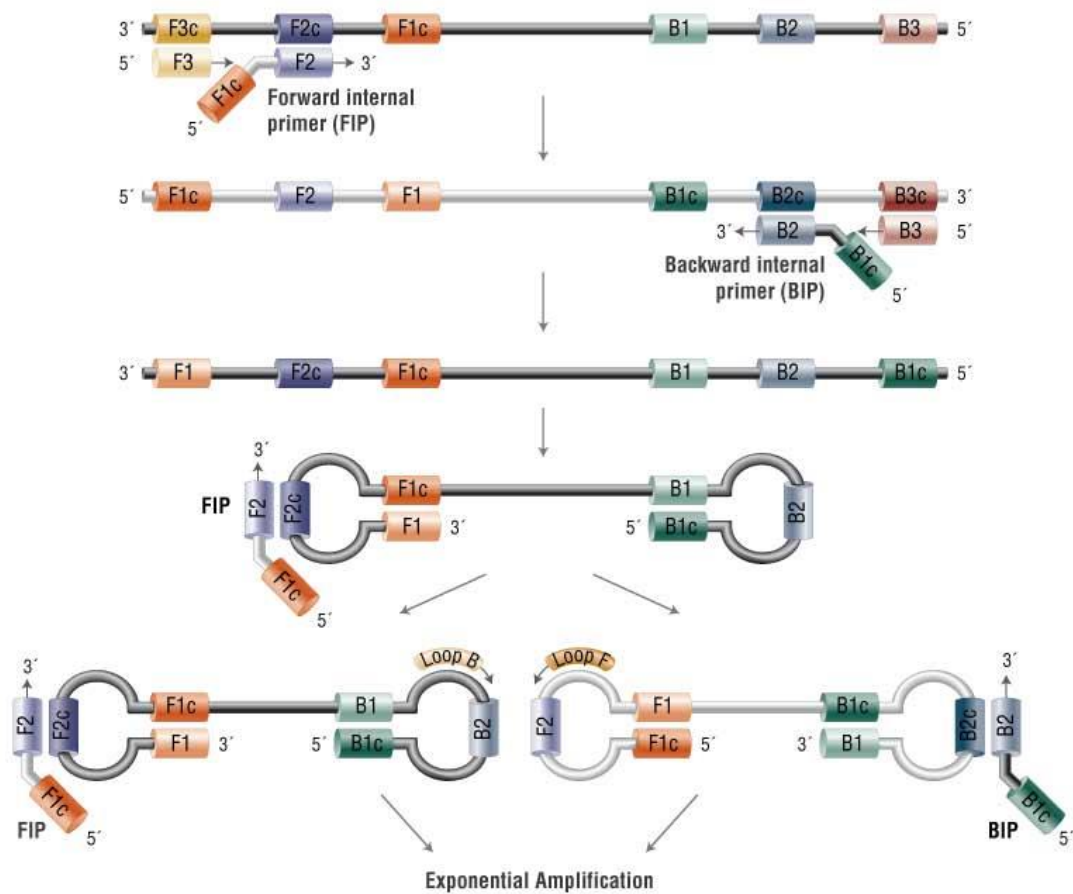
A fitoplazma kimutatás érzékenységét azzal tudjuk fokozni, ha az univerzális primerekkel végzett PCR reakció után, a termékként kapott DNS-t templatként felhasználva egy újabb PCR reakciónak vetjük alá, amit akár általános, akár csoport specifikus primerekkel hajtunk végre. Ezt a folyamatot nested PCR-nek nevezzük. A két egymás után elvégzett

PCR reakcióval ki lehet különböztetni az aspecifikus amplifikációkat és mivel két egymást követő sokszorozási reakciót használunk, a kimutatás érzékenysége is megnő.

A fitoplazma kimutatásokra alkalmas az ún. „loop-mediated isothermal amplification”/hurokközvetített izotermikus amplifikáció (LAMP) is. Ez a módszer egyszerű, gyors, nagyfokú specificitást mutató, költséghatékony, DNS-felsokszorozó technika. A reakció során egy lépésben történik a gén amplifikálása, és a kimutatás, így az egész folyamat maximum egy óráig tart. A LAMP izotermikus nukleinsav amplifikáló módszer, azaz a tesztben működő enzim egy adott hőmérsékleten működik, így nem igényel PCR gépet. A tesztben használt DNS-hez kötődő festékektől függően fotometriás, fluorometriás módszerrel, de akár szabad szemmel is követhető a folyamat, így a reakció végén nincs szükség a termék gélelektroforézissel történő elválasztására.

A LAMP módszert főleg kvalitatív kimutatásra használjuk, azaz arra, hogy megtudjuk, hogy a keresett fitoplazma jelen van-e vagy nincs a mintánkban. Ha azonban a fluoreszcens festék által adott jel megjelenését folyamatosan nyomon követjük, a jel megjelenésének idejét figyelembe véve a módszer kvantitatívvá tehető.

A LAMP teszt elve azon alapszik, hogy a DNS-ről történő amplifikáció során olyan primereket használunk, melyek a DNS-hez hurkokat alkotva tudnak kötődni. 2 primer párt használunk, egy külső (external) és egy belső (internal) párt, és egy olyan DNS polimerázt, ami szál helyettesítő aktivitással bír. A belső primerek ellenkező orientációban kötődnek a DNS szálra egymástól bizonyos távolságra, így az átíródó termékek komplementere az eredetinek, tehát tartalmazzák a hurok régiót is. A külső primer pár által indított szintézis szorítja ki a szintetizált DNS-t a reakció elején, de később erre már nincs szükség. A folyamathoz olyan DNS polimerázra van szükség, mely az eredeti DNS szál lebontása közben új DNS szálakat szintetizál, ezzel lecserélve a régit.



8. ábra: LAMP vázlatos folyamatábrája (<http5>)

4. Anyagok és módszerek

4.1. Növényi minták

A mintagyűjtés során olyan fák leveleiből vettünk mintát, amelyek fitoplazma gyanúsak voltak. A minta gyűjtés során fontos volt, hogy minden égtáj felől szedjünk mintát. A kajszibarackfák és az almafák esetén a mintavételezés 3 egészséges és 3 pusztuló fáról történt, azon belül is fánként 3 ágról.

A kísérletek elvégzéséhez szükséges Reglindis és Remo almafa levélmintákat 2017.05.04-én Olcsvaapátiban gyűjtötték témavezetőim.

A Pinkcot kajszibarackfa levél Somogytúrról származik, és gyűjtése 2018.10.15-én történt.

Ezen kívül Újfehértói fürtös meggy génbankban található egyedeit teszteltem. Ez esetben a levélminták gyűjtésére Érden került sor 2019. májusában és októberében.

A mintavételt követően a növényi mintákat -70 °C-on tároltuk.

4.2. Alkalmazott módszerek

4.2.1. DNS tisztítás

1. A levél-mintákból a MACHEREY-NAGEL NucleoSpin® Plant II kittet használva DNS-t izoláltam, a gyártó utasításai szerint.
2. A mintákat dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel összetörtem és 400 µl PL1 pufferral homogenizáltam.
3. A kapott elegyet egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe vittem át és 10 µl RNáz A enzimmel inkubáltam 65 °C-on 10 percig.
4. A lizátumterméket NucleoSpin Filter (ibolya gyűrű) oszlopba töltöttem, és 5 percig centrifugáltam 11000 x g-vel.
5. A tiszta felüliszót átpipettáztam egy új, 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, majd hozzáadtam 450 µl PC puffert és összevortexeltem.
6. A DNS megkötéséhez egy új NucleoSpin szűrőt (zöld) használtam, ami egy új gyűjtőcsőben (2 µl) volt benne.
7. Mindegyik szűrőbe 700 µl nyert folyadékot pipettáztam át.

8. Ezután 1 percig 11000 x g-vel centrifugáltam, majd az átszűrt folyadékot kidobhattam, és a szilikagél membránon megtapadt DNS-t mostam, illetve több lépésben szárítottam.
9. Az első lépésben 400 µl PW1 puffert (mosófolyadékot) pipettáztam a membránra. 1 percig centrifugáltam 11000 x g-vel, és a szűrt folyadékot eldobtam.
10. A második mosáshoz 700 µl PW2 puffert, a harmadik mosáshoz 200 µl-t használtam, azonban a végén 2 percig centrifugáltam, hogy biztosan mosófolyadék mentes legyen a DNS mintám.
11. A NucleoSpin szűrőt új 1,5 ml-es csőbe helyeztem, majd a DNS-t 50 µl PE pufferrel eluáltam, melyet előtte 5 percig 65 °C-on melegítettem. Ezt követően 1 percig centrifugáltam, majd az eluátummal ismételtam meg az elúciót, és nem újabb 50 µl pufferrel. Erre azért volt szükség, hogy töményebb legyen a kivonatom.

4.2.2. DNS koncentráció mérése/meghatározása

Nanodrop készülékkel a DNS koncentrációját és tisztaságát is ellenőriztem. 2 µl DNS mintából állapítottam meg ng/µl-ben a DNS koncentrációt.

Ezt követően az 50 µl DNS mintákból 2 µl-eket pipettáztam át újabb csövekbe, és ezeket 3 µl DNS festékkel elegyítettem, amely brómfenolkéket tartalmazott. Az így létrejött 5 µl-es mintákat EtBr-dal festett 1,2%-os agaróz géltre vittem fel. Elektroforézis után a géleket lefotóztam. Az utóbbi két lépés a kivont DNS minőségének ellenőrzésére szolgált.

4.2.3. PCR reakció

A fitoplazmák kimutatására, az izolált DNS-t templátként használva nested PCR reakciót indítottam, amelynek első lépéséhez a P1-P7 univerzális primerpárt használtam, bázissortrendet lásd 1. táblázat-ban.

Cél	Primer	Bázissorrend (5'-3')
PCR	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT
Nested PCR	R16mF2	CATGCAAGTCGAACGGA
	R16mR1	CTTAACCCCAATCATCGAC
	U3	TTCAGCTACTCTTTGTAACA
	U5	CGGCAATGGAGGAACT
	fO1	CGGAACTTTTAGTTTCAGT
	rO1	AAGTGCCCAACTAAATGAT

1. táblázat: PCR reakcióhoz használt oligonukleotidok bázissorrendjei

PCR reakciókeverék a következő összetevőket tartalmazza:

- MQ (steril desztillált víz): 9 µl
- Q5 5x Phire® reakciópuffer: 3 µl
- dNTP (10 mM): 0,3 µl
- Forward primer: 1 µl
- Reverse primer: 1 µl
- Q5 polimeráz: 0,2 µl
- Templát: 1 µl

A PCR reakciót PCR készülékben végeztem a következő program szerint:

1. Elő denaturáció: 98 °C, 30 másodperc
2. Denaturáció: 98 °C, 10 másodperc
3. Annealláció: 55 °C, 20 másodperc
4. Elongáció: 72 °C, 60 másodperc
5. Végso elongáció: 72 °C, 2 perc

A PCR reakció 40 ciklusból állt, minden ciklus denaturációs, anneallációs és elongációs lépéseket foglalt magába.

Egy negatív (Milli Q víz) és egy pozitív (16SrX-csoportba tartozó fitoplazmát tartalmazó DNS kivonat) kontrollt használtam.

A Nested PCR-hez az univerzális primerekkel kapott PCR terméket 1:40 arányban hígítottam, ami azt jelenti, hogy 0,5 µl PCR termékhez adtam 19,5 µl MQ vizet.

