

DIPLOMADOLGOZAT

GALOVICS ATTILA
Növényvédelmi szakmérnök

Keszthely
2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Georgikon Campus
Növényvédelmi szakmérnöki Szak

A DOLGOZAT CÍME

Belső konzulens: Dr. Keresztes Balázs
Beosztás: adjunktus

Külső konzulens: Nagyné dr. Galbács Zsuzsanna
Beosztás: tudományos munkatárs

Készítette: Galovics Attila
Neptun kód: VL4PC5
Tagozat: levelező

Intézet/Tanszék: Növényvédelmi Intézet

Készthely
Év: 2023

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. <i>CACOPSYLLA PRUNI</i> RENDSZERTANI BESOROLÁSA.....	6
2.2. LEVÉLBOLHÁK TESTFELÉPÍTÉSÉNEK JELLEGZETESSÉGEI	7
2.3. LEVÉLBOLHÁK TÁPLÁLKOZÁSA.....	9
2.4. LEVÉLBOLHÁK SZAPORODÁSA.....	9
2.5. ÉLETCIKLUSUK ÉS EGYEDFEJLŐDÉSÜK.....	10
2.6. KÁRTÉTELÜK.....	11
2.7. <i>A CACOPSYLLA PRUNI</i> ELŐREJELZÉSE.....	11
2.8. A FITOPLAZMÁK TULAJDONSÁGAI	12
2.8.1. A fitoplazmák rendszertani besorolása	13
2.8.2. A fitoplazma fejlődésmenete	14
2.8.3. A <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> által okozott tünetek	15
2.9. VÉDEKEZÉS	15
2.10. A FITOPLAZMÁK KIMUTATÁSA.....	18
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	20
3.1. MINTAVÉTELI TERÜLETEK KIVÁLASZTÁSA	20
3.1.1. Balaton-fruit Kft – Balatonvilágos.....	20
3.1.2. Barackvirág farm, Székesfehérvár-Csala.....	21
3.1.3. Dávid Sándor – Iszkaszentgyörgy:.....	22
3.2. <i>CACOPSYLLA PRUNI</i> GYŰJTÉSÉRE ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	23
3.2.1. Gyűjtés kopogtatással	23
3.2.2. A kopogtatás módja és a minták tárolása.....	25
3.2.3. A rovarminták mikroszkópos azonosítása.....	25
3.2.4. Gyűjtés színcsapdákkal	25
3.2.5. Gyűjtés hullámpapír övvel	26
3.3. NÖVÉNYI MINTÁK GYŰJTÉSE.....	26
3.3.1. Levélminták gyűjtése.....	26
3.3.2. Gyökérminták gyűjtése	28
3.4. ALKALMAZOTT LABORATÓRIUMI MÓDSZEREK	29
3.4.1. DNS tisztítás (növény, rovar mintákból)	29
3.4.2. Agarózgél öntése és a DNS futtatása	30
3.4.3. Nyers növényi kivonat készítése Plant Material Lysis Kittel.....	30
3.4.4. LAMP vizsgálat.....	31
4. VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	33
4.1. KOPOGTATÁSOS ROVARGYŰJTÉS EREDMÉNYE	33
4.1.1. Rovargyűjtés a balatonvilágosi ültetvényben	33
4.1.2. Rovargyűjtés a csalai ültetvényben.....	34
4.1.3. Rovargyűjtés az iszkaszentgyörgyi ültetvényben.....	36
4.1.4. Rovargyűjtés örökzöldekről	36
4.2. RAGACSLAPPAL ÉS HERNYÓFOGÓ ÖVVEL TÖRTÉNŐ ROVARGYŰJTÉSEK EREDMÉNYE...36	
4.2.1. Gyűjtés ragacslappal.....	36
4.2.2. Gyűjtés hullámpapír övekkel	37

4.3.	MOLEKULÁRIS GENETIKAI MÓDSZEREKKEL VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI	37
4.3.1.	Fitoplazma DNS analízise qPCR-rel	37
4.3.2.	Levél DNS analízis Optigene Genie III-mal.....	41
4.3.3.	DNS kivonás levélből Plant Material Lysis kittel.....	41
4.3.4.	DNS kivonás gyökérmintákból	43
4.3.5.	DNS kivonás rovarmintákból.....	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
5.	KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....	49
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	51
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	52
7.	SZAKIRODALOM JEGYZÉKE	53
8.	ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	59
9.	MELLÉKLET.....	60

1. Bevezetés és célkitűzés

A fitoplazmák világszinten okoznak problémát az állókultúrákban, hiszen számos gazdaságilag jelentős növényt képesek megbetegíteni, ami nemcsak terméseszkében nyilván meg, hanem legtöbbször az adott kultúra pusztulását okozza. Nem csak a szőlőskertekben jelentenek megoldhatatlannak tűnő gondot, de az almatermésűekben és a csonthéjasokban is. Magyarországon az 1990-as évek óta ismert, hogy a kajszi gutaütésszerű pusztulásáért nem egyedül a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* baktérium és a *Cytospora cincta* gomba kettőse felelős. Az ezredfordulóig keveset sikerült megtudni a csonthéjasok európai sárgaság fitoplazmáról (ESFY), de a PCR felfedezésével a fitoplazma kutatásban is jelentős előrelépés történt. Genomszerkezetük még mindig nem teljesen tisztázott, azonosításuk jelenleg is tart, többek között ezért is használják nevében a „Candidatus” előtagot. Az ESYF (European Stone Fruit Yellows), melynek kórokozója a *Ca. Phytoplasma prunorum* növényvédelmi szerepe jelentős, komoly gazdasági károkozásra képes a kajszi ültetvényekben, éves szinten akár 20%-ot meghaladó pusztulást is okozhat. Évekig tünetmentesen lappanghat, fertőzési forrásként szolgálva az egészséges növényekre, a betegség ellen nincs kidolgozott növényvédelmi technológia, vagy engedélyezett növényvédő szer. Kártételére molekuláris genetikai vizsgálat nélkül csak évek múlva derül fény, az ültetvény fitoplazma fertőzés miatt történő felszámolására akár a gazdasági megtérülési idő előtt is sor kerülhet.

A *Ca. Phytoplasma prunorum* terjedése vegetatív úton és rovarvektorok által lehetséges. Kajsziarack esetében a betegség vektora a szilvalevélbolha (*Cacopsylla pruni*). A *Cacopsylla pruni* biológiájának egyes pontjai szintén tisztázásra szorulnak. Szakdolgozatomban a *Ca. Phytoplasma prunorum* és a *Cacopsylla pruni* kapcsolatát vizsgáltam. Célkitűzéseim között szerepel a vektor betelepülésének és egyedszámváltozásának megfigyelése a kiválasztott ültetvényben különféle csapdázási eszközökkel, továbbá a szilvalevélbolha és a kajsziarackfák fitoplazmával való fertőzöttségének megállapítása molekuláris genetikai módszerekkel.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. *Cacopsylla pruni* rendszertani besorolása

Vizsgálatom tárgya a *Cacopsylla pruni* (Scopoli, 1763) csonthéjasok levélbolhája, vagy másnéven szilva levélbolha. A továbbiakban *C. pruni* néven kerül említésre. A rend szinte minden tagja fitofág, a *C. pruni* a csonthéjasok floémjének szívogatása mellett (RIPKA, 2008) vektora a *Candidatus Phytoplasma prunorum*nak, ami a csonthéjasok európai sárgulás fitoplazmáját (ESFY) okozza (CARRARO ÉS MTSAI, 1998).

A magyar psyllid-kutatás történetében Horváth Géza tevékenysége (1880, 1886, 1897, 1907, 1915) volt jelentős. Feltárta 87 faj előfordulását az Osztrák-Magyar Monarchia határain belül. Közülük 52 fajt azonosítottak a mai Magyarország területén (RIPKA, 2008).

Régebbi besorolás szerint a kabócák (*Hemiptera*) rendjének, levélbolhák (*Psyllinea*) alrendjébe tartoztak (SOÓS, 1984). Burckhardt 2007-es - és egyben talán a legelfogadottabb - besorolását követve a félfedeles szárnyúak (*Hemiptera*) rendjének, a növényi tetvek (*Sternorrhyncha*) alrendjének *Psylloidea* öregcsaládjába tartoznak. Nevük a bolha görög megfelelőjéből származik, mely utalás arra, hogy ügyesen ugranak (RIPKA, 2010). Az eddig leírt 900.000 rovar közül csaknem 95.000 a *Hemipterák* közé sorolható fajok száma (GULLAN ÉS CRANSTON, 2005). Ebből mintegy 3000, melyet a levélbolhák tesznek ki (Internet_a1, 2002). A legújabb kutatások szerint a *Psylloidea* öregcsalád 6 családból áll: *Calophyidae*, *Carsidariae*, *Homotomidae*, *Phacopteronidae*, *Psyllidae* és *Triozidae* (GULLAN ÉS MARTIN, 2003), (Internet_a2, 2005), (Internet_a3, 2007). Kozmopoliták, a világon gyakorlatilag mindenhol fellelhetőek, világszerte több mint 3000 fajuk ismert 235 nemzetségben (RIPKA, 2009). A *Psylloidea* öregcsalád Magyarországon 3 családból (*Calophyidae*, *Psyllidae* és *Triozidae*), ezeken belül 20 nemzetségből áll. A fenti családokba tartozó 67 fajt, 24 növényi család 98 gazdanövényén találták meg. A *Cacopsylla* nemzetség képviseli messze a legtöbb fajt, szám szerint 18-at (RIPKA, 2008). Legközelebbi rokonaik a levéltetvek, a liszteskék és a pajzstetvek (KRISTOFFERSEN, 2003). Egytől egyig fitofágok, de gazdasági kártételt világviszonylatban csak mintegy 40 fajuk okoz (Internet_a2, 2005).

2.2. Levélbolhák testfelépítésének jellegzetességei

Első ránézésre leginkább kabócákra emlékeztetnek (RIPKA, 2010). Apró, törékeny 1-10 mm nagyságúak (Internet_a1, 2002), fejük szélessége meghaladja annak hosszúságát, melyen oldalt álló nagy szemek ülnek. A *C. pruni* 2,5-3mm-nél nem nagyobb, a hímek kisebbek, mint a nőstények. Fedőszínük, akárcsak más levélbolhák esetében, az életük során változik. A fiatal imágók színe sárga, sárgás-narancssárga, mely a tél végére barna, barnás-feketére változik.

Az összetett szemek tövében eredő csápok előtt diagnosztikai bélyeg értékű pofakúpok találhatóak. A csáp 10 ízű, az utolsó ízén 2 hosszabb végserte található, a *C. pruni* esetében a csápok 1,75 mm-nél rövidebbek.

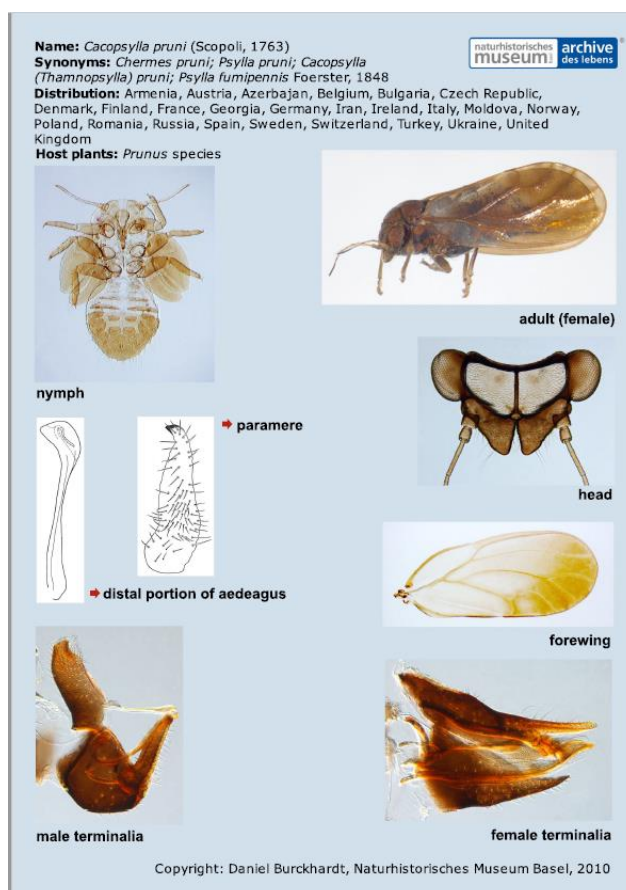
Tápnövény azonosításban, a színlátásban, valamint a táplálékból származó kémiai anyagok azonosításában játszanak szerepet. Imágók mindig 2 pár - gyéren, de erősen erezett - szárnnal rendelkeznek, melyek közül az elülsők jelentősen nagyobbak, mint a hátsók. Nyugalmi állapotban potroh felett sáttortetőszerűen tartják. Az elülső szárnyon található karér, a könyökér (egyes szerzők szerint középér), az abból eredő sugárerek, valamint a karér és a szárny elülső éle által határolt terület -szárnyjegy- fontos határozóbélyeg. A *C. pruni* elülső szárnyai hosszabbak, mint 3 mm, jól látható csúcsi szegély nélkül, opálosan, füstszzerűen sötétek, rajta narancsbarna színezettség látható, mely a szárny széle felé sötétedik.

Nem számítanak jó repülőknél, de akár 13 km-t is tudnak repülni a telelőhely felkeresése céljából, mely távolság jelentősen befolyásolt az időjárási tényezők által. A tápnövény keresése már jóval kisebb sugárban történik, ebből a célból ritkán repül 1,5 km-nél messzebbre.

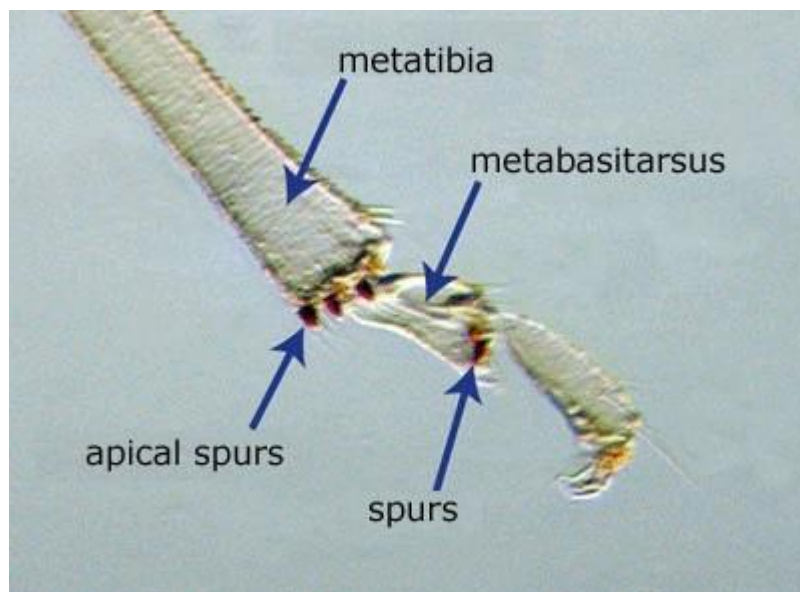
A 3 pár lábból a harmadik pár erős ugrólábbá fejlődött. A csípő erős, rajta ugrást segítő sarkantyú található. A **térdén**, a lábszárvégen, valamint a lábfej első ízén további sarkantyúk találhatóak, melyek amellet, hogy az ugrást segítik, a fajok meghatározásánál is jelentőséget nyernek. A hátsó lábak lábszárán térdtüske van. A *Cacopsylla* nemzetségre jellemző, hogy a metatarsuson 5, míg a metabasitarsuson 2 sarkantyú található. A hím szubgenitális lemeze csúcsi végén lekerekített, míg a nőstényé oldalról nézve folyamatosan keskenyedik (RIPKA, 2010, SOÓS, 1984, BOZSIK, 2014, (Internet_a4, 2010)).



1. ábra *Cacopsylla pruni* nőstény (balra) és hím (jobbra). Forrás: (Internet_a5, 2022)



2. ábra: *C. pruni* meghatározó bélyegei. Forrás: (Internet_a6,)



3. ábra: *Cacopsylla* nemzetségre jellemző hátsó láb jellegzetességei. Forrás: (Internet_a7, 2010)

2.3. Levélbolhák táplálkozása

Idejük nagy részét táplálkozással töltik. A levélbolhák „**kitűnő botanikusok**” (HORVÁTH, 1886) legtöbbjük csak egy tápnövényre specializált, míg mások -például a *C. pruni*- oligofágok. A szilva levélbolha megtalálható kökényen (*Prunus spinosa*), szilván (*Prunus domestica*), cseresznyeszilván, mirabolánon, népi nevén „**fosókán**” (*Prunus cerasifera* spp. *divaricana*), kökényszilván vagy damsonszilván (*Prunus insitita*), zselnicemeggyen (*Prunus padus*) őszibarackon (*Prunus persicae*) valamint kajszin (*Prunus armeniaca*). Legszívesebben a kökényt szívogatják (FIALOVA ÉS MTSAL, 2004). Levelek fonákán, hajtásokon, virágokon, vagy a fásszárú növények kérgén tartózkodnak. Szívogatásukkal néhány faj kivételével -amikor is gubacs képződik- szembetűnő károkat nem okoznak. A hőmérséklet emelkedésével kevesebb egyed található a *Prunus* fajokon, ezek a nyár elején visszarepülnek a fenyőkre és a tél beálltaig a fenyőtűkön élnek (JARAUSCH ÉS MTSAL, 2000, RIPKA, 2010, SOÓS, 1984, HORVÁTH, 1886, SÜLE 2014a, LEPRES ÉS MTSAL, 2018).

2.4. Levélbolhák szaporodása

Váltivarúak, megtermékenyítéssel szaporodnak, a levélbolhák között a szűznemzés csak bizonyos fajok esetén fordul elő. A potrohvég kilencedik szelvénye módosult, a nőstényeknél tojócsővé, a hímeknél kampós horgas nyúlvánnyá, ami maga a hím ivarszerv, mely a tizedik portohszelvénnel

együtt -akár csak a pofakúpok és sarkantyúk esetében- a faji meghatározást segítik. A nőstény szubgenitális lemeze oldalról nézve folyamatosan keskenyedik. A nőstények -akárcsak a lepkék esetében- feromont bocsájtanak ki a párosodás megkönnyítésére. A legtöbb levélbolha faj a megtermékenyítést követően petéiket levelekbe, kéregrepedésbe, rügyek mellé, vagy virágokba tojják, de a szilvalevélbolha esetében a nőstények tojásaikat a levélnyélre és a levél fonákára, illetve színére helyezik. A tojás mennyisége fajtól függően 20 -2500 közötti (RIPKA 2010, BOZSIK, 2014).

2.5. Életciklusuk és egyedfejlődésük

A szilvalevélbolha oligofág egynemzedékes kártevő, de van egy viszonylag hosszú periódus, mikor középhegységeken fenyőféléin is megtalálható (BOZSIK, 2014). A kelés ideje azoknál a *Cacopsylla* fajoknál melyek telelése tojás alakban történik, szinkronban van a növény tavaszi kihajtásával (RIPKA, 2010). A *C. pruni* esetében a telelés imágó alakban, a nyári időszakban a fenyőfélére elsősorban lucfenyőre történő vándorlással történik (Internet_a5, 2022), majd kora tavasszal visszavándorolnak a vad és termesztett *Prunus* fajokra, ahol párosodnak, majd megtörténik a tojásrakás. Az egyelőre nem ismeretes, hogy a fenyőféléken folytatnak-e táplálkozást (KONTSCHÁN és RIPKA, 2019). A tavaszi visszavándorlás mindig az időjárás függvénye, mely jellemzően márciusban következik be. Kezdetben az ültetvény környezetében található kőkenybokrokra (*Prunus spinosa*) telepednek meg, melyek nyugalmi időszaka hamarabb véget ér, mint más *Prunus* fajoké, valamint a *C. pruni* szempontjából a legkedveltebb vad tápnövénynek számít, majd innen vándorolnak az ültetvénybe. (Internet_a5, 2022). Francia adatok alapján az ültetvényekből gyűjtött *C. prunik* több, mint a fele alanyсарjakról származott. Ez azt mutatja, hogy a sarjak fontos táplálkozó- és szaporodóhely. A tapasztalatok szerint a diapauzából visszatérő szilvalevélbolhák populációja március áprilisban ér el a maximumot és május első felében pusztulnak el, majd az új generáció kora nyáron hagyja el az ültetvényt (LICHOU ÉS JAY, 2012). Az ültetvénybe betelepülő levélbolhák fitoplazmával való fertőzési képességéről ellentmondásos nézetek vannak. SÜLE (2014a) álláspontja szerint a tavasszal visszatelepülő egyedek „igen fertőzőképesek”, mert a nyugalmi állapot során a fitoplazma a rovarban tovább szaporodik. Ezt erősíti meg LICHOU ÉS JAY (2012) is. Ezzel szemben CARRARO ÉS MUNKATÁRSAI, (2001) Olaszországban 8,6%-os, JARAUSCH ÉS MUNKATÁRSAI, (2008) Németországban 2-3%, THÉBAUD ÉS MUNKATÁRSAI (2009) Franciaországban 0,5-0,6%, tavaszi fertőzöttségről adnak számot.

