



SZENT ISTVÁN EGYETEM

MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR

NÖVÉNYVÉDELMI INTÉZET

NÖVÉNYORVOS SZAK

Érdi kajszi ültetvény fitoplazma- és vírusfertőzöttségének vizsgálata

Készítette:
Oláh Beatrix

Konzulens:
Dr. Turóczy György
egyetemi docens

Külső konzulens:
Dr. Várallyay Éva
tudományos főmunkatárs

Czotter Nikoletta és Baráth Dániel
tudományos segédmunkatársak

Intézetigazgató:
Dr. Kiss József
egyetemi tanár

GÖDÖLLŐ

2017

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések.....	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Fitoplazmák jellemzői	5
2.1.1. A fitoplazmák rendszertani besorolása	5
2.1.2. ' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> ' jelentősége	6
2.1.3. Gazdasági jelentőségük.....	7
2.1.4. A betegség tünetei.....	8
2.1.5. Fertőzés kialakulása.....	9
2.1.6. Fitoplazmák terjedése – lehetséges vektorok.....	9
2.1.7. Fitoplazmák elleni védekezési lehetőségek	12
2.2. Kajszi vírusbetegségei	13
2.2.1. A növényeket fertőző vírusok.....	14
2.2.2. A vírusok terjedése	15
2.2.3. A vírusfertőzöttség jellemző tünetei	15
2.2.4. <i>Plum Pox Virus</i> (PPV)	15
2.2.5. <i>Cherry Virus A</i> (CVA).....	17
2.2.6. <i>Little Cherry Virus 1</i> (LChV1)	18
3. Anyag és módszer.....	19
3.1. Mintavétel.....	19
3.2. DNS tisztítás.....	25
3.3. Fitoplazma detektálás PCR-el	26
3.4. Nested PCR	27
3.5. PCR termékek izolálása agaróz gélből és tisztítása.....	28
3.6. RNS kivonás	28
3.7. cDNS készítése	29
3.8. Vírus-specifikus PCR	30
3.9. Northern-blot	31
4. Eredmények.....	34
4.1. Az ültetvény fitoplazma fertőzöttsége.....	34
4.1.1. DNS kivonás.....	34
4.1.2. Izolátorház fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata	34
4.1.3. Új törzsültetvény fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata	37

4.1.4. Öreg törzsültetvény fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata	39
4.1.5. Termőültetvény fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata	40
4.1.6. Tisztított minták szekvenálása	41
4.2. Vírusdiagnosztikai eredmények	43
4.2.1. PPV	43
4.2.2. CVA	44
4.2.3. LChV1	45
5. Következtetések, javaslatok	47
6. Összefoglalás	49
7. Irodalomjegyzék	50
8. Köszönetnyilvánítás	55
9. Mellékletek	56

1. Bevezetés és célkitűzések

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

A fitoplazmák alaposabb megismerésére már egy évszázada folynak kutatások. Azonosításuk és jelenleg is használt elnevezésük a XX. század végén történt meg, amikor a '*Candidatus phytoplasma*' taxon nevet kapták (Seemüller és Schneider 2004).

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

A kajszi fitoplazma súlyosságát az is jelzi, hogy Magyarországon csak a kajszi termesztésben egyes területek fertőzöttségét 70-80%-osra becsülik.

A növényvírusok számos termesztett kultúrában okoznak jelentős károkat, a kajszi esetében viszont nem tekintenek a vírusokra, mint jelentős kórokozókra. A kutatók is mindösszesen 20 éve foglalkoznak a csonthéjasok, azon belül a kajszin előforduló vírusokkal, azóta több, mint 10 vírusfajt írtak le, ami megtalálható a kajszin (Gümes et al. 2007).

Kutatásom célja:

1. Az Érdi Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet kajszi ültetvényeinek fitoplazma fertőzöttségének felmérése.
2. Az esetlegesen jelenlevő fitoplazmák rendszertani csoportjának meghatározása csoport (16SrX) specifikus primerekkel.
3. Az Érdi Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet kajszi ültetvényeinek vírusfertőzöttségének felmérése. Karantén és esetlegesen előforduló új vírusok azonosítása.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Fitoplazmák jellemzői

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

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

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

2.1.1. A fitoplazmák rendszertani besorolása

A fitoplazmák rendszertani elhelyezése még nem teljesen tisztázott. Az 1960-as évekig vírusként tartották számon a kórokozót (Samuel et al. 1933, Szirmai 1956), ez a besorolás azon alapult, hogy előfordulásukkor hasonló sárgulós tüneteket tapasztaltak, mint a vírusokkal fertőzött növényeken. 1967-ben Doi és munkatársai a vírushoz hasonló hirt növények floémájában változó alakú sejtfal nélküli egysejtűeket találtak (Doi et al. 1967). Immun- és genetikai vizsgálatok alapján megállapították (Lee et al. 1993, Seemüller et al. 1994), hogy a kórokozók a *Mollicutes* osztályba tartoznak, legközelebbi rokonai az *Acheloplasma*-k, ezért is javasolták 1994-ben a fitoplazma (*Candidatus phytoplasma*) elnevezést (Sears et al. 1994).