4.2.4. *Nested PCR reakció*

Annak érdekében, hogy növeljük a kimutatás érzékenységét és pontosságát, a hígított PCR termékkel nested PCR reakciót hajtottunk végre az X-es csoportra specifikus primerpárral. Az X-es fitoplazma csoportra specifikus primerek: R16mF2-R1, és fO1-rO1 párral vagy még egy univerzális U3-U5 primer párral végeztük a nested PCR reakciót (1. táblázat).

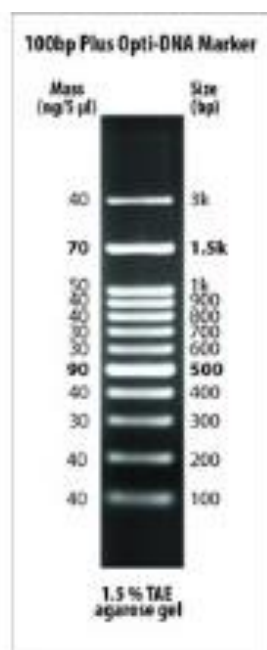
A Nested PCR reakció programja:

1. Elő denaturáció: 98 °C, 30 másodperc
2. Denaturáció: 98 °C, 10 másodperc
3. Annealláció: 60 °C, 20 másodperc
4. Elongáció: 72 °C, 60 másodperc
5. Végső elongáció: 72 °C, 2 perc

A PCR reakció 40 ciklusból állt, minden ciklus denaturációs, anneallációs és elongációs lépéseket foglalt magába.

4.2.5. *A PCR reakció eredmények vizsgálata (PCR termékek elválasztása agaróz gélen)*

Az egyes PCR-termékekből 5 µl -t mértem ki csövekbe és ezeket 3 µl DNS festékkel elegyítettem. A keletkezett 8 µl elegyet 1,2%-os Etidium-bromidos agaróz-gélre vittem fel. A kapott PCR termékek méret azonosításához Gene-Ruler 100 bp Plus (3µl) markert használtam (9. ábra)



9. ábra: A Thermo-Fischer scientific 100 bp Plus DNS markerének beosztása

4.2.6. *PCR termékek tisztítása*

A nested PCR reakció termékeit néhány esetben tovább vizsgáltuk. Sanger szekvenálással szeretnénk volna megbizonyosodni arról, hogy a termék valóban fitoplazmáról keletkezett és nem egy melléktermék.

A PCR termékek tisztítását a Thermo Scientific Gene Jet Gel Extraction Kit-jét használva végeztem, a gyártó utasításai alapján.

1. Első lépésként a PCR-rel terméket agaróz gélen elválasztottam, majd a gélből a megfelelő méretű termékeket tartalmazó darabokat szikével kivágtam és Eppendorf csőbe raktam.
2. A csöveket mérlegen lemértem, és a minta tömegével arányos mennyiségű Binding Buffert adtam hozzájuk, majd 10 percre 65°C-os vízfürdőre tettem a

mintákat, amíg a gélszelet teljesen fel nem oldódott. Ezzel egy időben az Elution Buffert is a 65°C-os vízfürdőre tettem, előmelegítés céljából.

3. A felolvadt mintát szűrős csőbe pipettáztam át, amit egy percen keresztül centrifugáltam.
4. A szűrőn átfolyt anyagot kidobtam, majd 100 µl Binding Buffert mértem rá, majd egy percnyi centrifugálás után lefolyt anyagot szintén kidobtam.
5. Ezt követően 700 µl Wash Buffert pipettáztam a mintára, amit ismételtén 1 percig centrifugáltam.
6. Ez után a felső szűrős kiscsövet tiszta Eppendorf csőbe helyezve rámértem 23 µl Elution Buffert, majd vártam 1 percet, aztán centrifugáltam 1 percig.
7. A gélből kitisztított mintákból 3 µl-éhez 1 µl DNS festéket adtam és agaróz gélen választottam el őket.

A tisztított minták bázissorrendjének hagyományos Sanger szekvenálással való meghatározását szolgáltatásként a BIOMI Kft. végezte.

4.2.7. LAMP teszt

A fitoplazmafertőzés más módszerrel történő kimutatására a sárgabarack- és alma mintákban LAMP (hurokközvetített izotermikus amplifikáció) vizsgálatot végeztem, melyhez a 2. táblázat-ban látható primereket használtam.

Primer	Bázissorrend (5'-3')
FIP	AGCATACCCTTGCGGGTCTTTTTTTTACAGTTGGAAACGACTGCTA
FOP	CCTGCCTCTTAGACGAGGAT
BIP	AAGAGATGGGCTTGCGGCACTTTTCTCAGTCCAGCTACACATCA
BOP	CAATGTGGCCGTTCAACCT

2. táblázat: LAMP teszthez használt oligonukleotid bázissorrendjei

- a. Forward Inner Primer (FIP) egy F2 régióból áll a 3'-végnél és F1c-régióból az 5'-végnél. Az F2 régió komplementer a templát szekvencia F2c régiójával.
- b. A Forward Outer Primer-t (FOP) F3-nak is hívják, ez a külső primer, hosszabb és rövidebb, mint a FIP. Egy F3 régióból áll, amely komplementer a templát szekvencia F3c régiójával.

- c. A hátsó belső primer (BIP) hasonló a FIP-hez, de a 3'-végén B2 régió található - ez kiegészíti a cél B2C-jét -, és a B1C régió az 5'-végnél található.
- d. A hátrányos külső primer (BOP), az úgynevezett B3 primer, egy B3 régióból áll, amely komplementer a templát szekvencia B3c régiójával.

A LAMP tesztet az Optigen Genie III készüléknek segítségével végeztük. A Genie III-ban egyszerre 8 minta vizsgálatára alkalmas és folyamatosan tudja detektálni a fluoreszcens jelet. A készülék egyik előnye, hogy terepen is használható. Hat kajsziabarack- és alma mintát, valamint két negatív és pozitív kontrollt vizsgáltam. A reakcióelegy 21 µl Master mixet és 4 µl DNS-t tartalmazott.

A Master mix a következőkből állt:

- LAMP Isothermal Master Mix: 15 µl
- FB - B3 primerpár: 0,5 µl - 0,5 µl
- FIP -BIP primerpár: 3 µl - 3 µl

A DNS amplifikálása izotermális körülmények között 65° C-on zajlott.

5. Eredmények és következtetések

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

5.1. Kajsziabarack minták fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

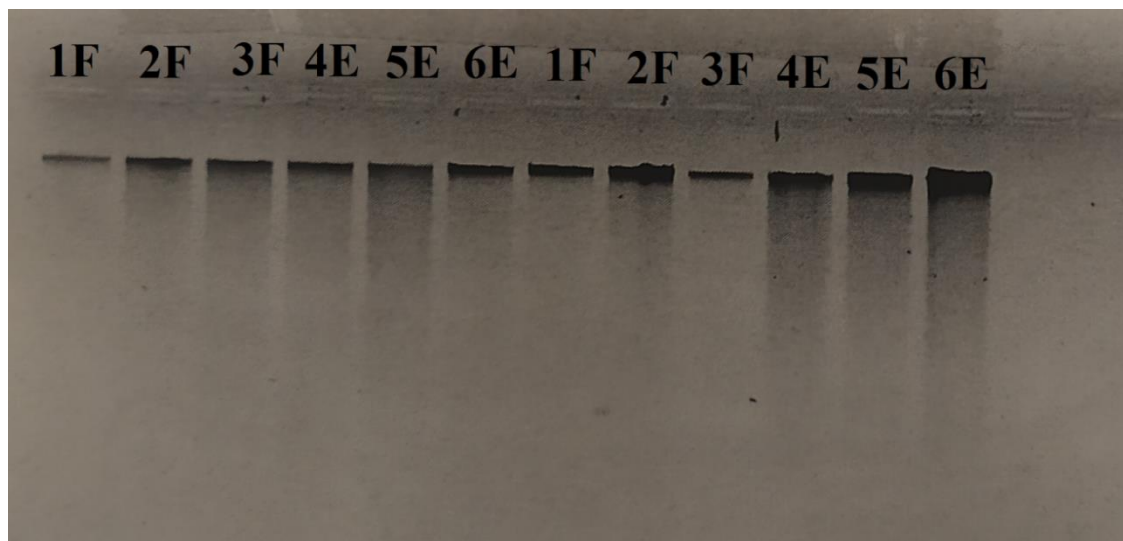
Nanodrop készülékkel a DNS koncentrációjának és tisztaságát mértem, ami mutatta, hogy a módszer jól működött a kajsziabarack mintákon (3. táblázat), és segítségével egy levélből 60-100 ng/μl DNS-t nyertünk ki.

Minta	Első kivonás	Második kivonás
	Koncentráció	Koncentráció
1F	65,6ng/μl	80,4 ng/μl
2F	84,8ng/μl	60,1ng/μl
3F	99,9ng/μl	78,4 ng/μl
4E	82,6ng/μl	84,6 ng/μl
5E	89,1ng/μl	87,9 ng/μl
6E	75,4ng/μl	99,2 ng/μl

3. táblázat: Kajsziabarack mintákból tisztított DNS koncentrációja

A vizsgálatba 6 kajsziabarack mintát vontunk be, 3 egészséges és 3 fertőzött fa levelét. A fertőzött fák 1F, 2F, 3F és a 3 egészséges 4E, 5E, 6E jelölést kapták.

A koncentráció mérés után további ellenőrzésként a DNS mintákat 1,2 %-os agaróz gélen választottuk el (10. ábra).

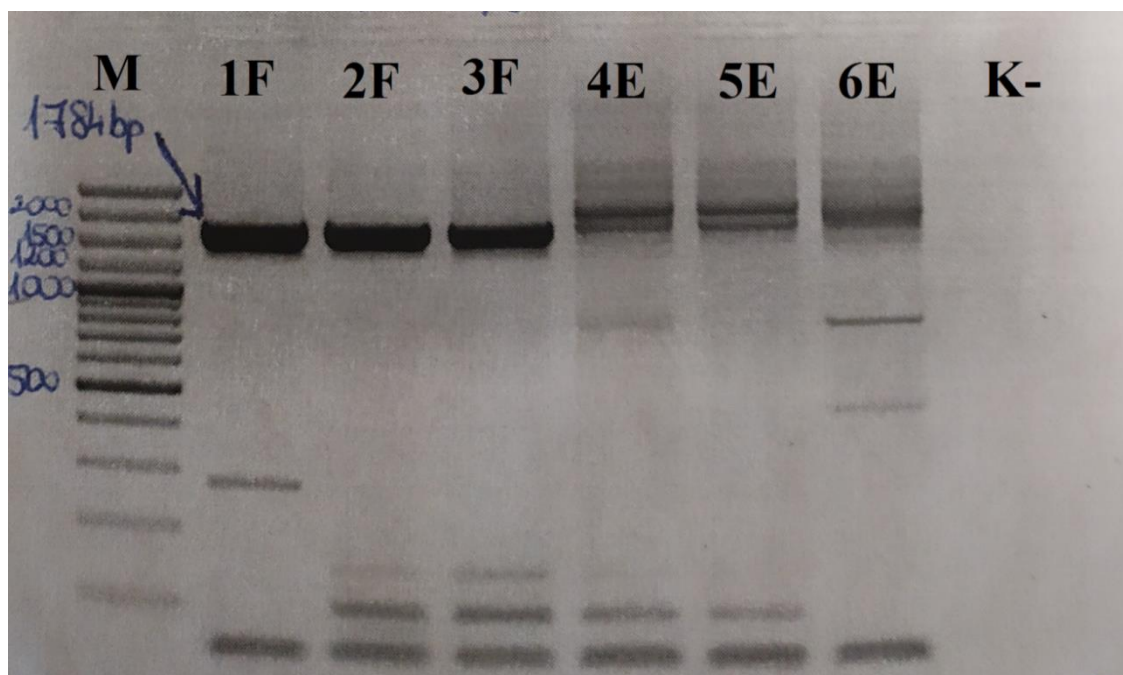


10. ábra: Kajszi minták DNS kivonatainak képe 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után.