A pete a növényi szövetből nedvességet vesz fel, melyből hemimetabolizmussal fejlődő, az imágóra nem hasonlító, három pár lábú lárva kel ki. Az 1-3. stádiumot lárvának, a 4-et előnimfának, az 5-et nimfának hívjuk. A lárvák lábai rövidek, a test mérete és a csápízek száma lárva stádiumonként nő,

legtöbbször csak az L1-2 stádium egyedei képesek helyváltoztatásra. A nimfa stádiumban a hátsó lábpáron már kifejlődnek a sarkantyúk és az ivari megkülönböztetés is ebben a stádiumban lehetséges először (RIPKA, 2010).

2.6. Kártételük

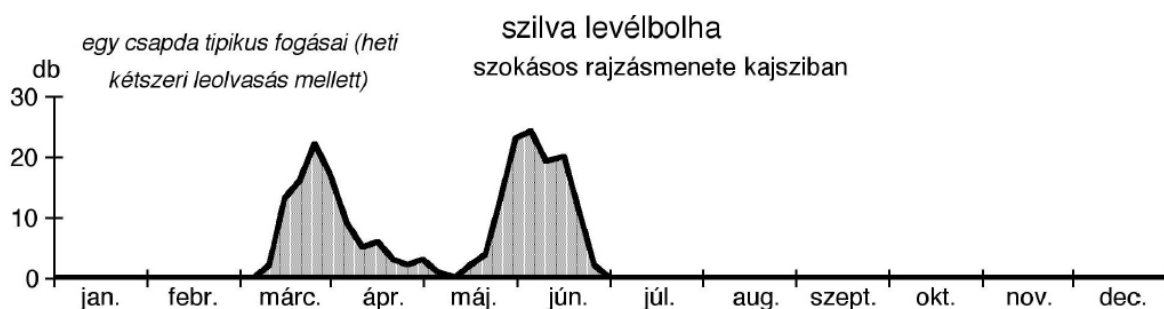
A levélbolhák lárvái, nimfái és a kifejlett egyedei is növényi nedveket szívogatnak, oly módon, hogy szipókájukkal a bőrszövetet megsebzik és a szállított növényi nedveket szívják a sejtközi járatokból. A legtöbb levélbolha faj imágójának a kártétele elenyésző, a *Cacopsylla pyrisuga* körtén és a *Cacopsylla mali* almafán történő nagymértékű elszaporodása hajtás torzulást okoz. Nagyobb mértékű közvetlen kártételért a lárvák a felelősek. Több fajuk esetén (pl.: *Cacopsylla pyri*), amennyiben a táplálkozás során felvett, főleg szénhidrát típusú táplálék mennyisége meghaladja a szükségleteiket, a felesleget ürülék formában kiválasztják. Ezt méhek, darazsak, hangyák és legyek is gyűjthetik. A ragacsos mézharmaton korompenészt okozó gombák telepedhetnek meg, melyek az esztétikai kártétel mellett a fotoszintetizáló felületet jelentősen csökkenthetik (HORVÁTH, 1884, RIPKA 2010).

2.7. A *Cacopsylla pruni* előrejelzése

Cacopsylla pruni a nehezen előrejelezhető fajok közé sorolható, keveset tudunk a pontos telelési körülményeiről. A legkézenfekvőbb mód az előrejelzésükre a kopogtató ernyővel történő megfigyelés, így nyomon követhetjük a betelepülésük sebességét. A fagyok elmúltával kopogtató ernyővel és egy bottal végig járjuk az ültetvényt. A vágásokra mért ütésekkel a levélbolhák és más károsítók az ág alá tartott ernyőbe hullanak. Pár év alatt tapasztalatot szerezhetünk a betelepülés irányáról. Kora tavasszal az ültetvénybe való betelepülésük előtt célszerű az ültetvényeken kívül található kökénybokrokat vizsgálni, mert a kökény korábbi fakadása miatt ott a *C. pruni* hamarabb megjelenik. Szintén érdemes figyelni a galagonya levélbolha (*Cacopsylla melanoneura*) megjelenését, mert ezen faj a szilvalevélbolha előtt nagyjából egy héttel jelenik meg (Internet_a5, 2022).

Szignalizációra szintén megfelelő eredményt adnak a ragacslapok. Mergenthaler és Viczián (Internet_a5, 2022) javaslata szerint a sárgalapos megfigyelés a szilvalevélbolhák mind tavaszi visszatelepülésére, rajzására, mind pedig az egyedszámuk alakulásának detektálására alkalmas. Az ATK Növényvédelmi Intézete, az által forgalmazott Csalomon színcsapdák leírásában szintén a ragacslapok hasznossága mellett érvel. Összehasonlító vizsgálatot végeztek, hogy a sárga, a fehér és

a zöldessárga ragacslapok milyen vonzó képességgel bírnak a *C. pruni* faj egyedeire. A sárga 50%-kal többet, míg a fehér ragacslap 2,5x több *C. pruni* egyedet fogott, mint a zöldessárga (Internet_b10,). A sárga, vagy egyéb színű színcsapdákhoz képest a fehér hatékonyabb bizonyul, mert szilvalevélbolhák ültetvénybe való betelepülését előbb jelzi, és a többi színnel szemben jelentősen többet egyedet fog (BODNÁR, 2022). Legalkalmasabb március elején a fák déli oldalán, 1,5-2 m magasságban kihelyezni a ragacslapokat. A hatékonyságukat 6-8 hétig képesek megőrizni, de mivel a fehér ragacslap a *C. pruni* kívül a *Hoplocampa* és egyes *Diptera* fajokra is vonzó hatással van, így a lapokat célszerű pár hetente cserélni. Rajzáscsúcsokra időjárástól függően március végén és június elején számíthatunk (Internet_a5, 2022), (Internet_b10,).



4. ábra: Szilva levélbolha rajzásmenete. Forrás: (Internet_b10,)

2.8. A fitoplazmák tulajdonságai

A csaknem 3000 levélbolha faj közül számos különböző növénybetegségeket, mint vírust, baktériumot, fitoplazmát terjeszt (Internet_a2, 2005). A fitoplazmákat természetes közegükben a rovarok terjesztik, ezek a *Cicadellidae*, *Cixiidae*, *Psyllidae*, *Delphacidae* és *Derbidae* családokba tartoznak (WEINTRAUB ÉS BEANLAND, 2006). Egyéb módon oltással, szemzéssel és fertőzött szaporítóanyaggal történhet terjedésük. MARCONE ÉS MUNKATÁRSAI (1997) beszámoltak arankával (*Cuscuta odorata*) történő fitoplazma átvitelről is.

Még a 2010-es évek elején is úgy gondolták, hogy a csonthéjasok legsúlyosabb betegségét, a csonthéjasok európai sárgasága fitoplazmát (*European Stone Fruit Yellow*s, ESFY) a kabócák terjesztik (DÉR ÉS MTSAI, 2002). Ellenben más kutatók, mint CARRARO ÉS MUNKATÁRSAI (1998 és 2001), valamint JARAUSCH ÉS MUNKATÁRSAI (2000) úgy vélték, hogy a fitoplazma terjesztésében a kabócák szerepe elenyésző és helyettük a *C. pruni* vektor szerepét vélték bizonyíthatónak, mivel kabócákban gyakorlatilag nem találták meg a kórokozót. SÜLE (2014a) egyenesen úgy fogalmazott, a betegség terjesztői kizárólag a levélbolhák. A fitoplazma a vektor segítségével növényi szállító szövetbe jutva

a növényben szétterjed, és felélve a növény tápanyagait sárgulás, sodródás és torzulás következik be, a termés minősége és mennyisége romlik, a hancsszövet elhal, melynek következtében a fertőződött fásszárú növény részben, vagy teljesen, de menthetetlenül gutaütésszerűen elpusztul (SÜLE, 2014a, DÉR ÉS MTSAI, 2003). A frissen elpusztult fák hancsszövege kezdetben narancssárga, később világosbarna, de ellentétben a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* tüneteivel, az ESFY sosem jár mézgaképződéssel (SÜLE, 2014b). A téli időszakban spontán rügyfakadás, ennek következtében fagykárosodás jelentkezhet. Magyarországon először Süle és munkatársai figyeltek fel rá az 1990-es évek elején, bár akkor még vírus tüneteknek vélték. Csupán 5 évvel később sikerült fitoplazmaként azonosítani és publikálni (SÜLE ÉS MTSAI, 1997, VICZIÁN ÉS MTSAI, 1997). 1993-ban sikerült kapcsolatot találni, hogy a levelek sárgulását nem a vírusok, hanem mikoplazmaszerű szervezetek okozzák, melyeket - utalva a növényt megbetegítő képességére - fitoplazmáknak neveztek el (GUNDERSEN ÉS MTSAI, 1994). A fitoplazmák egyfajta sejtfal nélküli baktériumok, méretük 500nm körüli, genom méretük 500 és 1000 kb közé esik (SÜLE, 2014a)

SEEMÜLLER és MUNKATÁRSAI (2004) publikációjukban rámutat, hogy az almafa boszorkányseprűsödését okozó *Ca. Phytoplasma mali*, a körte leromlást okozó *Ca. Phytoplasma pyri*, valamint a csonthéjasok európai sárgaságát okozó *Ca. Phytoplasma prunorum* 16S rDNS szekvenciája közel azonos. Ezalapján mindhárom a 16S rX csoport tagja (LEE ÉS MTSAI, 2007). Mivel a kórokozók genetikailag nehezen különíthetők el egymástól és a Koch-féle posztulátum szerint tiszta tenyészetbe sem sikerült hozni, így a „Candidatus” előtag, mint ideiglenes rendszertani státusz illeti meg őket (IRPCM, 2004). Jelenleg több, mint 46 különböző *Ca. Phytoplasma* fajt tartanak nyilván (SÜLE, 2014b)

2.8.1. A fitoplazmák rendszertani besorolása

Ország: Bacteria

Törzs: Firmicutes

Osztály: Mollicutes

Rend: Acholeplasmatales

Család: Acholeplasmataceae

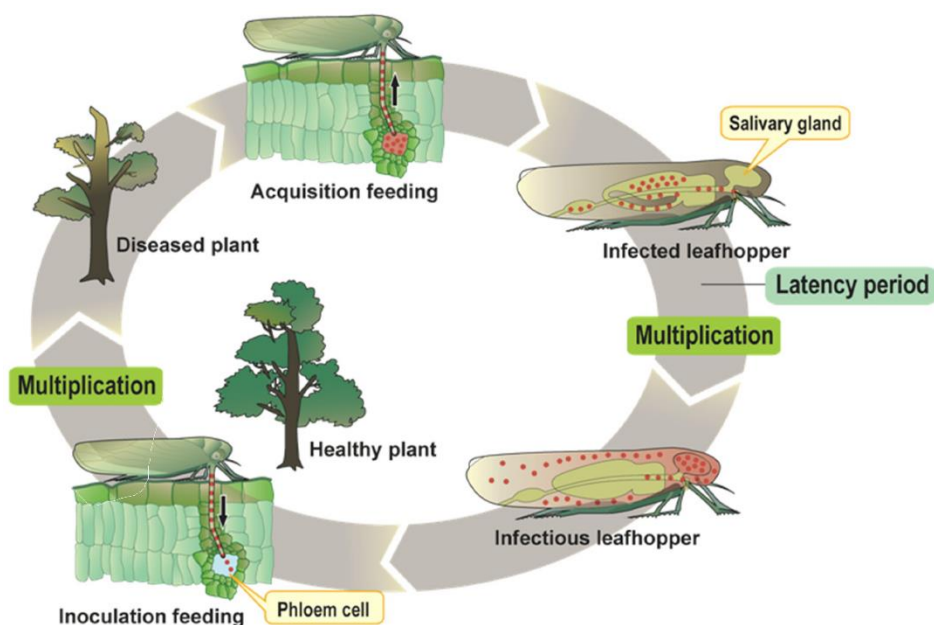
Nemzetség: Phytoplasma

Faj: Candidatus Phytoplasma prunorum (Internet_a8,)

Ca. Phytoplasma prunorum nemcsak a kajsziiban, de a cseresznyén, meggyen, szilván és őszibarackban is megtalálható (HORVÁTH, 2013).

2.8.2. A fitoplazma fejlődésmenete

A kórokozó obligát létéről megoszlanak a kutatások. AKIKO ÉS MUNKATÁRSAI (2012) fogalmazták meg, hogy a fitoplazmák obligát paraziták, vagyis csak élő szövetben képesek fennmaradni, és egyedülálló módon nem csak a növényi floémában, de a rovarban is képesek perzisztens módon szaporodni. CONTALDO ÉS MUNKATÁRSAI (2012) beszámoltak arról - cáfolva a kórokozó pusztán obligát fennmaradását -, hogy laboratóriumi körülmények között, táptalajon is sikerült tenyészteni. CARRARO ÉS MUNKATÁRSAI (2001) laboratóriumi kísérletekkel határozták meg a *Ca. Phytoplasma prunorum* *C. pruni* általi átvitelének paramétereit. Ezek szerint a szilva levélbolhának legalább 2-4 napon keresztül kell táplálkoznia a fitoplazmával fertőzött gyümölcsfán, hogy a megfelelő fitoplazma mennyiség a haemolimfájába kerüljön. A látens periódus, ami az az idő, amit a fitoplazmának a rovarban el kell tölteni, hogy az fertőzőképes legyen CARRARO ÉS MUNKATÁRSAI (2001) szerint 2-3 hét, míg THÉBAUD ÉS MUNKATÁRSAI (2009) szerint ez akár 7-8 hónap is lehet. A fertőzési idő 1-2 nap, vagyis minimálisan ennyi idő szükséges ahhoz, hogy a fitoplazma mentes növénybe küszöbérték feletti kórokozó mennyiség kerülhessen. Ezt követően 2-3 hét a lappangási idő, ami letelte után a fitoplazma már a frissen fertőzött növényből is kimutatható. A levélbolhák életük végéig megőrzik fertőzőképességüket (CARRARO ÉS MUNKATÁRSAI, 2001). TEDESCHI ÉS MUNKATÁRSAI (2006) arra világított rá munkájában, hogy nemcsak a kifejlett rovarból, de annak lárvájából, nimfájából, sőt a petéjéből is kimutatható a *Ca. Phytoplasma prunorum*.



5. ábra: A növényi tetvek által terjesztett fitoplazma fejlődésmenete. Forrás: (Internet_a9,)

A fitoplazma azonosítása az ültetvényben szemrevételezéssel nem egyértelmű, a tünetek összetéveszthetők a környezeti stressz (hősokk, aszály) tüneteivel, vagy akár tápelemhiánnyal is, de

PCR-rel - amennyiben már van összehasonlítás céljából pozitív mintánk – jó eséllyel elkülöníthetők és detektálhatók (VIRÁNYI, 2010)

2.8.3. A *Ca. Phytoplasma prunorum* által okozott tünetek

A fitoplazmák által okozott tünetek függenek a fa fajtától, fajtájától és a környezeti tényezőktől egyaránt. A kajszin – „szerencsés” esetben-egész évben láthatók a tünetek. Télen a gyökerekben telel át, majd a háncsszövet képződésekor a nedvkeringéssel megindul a vázágak irányába. Csak a floémában képes mozogni 3-20 mm/nap sebességgel. A fa kolonizációja nyár végére, kora őszre fejeződik be. Tavasszal, a virágzást megelőzően a fa leveleket hajt, gyakran az egészséges 5 szirmú virág helyett 6-8 szirmú virágot hoz. A fiatal levelek a színük felé kanalasodnak, melyet egyes esetekben a levelek sárgulása kísér, míg más esetekben a levelek haragoszöldek és törékenyek, később petyhüdté, fonnyadtá válnak (SÜLE 2014a). A gyümölcsök fejlődése eltér a normálistól, halvány színűek és az érésidő kezdete előtt lehullanak. A gyümölcshús szivacsos állományúvá válhat mely fogyasztásra alkalmatlan. Ősszel a klorotikussá vált levelek idő előtt lehullanak (LICHOU ÉS JAY, 2012). A kérget lehántva a háncs kezdetekben narancssárgás, később világosbarna színezetű. Ha a kórokozó körkörösén elpusztította a háncsot a vázágban, akkor az gutaütésszerűen elhal (TARCALI ÉS MTSAI, 2010.). A termőkorú fák jellemzően 1-2, ritkábban 3-4 éven belül jelentkeznek a tünetek (SÜLE, 2014a). Új ültetvényekben a 3-4. évtől figyelhetők meg tünetek (TARCALI ÉS MTSAI, 2010.). A fiatalabb fák gyorsabb, idősebbek esetében lassabb pusztulást tapasztalhatunk (Internet_a5, 2022), mely valószínűleg összefügg az ág és a törzs vastagságával (a mondat második tagja saját vélemény). A gazdasági jelentősége abban nyilvánul meg, hogy a fertőzött ültetvények éves pusztulásának mértéke 8-10%, de ez a szám akár 25-30%-ot is elérheti (SÜLE, 2014a).

2.9. Védekezés

A *C. pruni* és az általa terjesztett *Ca. Phytoplasma prunorum* ellen való védekezés a kajszi ültetvények esetében kiemelt jelentőségű, mivel évente 8-10%, de akár 25-30%-a is elpusztulhat egy adott ültetvénynek (SÜLE, 2014a). A már megfertőződött fák 60-80%-a bizonyosan elpusztul (MARCONE ÉS MTSAI, 2010). Mivel a megbetegedett fákat gyógyítani nem lehet és a kórokozó ellen ez idáig nem sikerült hatékony, üzemi körülmények között is eredményesen használható módszert kidolgozni, így egyetlen lehetőség a megelőzés, a kórokozó ültetvénybe való behurcolásának megakadályozása. Az integrált védekezésre egyrészt a telepítést megelőzően, másrészt az ültetvény teljes élettartama alatt kell gondolni. A legfontosabb teendő, hogy megakadályozzuk a szaporítóanyaggal a kórokozó

bejuttatását az ültetvénybe, vagyis a fertőzés mentes szaporítóanyag vásárlása. Ezt több akadály is nehezíti. A kórokozó az oltványokon látenszen lehet jelen, így a kisselektálásuk szemrevételezéssel nem megvalósítható. Az oltványok tömeges fertőződése a fertőzött anyafákról való szaporítással következik be. Ennek elkerülésére a faiskolák által használt anyafák molekuláris biológiai vizsgálatát 2-3 évente szükséges lenne elvégezni. A vektorok elszigetelésére tetűháló lenne a legalkalmasabb, melyet február végétől július elejéig kellene a törzsfákon tartani (SÜLE, 2014b).

Egyes fajtákon hamarabb, míg más fajtákon később jelentkeznek a tünetek. Fontos, hogy a környezethez igazodó fajtát és alanyt válasszunk. Az őszibarack alanyú oltványok kevésbé mutatják az első tüneteket, de hamar elpusztulnak a fitoplazma fertőzést követően. Ellenben a mirabolánra történő oltással a fertőzödést követően a kajszi több évig is életben képes maradni (LICHOU ÉS JAY, 2012).

A betegség elkerülésének egyik jövőbeni eleme lehet a rezisztens fajták létrehozása (WELLIVER, 1999). TARCALI ÉS MUNKATÁRSAINAK (2021) nyilatkozó gazdák véleménye szerint, a régi hagyományos magyar fajták kevésbé fogékonyak. Eddig rezisztenciával rendelkező szaporítóanyagot nem találtak. Az eredményes védekezési módszer kidolgozásához alaposan ismerni kell a rovar népeségváltozását nem csak az ültetvényben, de annak a környezetében is. Ebbe beletartozik az egyedszám nyomon követése, a vándorlás iránya, a károsító megjelenése az ültetvényben, a peterakás ideje, az új nemzedék megjelenése, valamint a telelőre vonulás kezdete (BOZSIK, 2014) és ebbe nem csak a *C. pruni* értendő bele, ugyanis TARCALI ÉS MUNKATÁRSAI (2021) szerint nem biztos, hogy a *C. pruni* a *Ca. Phytoplasma prunorum* egyedüli vektora.

A telepítést követően fitoplazma távoltartásának egyetlen lehetősége a vektor elleni védekezés. Ennek egyik módja az inszekticides kezelés. A kontakt hatású piretroidok mellett 2023-ban engedélyezett felszívódó hatóanyagok közül az abamektin és az acetamiprid használható (OCSKÓ, 2023). A védekezést a károsító ültetvénybe való visszatelepüléskor kontakt szerrel kell megkezdeni, majd a szaporodás időszakában a peterakást elkerülendő a kezelést folytatni kontakt, vagy felszívódó szerekkel. További védekezések lehetnek szükségesek a petékből kikelő lárvák ellen (BOZSIK, 2014). Mivel az abamektin a méhekre kifejezetten kockázatos, így a kajszi virágzásakor, valamint abban az esetben, ha a gyomflórát, illetve a környékbeli kultúrákat a méhek látogatják használata tilos. A gyakorlat azt mutatja, hogy a méhekre nem jelölésköteles acetamiprid hatóanyag a szilvalevélbolha egyedeit is hatékonyan gyéríti.

RIEDLE-BAUER ÉS MUNKATÁRSAI (2011) Ausztriában több különböző hatóanyagot is kipróbáltak szilvalevélbolha ellen (narancsolaj, fenyőolaj, paraffinolaj, édesköményolaj kivonat, zsíralkohol etoxilát keveréke, valamint kaolin). Az eredmények pozitív hatást mutattak az első 72 órában, de

azt követően a narancsolaj, valamint az édesköményolaj elvesztette repellens hatását. Ellenben a paraffinolaj, illetve a kaolin hatékonyan tartotta távol hosszabb ideig is levélbolha egyedeket. Magyarországon kaolin tartalmú készítmény (Surround WP) kajsziban még nincs engedélyezve, csak körtében és dióban, A körtében végzett kísérletek ígéretesnek bizonyultak ugyanis a kaolin mind a növény mind a károsító felszínét bevonja. Rügypattanás előtt történő bevándorlás során a rovarokat még nem a fa megváltozott színe taszítja, hanem a vesszők megváltozott felszíne gátolja a tojásrakást. A levelek megjelenésével a rovarok a leveleket preferálják tojásrakás céljából. Az ekkor kijuttatott szer repellens hatású a rovarokra. A legjobb eredményt a virágzást megelőző 2-3 kezelés adta (Internet_b11,). Más forrás szerint a kaolin a rovar köztakaróján megtapad, gátolja a táplálkozásukat és elpusztulnak (Internet_b12,).

Franciaországban finomszövésű hálóval vették körül a japánszilvafákat ültetvény méretben. Egy év elteltével semmiféle betegséget nem találtak a fákon (BOZSIK, 2014).

Az fertőzött, vagy már elpusztult fákat mindenképpen gyökerestől el kell távolítani, hogy ne szolgálhassanak fertőzés forrásaként. Bár a fitoplazma csak az élő fában képes életben maradni, a legyengült vagy elpusztult kajszifák alanyai még gyakran annyira életerősek, hogy az alany képes kihajtani. A vad sarjakon a levélbolhák száma mindig több mint a kajszifákon (LABONNE, 2004, LICHOU ÉS JAY, 2012) Az ápolási munkák során ezeket a vad sarjakat mindenképpen el kell távolítani. Amennyiben a nemes rész láthatóan beteg, úgy az alanyról feltörő új egyedet és a kajszifát is egyben (SÜLE, 2014b). Amennyiben lehetőségünk engedi, szükséges az ültetvény környezetében fellelhető vad *Prunus* fajokat eltávolítani (MARCONE ÉS MTSAI, 2010).

Tibenszky (2015) doktori értekezésében részletesen összefoglalja azokat az egyéb, egyelőre csupán in-vitro védekezési lehetőségeket melyek még kidolgozásra várnak. Ilyen a hajtáscsúcsstenyész, a hajtástenyész, illetve a kallusztenyész, melyek azon túl, hogy rendkívül körülményesek és hosszadalmasak, fennáll a más kórokozókval való fertőződés kockázata. Megfigyeltek olyan hidrogén-peroxid aktivitáshoz kötődő spontán gyulladásokat, mikor a növény föld feletti részéből eltűnt a kórokozó. A gyulladás mechanizmusa még nem tisztázott (CARRARO ÉS MTSAI, 2004, MUSETTI ÉS MTSAI, 2004, 2005, MARCONE ÉS MTSAI, 2010).

SALAZAR ES JAYASINGHE, (2001) olyan eljárást ismertet melyhez hasonló a szőlőoltvány készítésnél Magyarországon is használnak. A módszer lényege, hogy a kész oltványokat 30-37°C-os vízfürdőben áztatják. Mivel a vegetatív részek károsodhatnak, így ez az eljárás nem tudott elterjedni.

Franciaországban és Olaszországban MORVAN (1991), MORVAN ÉS MUNKATÁRSAI, (1986), CORNAGGIA ÉS MUNKATÁRSAI, (1995) valamint ERMACORA ÉS MUNKATÁRSAI (2010) olyan

hipovirulenciával átvihető fitoplazma törzseket találtak, melyek immunizáló hatással bírtak. Ezen törzsek a jövőben felhasználhatóak lehetnek keresztvédetség kialakítására.

TOUGERON ÉS MUNKATÁRSAI (2021) számoltak be körtében károsító *Cacopsylla* fajokat (*C. pyri*, *C. pyricola*, *C. pyrisuga*, *C. vasilievi*) eredményesen parazitáló *Trechnites insidiosus* fürkészdarázsról (Hymenoptera / Encyrtidae). Ez a faj ugyan a szilva levélbolhának nem parazitoidja, de mindenképpen reménykeltő, hogy a közelmúltban megtalált *T. insidiosus* és a körte levélbolha fajok kapcsolatán túl, a jövőben a *C. pruni* parazitoidjára is fény derülhet.

2.10. A fitoplazmák kimutatása

A fitoplazmák okozta növénymegbetegedésekről régóta vannak írásos feljegyzések. Az egyik legkorábbi leírás, az eperfa-törpe betegségéről 1600-as évekre tehető. Először ezeket a betegségeket növényi vírusoknak tulajdonították, mivel a fitoplazmák is hasonló tüneteket okoznak, terjedésükhöz rovarvektorok szükségesek és in vitro kultúrában nem tenyésztethetők. DOI ÉS MUNKATÁRSAINAK (1967) sikerült először elektronmikroszkóp segítségével a vírusoktól eltérő mikoplazmákhoz hasonló szervezeteket azonosítani a növény háncsszövetében és rostasejtjeiben. A fitoplazmák első detektálásához csupán az elektronmikroszkóp és egy speciális festési eljárás állt csak rendelkezésre, amelyet epifluoreszcens kimutatási módszernek, azaz DAPI tesztnek nevezünk. A DAPI festéssel kezelt fitoplazmát tartalmazó metszethez úgy kötődik a festék, hogy az fluoreszcens mikroszkóppal láthatóvá válik (SEEMÜLLER, 1976). A PCR széles körű elterjedésével ez a festési eljárás viaszorult (SÜLE, 2014a).

A polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction-PCR) során in vitro körülmények között lehetőség van egy tetszőleges DNS szakasz gyors amplifikálásra (felszaporítására). A módszer alapja, hogy az ismert szekvenciájú DNS mindkét szálára primereket, (oligonukleotid indítoszekvenciát) terveznek, amelyek komplementerek az amplifikálni kívánt DNS szakasszal. A reakció során a primerek által határolt DNS szakasz több ezerszeresére szaporítható fel.

A PCR használatával a fitoplazma jelenléte pontosan megállapítható a vizsgált növényből (VIRÁNYI, 2010). Az PCR alapú amplifikációt sikerrel alkalmazták más baktériumok (pl. mikoplazmák) kimutatására (BERNET ÉS MTSAI, 1989; HARASAWA ÉS MTSAI 1990, 1991). Akkor még nagyon kevés szekvencia ismeret állt rendelkezésre a fitoplazmákról, az első univerzális primereket a fitoplazma genom egyik konzervatív régiójára, a 16S rDNS szakaszra tervezték (AHRENS AND SEEMÜLLER, 1992). Később a 16S és 23S rDNS-re tervezett univerzális és specifikus primerek lehetővé tették a pontosabb azonosítást, fajszintű kimutatást (NAMBA ÉS MTSAI, 1993, GRIFFITHS

ÉS MTSAI, 1999, GUNDERSEN ÉS MTSAI, 1996). A PCR restrikciós endonukleázokkal történő hasításával azonosíthatóak az egyes fitoplazma csoportok, amelyek a későbbi osztályozás alapjait tették le (LEE ÉS MTSAI, 1993). A PCR használatának hátránya, hogy az értékeléshez gél elektroforézis szükséges, valamint az amplifikálás több órát is igénybe vesz (SALÁNKI, 2017)

A nukleinsav-amplifikáció alapú módszerek közül egyre inkább előtérbe kerülnek az izotermális amplifikáció elvén működő eljárások. A LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) módszer az egyik legelterjedtebb eljárás, amelynek kifejlesztése NOTOMI ÉS MUNKATÁRSAINAK (2000) a nevéhez fűződik. A kimutatás jól alkalmazható a fitoplazmák detektálására, amennyiben azokat fitoplazma csoport szinten kívánjuk meghatározni. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) vagy hurokközvetített izotermális amplifikáció, egy izotermikus nukleinsav-amplifikációs technika, előnye a PCR-rel szemben, hogy nem igényel hőmérsékleti ciklusokat, a reakció izotermális körülmények között zajlik. Nagy előnye a nagyfokú érzékenység és specifikusság, a rövid amplifikációs idő (30-60 perc). Az inhibitorokkal szemben kevésbé érzékeny, ezért a módszer jó használható terepi körülmények között, ahol a diagnosztikai vizsgálatot megelőző hagyományos DNS- vagy RNS-tisztítás nem kivitelezhető. Akár mobil laboratóriumként is alkalmazható lehet a jövőben. A folyamat során nem szükséges a ciklusonként hőmérséklet változtatás, a vizsgálat végig konstans 65°C-on történik, mivel a felhasznált *Bacillus stearothermophilus* eredetű polimeráz enzimnek ez a hőoptimuma. A LAMP reakció során 2 pár primer (vagy esetenként 3), egy külső external és egy belső internal, 6 (vagy 8) régiót ismernek fel a célszekvencián. Az alkalmazott polimeráznak szálhelyettesítési aktivitása is van, mely a régi DNS szál lebontása mellett újat szintetizál. A szálát kiszorító DNS-polimeráz elindítja a szintézist, és 2 speciálisan kialakított primer „hurok” struktúrákat alkot, hogy megkönnyítse a későbbi amplifikációs köröket a hurkon történő meghosszabbítás és a primerek további összekapcsolása révén. A reakció eredményeképpen tehát különböző méretű hajtűhurkot tartalmazó struktúrák jönnek létre. A termék detektálásának alapja lehet a turbiditás mérése (az amplifikáció melléktermékeként az oldatban lévő magnézium-pirofoszfát csapadék okozta zavarosság), a színváltozás (kolorimetriás LAMP) mérése, vagy valós idejű fluoreszcenciás jelzéssel történő jeldetektálás. A LAMP főleg kvalitatív (igen/nem) kimutatásra használható, de valós időben is követhető a fluoreszcens festék által adott jel mérésével a módszer kvantitatívvá tehető (NOTOMI, 2000, SALÁNKI, 2017), (Internet_b13,), (Internet_b14,), (Internet_b15,).

3. Anyag és módszer

Három helyszínen, három különböző méretű ültetvényben végeztem a vizsgálataimat, melyek egyrészből rovarfajok voltak, mely során rögzítésre került az ültetvénybe betelepülő *C. pruni* egyedszám változása, más részből molekuláris biológiaiak, melynek keretében a levélbolhák, a kajszibarackfák és egyéb fajok leveléből és gyökeréből kivont DNS-t vagy nyers kivonatokat vizsgáltam *Ca. P. prunorum*mal való fertőzöttség tekintetében.

3.1. Mintavételi területek kiválasztása

A mintákat egy Székesfehérvár közeli, egy balatonvilágosi és egy iszkaszentgyörgyi ültetvényen gyűjtöttem.

3.1.1. Balaton-fruit Kft – Balatonvilágos

Az ültetvény teljes területe 56 ha, melyből 42 ha kajszis. A kijelölt mintaterület 4,5 ha, kora változó, a legrégebbi telepítések 23 évesek, a pótlásokkal az ültetvény folyamatosan újul. Kiváló adottságú, a Balatontól alig 1,5km-re fekszik, mely az év nagy részében jó mikroklímát biztosít a vegetációnak. Tengerszint feletti magassága 140-160 m közötti, északi, a Balaton irányába lejtős területen fekszik. Az éves átlag csapadék 500 mm körüli, melyet csepegtető öntözéssel egészítenek ki. A virágzáskor fellépő fagykár mérséklésére paraffingyertyát használnak. A meteorológiai adatok gyűjtésére saját berendezés áll rendelkezésre. A gyümölcsfák sorában rendszeresen végzik a feltörő gyökérsarjak mechanikai irtását. Az ültetvény közvetlen szomszédságában üdülőtellek és lakóházak találhatók, melyek udvarán jellemzőek a különböző fajú fenyőfélék, melyeknek jelentősége a vektorok diapauzájában lehet. Az ültetvény ÉK oldalán egy mezővédő erdősáv húzódik, melyben megtalálható a *Prunus cerasifera*, *Prunus mahaleb* (sajmeggy), többféle *Prunus* faj, illetve *Rhamnus cathartica*. Fajták: A mintaterületen soronként 4:1 arányban Bergerouge és Late jumbo fajták váltják egymást.



6. ábra: A balatonvilágosi ültetvény műholdképe. Forrás: (Internet_b16, 2023)

3.1.2. Barackvirág farm, Székesfehérvár-Csala

A székesfehérvár-csalai ültetvény (továbbiakban: Csala) Székesfehérvártól 3 km-re Észak keletre található, légvonalban alig 1km-re a pátkai víztározótól. A gyümölcsös területe 54 ha, melyből kajszibarack 25 ha-t tesz ki, a további 29 ha-on szilvát, meggyet, szamócat és őszibarackot termelnek. A vizsgált terület nagysága 21,5 ha. A terület legmagasabb pontja 195m, míg a legalacsonyabb 162m-re van a tengerszint fölött, magasabban, mint az ültetvény környezete, így a korai fagyok kártétele a hideg „lefolyása” miatt mérsékeltebb (Internet_b17,). A fagyveszélyes napokon benzinmotoros mobil szélgéppel csökkenthető a fagykár. A térség csapadékban szegény, nyáron aszályra hajlamos, a szükséges víz pótlását csepegtető öntözéssel oldják meg. A meteorológiai adatokat folyamatos működésű automata gyűjti. Az évről évre jellemző kipusztulás eredményeként feltörő alanyhajtások (mirabolán sarjak) olyan mértékben vannak jelen az ültetvényben, hogy fává tudtak erősödni.



7. ábra: Fává erősödött Mirabolán alany Csalán.
Forrás: Saját

8. ábra: Egymás után pusztuló különböző korú kajszik Csalán. Forrás: Saját

A kajszi ültetvény megújítása folyamatos, az idősebb állomány kora 20 év feletti. A megújítás ültetvény részenként blokkban, illetve a pusztulások pótlásából áll. Az ültetvény kondíciója változó, pusztulások már a 10-15 éves állományban is megfigyelhetők, jellemző fajtái: Bergeron, Gönci magyar kajszi, Mandulakajszi, a Goldrich, valamint a Bergerouge.



9. ábra: A székesfehérvár-csalai Barackvirágfarm Kft ültetvényének műholdképe. Forrás: (Internet_b16, 2023)

3.1.3. Dávid Sándor – Iszkaszentgyörgy:

A harmadiknak választott ültetvényre az extenzív művelése miatt esett a választás. 2020-ban telepítették, méretét tekintve a legkisebb, mindössze 78 fa alkotja. Iszkaszentgyörgy-Kisiszka területére esik, zártkerti besorolású, a szomszéd területeken hétvégi és állandó lakóingatlanok találhatóak. Fekvése ÉKK-DNyNy irányú, 3 sorban hármas kötésbe rendezett. Csapadékban szegény, sekély termőrétegű, alapkőzete dolomit. Az esőmentes időszakok áthidalására csepegtető öntözés szolgál. A tulajdonos meteorológiai adatokat nem gyűjt. Az ültetvénynek több sajátossága is van, melyek kihatással lehetnek vizsgálatom tárgyára. Kizárólag kézi munkaerő áll rendelkezésre, ennek egyik oka a terület kis mérete a másik, hogy a nagy lejtőszög miatt (180m-en 25 m a szintemelkedés) erőgéppel nem járható. A közelben, alig 500 m-re, működő dolomit kőbánya található melyből, -az uralkodó szélirány miatt- a szél finom dolomitport terít az ültetvényre és a környékbeli ingatlanokra. A kémiai gyomszabályozást a tulajdonos nem végez, a területen legelésző 6-8 birka tartja minimumon a gyomvegetációt igen eredményesen. A gyümölcsös fiatal kora és az állatok állandó jelenléte miatt az ültetvényekben gyökérsarjak nem tudnak feltörni. Az ültetvény kondíciója kiváló, jellemző kajszi fajtái: Magyar kajszi, Gönci magyar kajszi, Piroska és Pannonia



10. ábra: Dávid Sándor ültetvényének műholdképe. Forrás: (Internet_b16, 2023)

3.2. *Cacopsylla pruni* gyűjtésére alkalmazott módszerek

3.2.1. Gyűjtés kopogtatással

A rovarok detektálására 65 cm átmérőjű, véka formájú, fehér vászonból készült kopogtató ernyőt, valamint a Biocont cég által is forgalmazott fehér ragacslapot használtam, alkalmilag kiegészítve sárga, illetve sárgászöld színű lapokkal. A kopogtatást 2022. márciusában kezdtem 2-3 hetes időközönkénti gyakorisággal és egész augusztusig figyelemmel kísértem a levélbolhák jelenlétét. 2023. február 20-tól a kopogtatást és a ragacslapos csapdázást is folytattam. A ragacslapok 2022-ben március elején kerültek kihelyezésre, míg 2023-ban már február végén. A *C. pruni* egyedszámának lecsökkenését követően a közeli szórvány fenyvesekben folytattam a kopogtatást, egészen augusztus végéig. 2022. októberben 25 cm széles hullámpapír öveket helyeztem ki az ültetvényekbe, valamint a közeli fenyők törzsére. A gyűjtött levélbolhák analízisére a gyűjtést követően került sor, mely során sztereomikroszkóppal a rovarok faj szintű azonosítását végeztem el. A levélbolhákból DNS-t tisztítottam és a LAMP -teszttel vizsgáltam a fitoplazma jelenlétét a rovarban.



11. ábra: Kopogtató ernyő. Forrás: Saját

A rovarok begyűjtésére a kopogtatóernyő bizonyult a legalkalmasabbnak. 2022 év első tavaszi kopogtatását a területek bejárásával és az ültetvényeken belüli vizsgálati területek kijelölésével kezdtem. Csalán 8 mintaterületet, Balatonvilágoson 6 mintaterületet, Iszkaszentgyörgyön 3 mintaterületet jelöltem ki, melyeket márciustól augusztusig kezdetben 2-3 hetes fordulóban, majd a levélbolhák eltűnését követően havi 1x vizsgáltam. A mintaterületeken belül 5-5 fát jelöltem ki kopogtatás céljából, melyeknek 4-4 oldaláról vettem mintát. Azon fák esetében melyek már a kipusztulás szélén álltak, vagy fiatal koruk miatt nem rendelkeztek elég ággal, ott a rendelkezésre álló ágakról vettem csak mintát. Csak a talajról elérhető vágásokat, gallyazatot vizsgáltam. Csalán Bergeron, Gönci magyar kajszi, Mandulakajszi, Goldrich, valamint Bergerouge fajtákat vizsgáltam. Balatonvilágoson Bergerouge és Late jumbo fajtákat, míg Iszkaszentgyörgyön Magyar kajszi, Gönci magyar kajszi, Piroska és Pannónia fajtákról gyűjtöttem mintákat.