5.1.1. *Fitoplazma jelenlétének vizsgálata nested PCR reakcióval*

A kutatás során szeretnénk volna igazolni, hogy a 3 egészségesnek vélt gyümölcsfa nem tartalmazza és a 3 fertőzöttnek vélt tartalmazza a kórokozót.

Ehhez először a DNS kivonatokkal univerzális P1-P7 primerekkel indítottunk PCR reakciót. Eredményként 1784 bázispáros termékeket vártunk (11. ábra).



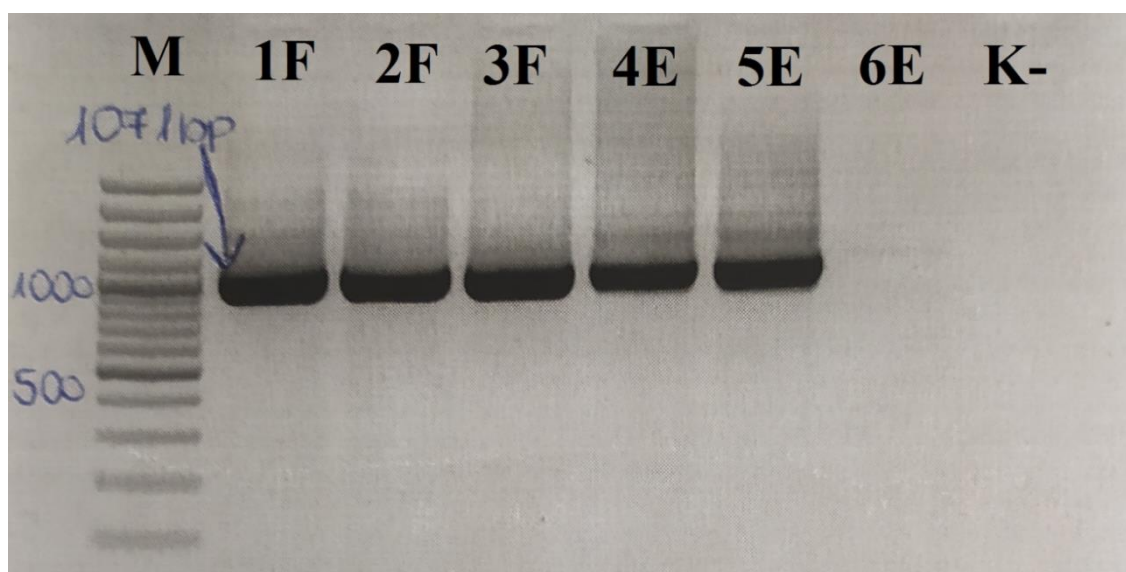
11. ábra: Kajszi minták DNS kivonásainak PCR analízise P1-P7 általános fitoplazma primereket használva, 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után

M: Marker:100 bp Plus

K-: templát helyett desztillált vizet használtunk

A PCR reakció során kapott terméket templátként felhasználva indítottuk a nested PCR reakciót, melyhez a 16SrX csoportra specifikus fO1-rO1 primerpárt használtuk indítószekvenciának, hogy növeljük a kimutatás érzékenységét, és szűkíthessük a mintában lévő fitoplazmák körét.

A 12. ábra mutatja, hogy a kajsziarack minták esetében tüneteket mutató egyedek mindegyikében és két tünetmentesnek mutatkozó fa (4E, 5E) mintájában is kimutatható volt a fitoplazma.



12. ábra: Kajszi minták DNS kivonásainak nested PCR analízise P1-P7 általános fitoplazma specifikus és fO1-rO1 16SrX csoportspecifikus primereket használva, 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után

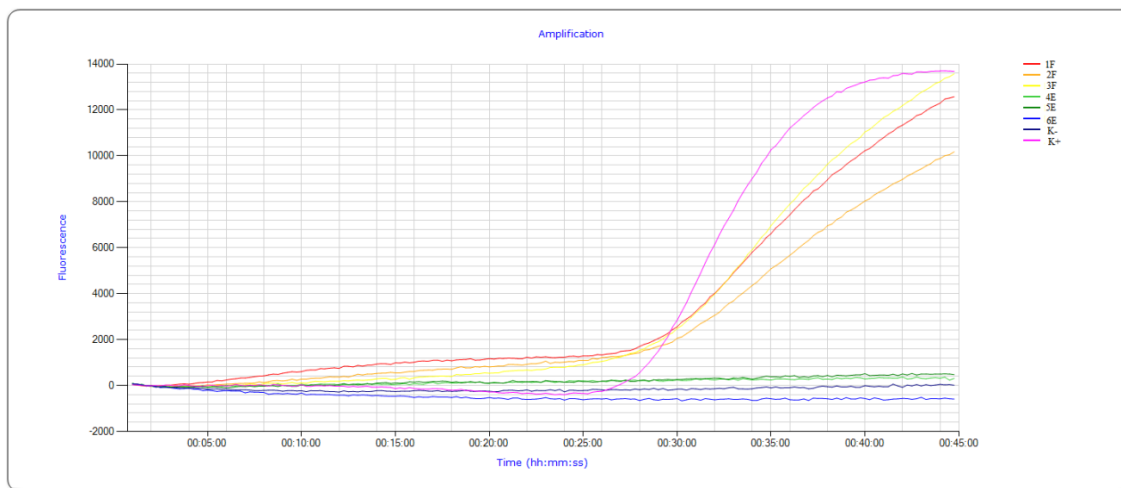
M: Marker:100 bp Plus

K-: templát helyett desztillált vizet használtunk

5.1.2. Fitoplazmák jelenlétének vizsgálata LAMP teszttel

Ennél a tesztnél a vizsgált mintáknál nem szükséges a gélelektroforézissel történő elválasztás, mert fluoreszcenciásan real time lehetett követni az eredményeket. Ez a teszt bizonyítja, hogy a fitoplazma- amire gyanakodtunk benne van a vizsgált mintáinkban, annak az elvén, hogy a mixben lévő festék csak, akkor tud a DNS-hez kötődni, hogy ha benne van a fitoplazma.

A 13. ábra jól mutatja, hogy a LAMP teszt jól sikerült, mert a 3 fitoplazma gyanús falevele tökéletesen követi a pozitív kontroll vonalát, és ugyanez mondható el a 3 egészségesnek vélt növényről a negatív kontrollal kapcsolatban.



13. ábra: LAMP teszt eredménye kajszi mintáknál

Minta	Első kivonás	Második kivonás
	LAMP	LAMP
1F	pozitív	pozitív
2F	pozitív	pozitív
3F	pozitív	pozitív
4E	negatív	negatív
5E	negatív	negatív
6E	negatív	negatív

4. táblázat: LAMP teszt eredménye kajszi mintáknál

5.2. Alma minták fitoplazmafertőzöttségének vizsgálata

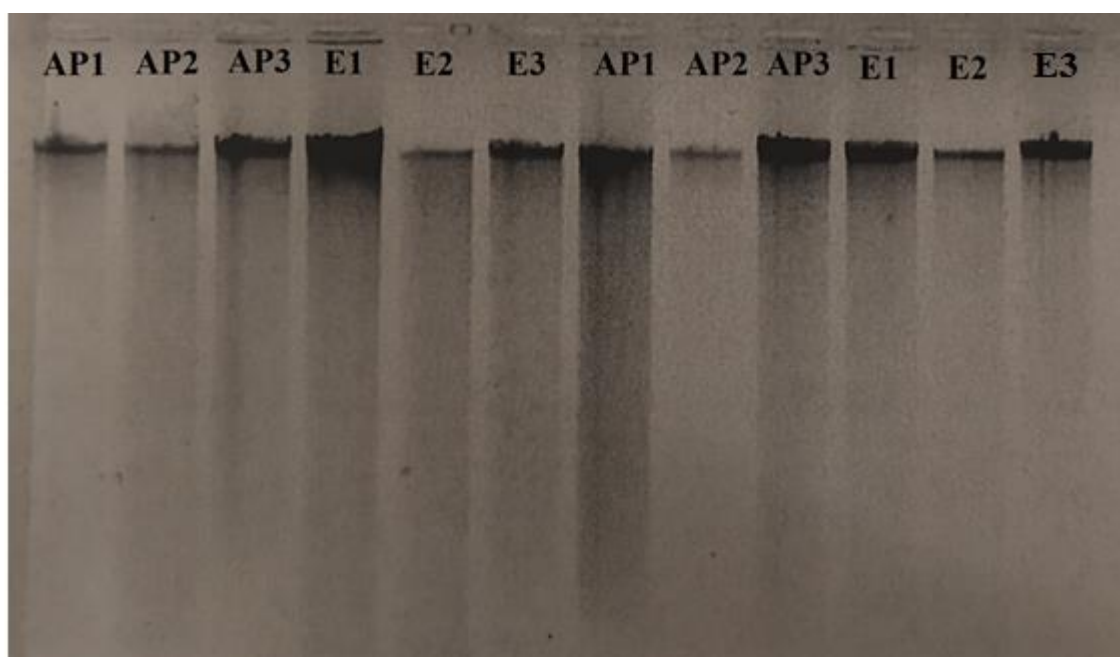
Alma minták esetében is Nanodrop készülékkel a DNS koncentrációjának és tisztaságát mértem, ami mutatta, hogy a módszer jól működött itt is (5. táblázat), és segítségével egy levélből 60-190 ng/μl DNS-t nyertünk ki.

Minta	Első kivonás	Második kivonás
	Koncentráció	Koncentráció
AP1	64,8 ng/μl	85,2 ng/μl
AP2	96,4 ng/μl	83,7 ng/μl
AP3	118,9 ng/μl	72,4 ng/μl
E1	181,3 ng/μl	160,5 ng/μl
E2	58,8 ng/μl	130,1 ng/μl
E3	77,4 ng/μl	78,0 ng/μl

5. táblázat: Alma mintákból tisztított DNS koncentrációja

6 alma mintát vizsgáltam, 3 egészséges és 3 fertőzött volt köztük. A fertőzött alma-fák az AP1, AP2, AP3 és a 3 egészséges az E1, E2, E3 jelölést kapták.

A koncentráció mérés után további ellenőrzésként a DNS mintákat 1,2 %-os agaróz gélen választottuk el (14. ábra).



14. ábra: Alma minták DNS kivonatainak képe 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után.

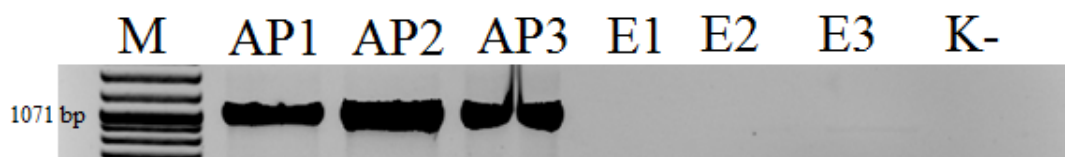
5.2.1. *Fitoplazma jelenlétének vizsgálata nested PCR reakcióval*

A kutatás során szeretnénk volna igazolni, hogy a 3 egészségesnek vélt gyümölcsfa nem tartalmazza és a 3 fertőzöttnek vélt tartalmazza a kórokozót.

Ehhez először a DNS kivonatokkal univerzális P1-P7 primerekkel indítottunk PCR reakciót. Eredményként 1784 bázispáros termékeket vártunk, de ezt nem futtattuk meg.

A PCR reakció során kapott terméket templátként felhasználva indítottuk a nested PCR reakciót, melyhez a 16SrX csoportra specifikus fO1-rO1 primerpárt használtuk indítószekvenciának, hogy növeljük a kimutatás érzékenységét, és szűkíthessük a mintában lévő fitoplazmák körét.

A 15. ábra mutatja, hogy a tünetmentes fákban nincs és a tünetet mutató fák esetén van PCR termék, így a fitoplazmák abban nem voltak kimutathatóak.



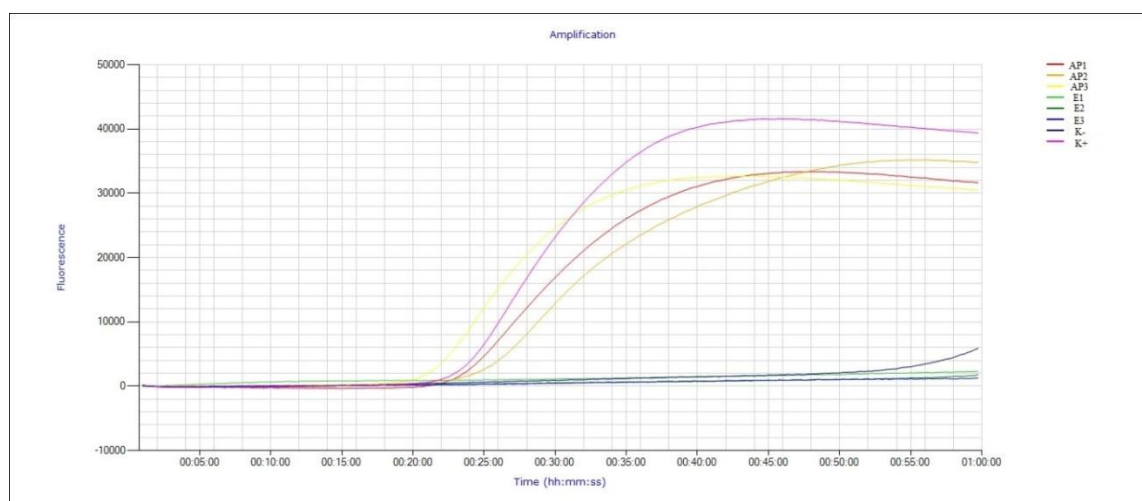
15. ábra: Alma minták DNS kivonásainak nested PCR analízise P1-P7 általános fitoplazma specifikus és fO1-rO1 16SrX csoportspecifikus primereket használva, 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után

M: Marker:100 bp Plus

K-: templát helyett desztillált vizet használtunk

5.2.2. Fitoplazmák jelenlétének vizsgálata LAMP teszttel

Az alma minták esetén is végeztünk LAMP tesztet. A 16. ábra jól mutatja, hogy a LAMP teszt jól sikerült, mert a 3 fitoplazma gyanús fák leveleiből származó minták tökéletesen követik a pozitív kontroll vonalát, és ugyanez mondható el a 3 egészségesnek vélt növényről a negatív kontrollal kapcsolatban.



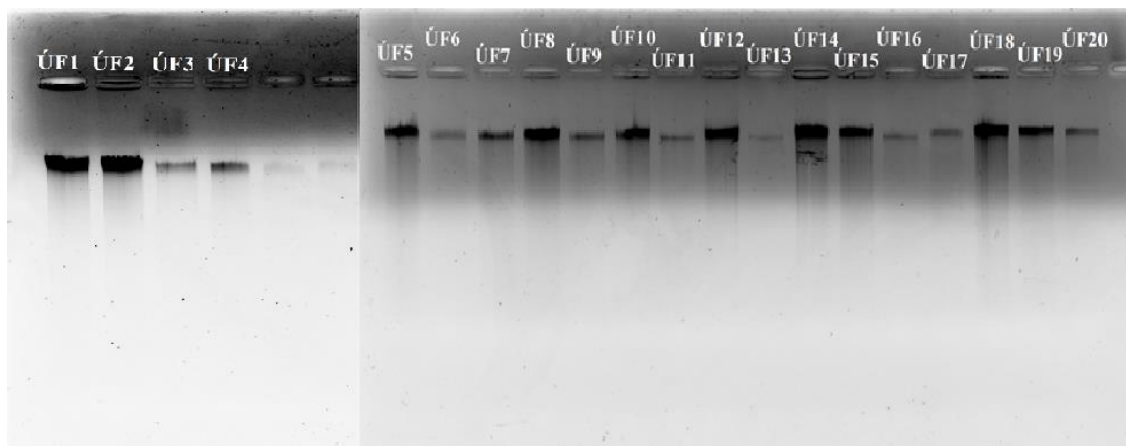
16. ábra: LAMP teszt eredménye alma mintáknál

Minta	Első kivonás	Második kivonás
	LAMP	LAMP
AP1	pozitív	pozitív
AP2	pozitív	pozitív
AP3	pozitív	pozitív
E1	negatív	negatív
E2	negatív	negatív
E3	negatív	negatív

6. táblázat: LAMP teszt eredménye alma mintáknál

5.3. Meggy minták fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

A meggy minták esetében nem mértem Nanodrop készülékkel a DNS koncentrációját a DNS kivonást követően, de a 1. ábra 17. ábra mutatja, hogy a módszer jól működött.



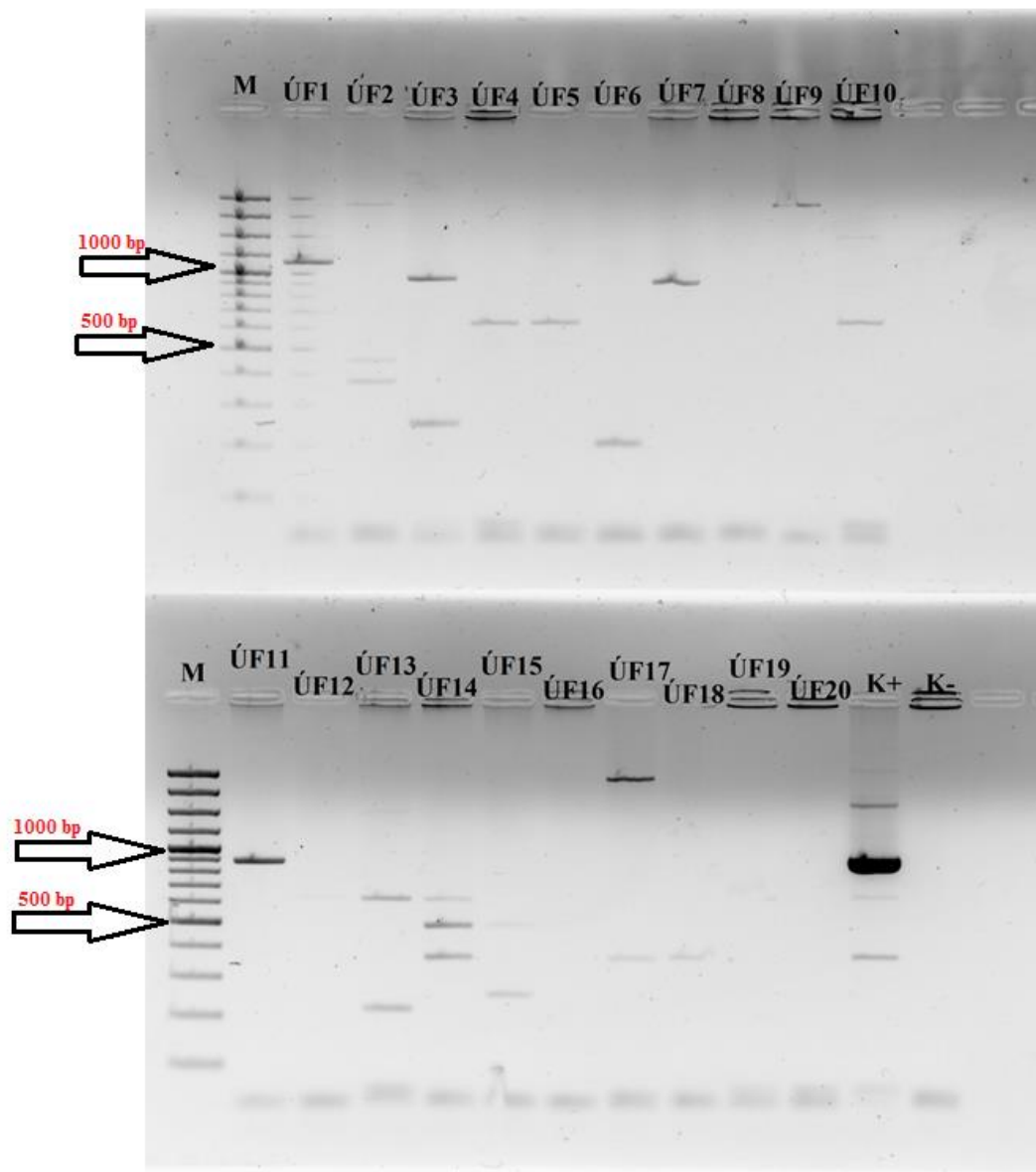
17. ábra: DNS kivonatok képe 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után

5.3.1. Fitoplazmák jelenlétének vizsgálata nested PCR reakcióval

A vizsgálatba 20 Újfehértói fürtös mintát vontunk be, mivel a gyümölcsfákon fitoplazmákra jellemző tüneteket figyeltünk meg. Külső vizuális megfigyelés alapján nem tudtuk megállapítani, hogy milyen csoporthoz tartozó fitoplazmák okozzák a tüneteket, ezért először univerzális P1- P7 primerpárral végeztünk PCR reakciót. Eredményül 1784 bázispár méretű terméket vártunk, de ezt nem futtattuk meg agaróz gélen.

A PCR reakció során kapott terméket templátként felhasználva indítottuk a nested PCR reakciót, melyhez egy másik univerzális U3-U5 primerpárt használtuk, hogy szűkíthessük a mintában lévő fitoplazmák körét. Kb. 900 bp méretű PCR terméket vártunk.

Az U3-U5 primerpárral végzett nested PCR reakció eredményeként 3 minta esetén kaptunk a várt mérettartományban PCR terméket. A 18. ábra mutatja az ÚF3, ÚF7, ÚF11-essel jelölt mintáknál.