A kajszi vizsgálat mellett igyekeztem felkutatni az ültetvények közelében található örökzöldeket, ugyanis a szakirodalmi források több ízben is utalnak arra, hogy a *Cacopsylla pruni* nyártól a következő tavaszig fenyőfélékre húzódik vissza és imágó alakban vészeli át a telet. Az örökzöldek vizsgálata több nehézségbe is ütközött. Egyrésztől magasságuk és kiterjedésük legtöbbször jelentősen meghaladta azt a méretet, amit kézi eszközökkel, vagy akár létráról is elvégezhettem volna. Másrésztől az örökzöldek a nyaralók, lakóingatlanok területén helyezkedtek el, ami a fenyőfélék vizsgálatát szintén nehezítette. Kopogtatással vizsgált örökzöldek:

- Fekete fenyő (*Pinus nigra*)
- Erdei fenyő (*Pinus sylvestris*)
- Ezüst fenyő (*Picea pungens*)
- Lucfenyő (*Picea abies*)

-Cédrus (*Cedrus spp.*)

-Keleti tuja (*Platycladus orientalis*, syn: *Thuja orientalis*)

-Tiszafa (*Taxus baccata*)

-Boróka fajok (*Juniperus spp.*)

3.2.2. A kopogtatás módja és a minták tárolása

A kopogtatóernyőt az ág alá tartjuk, majd egy kb. 3 cm átmérőjű bottal többször az ágra ütünk. Ha az ág hossza legalább ernyő átmérőjének 3 szorosa, úgy az ernyő áthelyezésével az ütést megismételhetjük. Minden kopogtatást követően szemléljük meg az ernyő tartalmát. A *Pylla* fajok szabad szemmel is láthatóak, 2,5-3 mm nagyságúak, a *C. pruni* naracssárga szárnyszínével jól kitűnik az egyéb levélbolha fajok közül. Apró méretük miatt begyűjtésükhöz optimális rovarszippantót használni, mert bármilyen más módszer használata esetén elugranak. Élénkebb szél a kopogtató ernyőt könnyen kifordítja, ezért célszerű egy 6-8 cm átmérőjű nehezéket (pl: dunakavicsot) az ernyő aljába helyezni. A felszippantott rovarokat egy kis méretű zacskóba átkopogtatjuk, majd a zacskó belsejébe grafitral írt azonosítót helyezünk. A rovarok elkábítására éter-acetáttal, vagy körömlakklemosóval átitatott papírzsebkendő darabot használjunk és ne vattát, ugyanis abba könnyen belegabalyodnak, illetve benne elbújhatnak. Végezetül a zacskót csomóval zárjuk le. Az illékony éter-acetát gőze a rovarokkal rövid időn belül végez.

3.2.3. A rovarminták mikroszkópos azonosítása

A mikroszkópos vizsgálat során csak a *C. pruni* azonosítását végeztem el, a rovarokon egyéb vizsgálatok elvégzése nem volt szempont. A legalkalmasabbnak a sztereomikroszkóp 6,3 x 1,6 nagyítása bizonyult. Az azonosítást követően rovar mintákat Eppendorfba tettem a könnyebb kezelhetőség érdekében, majd tárolásra mélyfagyasztóba helyeztem.

3.2.4. Gyűjtés színcsapdákkal

A ragacslapokat a vizsgált ültetvényekben még rügypattanás és a levélbolhák megjelenése előtt helyeztem ki. Az irodalmi adatok alapján a fehér ragacslap használata látszott a legalkalmasabbnak, így mindhárom ültetvényben a 15 cm x 22 cm nagyságú mindkét oldalán ragasztós típust használtam. Iszkaszentgyörgyön 3 db, Csalán mintaterületenként 2-2 db, míg Balatonvilágoson mintaterületenként 1-1 db-ot helyeztem ki, melyeket a telítődés és növényi részekkel való szennyeződés függvényében cseréltem. A lapokat a fák déli oldalán fejmagasságban rögzítettem a fákra. A balatonvilágosi ültetvény esetén a közeli mezővédő erdősávból bemigráló egyedek

megfigyelésére az ültetvény kerítésére rögzítettem a lapokat. A megfigyelési időszak augusztus végéig tartott.

3.2.5. Gyűjtés hullámpapír övvel

A vegetációs idő végén hullámpapír öveket helyeztem ki az ültetvényekbe, a közeli fenyő félékre (erdei-, fekete- és lucfenyő), illetve a mezővédő erdősávba is. A hernyófogó övek növényvédelmi haszna az araszólepkék, alma és barackmolyok gyérítésére közismert. Arra voltam kíváncsi, hogy a levélbolhák igénybe veszik-e a kihelyezett téli menedéket. A kajszikra kb. 50 cm törzsmagasságban kerültek ki a 25 cm széles övek, melyeket műanyag kötözőzsineggel szorítottam a törzsre. A fenyő félék esetében az öveket fejmagasságban tekertem a fák törzsére. A mezővédő erdősáv esetén a burjánzó növényzet miatt a törzsre nem lehetett a hullámpapírt felerősíteni, így ezen esetekben vastagabb ágakat tekertem körbe. 2023. februárjában szedtem le őket, majd 3 L-es nylon zacskóba tettem őket. A mintákat pár hétig 10°C-on, majd 15-20°C-on tartottam évszaknak megfelelő megvilágítás mellett, hogy a hirtelen hőmérsékletváltozásból eredő hőstresszt elkerüljem. Amennyiben a levélbolhák a hullámpapírövbe kerestek téli menedéket, úgy a diapauzából felébredve a zacskóban láthatóvá válnak.



12. ábra: Hullámpapír öv feketefenyőn és kajszin. Forrás: Saját

3.3. Növényi minták gyűjtése

3.3.1. Levélminták gyűjtése

A fitoplazma vizsgálat elvégzéséhez a levélminták megszedésére 2022. augusztus 31 és szeptember 2-a között került sor. A csalai mintaterület esetében a levélminták gyűjtésése céljából a kopogtatásra

kijelölt területet szűkíteni kellett, oly módon, hogy ahol pusztuló vagy elpusztult kajszit találtam, vagy a levél kanalasodása, sárgulás folytán a fa fitoplazma fertőzés gyanújára adott okot ott a „haldokló” fáról, valamint a körülötte lévő 3-9 szomszédos egyedről szedtem mintát. Ezen kívül levélmintákat vettem azokról a közeli, de nem a területhez tartozó mezővédő erdőszámban található növényekről is melyeken a kopogtatás során *C. pruni* egyedeket találtam, továbbá az ültetvény területén található alanyсарjаkról, melyek bizonyos esetekben már fa méretűekre nőttek. Az nyár végi időpont ideálisnak tekinthető a levélminták szedése céljából, mert a télre a gyökérbe visszahúzódott, majd tavasszal újra a hajtások irányába mozgó fitoplazma addigra a fát teljesen kolonizálta. A mintát minden egyes fa esetében, mind a 4 égtáj felől vettem. Égtájanként 1-1 levelet gyűjtöttem levéllyéllel és alufóliába csomagoltam. Mintaterületenként szedett mintákat egy nylon zacskóba tettem a későbbi könnyebb feldolgozás érdekében. Minden fáról fényképet készítettem, oly módon, hogy a fára egy kis méretű white-board táblát akasztottam, melyre a fa egyedi azonosítója került. A mintázást dokumentáltam, melyet kézzel rajzolt térképpel egészítettem ki. A könnyebb megtalálhatóság érdekében a fák törzsét narancs színű jelölő sprayjel jelöltem meg. A mintázott fákat a látható tünetek alapján 6 kategóriába soroltam be:

I: Mentés, látszólag egészséges

II: Levéltünetek 1 ágon

III: Sárgulás több ágon

IV: 1 elhalt ág

V: Több elhalt ág

VI.: Elpusztult fa



13. ábra: Pusztuló kajszi a balatonvilágosi ültetvényben

A kategóriákba sorolás alapját a TARCALI ÉS KÖVICS (2009) által felállított látható szimptómák szerinti besorolás képezte. A kajsziokról származó minták I-VI. tüneti besorolást kapták, míg a mezővédő erdősávból származó egyéb fajok – melyek nem mutattak tüneteket – I-est. A mintákat a mintázás ideje alatt hűtőtaszkában, majd MATE Növényvédelmi Intézetbe történő elszállításig -20 °C-on tároltam, ezt követően a laborban feldolgozásig -70°C-on tárolták a mintát.

3.3.2. Gyökérminták gyűjtése

Mivel a fitoplazma a növényi vegetációs időszak végén a gyökérbe húzódik vissza, ezért a gyökérmintákat a termő kajszi fák nyugalmi időszakában, februárban gyűjtöttem.

A mintázandó fák kiválasztását megelőzte a levélminták molekuláris genetikai vizsgálata, így az ott kapott eredmények alapján szűkítettem le a vizsgálandó fák körét. A minták megszedéséhez csak ásó és zacskó szükséges. A kiválasztott fák 2 oldaláról 1 ásónyom mélységből szedtem 4-5 db 5-10 cm hosszú gyökeret. Szem előtt kellett tartanom, hogy a fitoplazma vizsgálata fizikai feltárással kezdődik, így célszerű hajszálgyökereket, maximum 1 mm átmérőjű gyökereket választani. A zacskók zárása előtt pár ml vizet öntöttem a zacskóba a kiszáradás megelőzése céljából, majd a zacskókat kívülről címkéztem. A balatonvilágosi ültetvényben március végén, április elején 4 különböző fajtájú magyar eredetű, valamint 5 Spanyolországból és 1 Németországból származó különböző fajtájú oltvány telepítésre is sor került. A fajták egymástól elkülönítve vermelve várták a telepítést. Az egyedenkénti mintázás nem jöhetett szóba, a fajtákat külön-külön 4-4 oldalról mintáztam a fenti módszerrel. Az eltelepítendő fajtákról átlagban vártam eredményt a tekintetben, hogy az oltványok vajon fertőzöttek-e már fitoplazmával.

A vizsgálatig a gyökereket mindkét gyűjtést követően 4 °C-on tároltam. A levelekből és gyökerekből a MATE Növényvédelmi Intézet Genomikai Kutatócsoport munkatársaival a mintákból nyers növényi kivonatot, vagy DNS-t tisztítottunk és LAMP tesztel végeztük a fitoplazma detektálást.

3.4. Alkalmazott laboratóriumi módszerek

A rovarmintákat, az erdősávból gyűjtött levélmintákat, illetve a kajszfák levél és gyökérmintáit 2023. január-március hónapokban kezdtem vizsgálni a MATE Növényvédelmi Intézet Genomikai Kutatócsoportjában, Gödöllőn. Összesen 80 levélmintán, 10 gyökérmintán és 14 rovarmintán végeztem DNS kivonást, a tisztított DNS minőségét agaróz gél elektroforézissel ellenőriztem, a fitoplazma detektálást LAMP tesztel végeztem.

3.4.1. DNS tisztítás (növény, rovar mintákból)

A DNS kivonást NucleoSpin Plant II (MACHEREY-NAGEL) kittel végeztem. A kit tartalmazta mindazon puffereket és szűrőket, amik a DNS tisztításhoz szükségesek. A kiten kívül szükséges még 1,5 ml-es Eppendorf csövek, Eppendorf tartó, mintánként 1-1 dörzsmozsár, Eppendorf centrifuga (vortex), termoblokk, pipetták és pipetta hegyek.

A levélmintákat feldolgozásig -70 °C-on tároltam. A leveleket dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben homogenizáltam 400 µl PL1 lízis pufferben, ami segíti a sejtek feltárását. A gyökér és a rovarmintákból e módszerrel végeztem DNS tisztítást, annyi különbséggel, hogy a gyökereket előzetesen mintánként steril szikével aprítottam üveglapon, majd nitrogén hozzáadása mellett porítottam. A rovarminták esetén folyékony nitrogénre nem volt szükség a feltáráshoz, szét-dörzsölés után a PL1 puffer rámerésével kezdődött a DNS kivonás folyamata.

Az így kapott anyagot 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe öntöttem át, majd hozzáadtam 10 µl RNáz, mellyel a mintában fellelhető RNS-t bontattam el, így biztosítva, hogy csak DNS legyen a mintákban. A minták pár másodperc vortexelés után a 65°C-ra előmelegített termoblokkba tettem 20 percre inkubálni. Az inkubáció végén a mintákat 13.500 rpm-en centrifugáltam, hogy a sejttörmelékelt elkülönítsem a DNS-tartalmazó lizátumtól. A további lépésekhez a fölülúszót használtam, 700 µl-t

NucleoSpin Filter (lila gyűrű) szűrőre pipetáztam, majd 5 percig centrifugáltam. Az átszűrt folyadékot átöntöttem 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe és hozzáadtam 450 µl PC puffert, majd homogenizáltam. A folyadékból 700 µl átpipetáztam DNS megkötéséhez egy új NucleoSpin (zöld) szűrőt használtam, majd 1 percig 13.500 rpm-el centrifugáltam.

Az átfolyóra nem volt tovább szükség. A további 3 lépésben a szűrő mosását végeztem. Először 400 µl etanol tartalmú PW1 puffert adtam hozzá, majd 1 perc centrifugálás után az átfolyót leöntöttem, majd 700 µl PW2 puffert adagoltam hozzá, amit újabb 1 perc centrifugálás követett. Az átfolyót leöntöttem, majd itatóspapíron a szűrőn és a szűrőtartón lévő mosóanyagot leitattam. Újabb 200 µl PW2-t mértem a szűrőre, majd 2 perc centrifugálás után a szűrőt újra leitattam, majd ezt követően 4 percig centrifugáltam, hogy nem maradjon alkohol a szűrőmembránon. NucleoSpin (zöld) szűrőket 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe tettem és a termoblokkban előzetesen 65 °C-ra felmelegített PE-ből 25µl-t rápipettáztam a szűrő közepébe. A PE egy elúciós puffer, ami leoldja a DNS-t a szűrő membránról. 5 percig állni hagytam, majd 1 percig centrifugáltam. Az átfolyót újra rápipettáztam a zöld szűrőre és az újabb 1 perces centrifugálást követően az Eppendorf alján megkaptam az adott mintából származó pufferes közegben lévő tiszta DNS-t, melyeket azonnali felhasználásig jégen, későbbi felhasználásig -20 °C-on fagyasztoóban tároltam.

3.4.2. Agarózgél öntése és a DNS futtatása

Az agaróz gél közvetlenül a futtatás előtt elkészítettem. 8x15 cm üveglapra beállítottam a „fésűt”, ami a zsebeket készíti az agaróz gélbe. A talpas lombikban tárolt agarózhoz annyi desztillált vizet öntöttem, hogy kb 1 cm-re lépje el az agarózt, majd 4-5 percig mikrosütőben melegítettem, míg teljesen vízszerű állapotba került. A felmelegített agarózból 30 ml-t átöntöttem mérőpohárba és 1 µl etidium-bromidot adtam hozzá, ami a beépül a DNS-be és fluoreszkál UV fényben, ezáltal láthatóvá válik a későbbi fotózás során. A mérőpohárból az üveglapra öntöttem az agarózt, majd a gél megszilárdulása után (kb 30 perc) a „fésűt” kihúztam a géllapból.

A tisztított DNS minőségének ellenőrzését agaróz gélelektroforézissel végeztem. A minták festésére 3 µl DNS festéket használtam, amelyet 3 µl tisztított DNS-hez adtam, majd Etidium - bromiddal festett, 1,2 %-os agaróz gélre vittem fel. A festékkel kevert DNS-ből 6µl-t pipettáztam minden egyes zsebbe, majd 130 V feszültséget állítottam be 45 percre. Az eltelt idő alatt a DNS a gélben a pozitív sarok felé vándort. Az elektroforézis után a gélről a Bio-Rad ChemiDoc™ MP Imaging System segítségével fotót készítettem.

3.4.3. Nyers növényi kivonat készítése Plant Material Lysis Kittel

A fitoplazma kimutatáshoz számos szakirodalmi hivatkozás nyers növényi kivonatot alkalmaz, ezért a Plant Material Lysis Kit-el crude extractot készítettem a mintákból. A levelek egy részének szétdörzsöléséhez a Plant Material Lysis Kit-ben található erős műanyag csövet használtam, melyben egy a cső átmérőjéhez igazodó csapágygolyó van (Ø: 10mm). A levelekből 2 cm x 2cm darabokat, a gyökérmintákból pedig 3-4 db 3 cm-es darabokat előzetesen szikével kisebb darabokra

vágtam a könnyebb feltárás érdekében, majd a csövekbe helyeztem és hozzáadtam 1 ml lízis puffert és lezártam. A minta típusától függően 1-5 percig vortexeltem, amíg a minta szöveteit teljesen széttroncsoltam. A kit tartalmaz a szükséges folyadék minta kiemelésére alkalmas műanyag hurokban végződő pálcikát, mellyel 10 µl-t (egy adag) vittem át a hígítópuffert tartalmazó fiolába és összekevertem, majd 5 µl-t használtam templátként a LAMP teszthez.

3.4.4. LAMP vizsgálat

A fitoplazma kimutatására LAMP vizsgálatot használtam mely egy izotermális amplifikáción alapuló módszer. X. csoportra specifikus primereket (indítószekvenciákat) alkalmaztam a fitoplazmák kimutatására. A módszer lényege, hogy a 4 primer (2 pár) 6 célszakaszt ismer fel a templát DNS-en, ezzel a kimutatás specifikussága növelhető (4 különböző primert használtam a célgén 6 különböző régiójának amplifikálására, ami növeli a kimutatás specitását: két külső primert (F3 és B3) és két belső kettős primert (FIP és BIP))

1. táblázat: LAMP teszthez használt indítószekvenciák bázissorrendjei

Primer	Bázissorrend (5'-3')
FIP	AGCATACCCTTGCGGGTCTTTTTTTTACAGTTGGAAACGACTGCTA
BIP	AAGAGATGGGCTTGCGGCACTTTTCTCAGTCCAGCTACACATCA
F3	CCTGCCTCTTAGACGAGGAT
B3	CAATGTGGCCGTTCAACCT

A detektálás alapja a LAMP Isothermal Master Mix-ben található fluoreszcens festék (SYBR green), amely lehetővé teszi a valós idejű fotometriás detektálást.

A Master Mix a következő komponenseket tartalmazza:

-15 µl LAMP Isothermal Mastermix

-0,5-0,5 µl F3 - B3 primerpár

-3-3 µl FIP – BIP primerpár

Az elkészült mixet rövid ideig vortexeltem, majd felhasználásig jégen tároltam.

A LAMP vizsgálatokat 2 készüléken végeztem minta mennyiségtől függően. Az Optigene Genie III kompakt, terepi használatra is használható. Egyidejűleg 6 minta (+2 kontroll minta) vizsgálatára alkalmas. A Roche Light Cycler 96 real-time PCR készülék, 94 minta (+2 kontroll) egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé. Az Optigene-hez 8-as, míg a Roche-hoz 12-es csöveket (microtube stripe) használtam. A vizsgálatához 5 µl templátot használtam. Minden vizsgálatához pozitív és negatív

kontrollokat használtam, a vizsgálat validitásának alátámasztására. Pozitív kontrollként egy igazoltan fitoplazma fertőzött kajsziabarack mintából tisztított DNS-t, míg negatív kontrollként steril desztillált vizet használtam. Ezt követően 21 µl LAMP mixet adtam a mintákhoz. A vizsgálatot a Optigene Genie III. illetve a Roche Light Cycler 96 real-time PCR készülékben végeztem. Az amplifikáció izotermális körülmények között zajlott, 65°C-on 50 percig. Az amplifikáció a készülékek kijelzőjén valós időben követhető.

A LAMP amplifikáció után a minták egy részét ellenőrzésképpen 1,2%-os agaróz gélen is megfuttattam.

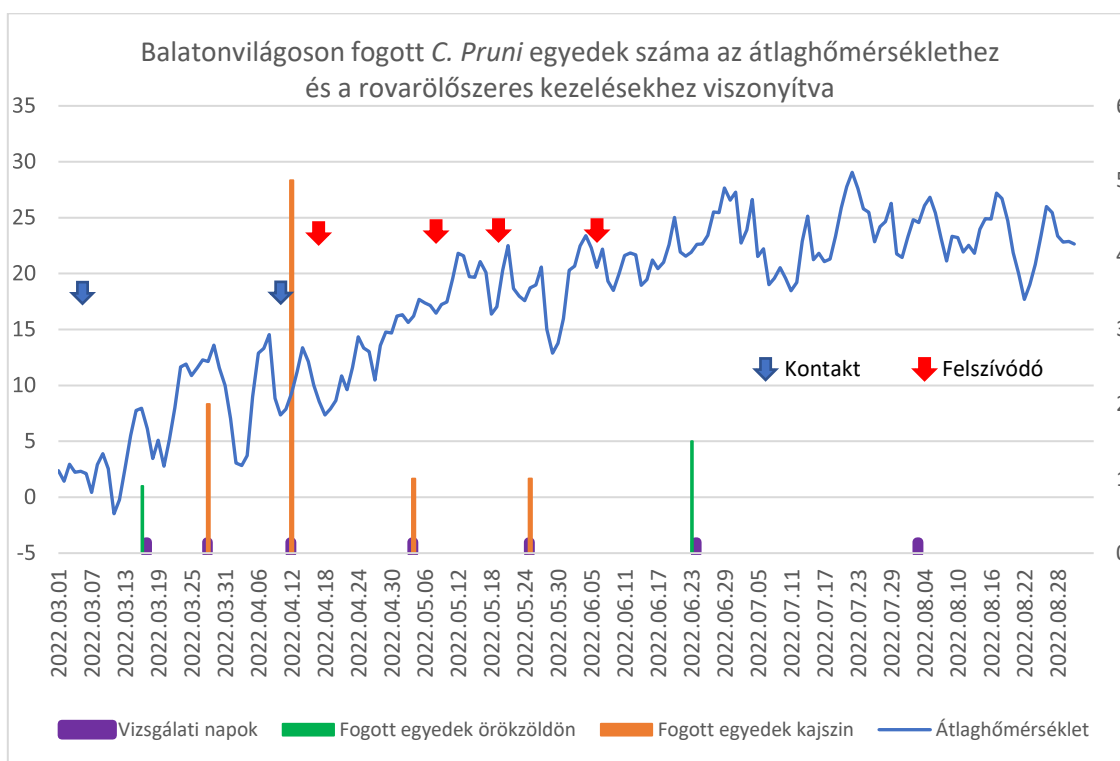
4. Vizsgálati eredmények és értékelésük

4.1. Kopogtatásos rovargyűjtés eredménye

2022-ben Iszkaszentgyörgyön és Balatonvilágon 7-7, míg Csalán 8 alkalommal kerestem kopogtatással *C. pruni* egyedeket. A vizsgálatokat 2023-ban is folytattam, de az eredmények jelen szakdolgozatban már nem szerepelnek.