18. ábra: Meggy minták DNS kivonásainak nested PCR analízise P1-P7 általános fitoplazma specifikus és U5-U3 univerzális primereket használva, 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után

M: Marker:100 bp Plus

K+: fitoplazma pozitív kajszibarack minta

K-: templát helyett desztillált vizet használtunk

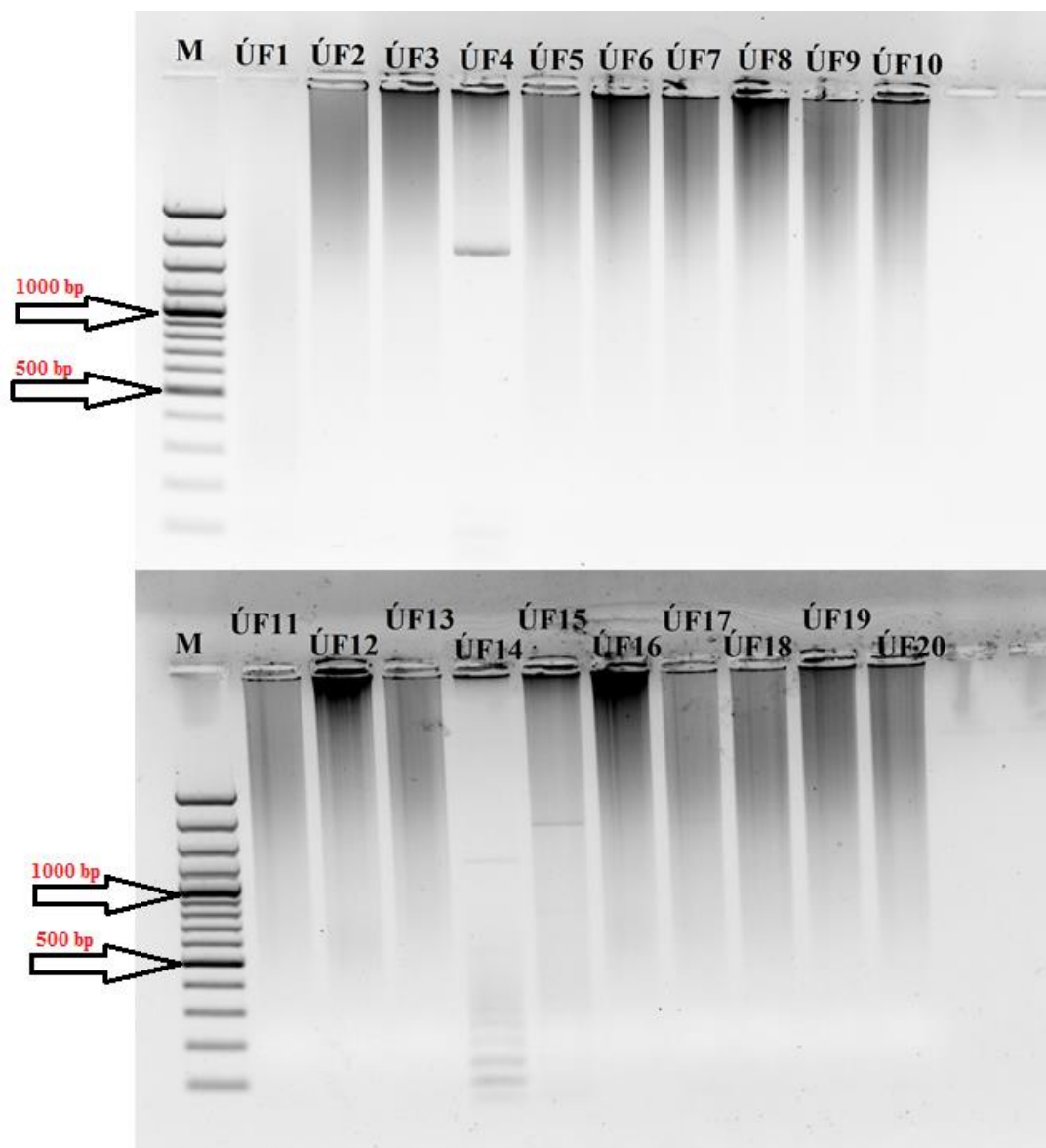
A nested PCR reakció eredményeit a 7. táblázat-ban foglaltam össze, és szemléltettem.

Minta neve	U3-U5
Újfehértói fűrtös 1	-ÚF1
Újfehértói fűrtös 2	-ÚF2
Újfehértói fűrtös 3	+ÚF3
Újfehértói fűrtös 4	-ÚF4
Újfehértói fűrtös 5	-ÚF5
Újfehértói fűrtös 6	-ÚF6
Újfehértói fűrtös 7	+ÚF7
Újfehértói fűrtös 8	-ÚF8
Újfehértói fűrtös 9	-ÚF9
Újfehértói fűrtös 10	-ÚF10
Újfehértói fűrtös 11	+ÚF11
Újfehértói fűrtös 12	-ÚF12
Újfehértói fűrtös 13	-ÚF13
Újfehértói fűrtös 14	-ÚF14
Újfehértói fűrtös 15	-ÚF15
Újfehértói fűrtös 16	-ÚF16
Újfehértói fűrtös 17	-ÚF17
Újfehértói fűrtös 18	-ÚF18
Újfehértói fűrtös 19	-ÚF19
Újfehértói fűrtös 20	-ÚF20

7. táblázat: Újfehértói fűrtös minták nested PCR eredményeinek összegzése

A P1-P7 primerpárral végzett PCR reakció eredményét templátként felhasználva egy másik univerzális R16mF2-R16mR1 primerpárral is indítottunk nested PCR reakciót.

Az R16mF2-R16mR1 primerpárral végzett nested PCR reakció esetében nem volt olyan egyértelműen értelmezhető a kapott eredmény. Ebben az esetben egy kb. 1400 bázispáros terméket vártunk, de ilyet egyik reakció során sem tudtunk detektálni (19. ábra).



19. ábra: Meggy minták DNS kivonásainak nested PCR analízise P1-P7 általános fitoplazma specifikus és R16mF2-R16mR1 16SrX csoportspecifikus primereket használva, 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után

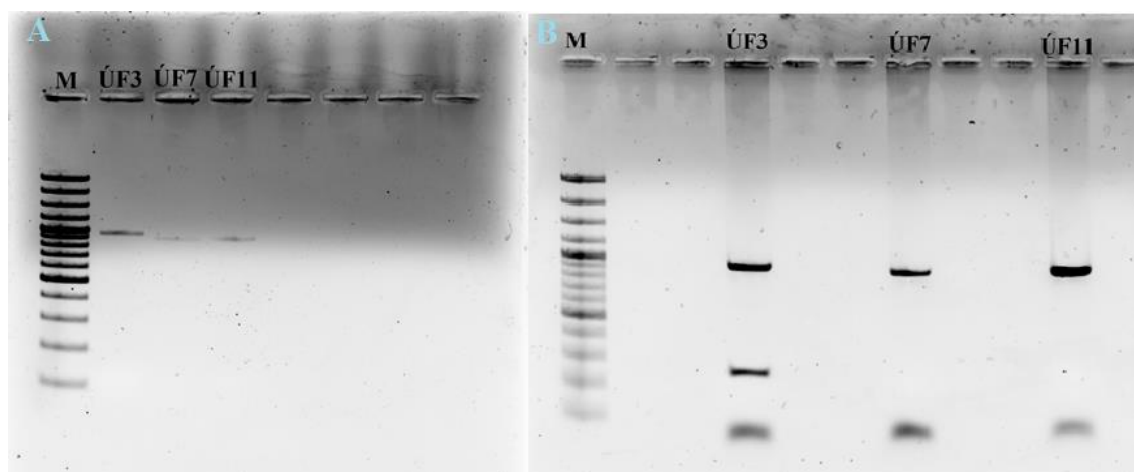
M: Marker:100 bp Plus

K+: fitoplazma pozitív kajsziabarack minta

K-: templát helyett desztillált vizet használtunk

5.3.2. Tisztított minták szekvenálása

Az U3-U5 primerpárral végzett nested PCR reakció során 3 mintánál találtunk fitoplazma méretű PCR terméket, amelyet gélből kivágtunk, tisztítottuk a Thermo Scientific Gene Jet Gel Extraction Kit segítségével. Az izolálás előtt és után is agaróz gélen választottuk el a PCR termékeket (20. ábra).



20. ábra: Tisztított meggy minták képe 1,2 %-os agaróz gélen

A: visszaizolálás előtt

B: visszaizolálás után

A nested PCR reakció termékeinek a gélből való visszaizolálására azért volt szükség, mert ezeket Sanger szekvenálással tovább vizsgáltuk, mivel szerettünk volna megbizonyosodni arról, hogy a termék valóban fitoplazmáról keletkezett és nem egy melléktermék. Tehát az U5-U3 primerekkel amplifikált PCR termékből az említett módszerrel kivágtott, és tisztított terméket szekvenáltattuk. A Sanger szekvenálást a BIOMI Kft végezte.

A 16 SrX csoportba tartozó fitoplazmák közül csak a '*Ca. Phytoplasma mali*' teljes genomját ismerjük, amin megkerestük a P1-P7 primerekkel határolt szakaszt. Az így kapott szakasz a '*Ca. Phytoplasma mali*'-nak a 16S rRNS régiója, és ehhez hasonlítottuk az NCBI BLAST program segítségével az Újfehértói fürtös minták szekvenciáit.

A 20. ábra mutatja, hogy az ÚF3-as minta amplifikációja után tisztított termék kicsit nagyobb, mint az ÚF7-es és az ÚF11-es. Az illesztés során kiderült, hogy az ÚF3 nem mutatott hasonlóságot a '*Ca. Phytoplasma mali*' genomjával, így feltehetően egy aspecifikusan, amplifikált terméket szekvenáltattunk. A minta nagyon „kevertnek” bizonyult, így további vizsgálatokat igényel annak eldöntése, hogy a mintában van-e

fitoplazma és ha igen milyen és melyik csoportba tartozik. Így abban a fában, amelyikről az ÚF3-as minta származik nem tudtuk bizonyítani a fitoplazma jelenlétét.

A másik két minta: az ÚF7 és az ÚF11 90%-nál nagyobb hasonlóságot mutatott a '*Ca. Phytoplasma mali*' 16S rRNS régiójával.

Az említett két minta esetében a két ellentétes irányú szekvenálás eredményét illesztettük, ami így az egész amplifikált régiót lefedte. Ezt NCBI BLAST program segítségével összehasonlítottuk az NCBI adatbázisában található szekvenciákkal. Eredményül azt kaptuk, hogy a '*Prunus persica*' fitoplazma genes for 16S ribosomal RNA, '*Prunus dulcis*' fitoplazma clone Alm-Z, '*Rosa canina*' fitoplazma clone Ros-Z és *Aster yellows* fitoplazma clone 16SrRNS szekvenciákhoz hasonlítanak az ÚF minták DNS szakaszai.

Az *Aster yellows* fitoplazma a 16 SrI csoport tagja, melyet Lee és munkatársai a biológiai tulajdonságai és földrajzi eloszlása alapján több alcsoportba soroltak, és ezek közül a 16SrI-Q alcsoport fás szárú növényeket is fertőz, többek között őszibarackon („red leaf”) és cseresznyefákon írták le a betegséget.

A vizsgált szekvenciák hasonlóságát, és eltérését a Clustal Omega illesztő program segítségével is vizsgálni lehet. A program lehetővé teszi, hogy a szekvenciák közötti eltéréseket bázispárra lebontva lehessen látni. Mi is ezt használtuk, a BLAST vizsgálat során kapott találatok és az U5-U3 primerekkel amplifikált termékek szekvenciáinak összehasonlítására. Az említett szekvenciákat bemásolva a Clustal Omega programba, elvégezve az illesztéseket, egy többszörös illesztést kaptunk eredményül (21. ábra és 22. ábra). A csillagok jelentik a teljes egyezést a szekvenciák között, ahol pedig, hiányzik a csillag ott bázispár eltérés van egy vagy több szekvenciában is.

A szekvencia illesztés eredménye alapján elmondhatjuk, hogy az ÚF7-es minta 98%-os egyezést mutat az adatbázisban található '*Prunus dulcis*' phytoplasma és '*Rosa canina*' phytoplasma clone Ros-Z izolátumok szekvenciájával (21. ábra).

ÚF7	-----TATTTC	6
KX844634 P.DULCIS FIT	AATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAATGCCGCGTGAAACGATGAAGTATITC	240
KX844630 R. CANINA FIT	AATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAATGCCGCGTGAAACGATGAAGTATITC	208

ÚF7	GGTACGTAAAGTTCCTTTTATTAGGGAAGAAAAGATGGTGGA-AAAANNANTATGACGGTAC	65
KX844634 P.DULCIS FIT	GGTACGTAAAGTTCCTTTTATTAGGGAAGAAAAGATGGTGGA-AAAANNANTATGACGGTAC	300
KX844630 R. CANINA FIT	GGTACGTAAAGTTCCTTTTATTAGGGAAGAAAAGATGGTGGA-AAAANNANTATGACGGTAC	268

ÚF7	CTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACATAGGGGGCAAT	125
KX844634 P.DULCIS FIT	CTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACATAGGGGGCAAG	360
KX844630 R. CANINA FIT	CTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACATAGGGGGCAAG	328

ÚF7	CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTAAATAAGTTTATGGTCTA	185
KX844634 P.DULCIS FIT	CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTAAATAAGTTTATGGTCTA	420
KX844630 R. CANINA FIT	CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTAAATAAGTTTATGGTCTA	388

ÚF7	AGTGCAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTAGCTAGAGTTGGATAGAGGCA	245
KX844634 P.DULCIS FIT	AGTGCAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTAGCTAGAGTTGGATAGAGGCA	480
KX844630 R. CANINA FIT	AGTGCAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTAGCTAGAGTTGGATAGAGGCA	448

ÚF7	AGTGGAAATCCGTTGTGTAGTGGTAAATGCGTAAATATACGGAGGAACACCAGAAGCGAA	305
KX844634 P.DULCIS FIT	AGTGGAAATCCGTTGTGTAGTGGTAAATGCGTAAATATACGGAGGAACACCAGAAGCGAA	540
KX844630 R. CANINA FIT	AGTGGAAATCCGTTGTGTAGTGGTAAATGCGTAAATATACGGAGGAACACCAGAAGCGAA	508

ÚF7	GGCGGCTTGCTGGGTCTTAACGTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATT	365
KX844634 P.DULCIS FIT	GGCGGCTTGCTGGGTCTTAACGTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATT	600
KX844630 R. CANINA FIT	GGCGGCTTGCTGGGTCTTAACGTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATT	568

ÚF7	ATATACCCCTGGTAGCCACGCCCTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGATAAAACAGTGT	425
KX844634 P.DULCIS FIT	ATATACCCCTGGTAGCCACGCCCTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGATAAAACAGTGT	660
KX844630 R. CANINA FIT	ATATACCCCTGGTAGCCACGCCCTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGATAAAACAGTGT	628
	* ***** *	
ÚF7	TGAAGTTAACACATTA-----	441
KX844634 P.DULCIS FIT	TGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAG	720
KX844630 R. CANINA FIT	TGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAG	688

21. ábra: Az NCBI adatbázisban megtalálható '*Prunus dulcis*' phytoplasma és '*Rosa canina*' phytoplasma clone Ros-Z izolátumok szekvenciája és az ÚF7-es minta szekvenciáinak illesztése Chustal Omega programmal.

A szekvencia illesztés eredménye alapján megállapítható, hogy ÚF11-es minta 100 %-os egyezést mutat az adatbázisban található 'Prunus persica' phytoplasma clone és 'Aster yellows' phytoplasma clone izolátumok szekvenciájával (22. ábra).

ÚF11	-----GATGAAGTA	9
KF723593 P. PERS. FIT.	AGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA	300
MF092790 A. YELLOWS FIT.	AGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA	271

ÚF11	TTTCGGTACGTAAAGTTCITTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACG	69
KF723593 P. PERS. FIT.	TTTCGGTACGTAAAGTTCITTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACG	360
MF092790 A. YELLOWS FIT.	TTTCGGTACGTAAAGTTCITTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACG	331

ÚF11	GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGG	129
KF723593 P. PERS. FIT.	GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGG	420
MF092790 A. YELLOWS FIT.	GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGG	391

ÚF11	CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCTGTTAAATAAGTTTATGG	189
KF723593 P. PERS. FIT.	CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCTGTTAAATAAGTTTATGG	480
MF092790 A. YELLOWS FIT.	CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCTGTTAAATAAGTTTATGG	451

ÚF11	TCTAAGTGCAATGCTCAACATGTGATGCTATAAAAACTGTTAGCTAGAGTAAGATAGA	249
KF723593 P. PERS. FIT.	TCTAAGTGCAATGCTCAACATGTGATGCTATAAAAACTGTTAGCTAGAGTAAGATAGA	540
MF092790 A. YELLOWS FIT.	TCTAAGTGCAATGCTCAACATGTGATGCTATAAAAACTGTTAGCTAGAGTAAGATAGA	511

ÚF11	GGCAAGTGGAAATCCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCGTAG	309
KF723593.1	GGCAAGTGGAAATCCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCGTAG	600
MF092790 A. YELLOWS FIT.	GGCAAGTGGAAATCCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCGTAG	571

ÚF11	CGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAG	369
KF723593 P. PERS. FIT.	CGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAG	660
MF092790 A. YELLOWS FIT.	CGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAG	631

ÚF11	GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAAACCA	429
KF723593 P. PERS. FIT.	GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAAACCA	720
MF092790 A. YELLOWS FIT.	GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAAACCA	691

ÚF11	GTGTTGAAGTTAACACATTAACTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTT	489
KF723593 P. PERS. FIT.	GTGTTGAAGTTAACACATTAACTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTT	780
MF092790 A. YELLOWS FIT.	GTGTTGAAGTTAACACATTAACTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTT	751

ÚF11	AAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCC	549
KF723593 P. PERS. FIT.	AAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCC	840
MF092790 A. YELLOWS FIT.	AAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCC	811

ÚF11	GAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTA	609
KF723593 P. PERS. FIT.	GAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTA	900
MF092790 A. YELLOWS FIT.	GAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTA	871

ÚF11	TCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT	669
KF723593 P. PERS. FIT.	TCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT	960
MF092790 A. YELLOWS FIT.	TCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT	931

ÚF11	CCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATGTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCA	729
KF723593 P. PERS. FIT.	CCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATGTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCA	1020
MF092790 A. YELLOWS FIT.	CCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATGTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCA	991

ÚF11	AGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTG TGTGGGTTAA-----	770
KF723593 P. PERS. FIT.	AGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTG GGGACGACGTC AAATCATCATGCCCTTAT	1080
MF092790 A. YELLOWS FIT.	AGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTG GGGACGACGTC AAATCATCATGCCCTTAT	1051

22. ábra: Az NCBI adatbázisban megtalálható 'Prunus dulcis' phytoplasma és 'Rosa canina' phytoplasma clone Ros-Z izolátumok szekvenciája és az ÚF11-es minta szekvenciáinak illesztése Clustal Omega programmal.

Hogy megvizsgáljuk, hogy az U5-U3 primerekkel amplifikált PCR termékek és a hozzájuk legnagyobb hasonlóságot mutató NCBI adatbázisában található szekvenciák egymáshoz mennyire hasonlítanak. Ezt a többszörös illesztést is Clustal Omega programmal végeztük (23. ábra).

Az ábrán jól látható, hogy az általunk izolált PCR termékek szekvenciája több helyen is eltér egymástól. A 16S rRNS gén igen hasonló, így ugyan az összehasonlított DNS szakaszok egymáshoz 90%-nál nagyobb hasonlóságot mutatnak, az ÚF7 és ÚF11 különböző fitoplazmából származik. Ennek alátámasztására, készítettünk egy összehasonlítást, az általunk izolált PCR termékeket és az NCBI BLAST program segítségével is. Eredményül azt kaptuk, hogy az ÚF7 és ÚF11-es minták között 95%-os a hasonlóság, így feltételezhető, hogy két különböző fitoplazmáról van szó.

Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a két Újfehértói fürtös egyed esetében a tüneteket valószínűleg különböző fitoplazma általi fertőzés okozhatja. A rendszertani osztályozáshoz a fitoplazmák körében a konzervatív 16S riboszomális RNS-t kódoló, 16S rDNS gént használják, ez azonban annyira hasonló, hogy elemzése filogenetikai vizsgálatokra nem alkalmas. Ehhez, teljes genom hiányában, más, ennél kevésbé konzervált gének rokonsági vizsgálata szükséges (Seemüller, et al., 1998).

ÚF11		TTTCGGTACGTAAGTTCCTTTTATTAGGGAAGAA	TAATGATGGAAAAATCATTCTGACG	69
KF723593 P. PERS. FIT.		TTTCGGTACGTAAGTTCCTTTTATTAGGGAAGAA	TAATGATGGAAAAATCATTCTGACG	360
MF092790 A. YELLOWS FIT.		TTTCGGTACGTAAGTTCCTTTTATTAGGGAAGAA	TAATGATGGAAAAATCATTCTGACG	331
ÚF7		TTTCGGTACGTAAGTTCCTTTTATTAGGGAAGAA	AGATGTTGGAAAAANNANTATGACG	61
KX844634 P. DULCIS FIT		TTTCGGTACGTAAGTTCCTTTTATTAGGGAAGAA	AGATGTTGGAAAAATCATTATGACG	296
KX844630 R. CANINA	FIT	TTTCGGTACGTAAGTTCCTTTTATTAGGGAAGAA	AGATGTTGGAAAAATCATTATGACG	264

ÚF11		GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGGGG		129
KF723593 P. PERS. FIT.		GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGGGG		420
MF092790 A. YELLOWS FIT.		GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGGGG		391
ÚF7		GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGGGG		121
KX844634 P. DULCIS FIT		GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGGGG		356
KX844630 R. CANINA	FIT	GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGGGG		324

ÚF11		CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCT	GTAAATAAGTTTATGG	189
KF723593 P. PERS. FIT.		CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCT	GTAAATAAGTTTATGG	480
MF092790 A. YELLOWS FIT.		CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCT	GTAAATAAGTTTATGG	451
ÚF7		CAATCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCT	GTAAATAAGTTTATGG	181
KX844634 P. DULCIS FIT		CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCT	GTAAATAAGTTTATGG	416
KX844630 R. CANINA	FIT	CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCT	GTAAATAAGTTTATGG	384

ÚF11		TCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGT	AAATAGATA	249
KF723593 P. PERS. FIT.		TCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGT	AAATAGATA	540
MF092790 A. YELLOWS FIT.		TCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGT	AAATAGATA	511
ÚF7		TCTAAGTGCAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGT	TGATAGATA	241
KX844634 P. DULCIS FIT		TCTAAGTGCAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGT	TGATAGATA	476
KX844630 R. CANINA	FIT	TCTAAGTGCAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGT	TGATAGATA	444

ÚF11		GGCAAGTGGAAATTCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATA	TGGAGGAACACCAGTAG	309
KF723593 P. PERS. FIT.		GGCAAGTGGAAATTCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATA	TGGAGGAACACCAGTAG	600
MF092790 A. YELLOWS FIT.		GGCAAGTGGAAATTCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATA	TGGAGGAACACCAGTAG	571
ÚF7		GGCAAGTGGAAATTCGTTGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATA	TGGAGGAACACCAGTAG	301
KX844634 P. DULCIS FIT		GGCAAGTGGAAATTCGTTGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATA	TGGAGGAACACCAGTAG	536
KX844630 R. CANINA	FIT	GGCAAGTGGAAATTCGTTGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATA	TGGAGGAACACCAGTAG	504

ÚF11		CGAAGGCGGCTTGCCTGGGCTCTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACACG		369
KF723593 P. PERS. FIT.		CGAAGGCGGCTTGCCTGGGCTCTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACACG		660
MF092790 A. YELLOWS FIT.		CGAAGGCGGCTTGCCTGGGCTCTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACACG		631
ÚF7		CGAAGGCGGCTTGCCTGGGCTCTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACACG		361
KX844634 P. DULCIS FIT		CGAAGGCGGCTTGCCTGGGCTCTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACACG		596
KX844630 R. CANINA	FIT	CGAAGGCGGCTTGCCTGGGCTCTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACACG		564

ÚF11		GATTAGATACCTCGTAGTCCACGCC	TAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAACCA	429
KF723593 P. PERS. FIT.		GATTAGATACCTCGTAGTCCACGCC	TAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAACCA	720
MF092790 A. YELLOWS FIT.		GATTAGATACCTCGTAGTCCACGCC	TAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAACCA	691
ÚF7		GATTATACCTCGTAGTCCACGCC	TAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAACCA	421
KX844634 P. DULCIS FIT		GATTAGATACCTCGTAGTCCACGCC	TAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAACCA	656
KX844630 R. CANINA	FIT	GATTAGATACCTCGTAGTCCACGCC	TAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAACCA	624

ÚF11		GTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTT		489
KF723593 P. PERS. FIT.		GTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTT		780
MF092790 A. YELLOWS FIT.		GTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTT		751
ÚF7		GTGTTGAAGTTAACACATTA-----		441
KX844634 P. DULCIS FIT		GTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTT		716
KX844630 R. CANINA	FIT	GTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTT		684

23. ábra: Az NCBI adatbázisban megtalálható 'Prunus dulcis' phytoplasma és 'Rosa canina' phytoplasma clone Ros-Z izolátumok szekvenciájának illesztése az ÚF7-es és az ÚF11-es minta szekvenciájával a Clustal Omega programban.