4.1.1. Rovargyűjtés a balatonvilágosi ültetvényben

A balatonvilágosi ültetvényben – valószínűleg a gyakoribb rovarölőszeres kezelésnek köszönhetően – nem tudott megtelepedni a levélbolha. A 7 vizsgálati alkalomból összesen egyszer találtam 1db *C. pruni* egyedét az ültetvény területén. A további 6 alkalommal 2022. március 17. és augusztus 8-a között csak az ültetvény közelében található mezővédő erdősávban és zártkertek örökzöldjein voltak fellelhetőek, az összes fogás 20 szilvalevélbolha volt, ebből 5 példányt júniusban a közeli zártkertek kerítése mentén található *Thuja orientális*ról gyűjtöttem. A mintavételi napok évszakra jellemző hőmérsékletűek voltak, naposak, szélcsendesek vagy gyengén szelesek.



14. ábra: Balatonvilágoson fogott *C. pruni* egyedek létszámváltozása. Forrás: Saját

2023. februárban 2x és márciusban is 2x mintáztam az ültetvényt. Mind február 20-án, mind pedig február 27-én tömeges volt a *Cacopsylla peregrina* jelenléte, míg *Cacopsylla pruni*ből 2 egyedet fogtam az ültetvényben kopogtatással, egyet az ültetvényen kívüli mezővédő erdősávban *Prunus cerasiferán*, míg egy szilvalevélbolha a fehér ragacslapba ragadt. 2023. március elején az ültetvény réz tartalmú kezelést kapott kiegészítve kontakt rovarölővel, ennek eredményeként a március 9-i gyűjtés eredménytelen volt, az ültetvényben nem volt levélbolha, sem más, kopogtatással gyűjthető rovar. A mezővédő erdősávot nem permetezték, ennek ellenére sem a vad *Prunus* fajokon, sem sajmeggyen, sem pedig mirabolán sarjakon nem lehetett *Cacopsylla* fajokat találni. Március 22-én az ültetvényben továbbra sem volt tapasztalható levélbolhák jelenléte, de a mezővédő erdősávban újra megjelentek különböző vad *Prunus* fajokon.



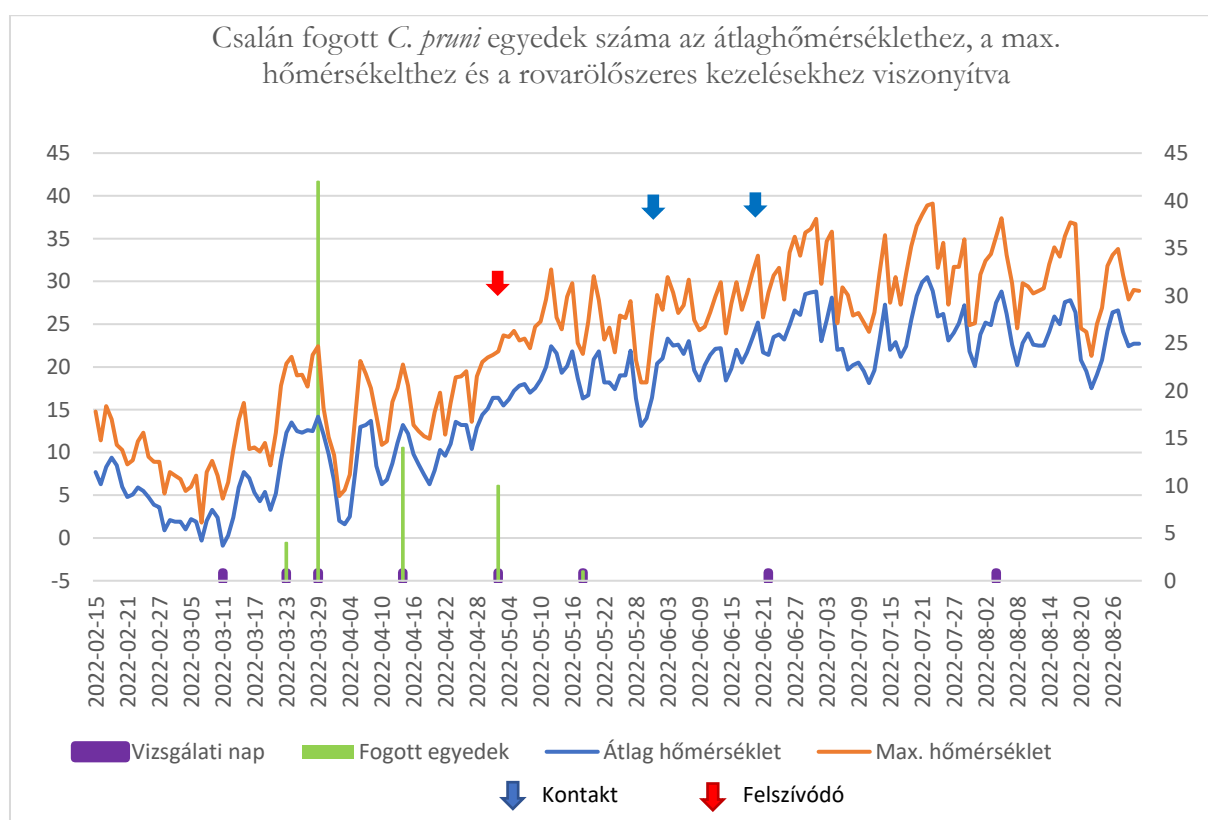
15. ábra: *C. peregrina* nőstény és hím, alul: *C. pruni* nőstény és hím. Forrás: Saját

4.1.2. Rovargyűjtés a családi ültetvényben

A családi ültetvényben a 2022-es vegetáció alatt 8 alkalommal vizsgáltam a *C. pruni* egyedszám változását. A kora márciusi időpontban az ültetvény egyik mintaterületén sem találtam levélbolhákat. Az átlaghőmérséklet február közepétől folyamatosan csökkent, a vizsgálat időpontjában az átlaghőmérséklet -1°C volt, de a napi maximum is 5°C alatt maradt. A hőmérséklet március 12-től emelkedett mutatott. Március 23-án az ültetvény Ény-Ny szélén már fogtam 4 egyedet, ekkor az átlaghőmérséklet 12°C felett volt, majd március végén kezdtek az ültetvénybe a szilva levélbolhák tömegesen betelepülni. Ekkor az ültetvény mind a 4 mintaterületén fogtam

nagyobb egyedszámban. A fogott egyedek fele mirabolán vadsarjakról származott. Áprilisban és májusban a fogások folyamatosan csökkentek, majd május végén fogtam a csalai ültetvényben az utolsó példányt.

A csalai ültetvény 2022-es vegetáció során felszívódó (acetamiprid) rovarölőszeres kezelést kapott május 2-án, majd ezt követően május 31-én és június 20-án kontakt (lambda-cihalotrin) szerrel kezelték. A rovarölőszeres védekezések a levélbarkók, valamint a lepkehernyók ellen irányultak, a levélbolhák számát érdemben már nem befolyásolták. Március hónapban és áprilisban a kajsziiban kizárólag fungicides kezelést és gyomirtás végeztek. A diagrammon a fogások számából jól látszik növekvő kora tavaszi populáció, mely zavartalanul tudott az ültetvénybe betelepülni a kora tavaszi rovarölőszeres kezelés hiánya miatt.



16. ábra: Csalán fogott *C. pruni* egyedszámváltozása. Forrás: Saját

Összehasonlítva a csalai és a balatonszentgyörgyi rovarölőszeres kezelés időzítésének hatékonyságát a csalai ültetvény más károsítók ellen időbeni, de a *C. pruni* ellen megkésített első kezelése a betelepülő levélbolha populációra már befolyással nem tudott lenni, azok – amennyiben fertőzöttek voltak fitoplazmával – a szívogatásuk során azt a növényi floemnek átadták. A májusi, júniusi kezelésekkal csupán a tojásokból kikelő lárvák számát gyérítették. A balatonvilágosi ültetvényben a 2 kontakt majd az ezt követő 4 felszívódószeres kezelés az ültetvénytől eredményesen tartotta távol a levélbolhákat, hiszen míg a mezővédő erdősávban a *C. pruni* jelenléte

folyamatos volt a március májusi periódusban, addig az ültetvényben 1 alkalmat leszámítva nem sikerült levélbolhákat megfigyelni.

4.1.3. Rovargyűjtés az iszkaszentgyörgyi ültetvényben

Az iszkaszentgyörgyi ültetvény extenzív művelésű. A kora tavaszi lemosó permetezést követően május közepén és végén 1-1 acetamiprid hatóanyagú rovarölőszeres kezelést kapott. 2022. március és július között 7 alkalommal történő kopogtatással és fehér lapos csapdázással sem sikerült egyetlen egyedet sem fognom.

4.1.4. Rovargyűjtés örökzöldekről

A *C. pruni* egyedek diapauzára vonulását követően Balatonvilágoson és Csalán az ültetvények közelben található örökzöldeket kopogtattam, mert szakirodalmi adatok szerint a szilvalevélbolha a nyugalmi periódusát túlevelűeken tölti.

A balatonvilágosi ültetvénytől légvonalban 2 km-re keletre található az Alsótekeresi faiskola, ahol 2 alkalommal jártam végig az eladásra termelt örökzöldeket. Vizsgáltam többek között Tuja féléket, Ezüsfenyőt, Boróka fajokat, Fekete- és Erdei fenyőt, Cédrus féléket és Tiszafát is. A kajszi ültetvény közvetlenül a balatonvilágosi nyaralókkal szomszédos. 2022. kora márciusban, majd májustól augusztus végéig rendszeresen vizsgáltam a legközelebbi utcák örökzöld fajait melyek főleg Luc- és Ezüst fenyőből, Boróka és Tuja fajokból álltak. Az Alsótekeresi faiskolában egyik alkalommal sem találtam *C. prunit*, míg a nyaraló övezetben március elején 1 db-ot, míg június végén 5 db-ot Thuja (syn: *Platycladus*) *orientalison* (14. ábra zöld oszlopokkal jelölve).

A csalai ültetvénytől alig 1 km-re, DK irányba 5 ha területű feketefenyő erdő található. 2022. június elejétől augusztus végéig vizsgáltam a fák talajról is elérhető ágait kopogtatással. Csala nevű Székesfehérvárhoz tartozó település 2 km-re található, ahol a parkban, utcákon található Lucfenyőt, Cédrus fajokat, Tiszafát vizsgáltam. Mind a feketefenyők esetében, mind a csalai közterületek örökzöldjei esetében negatív eredményt hoztak a vizsgálatok.

4.2. Ragacslappal és hernyófogó övvel történő rovargyűjtések eredménye

4.2.1. Gyűjtés ragacslappal

A fehér ragacslapokból Csalán mintaterületenként 2-2 db-ot (összesen 8-at), Balatonvilágoson a mezővédő erdősáv és az ültetvény közé 2 db-ot, a kajszi ültetvénybe 5 db-ot, míg

Iszkaszentgyörgyön 3 db -ot helyeztem ki. Ezen kívül Balatonvilágoson kísérleti jelleggel 2022-ben 7 db sárga ragacslapot, míg idén a fehér lapok mellett a sárgászöld színűt függesztettem ki. A 2022 márciustól augusztusig tartó megfigyelési időszak alatt sem a fehér lapok, sem a sárgás lapok nem fogtak *Cacopsylla pruni* sem az ültetvényben, sem az ültetvényen kívül található egyik mintaterületen sem. A Balatonvilágosra kihelyezett sárga lapokat a kajszi virágzásának kezdetén a tulajdonos kérésére eltávolítottam, mert a megporzást végző háziméhekre vonzó hatással bírt és nagy számú méh ragadt bele. 2023-ban 1 fogást leszámítva sem a fehér, sem a sárgászöld ragacslapokkal nem sikerült *Cacopsylla pruni* fogni. Negatív tapasztalat, hogy a lapok könnyen szennyeződtek növényi törmelékekkel (szíromhullás), számos érdektelen fajt is gyűjtöttek (Csalán nagy számú légy ragadt a csapdába a közeli hulladéklerakó miatt), emiatt gyakran kellett cserélni. Továbbá a ragacslapok sérülékenyek, viharos erejű szelek könnyen letépték a fák ágaira erősített lapokat.

4.2.2. Gyűjtés hullámpapír övekkel

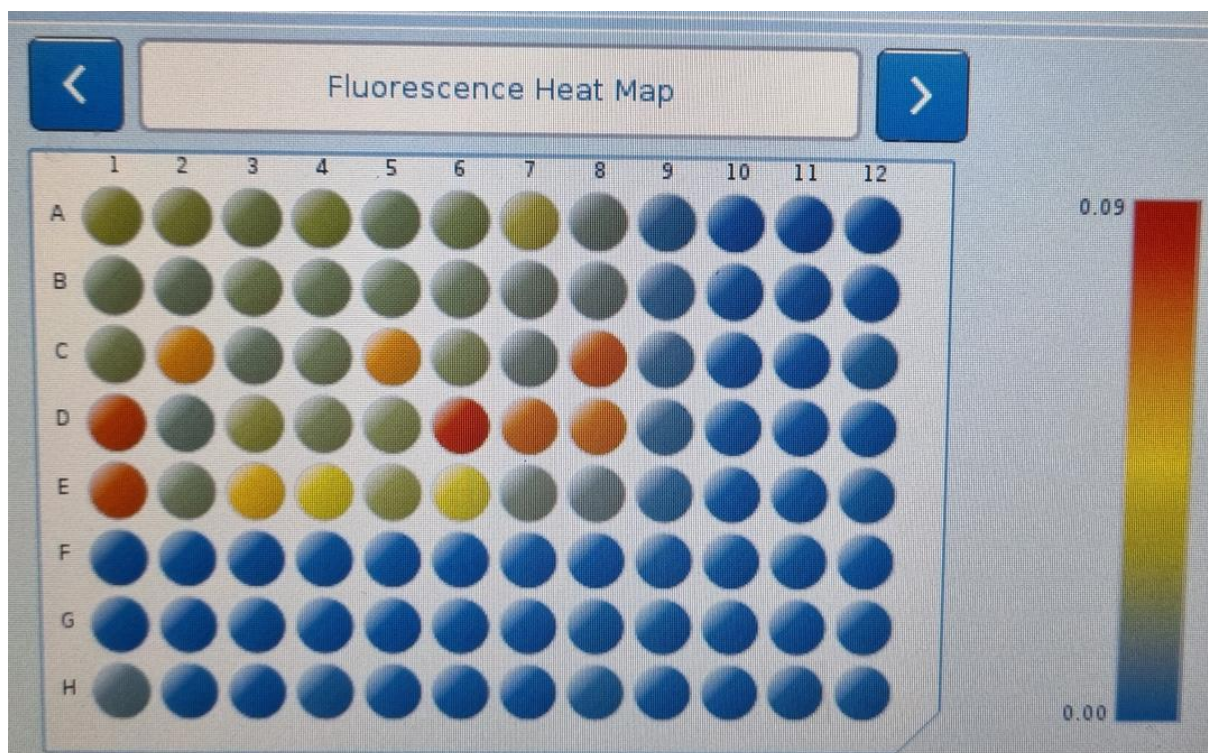
A hullámpapír öveget kihelyezésére 2022. október elején került sor. A 25 cm széles hullámpapír csíkokat Csalán és Balatonszentgyörgyön kajszi fák és mirabolán sarjak törzsére, illetve az ültetvények közelében található örökzöldek (Erdei- és Feketefenyő, Lucfenyő) törzsére helyeztem ki. A több mint fél éves kint létet az időjárás által igénybevételt a hullámpapírovek nehezen bírták, az esőzések és az erős szél többet is letépett a fák törzséről. A megmaradt öveget február végén távolítottam el és minta tekercsenként zacskókban elkülönítve tároltam. Az értékelésük makro- és mikroszkópos módszerrel történt. Az hullámpapírból készült hernyóövet sem a *Cacopsylla pruni* sem más levélbolha fajok nem vették igénybe téli diapauzálsági idejük alatt.

4.3. Molekuláris genetikai módszerekkel végzett vizsgálatok eredményei

4.3.1. Fitoplazma DNS analízise qPCR-rel

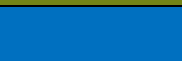
Kajszi levelekből NucleoSpin Plant II. kittel végeztem 80 mintán DNS kivonást. 56 minta származott a csalai ültetvényből, 21 minta Balatonvilágosról, 3 pedig Iszkaszentgyörgyről. A vegetációs időben látható szimptómák alapján értékelt egyedek DNS mintáiból kiválasztottam 60-at, melyekből 35 fa tünetmentes (I.) volt, 2 esetben csak egy ágon voltak tünetek (II.). 11 fán több ágon volt tapasztalható sárgulás (III.), 5 fának 1 elhalt ága volt (IV.) és 7 esetben a gyümölcsfa több ága is elhalt (V.). A kiválasztott minták LAMP vizsgálatát 2 körben Roche Light Cycler 96 real-time PCR készülékben végeztem. A mintákat izotermális hőfokon történő amplifikálását követően fluoreszcens hőtésképen (heat map), valamint grafikus módon diagramm segítségével értékeltem.

A kapott eredményeket összevettem a tüneti besorolásokkal. A heat map színjelöléseket (zöldtől a vörösig) 5 kategóriába soroltam.



17. ábra: A qPCR fluoreszcens hő térképe alapján mutatott első 36 eredmény (az E sor 5-8. minta a kontroll). Forrás: Saját

2. táblázat: qPCR heat map színekódolás. Forrás: Saját

qPCR fluoreszcens heat map jelerősségének színekódolása			
	++++		+
	+++		negatív
	++		nem vizsgált

A 60 vizsgált mintából 10 minta esetében mutatott a heat map ++++ **jelerősséget**, 2 esetben ++, négyszer ++ és 1 esetben +. Összesen 17 mintánál volt kimutatható a fitoplazma jelenléte. A többi minta negatívnak bizonyult. Ugyan ezen minták értékelését elvégeztem real-time grafikonokon is. A valós idejű és a heat map értékek alapján kapott eredmény csaknem azonos. 17 vizsgálatból 15 esetben a hő térkép és a valós idejű grafikon is pozitív fitoplazma fertőzöttséget mutatott, mindösszesen 2 minta esetében nem egyeztek az eredmények. Az eltérések adódhatnak akár bemérési pontatlanságból is. A 17 pozitív real-time qPCR eredményből 11 kajszifa a vegetációs időben mutatott tünetek alapján tünetmentes volt, további 2-2-2 fa pedig a III, IV, V tüneti besorolásba tartozott, vagyis a tünetek szemmel is jól láthatóak voltak és ezt a vizsgálatok is

visszaigazolták. A látszólag tünetmentes fák esetén a *Ca. Phytoplasma prunorum* mutatott pozitív eredmény előrejelzi a fák jövőbeni pusztulásának lehetőségét.

A kiválasztott 60 mintából 17 lett pozitív és 40 negatív, vagyis azokban nem találtam meg a fitoplazma X csoportjának a génjét. 3 egyéb esetben a qPCR hibát detektált a DNS minta feldolgozása során. A 40 negatív eredményű kajszi 23 az ültetvényben is egészségesnek mutatkozott, 1 fa esetében 1 ágon mutatkoztak tünetek, 9 esetben a sárgulás már több ágon is mutatkozott, míg 3-szor találtam 1 elhalt ágat, míg 4 esetben több elhalt ág is volt a kajszikon.

Ültetvényekre lebontva az eredményeket az 56 családi mintából 6 volt pozitív. 3 kajszi a vegetációs időben nem mutatott tüneteket, 2 fának több ágán is mutatkoztak sárgulások, míg 1 esetben a minta az ültetvényben felnövő Mirabolán alanyáról származott.

3. táblázat: A családi levélminták analízise qPCR-rel. Forrás: Saját

Ültetvény	Minta száma	qPCR kijelző heat map	qPCR táblázat heat map	qPCR grafikon szerint G9-10:	Tünet	Minta származása
Csala	ŐB VI/1	Pozitív	+	Pozitív	I	kajszi
Csala	ŐB VI/10	Pozitív	hiba	Pozitív	I	kajszi
Csala	ŐB VII/8	Pozitív	++	Pozitív	III	kajszi
Csala	ŐB VIII/1	Pozitív	++++	Pozitív	III	kajszi
Csala	ŐB VIII/6	Pozitív	++	Pozitív	I	kajszi
Csala	ŐB M1	Pozitív	++++	Pozitív	I	Mirabolán

Ültetvény	Minta száma	Minta származása	Besorolás a vizuálisan megfigyelhető tünetek alapján	Heat map (jelerősség)	LAMP vizsgálat eredménye
Csala	ŐB VI/1	kajszi	I	+	Pozitív
Csala	ŐB VI/10	kajszi	I	hiba	Pozitív
Csala	ŐB VII/8	kajszi	III	++	Pozitív
Csala	ŐB VIII/1	kajszi	III	++++	Pozitív
Csala	ŐB VIII/6	kajszi	I	++	Pozitív
Csala	ŐB M1	Mirabolán	I	++++	Pozitív

A családi vizsgálati eredményeket fajták szerint megvizsgálva szembetűnő eltéréseket tapasztaltam. A Gönci magyar kajszi (minta szám EP...) levélmintái közül 18 egészségesnek tűnő, 10 pedig valamilyen szinten betegség tüneteit mutató kajszirol származtak. A 28 mintát leszűkítettem 19-re, eltávolítva azon egyedek egy részét melyek egészségesnek látszottak, így már fele-fele arányban voltak a betegnek látszó és egészséges egyedek. Ezen minták qPCR-en történő vizsgálatát követően a minták 100%-a bizonyult a fitoplazma X csoportjára negatívnak. Az eredményeket meg kívántam erősíteni gyökerekből származó DNS vizsgálatával is. A Gönci fajtából származó gyökerek 2/3-ából nem lehetett kimutatni a fitoplazma jelenlétét. Vagyis ezen egyedeknél tapasztalható pusztulások a legtöbb esetben nincsenek összefüggésben a *C. pruni* és az általa hordozott *Ca. Phytoplasma prunorum*mal. A Bergerouge fajta (minta szám: ŐB...) a fitoplazmával szemben kevésbé bizonyult ellenállóknak. A 26 mintázott egyedből 17 esetben vontam ki DNS-t, melyekből egyenlő arányban voltak jelen a vizuálisan értékelt fertőzött és egészségesnek tűnő egyedek. A 17 vizsgált mintából 5 minta eredménye mutatott fitoplazma fertőzöttséget. 4 esetben gyökér mintákból tisztított DNS mintát is megvizsgáltam fitoplazma detektálás céljából. Az eredmények minden esetben igazolták a fitoplazma jelenlétét. Egy ültetvényen belül vizsgált 2 eltérő kajszi fajtájú mintaterület esetén, ahol a március-augusztusi időben közel azonos volt a fogott levélbolhák száma, valamint minden vizsgált levélbolhában kimutatható volt X csoportba tartozó fitoplazma jelenléte, a fajták közötti eltérő fogékonyságnak kiemelkedő szerepe lehet. Ezt a feltevést erősíti meg TARCALI ÉS MUNKATÁRSAINAK (2021) gazdákkal folytatott beszélgetései, akik szerint a hagyományos magyar fajták fogékonysága kisebb az ESFY-vel szemben.

A balatonvilágosi ültetvényből 21 minta került bevizsgálásra, ebből 11 esetben bizonyosodott be, hogy a minták hordozzák a fitoplazma X csoport génjét. A pozitív mintákból 3, a vegetációs időben történt felmérés során tünetmentesnek mutatkozott, 4 esetben a kajszi egy, illetve több ágán mutatkozott pusztulás, míg 4 minta – amelyek a mezővédő erdősávból származtak – szintén pozitív eredményt mutattak. A balatonvilágosi ültetvény esetében fajta összehasonlításra nem volt lehetőségem.

4. táblázat: A balatonvilágosi levélminták analízise qPCR-rel. Forrás: Saját

Ültetvény	Minta száma	qPCR kijelző heat map	qPCR táblázat heat map	qPCR grafikon szerint G9-10:	Tünet	Minta származása
Balatonvilágos	BV X/1	Pozitív	++++	pozitív	I	kajszi
Balatonvilágos	BV X/2	Pozitív	++++	pozitív	I	kajszi
Balatonvilágos	BV X/3	Pozitív	++++	pozitív	I	kajszi

Balatonvilágos	BV XI/2	Pozitív	++++	pozitív	V	kajszi
Balatonvilágos	BV XII/3	Pozitív	++++	pozitív	IV	kajszi
Balatonvilágos	BV XIII/2	Pozitív	+++	pozitív	V	kajszi
Balatonvilágos	BV XIV/2	Pozitív	++++	pozitív	IV	kajszi
Balatonvilágos	BV XV/1	Pozitív	negatív	pozitív	I	Varjútövis
Balatonvilágos	BV XV/2	Pozitív	++++	pozitív	I	Prunus sp
Balatonvilágos	BV XV/3	Pozitív	++	pozitív	I	Sajmeggy
Balatonvilágos	BV XV/4	Pozitív	++++	pozitív	I	Mirabolán

Iszkaszentgyörgyi ültetvény esetében 3 mintaterületről származó levélmintákat vizsgáltam meg. A vegetáció során minden egyed egészségi állapota kiváló volt, amit a qPCR-rel végzett vizsgálatok is visszaigazoltak. Minden minta eredménye fitoplazma tekintetében negatív.

4.3.2. Levél DNS analízis Optigene Genie III-mal

A három mintaterület 60 mintájából kiválasztottam 6-t, melyek DNS-ét a Optigene Genie III készüléken is megvizsgáltam. 4 minta a balatonvilágosi ültetvény melletti mezővédő erdősávból származott (Sajmeggy, vad Prunus faj, Mirabolán sarj, Varjútövis), illetve 2 minta kajszi, melyekből az egyik látszólag egészséges (I. tünet csoport), míg a másik csak 1 ágon mutatott tüneteket (a II-es tünetcsoport). A 65°C-on történő amplifikációt követően a látszólag egészségesnek tűnő, valamint a II. tünetcsoportba tartozó kajszi is pozitívnak bizonyult fitoplazmára, annak ellenére, hogy a qPCR negatív eredményt hozott. A vad fajok esetében a Mirabolán és a varjútövis is hordozta a fitoplazma gént, míg a sajmeggy és a vad Prunus faj negatív eredményt hozott. A qPCR-en történt vizsgálat mind a 4 esetben pozitív volt.

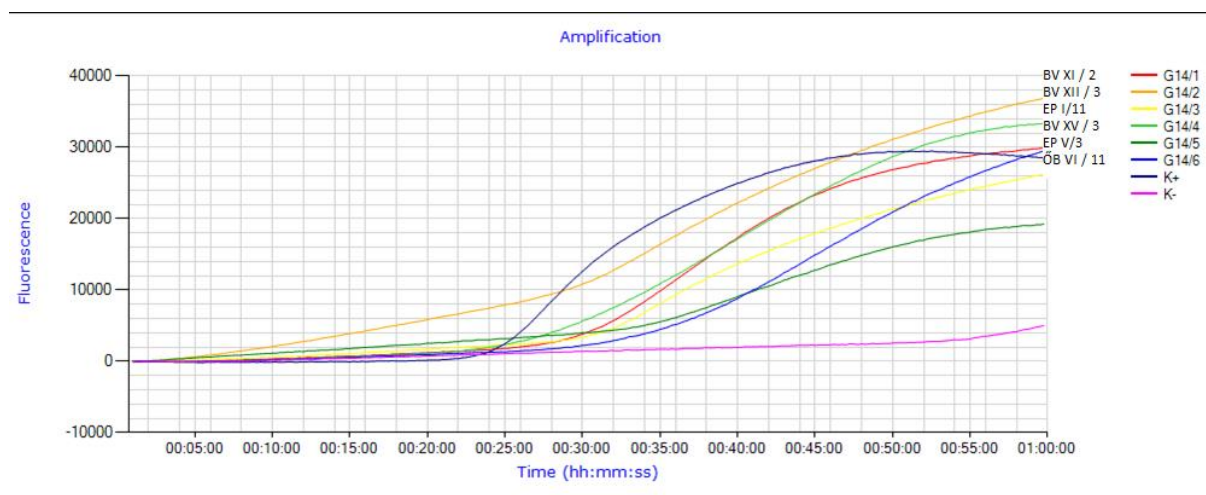
4.3.3. DNS kivonás levélből Plant Material Lysis kittel

6 kajszi levél mintát kiválasztottam abból a 60-ból, melyeket már a NucleoSpin Plant II kittel is vizsgáltam, és ezeknek az 1-1 cm²-es darabjaiból a Plant Material Lysis kittel végeztem DNS kivonást, a kapott DNS-t pedig az Optigene Genie III készülékkel vizsgáltam. A családi ültetvényből 3, a qPCR-en negatív, vagy hibát jelző, de erős tüneti szimptomákat (V. kat.) mutató kajsziakat választottam, míg a balatonvilágosi ültetvényből 2, a qPCR-en pozitív és fitoplazmára szintén erős tüneteket (IV, V) mutató kajszi esetét a választásom. A 6. minta a balatonvilágosi mezővédő

erdősávból származó sajmeggy volt. Az izotermális amplifikálást követően mind a 6 minta eredménye visszaigazolta a fitoplazma jelenlétét.

5. táblázat: Levélminták feldolgozása Crude extract módszerrel. Forrás: Saját

Ültetvény	Minta szám	qPCR kijelző heat map eredmény	qPCR táblázat heat map	qPCR grafikon szerint G9-10:	Crude levélből	Tünet	Minta származása
Csala	EP I/11	Pozitív	hiba	hiba	Pozitív	V	kajszi
Csala	EP V/3	Negatív	Negatív	Negatív	Pozitív	V	kajszi
Csala	ŐB VI/11	Negatív	Negatív	Negatív	Pozitív	V	kajszi
Balatonvilágos	BV XI/2	Pozitív	++++	Pozitív	Pozitív	V	kajszi
Balatonvilágos	BV XII/3	Pozitív	++++	Pozitív	Pozitív	IV	kajszi
Balatonvilágos	BV XV/3	Pozitív	++	Pozitív	Pozitív	I	Sajmeggy



18. ábra: Levélminták analízise Optigene Genie III. készülékkel. Forrás: Saját

4.3.4. DNS kivonás gyökérmintákból

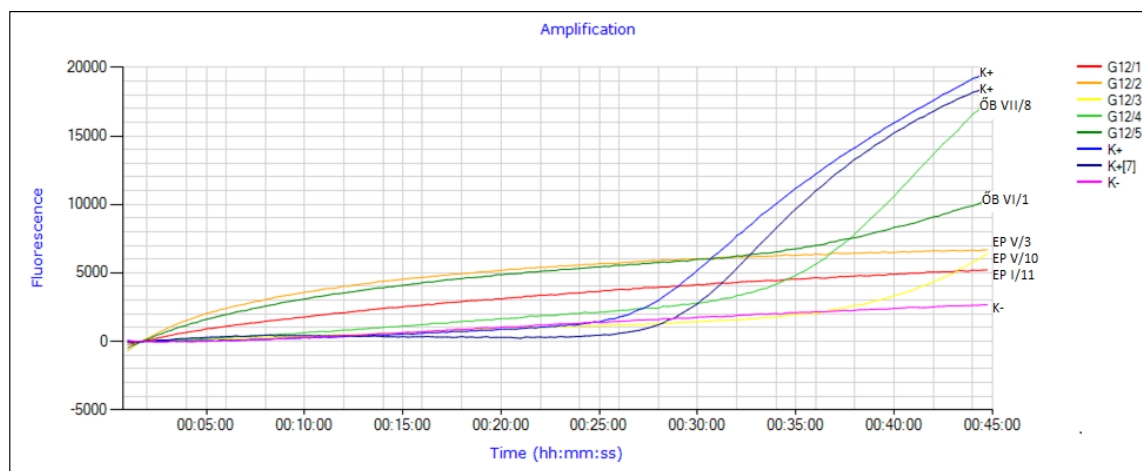
Gyökérminták DNS kivonására is a NucleoSpin Plant II kitet, valamint a Plant Material Lysis kitet használtam.

A NucleoSpin Plant II kittel 7 kajszi gyökéréből vontam ki DNS-t, melyeket a csalai ültetvényből gyűjtöttem. 4 kajsziból származó minta a tüneti szimptomák alapján több ágán is elszáradás (V.) tünetét mutatta, de a qPCR vizsgálat során negatív eredményt hozott. 2 minta a vegetációs időben tünetmentesnek bizonyult, de a qPCR vizsgálat fitoplazma jelenlétét mutatta, míg egy minta esetében a qPCR vizsgálat szerint pozitív és a tünete alapján is fertőzött (III. tüneti kat.) fát választottam. A kivonást követően a mintákat 1,2%-os agaróz gélen megfuttattam. A gyökérminták DNS-ének amplifikációját a Optigene Genie III-mal végeztem.

6. táblázat: Csalai kajszi gyökérminták analízise Optigene Genie III. készülékkel. Forrás: Saját

Ültetvény	Minta szám	qPCR kijelző heat map eredmény	levélminta qPCR táblázat heat map	levélminta qPCR grafikon szerint G9-10:	Gyökérminta Optigene	Tünet	Minta származása
Csala	EP I/11	Pozitív	hiba	negatív	Negatív	V	kajszi
	EP V/3	Negatív	negatív	negatív	Negatív	V	kajszi
	EP V/10	Negatív	negatív	negatív	Pozitív	V	kajszi
	ŐB VI/1	Pozitív	+	Pozitív	Pozitív	I	kajszi
	ŐB VI/7	Negatív	negatív	Pozitív	Pozitív	V	kajszi
	ŐB VI/10	Pozitív	hiba	Pozitív	Pozitív	I	kajszi
	ŐB VII/8	Pozitív	++	Pozitív	Pozitív	III	kajszi

Azon fák esetében, ahol a qPCR-rel vizsgált levélminták pozitív eredményt adtak (ŐB jelű minták), ott a gyökerekben is kimutatható volt a fitoplazmából származó DNS. 2 esetben a negatív qPCR vizsgálatot a gyökérvizsgálati eredmények is megerősítették (EP I/11 és EP V/3).



19. ábra: Csalai kajszi gyökérminták grafikus analízise. Forrás: Saját

A Plant Material Lysis kittel kajszi fák és telepítésre váró oltványok gyökeréből vontam ki örökítőanyagot. Összesen 18 mintát vizsgáltam meg, ebből 10 minta származott 1 éves oltványokból és 8 minta a balatonvilágosi ültetvény termő korú ültetvényéből.

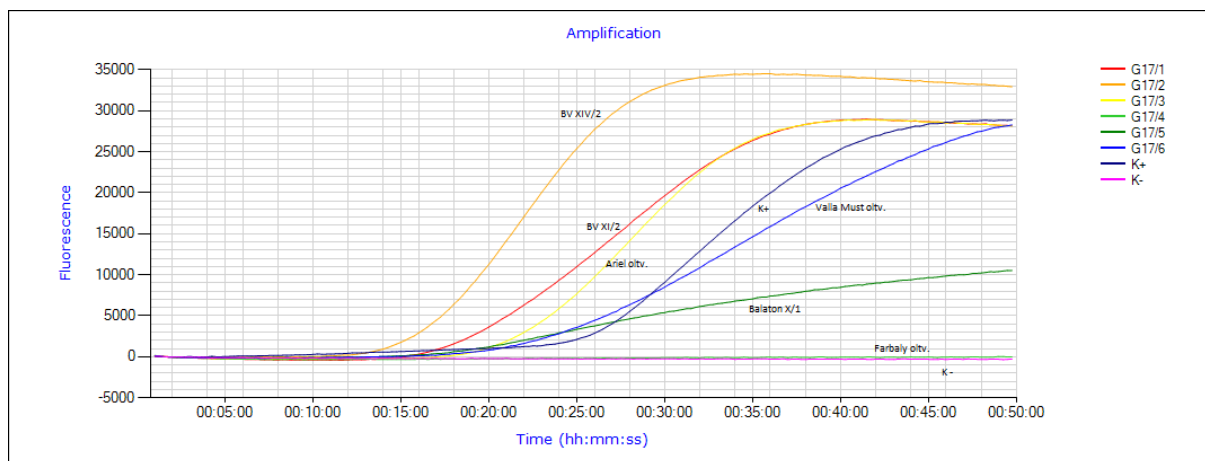
A termőkajszikból származó minták kiválasztásánál szempont volt, hogy a tünetmák alapján legyen tünetmentes és erős fertőzést mutató minta is, melyek a qPCR vizsgálat során pozitív eredményt adtak a fitoplazma fertőzöttségre. 1 minta negatív volt, mind a tüneteket illetőleg mind pedig a qPCR vizsgálati eredmény alapján. Ezen kívül 1 mintát választottam, amit a qPCR vizsgálat

során hiba miatt nem sikerült értékelni. A gyökerekből származó DNS amplifikációt követően azok a minták, melyek a qPCR-en fitoplazma jelenlétére pozitív eredményt adtak, függetlenül a vegetációs időben mutatott tünetek erősségétől, pozitívnak bizonyultak a gyökérvizsgálatot követően is. Az a minta, ami negatív volt a qPCR-en a gyökér vizsgálat során is negatív eredményt adott (BV XIII/3). Az a minta, amit hiba miatt nem sikerült értékelni qPCR-rel a gyökéranalízist követően pozitív eredményt adott.

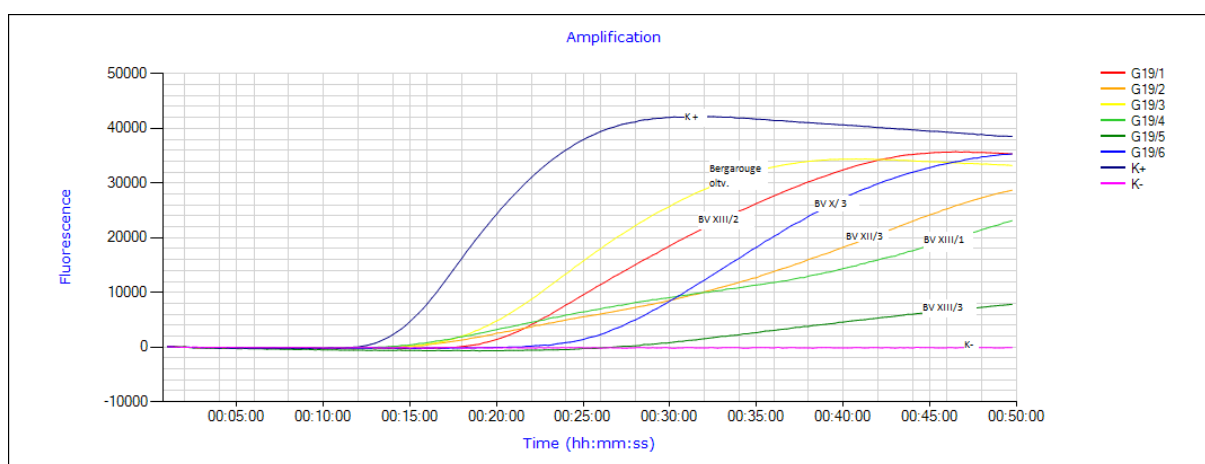
7. táblázat: Balatonvilágosi kajszi gyökérminták elemzése Optigene Genie III készülékkel. Forrás: Saját

	Minta szám	qPCR kijelző eredmények	qPCR táblázat heat map	qPCR grafikon szerint G9-10:	Gyökérminta Optigene Genie III.	Tünet	Minta származása
Balatonvilágosi	BV X/1	pozitív	++++	pozitív	+	I	kajszi
	BV X/3	pozitív	++++	pozitív	++	I	kajszi
	BV XI/2	pozitív	++++	pozitív	++	V	kajszi
	BV XII/3	pozitív	++++	pozitív	++	IV	kajszi
	BV XIII/1	Negatív	hiba	hiba	++	I	kajszi
	BV XIII/2	pozitív	+++	pozitív	++	V	kajszi
	BV XIII/3	pozitív	negatív	negatív	-	I	kajszi
	BV XIV/2	pozitív	++++	pozitív	++	IV	kajszi

Az oltványok vizsgálata két alkalommal történt, első alkalommal 4 magyar előállítású mintából, majd 6 német és spanyol előállítású oltványból vettem gyökérmintákat. Az előkészítést és Plant Material Lysis kittel való DNS kivonást és az Optigene Genie III-mal történő amplifikációt követően az eredményeket a kapott grafikonok alapján értékeltem. Mivel a vegetációs időben levélminták szedésére nem volt lehetőség, így az eredményeket nem tudtam viszonyítani más mérésekhez.