6. Összefoglalás, konklúzió

A PCR tesztek és a LAMP tesztek is azt mutatják, hogy a fitoplazmák sokszor alacsony koncentrációban vannak jelen a növényben, így kimutatásuk nem egyszerű. Ehhez hozzájárul, hogy a fitoplazmák mellett a baktériumoknak és gomba kórokozóknak is szerepük lehet a fák pusztulásában. Kutatásaink során mi is ezekkel a problémákkal szembesültünk.

Vizsgálatainkból kiderült, hogy a kajszibarack minták esetén nested PCR technikával a tünetmenteket mutató egyedek mindegyikében és két tünetmentesnek mutató fa mintájában is kimutatható volt a fitoplazma. Ezzel szemben a LAMP teszt eredménye azt mutatta, hogy csak a 3 fitoplazma gyanús falevele tartalmazta a fitoplazmát, és a 3 egészségesnek vélt pedig nem. A nested PCR érzékenyebb módszer, így lehetséges, hogy az ilyen koncentrációban jelenlévő fitoplazmát is kimutatja, azt is, amit a LAMP érzékenysége nem tesz lehetővé. Mivel azonban a tünetek előfordulásával a LAMP teszt eredménye egyértelműen korrelál, tehát ez a módszer alkalmas lehet az ESFY gyors detektálására.

Dolgozatomban ugyanezekkel a technikákkal vizsgáltam alma mintákat is. A nested PCR esetén jól látható volt, hogy a tünetmentes fákban nincs és a tünetet mutató fák esetén van PCR termék, így a fitoplazmák abban nem voltak kimutathatóak. Ezzel az eredménnyel megegyező következtetést vonhattunk le a LAMP tesztből is, azaz a 3 fitoplazma gyanús falevél esetén olyan jelet kaptunk a géptől, mint a pozitív kontroll, és ugyanez mondható el a 3 egészségesnek vélt növényről a negatív kontrollal kapcsolatban. Tehát itt elmondható, hogy mindkét eredmény jól korrelált a tünetekkel.

A meggy minták esetén kicsit más megközelítést használtunk, hiszen ebben az esetben nem tudtuk, hogy milyen fitoplazmát kell keresnünk. A fitoplazma jelenlétét, a kajszihoz, és az almához hasonlóan nested PCR reakcióval vizsgáltuk. Ebben az esetben, nem elégedtünk meg a PCR termék detektálásával, hanem tovább vizsgáltuk, és Sanger szekvenálással szeretnénk volna megbizonyosodni arról, hogy a kapott termék valóban fitoplazmáról keletkezett és nem egy melléktermék. A szekvenálást követő szekvenciaelemzés során az U3-U5 primerekkel amplifikált 3 mintából 2 esetben találtunk olyan régiót, ami *Prunus* specifikus fitoplazmával mutatta a legnagyobb hasonlóságot.

A szekvenálási technikák fejlődésének köszönhetően ma már különböző biológiai mintákból akár az összes kórokozó teljes metagenomja kimutatható. A szekvenáláshoz, baktériumok esetében a 16S rRNS régiót, gombák esetében pedig egy gomba specifikus rRNS-t kódoló szakasz ITS régiójának egy részét PCR reakcióban amplifikálják speciális, baktériumokra, vagy gombákra konzervatív régióra tervezett primerek segítségével. Ezzel a módszerrel készítik a metagenom szekvenáló könyvtárakat. Ezek szekvenálása után a kapott olvasatokat bioinformatikai módszerekkel elemezve nemzetség szinten megállapítható az adott minta baktérium, vagy gomba metagenomja.

A szekvenálási technikák fejlődésére egy másik jó példa az új, ún. „loop” szekvenálás, melyet az Illumina fejlesztett ki. Ezen technika során szintén baktérium vagy gomba specifikusan amplifikálják a mintát, szekvenálás előtt, de minden egyes DNS molekulát egy vonalkóddal jelölnek, így az adott DNS-hez tartozó vonalkód később visszakereshető. A vonalkódoknak köszönhetően a szekvenálási olvasatok összeilleszthetőek, így tehát a teljes 16S rRNS gén vagy gomba ITS régió szekvenálásra kerül. Ennek köszönhetően nemcsak faj szinten azonosíthatóak a mintában jelenlevő kórokozók, hanem azt is megtudjuk, hogy egy adott faj milyen gyakorisággal volt a mintában jelen, mivel a szekvenálás molekulánként történt.

A NAIK Molekuláris Növénykórtan Csoportja ezt az új módszert is kipróbálta, az általam vizsgált kajsziparack és alma mintákon, melyekhez én tisztítottam DNS-t a levelekből.

Mivel nem voltunk biztosak abban, hogy az általunk használt MACHEREY-NAGEL NucleoSpin® Plant II DNS tisztító kit alkalmas-e a növényi levelekben jelenlevő baktériumok és gombák DNS-ének kivonására, ezért további vizsgálat során a baktérium 16S és gomba ITS specifikus régiókra tervezett primerekkel teszteltük a vizsgálatba bevont mintáinkat egy teszt PCR reakcióval. Arra az eredményre jutottunk, hogy a tisztítás során a baktérium és gomba DNS is tisztítódik, és nem bomlik le, így ezek a minták alkalmasak a loop szekvenálásra.

A szekvenálás már a kajsziparack és alma minták esetében megtörtént, de a kiértékelésükre nem került még sor.

A vizsgálatok folytatása során érdekes lesz megtudni, hogy vajon a loop szekvenálás milyen hatékonysággal mutatja ki a fitoplazmákat, és ezek mellett milyen bakteriális és gomba kórokozók jelenlétét fedhetjük fel. Az adatok részletes elemzése után reméljük kiderül, hogy találunk-e olyan kórokozókat, melyek jelenléte, vagy csak a tünetet mutató, vagy csak az egészséges gyümölcsfákban van jelen és így esetleg szerepük lehet a tünetek megjelenésében, vagy az ültetvény pusztulásában.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni külső témavezetőmnek, Dr. Várallyay Évának, és konzulensemnek Nagyné Dr. Galbács Zsuzsannának azt a rengeteg időt, amit rászántak, hogy segítsék munkámat, mind elméleti, mind gyakorlati tudásuk átadásával. Köszönöm nekik, hogy részt vehettem ezen érdekes és új területen folytatott kutatásaikban. Készségesen és türelemmel válaszoltak minden technikai jellegű kérdésekre a diplomamunkám megírásával kapcsolatban.

Emellett szeretném megköszönni Demián Emesének és Baráth Dánielnek, akik bevezettek a molekuláris biológia labor rejtelmeibe és segítették gyakorlati munkámat.

Továbbá köszönettel tartozom belső témavezetőmnek Dr. Vértessy Beáta Tanárnőnek támogatásáért.

Szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak, akik egyetemi tanulmányaim során mindvégig mellettem álltak és lelki támaszt nyújtottak.

8. Irodalomjegyzék

- Ahrens, U. & Seemüller, E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82 (8). kötet, pp. 828-832.
- Audergon, J. M., 1997. Prospects for breeding apricot for resistance to diseases: sharka, bacteria and apricot chlorotic leafroll. *Italus Hortus*, 4. kötet, pp. 24-28.
- Berges, R., Rott, M. & Seemüller, E., 2000. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90(10), pp. 1145-1152.
- Bertaccini, A., 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Front. Biosci*, pp. 12:673-689.
- Bertaccini, A. & Duduk, B., 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent. *Phytopathol. Mediterr*, pp. 48: 355-378.
- Blomquist, C. & Kirkpatrick, B., 1218-1226. Frequency and seasonal distribution of pear psylla infected with the pear decline phytoplasma in California pear orchards. *Phytopathology*, 92 (11):.
- Bozsik, A., 2017. Gondolatok a csonthéjasok fitoplazmás pusztulásáról – rovarász szemmel. *Agrártudományi Közlemények*, Issue 2014/62, pp. 30-34.
- Carraro, L., Loi, N. & Ermacora, P., 2001. Transmission characteristics of the European stone. *Eur. J. Plant Pathol*, Issue 107 (7), pp. 695-700.
- Carraro, L. és mtsai., 1998. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *J. Plant Pathol.*, 80 (3):, pp. 233-239.
- Chabrolin, C., 1924. Quelques maladies des arbres fruitiers de la Vallée du Rhône. *Annales des Epiphyties* 10:, pp. 265-333.
- CONTALDO, N. és mtsai., 2012. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, p. 607–617.
- Danet, J. és mtsai., 2007. Imp and secY, two new markers for MLST (multilocus sequence typing) in the 16SrX phytoplasma taxonomic group. *Bull. Insectol.* 60:, pp. 339-340.
- Davis, R. & Sinclair, W., 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88 (12). kötet, pp. 1372-1376.
- Del Serrone, P. és mtsai., 1998. Occurrence of apple proliferation and pear decline phytoplasmas in diseased pear trees in Hungary. *J. Plant Pathol.*, pp. 53-58.