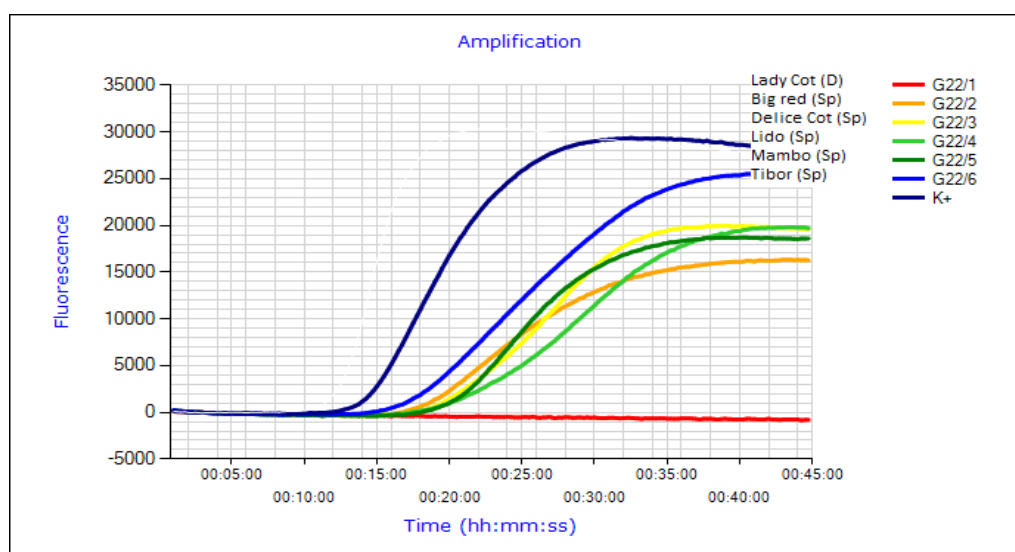


20. ábra: Balatonvilágosi kajszi gyökérminták grafikus analízise 1. Forrás: Saját



21. ábra: Balatonvilágosi kajszi gyökérminták grafikus analízise 2. Forrás: Saját

A 10 minta vizsgálatából 2 minta lett negatív (1 magyar és a német), míg a többi 3 magyar előállítású minta, valamint a spanyol minták egyértelműen hordozzák a fitoplazma X csoportjára jellemző DNS-t.

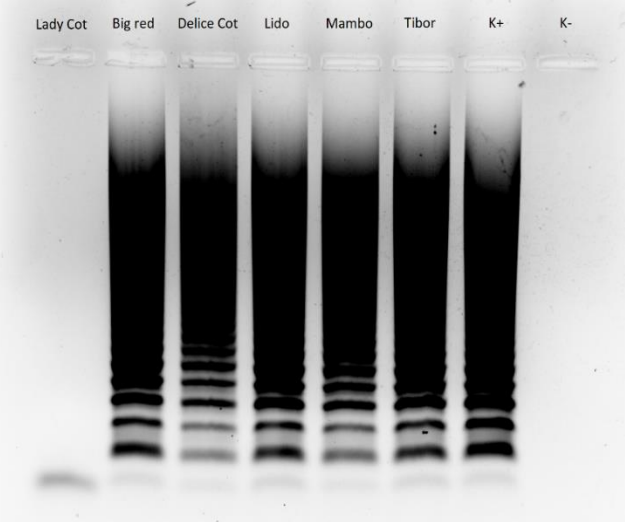


22. ábra: Német és spanyol előállítású oltványok gyökérmintáinak grafikus analízise. Forrás: Saját

A német és spanyol mintákat az analízist követően megfuttattam 1,2%-os agaróz lemezen. Az eredmény összhangban van az Optigene készüléken mért adatokkal.

8. táblázat: Oltványok LAMP vizsgálatának eredménye. Forrás: Saját

	fajta név	előállítás	Gyökérminta Optigene Genie III.
Balatonvilágos	Ariel	magyar	++
	Valla Must	magyar	++
	Bargarouge	magyar	++
	Farbaly	magyar	-
	Lady Cot	német	-
	Big Red	spanyol	++
	Delice Cot	spanyol	++
	Lido	spanyol	++
	Mambo	spanyol	++
	Tibor	spanyol	++



23. ábra: Oltványokból kivont DNS futtatása agaróz lemezen . Forrás: Saját

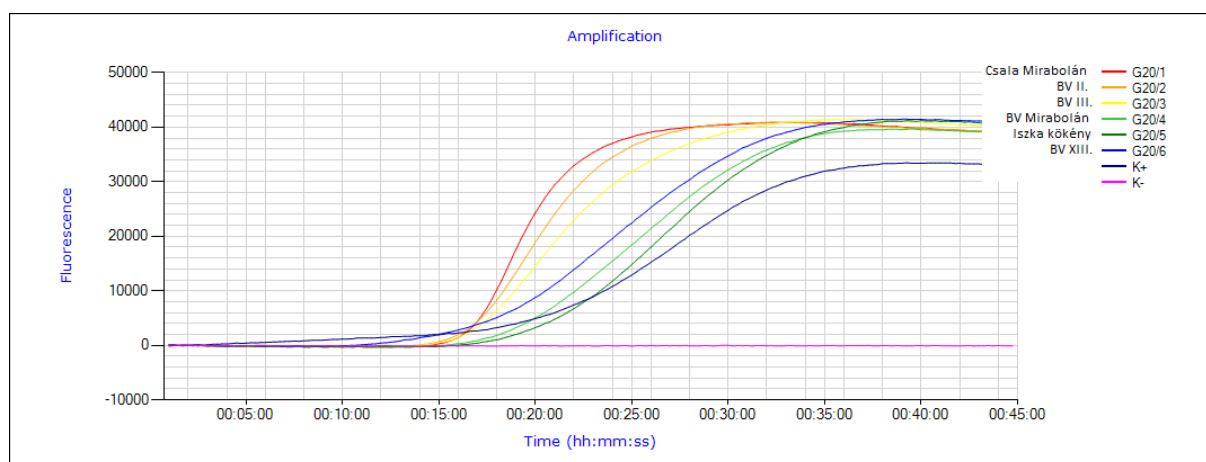
4.3.5. Rovarminták fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

A gyűjtött rovarmintákból is vontam ki DNS-t NucleoSpin Plant II kittel, valamint Plant Material Lysis kittel. SÜLE (2014a) a *Cacopsylla pruni* fitoplazma fertőzöttségének vizsgálatokor vizsgálatonként 10 levélbolha elegyből végzett PCR analízist. Mivel mintaterületenként sem a 2022 évi gyűjtéseimből, sem a kora tavaszi 2023-as gyűjtésemből nem állt ilyen sok egyed rendelkezésemre, ezért 1, illetve 2 rovarból képzett mintaalapokból vontam ki DNS-t. A NucleoSpinnel történő DNS kivonáshoz nem volt szükség folyékony nitrogénben való előzetes homogenizálásra. A kivonást követően a detektálást Optigene Genie III készülékkel végeztem. Mindkét módszer alkalmas volt arra, hogy a kivonatokból a fitoplazma jelenlétét izotermális amplifikációval igazoljuk. A 11 vizsgált rovarmintából 7db *C. pruni* míg 4db *C. peregrina* minta volt. Utóbbiakat a kora tavaszi mintázás során nagy számban sikerült gyűjteni. Az Optigene Genie III-mal már 1-2 rovarból álló mintából is sikerült kimutatni a fitoplazma DNS-t. Az eredmények jól mutatják, hogy mind a szilvalevélbolha, mind a vándor levélbolha is 100%-ban pozitív volt a

fitoplazma tekintetében. Irodalmi adatok híján további kutatást igényelne, hogy a *Cacopsylla prunin* kívül van-e más vektora-e a *Ca. Phytoplasma prunorum*nak.

9. táblázat: Rovarminták analízise Optigene Genie III. készülékkel. Forrás: Saját

Mintaszám	Faj	Gyűjtött darab	Optigene Genie III.	Gyűjtés ideje	Gyűjtés helye	Növény
G11/8	<i>C. pruni</i>	1	pozitív	2022	Csala	Kajszi
G16/1	<i>C. pruni</i>	2	pozitív	2023.febr	Csala	Mirabolán sarj
G16/2	<i>C. pruni</i>	1	pozitív	2023.febr	Balatonvilágos	Kajszi
G16/3	<i>C. pruni</i>	1	pozitív	2023.febr	Balatonvilágos	Kajszi
G16/4	<i>C. pruni</i>	1	pozitív	2023.febr	Balatonvilágos	Mirabolán sarj
G16/5	<i>C. pruni</i>	1	pozitív	2023.febr	Iszkaszentgyörgy, 1km az ültetvénytől	Kökény
G16/6	<i>C. peregrina</i>	12	pozitív	2023.febr	Balatonvilágos	Kajszi
G16/7	<i>C. peregrina</i>	7	pozitív	2022	Balatonvilágos	Kajszi
G16/8	<i>C. peregrina</i>	12	pozitív	2023.febr	Balatonvilágos	Prunus sp.
G16/9	<i>C. peregrina</i>	12	pozitív	2023.febr	Csala	Mirabolán sarj
G16/10	<i>C. pruni</i>	2	pozitív	2023.febr	Csala	Mirabolán sarj



24. ábra: Rovarminták LAMP vizsgálatának grafikus ábrázolása. Forrás: Saját

5. Következtetések, javaslatok

Franciaországban az 1920-as évek közepe, míg Magyarországon az 1990-es évek óta ismert, hogy a kajszik gutaütésszerű pusztulásainak más oka is lehet a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* baktérium és a *Cytospora cincta* együttes jelenlétén kívül.

Kutatásomban többek között a *Cacopsylla pruni* ültetvényekbe való betelepülésének időpontját, illetve a vegetációs időben való egyedszám változását kívántam figyelemmel kísérni, valamint megállapítani a vektor által terjesztett betegség mértékét az ültetvényben, mind makroszkópos, mind molekuláris genetikai módszerekkel. Vizsgálataimmal arra kerestem válaszokat, hogy az általam választott ültetvényekben tapasztalható pusztulások összefüggnek-e *Cacopsylla pruni* vektor jelenlétével, és az általa terjesztett *Ca. Phytoplasma prunorum*mal.

A kajszit érintően a csonthéjasok európai sárgaságát okozó fitoplazma a legjelentősebb gazdasági kár okozója a kórtani problémák közül. Míg az 1990-es évek végén, 2000-s évek elején alig néhány megyében volt ismert a probléma, addigra napjainkra már az egész ország érintetté vált. Az ESFY kórokozója valószínűleg már minden ültetvényben ott van, még akkor is, ha látható tüneteket nem okoz.

Kutatásom során többféle gyűjtési és labor analitikai módszert kipróbáltam. A gyűjtési módszerek közül a legmegbízhatóbbnak a kopogtatás bizonyult, melynek előnye, hogy a levélbolhák begyűjtése mellett aktuális képet kaphatunk a különböző kártevők ültetvénybe való betelepüléséről, egyedszámuk változásáról, valamint fejlődési stádiumaikról, ezáltal a védekezés időpontját és módját optimalizálhatjuk. Hátránya, hogy az időt rá, kell szánni és a hatékonyságot az időjárás (szél, csapadék) befolyásolja. A színes ragacslapos megfigyelés sok kártevő detektálásában és gyérítésében játszik fontos szerepet, de a több, mint egy éves kutatási idő alatt nem sikerült bizonyítani a *C. pruni* ültetvénybe való betelepülésének időpontjára, valamint az egyedszámváltozásra vonatkozó felhasználhatóságát. A levélbolhák életmódjának egyik legkevesbé ismert része a diapauzálás helye. Számos publikáció említi a fenyőfélékre való visszahúzódásukat, de ezt sem kopogtatással, sem hernyóövek kihelyezésével nem sikerült bizonyítani.

A levél-, gyökér- és rovarminták DNS kivonására és a fitoplazma jelenlétének igazolására több molekuláris genetikában használt módszert és eszközt is kipróbáltam. A DNS mintákból és nyers növényi kivonatokból LAMP vizsgálatot végeztem, amely alkalmasnak bizonyult a fitoplazma kimutatására. A laborszintű felhasználásra mind a NucleoSpin Plant II kit, mind a Plant Material Lysis kit megfelelőnek bizonyult, akárcsak az DNS amplifikációjára alkalmazott Roche Light Cycler 96, vagy az Optigene Genie III készülékek. Üzemi használatra kiválóan alkalmas a rövid betanulási

és minta feldolgozási idő, valamint a laboratóriumon kívüli használhatósága miatt a Plant Material Lysis kit és az Optigene Genie III.

Vizsgálataim során lehetőségem nyílt telepítés előtt álló kajszi oltványokról való minták gyűjtésére, és molekuláris genetikai módszerekkel való vizsgálatukra. A vizsgált minták 80%-nak esetében a fitoplazma jelenléte igazolható volt. A termőkorú fertőzött fák kivágásának a javaslata a probléma gyors orvoslása irányába mutat, de addig, amíg előzetes vizsgálatok hiányában állítunk elő, vagy hozunk be az országba fertőzött oltványokat és azokból hozunk létre új ültetvényeket, elvetendő gondolat. A technológia elérhető, akár üzemi körülmények között is használható. A hazai és a külföldi szaporítóanyag előállítók ellenőrzésével és a fertőzött anyatövek, valamint a szaporítóanyagok megsemmisítésével a fennálló kórtani probléma elsőre nem oldódna meg, de az integrált védekezés első lépcsőfokaként felfogható.

A lehetséges kár csökkentésére integrált szemlélet alapján kell gondolni. A vektor biológiájának pontosabb megismerésével a védekezést is célirányosan tervezhetjük. Mivel a kórokozó által fertőzött fák jelen ismereteink alapján nem gyógyíthatóak, így az első lépés a fitoplazma mentes szaporítóanyag garantálása és csak az ilyen jellegű oltványok telepítésének engedélyezése. A kajszi gyümölcs piacossága és pulton tarthatóságának prioritása, valamint az adott fajta fitoplazmával szembeni feltételezett érzékenysége mértéke nem minden esetben támogatják a jó választást. Célszerű lenne egy átfogóbb vizsgálatot végezni a különböző kajszi fajták fitoplazmával szembeni toleranciáját illetően. A termőkorú ültetvényekben a vektor elsősorban a mirabolán sarjhajtásokon fordul elő. A kipusztult, de alanyról újjahajtott növények gyökerestől való eltávolításáról, valamint a gyökérről felnövő sarjak irtásáról minden esetben gondoskodni kell. Mivel a mirabolán cserjék és egyéb vad *Prunus* fajok – mint a kökény – az ültetvényen kívül a természetes biodiverzitás részét képezik, így pusztán növényvédelmi okból azokat kivágni nem lenne etikus. Viszont ezen fajok felhasználhatóak rövid távú előrejelzésre, ugyanis mind a kökény, mind a mirabolán, akár több héttel is hamarabb fakad, mint a kajszi és mint ilyet, a levélbolha előszeretettel keresi fel. Február végétől mind az ültetvényben, mind ültetvényen kívül keresnünk kell az áttelelt egyedeket. A megfigyelésre alapozott kora tavaszi kontakt kezeléssel, valamint a károsító egyedszámváltozásának – akár kopogtatással – való nyomon követésével, majd ismételt kontakt, majd a virágzást követően felszívódó rovarölőszeres kezelésekkel a károsító ültetvényben való jelenléte jól szabályozható. Az alumínium-szilikát (kaolin) használatának, mely kajsziiban már több nyugat-európai országban engedélyezett, a mielőbbi magyarországi engedélyezésével a védekezési módszerek kiszélesíthetőek lennének.

VAN MÉG MÁS IS AMI TERJESZTI (egyéb bolha)??

6. Összefoglalás

A kajszi termesztése nehezített pálya. A késői termőre fordulás, a nagyra növő fák miatti hektáronkénti sűrítés nehézsége, nagy kézi munkaerőigény, a gyümölcs rövid eltarthatósági ideje, időjárásból eredő megtérülés bizonytalansága... Csak néhány azokból a nehézségekből, ami kockázatosná teszi az eredményes kajszi termesztést. Ezeken felül pedig ott vannak az évről évre jelentkező megoldhatatlannak tűnő növényvédelmi problémák, mint a bakteriális és gombás fertőzések miatt jelentkező pusztulások és a *Ca. Phytoplasma prunorum*.

A klorózissal, lombvesztéssel, majd később részleges, majd teljes pusztulással járó fitoplazmás betegség megismerése a közelmúltban teljessé vált ki, de a jövő nemzedékére vár, hogy a végleges megoldást megtalálja. A védekezést már telepítés előtt kell elkezdni. Ehhez olyan szintű országos vizsgálatra és ellenőrzésre lenne szükség, ami biztosítaná a fitoplazma mentes szaporítóanyag létrehozását és értékesítését. A jelenetektelennek tűnő, az ültetvényben látványos károkat nem okozó rovarvektora, a *Cacopsylla pruni* elleni védekezés pedig csak az egyik szegmense a szükséges védekezési megoldásoknak.

A vektor elleni védekezést számos tényező nehezíti. A természetes táplálékforrásai, mint a vad *Prunus* fajok, cosmopoliták fitoplazmával anélkül képesek fertőződni, hogy látható tüneteket okoznának bennük. A vektor rövid időt tölt a vad és termesztett *Prunus* fajokon, de e rövid idő alatt is képes átadni a benne perzisztens módon inkubálódó fitoplazmát.

A fitoplazma fertőzőtlenség felméréséhez az általam is kipróbált Nucleospin Plant II. kit, a nyers kivonat készítésére alkalmas Plant Material Lysis kit és a fitoplazmák növényi kivonatban való kimutatására használt LAMP vizsgálat mind gyökérből, mind levélből, mind pedig rovarból gyors és értékelhető eredményt adott. A szemrevételezéssel történő fertőzőtlenség megállapítása és a tényleges fertőzőtlenség között nem egyértelmű az összefüggés, mivel az egyes pusztuló egyedekből a fitoplazma fertőzőtlenség nem volt kimutatható annak ellenére, hogy a fa súlyos tüneteket mutatott.

A védekezés kulcsfontja az ellenőrzött vírus és fitoplazma mentes szaporítóanyag, a korai betelepülő rovarvektorok elleni vegyszeres (engedélyezés esetén Al-szilikátos) előrejelzésre alapozott védekezés, a beteg fák eltávolítása és mindenekelőtt a feltörő alansarjak irtása.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni konzulensemnek dr. Keresztes Balázsnak, hogy témaválasztáskor olyan témát javasolt, ami igazán aktuális és sok kérdés tekintetében megválaszolatlan továbbá, hogy szakmai kérdésekben a maximális segítőkészséggel támogatta a munkámat. Továbbiakban dr. Takács András Péternek, aki Virologia tantárgyból megalapozta a fitoplazmákkal kapcsolatos ismereteimet és jó tanácsot adott a biotechnológia kutatásokat illetően.

Külön köszönet illeti Szabó Józsefet ügyvezetőt és Németh Zsoltot a Szabó Farm Kft munkatársát, Borsos Gergely ügyvezetőt és Antyipenkó Beátát a Balaton Fruit munkatársát, valamint Dávid Sándort, akik minden kérdésemre a legjobb tudásuk szerint igyekeztek válaszolni. Nélkülük és az ültetvényük nélkül ez a szakdolgozat nem valósulhatott volna meg.

A legnagyobb hálával a MATE Növényvédelmi Intézet Genomikai Kutatócsoport munkatársainak, dr. Várallyay Évának és Nagyné dr. Galbács Zsuzsának tartozom, akik egy telefonhívásra felajánlották a segítségüket, a szaktudásukat és rendelkezésemre bocsájtották az intézet technológiáját.

Nem feledkeznék el a köszönetnyilvánításomban családomról sem, akik a legnagyobb türelemmel viselték, hogy a lakásunk hosszú időre laboratóriummá változott.

7. Szakirodalom jegyzéke

Ahrens, U. and 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 (8): 828-832.

Akiko S. and Saskia A.H (2012): The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects.- *Current Opinion in Microbiology* 15 (3): 247-254.

Bernet, C., Garret, M., de Barbeyrac, B. and Bonnet, J (1989): Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(11): 2492-2496.

Bodnár, D., Koczor, S., Tarcali, G., Tóth, M., G. Ott, G. P. and Tholt, G., (2022): *Cacopsylla pruni* (Hemiptera, Psyllidae) in an apricot orchard is more attracted to white sticky traps dependent on host phenology. *Biodiversity data Journal*, 10:e93612

Bozsik A (2014): Gondolatok a csonthéjasok fitoplazmás pusztulásáról – rovarász szemmel. *Agrártudományi közlemények*, 2014/62. Különszám 30-34.

Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P. and Refatti, E (1998). Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *Journal of Plant Pathology* 80: 233-239.

Carraro, L., Loi, N. and Ermacora, P (2001): Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector; *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology*, 107(7): 695-700.

Carraro, L., Ermacora, P., Loi, N. and Osler, R (2004): The recovery phenomenon in apple proliferation-infected apple trees. *Journal of Plant Pathology* 86: 141-146.

Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltrinieri, S., Windsor, H.M. and Windsor, D (2012): Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea* 51 (3): 607-617

Cornaggia, D., Gentit, P., Boye, R. and Desvignes, J.C (1995): A new phytoplasma disease of apricot tree: the peach vein clearing. *Acta Horticulturae* 386: 448-453.

Dér Zs., Péntes B. és Orosz A (2002): Kajsziültetvényben előforduló kabócák. A Solanaceae növénycsalád fontosabb fajainak (burgonya, paradicsom, paprika, dohány) időszakos növényvédelmi kérdései. 7. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum. 2002. október 16-17., Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum, Előadások: Szerkesztő: Kövics György J. PhD, 235-243.

Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. and Asuyama, H (1967): Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches-broom, aster yellows, or paulownia witches-broom. *Japanese Journal of Phytopathology*, 33: 259-266.

Ermacora, P., Loi, N., Ferrini, F., Loschi, A., Martini, M., Osler, R. and Carraro, L (2010): Hypoand hyper-virulence in apricot trees infected by European stone fruit yellows. *Julius Kuhn-Archiv* 427: 197.

Fialova, R., Navratil, M., Valova, P., Lauterer, P., Kocourek, F. and Poncarova-Vorackova, Z (2004): Epidemiology of European Stone Fruit Yellows phytoplasma in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 657: 483–487.

Grittiths, H.M., Gundersen, U.E., Sinclair, N.A., Lee, I-M., and Davis, R.E (1999): Mycoplasma-like organisms from milkweed, goldenrod- and spirea represent two new 16S rRNA sub-groups and three new strain sub-clusters related to peach X-disease. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16: 55-66.

Gullan, P. J. and Cranston P. S (2005): The insects: an Outline of Entomology. Blackwell Publishing Ltd. 3rd edition: 505.

Gullan, P. J. and Martin, J. H (2009): Sternorrhyncha (Jumping Plant Lice, Whiteflies, Aphids and Scale Insects). In: Resh and Cardé (eds): *Encyclopedia of Insects*: 957-967.

Gundersen, D. E., Lee, I. M., Rehner, S. A., Davis, R. E. and Kingsbury, D. T (1994): Phylogeny of mycoplasma organisms (phytoplasmas): A base for their classification. *Journal of Bacteriology*, 176 (17): 5244-5254.

Gundersen, D.E., Lee, I-M., Schaff, D.A., Harrison, N.A., Chang, C.J., Davis, R.E., and Kingsbury, D.T (1996): Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in the 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 64-75.

Harasawa, R., Koshimizu, K., Uemori, T., Takeda, O., Asada, K. and Kato, I (1990): The Polymerase Chain Reaction for *Mycoplasma pulmonis*. *Microbiology and Immunology*, 34(4): 393–395.

Harasawa, R., Koshimizu, K., Takeda, O., Uemori, T., Asada, K. and Kato, I (1991): Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 5(2): 103–109.

Horváth Cs (2013): Csonthéjasokat veszélyeztet a fitoplazma. *Kertészet és Szőlészet* (62) 2.

Horváth G (1886): A magyarországi psyllidákról In: B. Eötvös Lóránd (szerk.): *Mathematikai és természettudományi közlemények vonatkozólag a hazai viszonyokra*. Kiadja a Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, XXI.kötet, 291-320.

Jarausch B., Mühlentz I., Beck A., Lampe I., Harzer U. and Jarausch W (2008): Epidemiology of European stone fruit yellows in Germany. *Acta Horticulturae*, 781: 417-422.

Jarausch, W., Eyquard, J.P., Lansac, M., Mohns M. and Dosba, F (2000): Susceptibility and tolerance of new French *Prunus domestica* cultivars to European stone fruit yellows phytoplasmas. *Journal of Phytopathology*, 148 (7-8): 489-493.

Kontschán J. és Ripka G (2019): Új adatok egyes levélbolhafajok (Insecta: Psylloidea) telelőhelyet biztosító növényeihez városi élőhelyeken. *Növényvédelem* 80.

Kristoffersen, L (2003): The chemical ecology of Homoptera – from host plants to conspecific interaction. Department of Ecology Chemical Ecology. Lund University Introductory paper no: 147: 38.

Labonne, G. and Lichou, J (2004): Data on the life cycle of *cacopsylla pruni*, psyllidae vector of European stone fruit yellows (ESFY) phytoplasma in France. *Acta Horticulturae*, (657): 465–470.

Lee, I.-M., Gundersen, D., Davis, R. and 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. *Journal of Bacteriology* 174,. 6694-6698.

Lee, I.M., Hammond, R.W., Davis, R.E. and Gundersen, D.E (1993): Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83 (8): 834-842

Lee, I-M., Zhao, Y., Davis, R.E., Wei, W. and Martini, M (2007): Prospects of DNS-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. *Bulletin of Insectology*, 60(2): 239-244.

Lepres L. A., Mergenthaler E., Viczián O. és Tóth F (2018): A szilva levélbolha (*Cacopsylla pruni* scopoli, 1763) jelenlétének felmérése és „*Candidatus phytoplasma prunorum*” kórokozóval való fertőzöttségének vizsgálata egy heves megyei kajszibarack ültetvényben. *Növényvédelem* 2018, 79 (54): 5.

Lichou, J. és Jay, M. (2012): Abricot (monographie). Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (Ctifl)

Marcone, C., Ragozzino, A. and Seemuller, E (1997): Dodder transmission of alder yellows phytoplasma to the experimental host *Catharanthus roseus* (periwinkle). *Forest Pathology*, 27(6): 347–350.

Marcone, C., Jarausch, B. and Jarausch, W (2010): *Candidatus Phytoplasma prunorum*, the causal agent of European stone fruit yellows: an overview. *Journal of Plant Pathology*, 92 (1): 19-34.

Morvan, G., Castelain, C. and Arnoux, M (1986): Prospective for the control of apricot chlorotic leaf roll, a mycoplasma disease, by cross protection. *Acta Horticulturae* 193: 359-366.

Morvan, G (1991): Virus and mycoplasma diseases of apricot. *Acta Horticulturae* 293: 537-553.

Musetti, R., Di Toppi, L.S., Ermacora, P. and Favali, M.A (2004): Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: An ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology*, 94 (2): 203-208.

Musetti, R., di Toppi, L.S., Martini, M., Ferrini, F., Loschi, A., Favali, M.A. and Osler, R (2005): Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. *European Journal of Plant Pathology* 112 (1): 53-61.

Namba, S., Oyaizu, H., Kato, S., Iwanami, S., and Tsuchizaki, T (1993): Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43: 461-467.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T (2000): Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28 (12).

Ocskó Z (2023): Növényvédő szerek, Földművelésügyi Minisztérium megbízásából nyomtatta: Centrál Dabasi Nyomda

Ridle-Bauer, M., Bauer, H. and Mörtel, J (2011): Effects of possible repellents on feeding and survival of *Cacopsylla pruni* (Scopoli). Bulletin of Insectology 64 (Supplement), 263-264.

Ripka G (2008): Checklist of the Psylloidea of Hungary (Hemiptera: Sternorrhyncha) In: Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 43 (1), 121–142.

Ripka G (2009) Additional Data to the Aphid and Psyllid Fauna of Hungary. In: Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 44 (2), 397–417.

Ripka G (2010): Levélbolhák, Agroinform Kiadó, Budapest

Salánki S (2017): Növényi kórokozók diagnosztikájának új lehetőségei és módszerei in: Az MTA Agrártudományi Kutatóközpont agrárkutatási stratégiai tanulmányai.

Salazar, L. and Jayasinghe, U (2001): Diseases caused by phytoplasmas in potato. Techniques in plant virology. International Potato Center (CIP) Lima, Peru.

Seemüller, E (1976): Investigations to demonstrate mycoplasma-like organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. Acta Horticulturae 67: 109-112.

Seemüller E. and Schneider B. (2004): „Candidatus Phytoplasma” „Candidatus Phytoplasma pyri” and „Candidatus Phytoplasma prunorum”, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54(4): 1217–1226.

Soós Á: Kabócák. In: Móczár L (1984): Állathatározó I. kötet 319-337.

Süle S., Viczián O. és Péntes B (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása. Kertészet és Szőlészet 45, 8-11.

Süle S (2014a): Gyümölcsfélék fitoplazmás betegségei Magyarországon. Agrártudományi közlemények, 2014/62. Különszám 24-29.

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

Tarcali, G. és Kövics, G. J (2009): Occurrence of stone fruit yellows phytoplasma disease in Gönc region, Northern-Hungary. 5th International Plant Protection Symposium at University of Debrecen, 20-22 October 2009, Debrecen, Hungary. Journal of Agricultural Sciences / Acta Agraria Debreceniensis, University of Debrecen 38: 69-74.

Tarcali G., Kiss E., Kövics Gy., Süle S., Irinyi L. és Kiss L (2010): Kajszi ültetvények fitoplazmás pusztulása ("Ca. Phytoplasma prunorum") Borsod-Abaúj-Zemplén megyében. Agrártudományi közlemények, 2010/39. Különszám

Tarcali G., Kövics Gy., Biró Gy., Mergenthaler E. és Bodnár D (2021): A csonthéjasok fitoplazmás megbetegedésének hazai helyzete. Növényorvos képzés Debrecenben: 250-273.

Tedeschi R., Ferrato V., Rossi J. and Alma A (2006): Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. Plant Pathology 55 (1): 18-24.

Thébaud, G., Yvon, M., Alary, R., Sauvion, N. and Labonne, G (2009): Efficient transmission of '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' is delayed by eight months due to a long latency in its host-alternating vector. Phytopathology, 99: 265-273.

The 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 . International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54 (4): 1243–1255.

Tibenszkyné K. E (2015): Eltérő virulenciájú fitoplazma törzsek kölcsönhatásának szerepe a keresztvédetség kialakulásában. Doktori értekezés, MTA ATK Növényvédelmi Intézet, Budapest

Tougeron, K., Iltis, C., Renoz, F., Albittar, L., Hance, T., Demeter, S. and Le Goff G. J (2021): Ecology and biology of the parasitoid *Trechus insidiosus* and its potential for biological control of pear psyllids. Pest Management Science

Viczián O. Süle S. Péntes B. és Seemüller, E (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása Magyarországon. Új Kertgazdaság 1: 48-51.

Virányi F (2010) Általános növénykórtan. Szent István Egyetem, Jegyzet,

Weintraub, P. and Beanland, L., (2006). Insect vectors of phytoplasmas. Annual Review Entomology, 51(1): 91-111.

Welliver R (1999): Diseases Caused by Phytoplasmas. Regulatory Horticulture, Plant Pathology Circular, 42:17-22.

Internetes források

Internet_a1 (2002). *HOLLIS, D (2002): Superfamily Psylloidea Jumping Plantlice, Lerps. Australia Biological Resources Study. Australian Faunal Directory.*
www.environment.gov.au/biodiversity/abrs/online-resources.

Internet_a2 (2005). *PERCY, D. M (2005): Psyllids or 'jumping plant lice' (Psylloidea, Hemiptera). UBC Botanical Garden and Centre for Plant Research and Smithsonian Institution (NMNH)*
<https://psyllids.org/index.htm>.

Internet_a3 (2007). *BURCKHARDT, D (2007): Fauna Europaea: Psylloidea. Fauna Europaea version 1.3., Taxon Details.* www.faunaeur.org.

Internet_a4 (2010). <https://www.dlr.rlp.de/Psylliden-english/Key/Adults/genera>.

Internet_a5 (2022). *Mergenthaler Emese/Viczián Orsolya: Rovarokkal terjedő betegségek*
<https://magyarmezogazdasag.hu/2022/01/19/rovarokkal-terjedő-betegségek>.

Internet_a6 ().
[www.dlr.rlp.de/Internet/global/Themen.nsf/b81d6f06b181d7e7c1256e920051ac19/5f722b729e24cfccc12584430022b32e/\\$FILE/cacopsylla_pruni.pdf](http://www.dlr.rlp.de/Internet/global/Themen.nsf/b81d6f06b181d7e7c1256e920051ac19/5f722b729e24cfccc12584430022b32e/$FILE/cacopsylla_pruni.pdf).

Internet_a7 (2010). www.dlr.rlp.de/Psylliden-english/Morphology/hind-leg.

Internet_a8 (). <http://www.cabi.org/isc/datasheet/34065>.

Internet_a9 (). https://plos.figshare.com/articles/figure/_Life_cycle_of_phytoplasmas_/416226.

Internet_b10 (). Forrás:
www.csalomoncsapdak.hu/5kartevoklatinnevszerint/pdfajonkentik/cacopsyllapruniszilvaleve_lbolha.pdf.

Internet_b11 (). <https://www.biokontroll.hu/a-kaolin-reszecske-filmtechnologia-hatekonysaga-a-fuestoesszarnyu-koerte-levelbolha-elleni-vedekezesben/>.

Internet_b12 (). <https://www.magro.hu/agrahirek/biologiai-megoldas-korte-levelbolha-es-a-dioburok-furolegye-ellen-promo/>.

Internet_b13 (). *Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Tutorial:*
<https://www.youtube.com/watch?v=L5zi2P4lggw>.

Internet_b14 (). *Loop mediated isothermal amplification (LAMP protocol explained),*
<https://www.youtube.com/watch?v=UJE9SBMrh20>.

Internet_b15 ().
https://hu.frwiki.wiki/wiki/Amplification_isotherme_m%C3%A9di%C3%A9e_par_les_boucles.

Internet_b16 (2023). Forrás: <https://www.mepar.hu/mepar>.

Internet_b17 (). <http://szabofarm.hu/Gazdasag>.

8. Ábrák és táblázatok jegyzéke

1. ábra <i>Cacopsylla pruni</i> nőtény ((balra) és hím (jobbra)).....	8
2. ábra: <i>C. pruni</i> meghatározó bélyegei. Forrás: (Internet6,).....	8
3. ábra: <i>Cacopsylla</i> nemzetségre jellemző hátsó láb jellegzetességei.....	9
4. ábra: A növényi tetvek által terjesztett fitoplazma fejlődésmenete.....	14
5. ábra: Szilva levélbolha rajzásmenete.....	12
6. ábra: A balatonvilágosi ültetvény műholdképe.....	21
7. ábra fent: Fává erősödött Mirabolán alany Csalán.	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
8. ábra jobbra fent: Egymás után pusztuló különböző korú kajszi Csalán. t.....	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
9. ábra: A székesfehérvár-csalai Barackvirágfarm Kft ültetvényének műholdképe.	22
10. ábra: Dávid Sándor ültetvényének műholdképe.	23
11. ábra: Kopogtató ernyő.	24
12. ábra: Pusztuló kajszi a balatonvilágosi ültetvényben.....	28
13. ábra: Balatonvilágoson fogott <i>C. pruni</i> egyedek létszámváltozása.....	33
14. ábra: <i>C. peregrina</i> nőtény és hím, alul: <i>C. pruni</i> nőtény és hím.....	34
15. ábra: Csalán fogott <i>C. pruni</i> egyedszámváltozása.....	35
16. ábra: A qPCR fluoreszcens hőterképe alapján mutatott első 36 eredmény.....	38
17. ábra: Levélminták analízise Optigene Genie III. készülékkel.	43
18. ábra: Csalai kajszi gyökérminták grafikus analízise.....	44
19. ábra: Balatonvilágosi kajszi gyökérminták grafikus analízise 1.	46
20. ábra: Balatonvilágosi kajszi gyökérminták grafikus analízise 2.	46
21. ábra: Német és spanyol előállítású oltványok gyökérmintáinak grafikus analízise.....	47
22. ábra: Oltványokból kivont DNS futtatása agaróz lemezen	47
23. ábra: Rovarminták LAMP vizsgálatának grafikus ábrázolása.	48
1. táblázat: LAMP teszthez használt indítószekvenciák bázissorrendjei.....	31
2. táblázat: qPCR heat map színekódolás.	38
3. táblázat: A csalai levélminták analízise qPCR-rel.....	39
4. táblázat: A balatonvilágosi levélminták analízise qPCR-rel.....	40
5. táblázat: Levélminták feldolgozása Crude extract módszerrel.	43
6. táblázat: Csalai kajszi gyökérminták analízise Optigene Genie III. készülékkel.....	44
7. táblázat: Balatonvilágosi kajszi gyökérminták elemzése Optigene Genie III készülékkel.	45
8. táblázat: Oltványok LAMP vizsgálatának eredménye.	47
9. táblázat: Rovarminták analízise Optigene Genie III. készülékkel.....	48

9. Melléklet

Nucleospin Plant II kit felhasználási útmutató

NucleoSpin® Plant II

5 NucleoSpin® Plant II protocols

5.1 Genomic DNA from plant

Before starting the preparation:

- Check that Wash Buffer PW2 and RNase A were prepared according to section 3.
- Preheat Elution Buffer PE to 65°C.

Note: The NucleoSpin® Plant II kits include two different lysis buffers for optimal results with most common plant species. Please refer to section 2.5 for choosing the optimal lysis buffer system for your individual plant sample and for information on how to process even more sample material than recommended in the following protocol.

1 Homogenize sample

Homogenize up to 100 mg wet weight or up to 20 mg dry weight (lyophilized) plant material (for homogenization methods see section 2.4).



Homogenize samples

Proceed with cell lysis using **Buffer PL1** (step 2a) or alternatively **Buffer PL2** (step 2b).

2a Cell lysis using Buffer PL1

Transfer the resulting powder to a new tube and add **400 µL Buffer PL1**. Vortex the mixture thoroughly.

+ 400 µL PL1

***Note:** If the sample can not be resuspended easily because for example the plant powder is soaking up too much buffer, additional **Buffer PL1** can be added. Note that the volumes of **RNase A** (step 2a) and **Buffer PC** (step 4) have to be increased proportionally.*



Add **10 µL RNase A** solution and mix sample thoroughly.

**+ 10 µL
RNase A**

Incubate the suspension for **10 min** at **65°C**.

**65 °C,
10 min**

***Note:** For some plant material it might be advantageous to increase the incubation time to 30 – 60 min.*

Proceed with step 3.

2b Cell lysis using Buffer PL2

Transfer the resulting powder to a new tube and add **300 μ L Buffer PL2**. Vortex the mixture thoroughly.

*Note: If the sample can not be resuspended easily because for example the plant powder is soaking up too much buffer, additional **Buffer PL2** can be added. Note that the volumes of **RNase A**, **Buffer PL3** (step 2b), and **Buffer PC** (step 4) have to be increased proportionally.*

Add **10 μ L RNase A** solution and mix sample thoroughly.

Incubate the suspension for **10 min at 65 °C**.

Note: For some plant material it might be advantageous to increase the incubation time to 30–60 min.

Add **75 μ L Buffer PL3**, mix thoroughly and incubate for **5 minutes on ice** to precipitate SDS completely.

Proceed with step 3.

+ 300 μ L PL2

+ 10 μ L
RNase A

65 °C,
10 min

+ 75 μ L PL3
on ice
5 min



3 Filtration / Clarification of crude lysate

Place a **NucleoSpin® Filter** (violet ring) into a new Collection Tube (2 mL) and load the lysate onto the column. Centrifuge for **2 min at 11,000 x g**, collect the clear flow-through and discard the NucleoSpin® Filter.

If not all liquid has passed the filter, repeat the centrifugation step.

If a pellet is visible in the flow-through, transfer the clear supernatant to a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided).

Alternatively, centrifuge the crude lysate for 5 min at 11,000 x g and transfer the supernatant to a new tube or pass the precleared supernatant through the NucleoSpin® Filter to remove solid particles completely.



11,000 x g,
2 min

4 Adjust DNA binding conditions

Add **450 μ L Buffer PC** and mix thoroughly by pipetting up and down (5 times) or by vortexing.



+ 450 μ L PC

5 Bind DNA

Place a **NucleoSpin® Plant II Column** (green ring) into a new Collection Tube (2 mL) and load a maximum of 700 µL of the sample.



Load lysate

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g** and discard the flow-through.



**11,000 x g,
1 min**

The maximum loading capacity of the NucleoSpin® Plant II Column is 700 µL. For higher sample volumes repeat the loading step.

6 Wash and dry silica membrane

1st wash

Add **400 µL Buffer PW1** to the NucleoSpin® Plant II Column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g** and discard flow-through.

**+ 400 µL
PW1**

**11,000 x g,
1 min**

Note: Although washing with Buffer PW1 increases purity it can in some cases slightly reduce the final yield.



**+ 700 µL
PW2**

2nd wash

Add **700 µL Buffer PW2** to the NucleoSpin® Plant II Column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g** and discard flow-through.

**11,000 x g,
1 min**



3rd wash

Add another **200 µL Buffer PW2** to the NucleoSpin® Plant II Column. Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g** in order to remove wash buffer and dry the silica membrane completely.

**+ 200 µL
PW2**

**11,000 x g,
2 min**