- Doi, Y., Teranakat, M., Yora, K. & Asuyama, H., 1967. Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches-broom, aster yellows, or paulownia witches-broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*, 33, pp. 259-266.
- Fialová, R., Navratil, M., Lauterer, P. & Navrkalova, V., 2007. 'Candidatus Phytoplasma prunorum': the phytoplasma infection of *Cacopsylla pruni* from apricot orchards and from overwintering habitats in Moravia (Czech Republic). *B. Insectol.*, 60 (2):, p. 183.
- Frisinghelli, C. és mtsai., 2000. *Cacopsylla costalis* (Flor 1861), as a vector of apple proliferation in Trentino. *J. Phytopathol.*, 148 (7-8):, pp. 425-431.
- Gundersen, D. és mtsai., 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas), a basis for their classification. *J. Bacteriol.*, 176:, pp. 5244-5254.
- Horváth, C., 2013. Csonthéjasokat veszélyeztet a fitoplazma. *Kertészet és Szőlészet* (62.) 2:, pp. 16-17.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group, 2004. Description of the genus 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54:, pp. 1243-1255.
- Jarausch, B. és mtsai., 2003. First report of *Cacopsylla picta* as a vector of apple proliferation phytoplasma in Germany. *Plant Dis.*, 87 (1):, p. 101.
- Jarausch, W., Lansac, M., Bliot, C. & Dosba, F., 1999. Phytoplasma transmission by in vitro graft inoculation as a basis for a preliminary screening method for resistance in fruit trees. *Plant pathol.*, 48 (2):, pp. 283-287.
- Jarausch, W. és mtsai., 2000. PCR-RFLP and sequence analysis of a non-ribosomal fragment for genetic characterization of European stone fruit yellows phytoplasmas infecting various *Prunus* species. *Mol. Cell. Probes.*, 14:, p. 171-179.
- Jensen, D., Schneider, H., Griggs, W. & Gonzales, C., 1964. Pear decline virus transmission by pear psylla. *Phytopathology*, 54 (11):, p. 1346.
- Kirkpatrick, B., 1992. Mycoplasma-like organisms, Plant and Invertebrate Pathogens.. *Prokaryotes*, eds. Springer-Verlag, New York, USA, pp. 4050-4067.
- Kiss, E., Mergenthaler, E., Kiss, B. & Viczián, O., 2015. A csonthéjasok európai sárgulása (ESFY) magyarországi terjedésének hátterében álló okok. *Horváth, J., Haltrich, A., Molnár, J. (szerk.). 61. Növényvédelmi Tudományos Napok*, február 17-18(60).
- Klement, Z., 1977. Bacterial canker and dieback disease of apricots (*Pseudomonas syringae* van Hall). *Bull. OEPP*, 7:, pp. 57-68.

Kövics, G. & Tarcali, G., 2015. A csonthéjasok növekvő veszélyben. <http://agroforum.hu/hirek/csonthejasok-novekvo-veszelyben>, Issue 2017. szeptember.

Lee, I.-M. D. R. a. G.-R. D., 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.*, pp. 54: 221-255.

Lee, I.-M., Gundersen, D., Davis, R. & Chirykowski, L., 1992. Identification and analysis of a genomic strain cluster of mycoplasma-like organisms associated with Canadian peach (eastern) X-disease, Western X-disease and clover yellow edge. *J. Bacteriol.*, 174, pp. 6694-6698.

Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. & Bertaccini, A., 1998. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88 (12):, pp. 1359-1366.

Lee, I.-M. és mtsai., 2004. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *Systematic and Evolutionary Microbiology*, Issue 54, pp. 1037-1048.

Marcone, C. & Gáborjányi, R., 1999. Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek. In: hely nélkül: Mezőgazda Kiadó, pp. 15-25.

Marcone, C., Jarausch, B. & Jarausch, W., 2010. 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agent of European stone fruit yellows: an overview. *J. Plant Pathol.*, 92:, pp. 19-34.

Marcone, C., Jarausch, B. & Jarausch, W., 2010. Candidatus Phytoplasma prunorum, the causal agent of European stone fruit yellows: an overview. *Journal of Plant Pathology* (2010), Issue 92, pp. 19-34.

Mattedi, L. és mtsai., 2007. Transmission of 'Candidatus Phytoplasma mali' by psyllid vectors in Trentino. *IOBC WPRS BULL.*, 30 (4):, p. 264.

Morvan, G., Castelain, C. & Arnoux, M., 1986. Prospective for the control of apricot chlorotic leaf roll, a mycoplasma disease, by cross protection. *Acta Hort*, Issue 193, pp. 359-366.

Namba, S. és mtsai., 1993. Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43:, pp. 461-467.

Osler, R. és mtsai., 1996. Le più importanti malattie da fitoplasmi nel Friuli- Venezia Giulia, Atlante. *Notiziario ERSA*, Anno IX, Sup- pl. 4, Luglio-Agosto 1996 (Arti Grafiche Friulane.).

Osler, R. & Loi, N., 1986. Apple proliferation disease. R.A. Cappellini, J.M. Wells (eds.). *Fastidious plant prokaryotes: cultivation, detection and associated economic problems*. ARS-USDA, pp. 59-73.

Rui, D., Ciferri, R. & Refatti, E., 1950. La virosi degli "scopazzi del melo" nel Veronese. *Not.Mal. Piante*, 13:, pp. 7-11.

- Schneider, B. & Seemüller, E., 1994b. Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (9):, pp. 3409-3412.
- Seemüller, E., 1990. Apple proliferation. In: Compendium of Apple and Pear Diseases. A. L. Jones and H. S. Aldwinkle, eds. APS Press, St. Paul, M , USA, pp. 67-68.
- Seemüller, E. & Foster, A., 1995. European stone fruit yellows. In: Ogawa J.M., Zehr E.I., Bird G.W., Ritchie D.F., Uriu K., Uyemoto J.K. (eds.).. *Compendium of Stone Fruit Diseases*, APS Press, St. Paul, MN, USA, pp. 59-60.
- Seemüller, E., Kartte, S. & Kunze, L., 1992. Resistance in established and experimental apple rootstocks to apple proliferation disease. *Acta Hort.*, 309:, pp. 245-251.
- Seemüller, E., Kiss, E., Süle, S. & Schneider, B., 2010. Multiple infection of apple trees by distinct strains of 'Candidatus Phytoplasma mali' and its pathological relevance. *Phytopathology*, 100 (9):, pp. 863-870.
- Seemüller, E. és mtsai., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.*, 80:, pp. 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54:, pp. 1217-1226.
- Seemüller, E. és mtsai., 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic Mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44:, pp. 440-446.
- Seemüller, E. és mtsai., 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic Mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44:, pp. 440-446.
- Suigo, A. & Hogenhout, A., 2012. The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects.. *Microbiology* (15.), pp. 247-254.
- Süle, S., 2012a. A kajszipusztulás fitoplazmás pusztulása. *Kertészet és Szőlészet*, 26:, pp. 12-13.
- Süle, S., 2012b. Mitől pusztulnak a kajszipusztulások?. *Mezőhír*, 9:, pp. 64-66.
- Süle, S., 2014. Kajszipusztulás és az ellene való védekezés. *Növényvédelem*, pp. 50 (1): 23-25. p..
- Tedeschi, R. & Alma, A., 2006. Fieberiella florii (Homoptera: Auchenorrhyncha) as a vector of "Candidatus Phytoplasma mali". *Plant Dis.*, , 90 (3). kötet, pp. 284-290.
- Tedeschi, R., Bosco, D. & Alma, A., 2002. Population dynamics of Cacopsylla melanoneura (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. *J. Econ. Entomol.*, Issue 95 (3), pp. 544-551.

8.1. Ábrajegyzék

1. ábra: Fitoplazma által okozott tünetek: A: Meggyfa sárguló levelei B: Meggyfa levelei a színük felé kanalasodnak C: Meggyfa levelei barnás elszíneződései D: Meggyfa részleges elhalása (Fotó: Baráth Dániel).....	4
2. ábra: Levélbolhák életciklusa (http1).....	6
3. ábra: Aranka (Cuscuta) (http2).....	7
4. ábra: Fitoplazma mikroszkópikus képe (http3).....	8
5. ábra: Candidatus Phytoplasma prunorum fitoplazma által okozott tünetek: A: Kajszi háncs narancssárga-barna elszíneződése B: A beteg kajszi sárguló levelei, a színük felé kanalasodnak C: Kajszi fa részleges ágelhalása D: A teljes fapusztulás	10
6. ábra: Candidatus Phytoplasma legjellemzőbb tünetei: A: Alma „boszorkányseprűsödés”, kisebb gyümölcs B: Kanalasodó levelek C: Pállhalevelek D: Kontrollálatlan virágzás (Fotó: Molekuláris Növénykórtan csoport)	12
7. ábra: A fitoplazma 16rRNS operonjának grafikus ábrázolása, a PCR kimutatáshoz használt oligonukleotid primerek feltüntetésével.....	14
8. ábra: LAMP vázlatos folyamatábrája (http5).....	16
9. ábra: A Thermo-Fischer scientific 100 bp Plus DNS markerének beosztása	21
10. ábra: Kajszi minták DNS kivonatainak képe 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után.	25
11. ábra: Kajszi minták DNS kivonásainak PCR analízise P1-P7 általános fitoplazma primereket használva, 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után M: Marker:100 bp Plus K-: templát helyett desztillált vizet használtunk	26
12. ábra: Kajszi minták DNS kivonásainak nested PCR analízise P1-P7 általános fitoplazma specifikus és fO1-rO1 16SrX csoportspecifikus primereket használva, 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után M: Marker:100 bp Plus K-: templát helyett desztillált vizet használtunk	27
13. ábra: LAMP teszt eredménye kajszi mintáknál	28
14. ábra: Alma minták DNS kivonatainak képe 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után.	29
15. ábra: Alma minták DNS kivonásainak nested PCR analízise P1-P7 általános fitoplazma specifikus és fO1-rO1 16SrX csoportspecifikus primereket használva, 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után M: Marker:100 bp Plus K-: templát helyett desztillált vizet használtunk	30
16. ábra: LAMP teszt eredménye alma mintáknál	31
17. ábra: DNS kivonatok képe 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után.....	32
18. ábra: Meggy minták DNS kivonásainak nested PCR analízise P1-P7 általános fitoplazma specifikus és U5-U3 univerzális primereket használva, 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után M: Marker:100 bp Plus K+: fitoplazma pozitív kajsziбарack minta K-: templát helyett desztillált vizet használtunk	33
19. ábra: Meggy minták DNS kivonásainak nested PCR analízise P1-P7 általános fitoplazma specifikus és R16mF2-R16mR1 16SrX csoportspecifikus primereket használva, 1,2 %-os agaróz gélen való elválasztás után M: Marker:100 bp Plus K+: fitoplazma pozitív kajsziбарack minta K-: templát helyett desztillált vizet használtunk ..	35

20. ábra: Tisztított meggy minták képe 1,2 %-os agaróz gélen A: visszaizolálás előtt B: visszaizolálás után.....	36
21. ábra: Az NCBI adatbázisban megtalálható 'Prunus dulcis' phytoplasma és 'Rosa canina' phytoplasma clone Ros-Z izolátumok szekvenciája és az ÚF7-es minta szekvenciáinak illesztése Clustal Omega programmal.	38
22. ábra: Az NCBI adatbázisban megtalálható 'Prunus dulcis' phytoplasma és 'Rosa canina' phytoplasma clone Ros-Z izolátumok szekvenciája és az ÚF11-es minta szekvenciáinak illesztése Clustal Omega programmal.	39
23. ábra: Az NCBI adatbázisban megtalálható 'Prunus dulcis' phytoplasma és 'Rosa canina' phytoplasma clone Ros-Z izolátumok szekvenciájának illesztése az ÚF7-es és az ÚF11-es minta szekvenciájával a Clustal Omega programban.....	41

8.2. Táblázatjegyzék

1. táblázat: PCR reakcióhoz használt oligonukleotidok bázissorrendjei.....	19
2. táblázat: LAMP teszthez használt oligonukleotidok bázissorrendjei.....	22
3. táblázat: Kajsziarack mintákból tisztított DNS koncentrációja	24
4. táblázat: LAMP teszt eredménye kajszi mintáknál	28
5. táblázat: Alma mintákból tisztított DNS koncentrációja	29
6. táblázat: LAMP teszt eredménye alma mintáknál	31
7. táblázat: Újfehértói fürtös minták nested PCR eredményeinek összegzése.....	34