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

Az univerzális primerek minden fitoplazma kimutatására alkalmasak (Kirkpatrick et al. 1994), míg a csoport specifikusak az adott fitoplazma csoportba tartozó összes fajt amplifikálják (Lee et al. 1992, Ahrens és Seemüller 1992).

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

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

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

A közeli rokonsági kapcsolat következményeként a három fitoplazma csoport DNS szekvenciája kevés különbséget mutat (Lorenz et al. 1994).

2.1.2. '*Ca. Phytoplasma prunorum*' jelentősége

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

Rendszertani besorolása (http1):

Domén: Bacteria

Törzs: Firmicutes/Tenericutes

Osztály: Mollicutes

Rend: Acholeplasmatales

Család: Acholeplasmataceae

Nemzetség: Phytoplasma

Faj: Phytoplasma prunorum

2.1.3. Gazdasági jelentőségük

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

Magyarországon a betegséget először Süle és munkatársai azonosították 1992-ben (Süle et al. 1997). Azóta egyre több helyről számolnak be valószínűleg fitoplazmák okozta kajszi gyümölcsfák tömeges pusztulásáról. Előfordult már a betegség Pest, Fejér, Somogy, Borsod-Abaúj-Zemplén, és Bács-Kiskun megyében, de legnagyobb károkról a Gönci Kajszi-termesztő régióból számoltak be (Kövics és Tarcali 2015, Horváth 2015).

2.1.4. A betegség tünetei



1. ábra Tünetek 1. boszorkányseprűsödés, 2-3. kanalasodás, 4-5. háncsszövet sárgulása (<http2>)

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

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

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

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

2.1.5. Fertőzés kialakulása

A fitoplazmák önmagukban életképtelenek, a természetben a növények hánccsszöveteiben, illetve rovarvektorokban élnek (Contaldo et al. 2012).

A hánccsszövet rostasejtjeinek pórusain keresztül az egész növényben szétterjednek, az asszimilált anyagok felélése a levelek sárgulását és torzulását okozza, a felbomlott anyagcsere következtében elpusztulnak a hánccsszöveti edénynyalábok, ami végül a gazdanövény pusztulásához vezet (Süle 2014b).

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

2.1.6. Fitoplazmák terjedése – lehetséges vektorok

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

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

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



2. ábra Vektorok 1. *Cacopshylla pruni* 2. *Psammotettix alienus* 3. *Cuscuta campestris*, 4. *Myzus persicae* ([http3](http://3))

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

A fitoplazmák áttelelhetnek a rovarban vagy élő növényekben.

Azt is megfigyelték, hogy az egymással szoros rokonságban lévő fitoplazmákat taxonómiaiilag közel álló rovarfajok terjesztik. Ezen megfigyelésekből arra következtettek, hogy a fitoplazmák az evolúció szempontjából inkább kötődnek a rovarokhoz, mint a növényekhez (Boudon-Padieu és Maixner 1998).

2.1.6.1. Levélbolha

Carraro és munkatársai (Carraro et al. 2001a) Olaszországban begyűjtött *Cacopsylla pruni* egyedek segítségével meghatározták a fitoplazma átvitel legfontosabb tulajdonságait:

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

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

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

Ezek alapján a levélbolha átvitel tipikusan perzisztens jellegű. Carraro és munkatársai (Carraro et al. 2001b) minden egyes növény és levélbolha esetében molekuláris biológiai eljárásokkal (PCR/RFLP) kimutatták a kórokozó jelenlétét. Számos esetben igazolták, hogy a fitoplazma képes áttelelni a vektorszerkezetben (Kiss et al. 2015, Davies és Sinclair 1998, Tedeschi et al., 2003, Cerrato et al. 2001c).

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

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

Terjedésének szempontjából fontos szerepe van az ültetvény körüli toleráns fajoknak, mint a kökény (*Prunus spinosa*), cseresznyeszilva (*Prunus cerasifera*), elvadult szilva (*Prunus domestica*), mivel ezek áttelő helyként szolgálnak a levélbolháknak (Jarausch et al. 2000).

2.1.7. Fitoplazmák elleni védekezési lehetőségek

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

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

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

A kórokozó vektora a szilva-levélbolha (Carraro et al. 2001d, Fialová et al. 2007, Tedeschi et al. 2006, Torres et al. 2004) elleni célzott védekezés.

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

Ezeket az európai országok többségében már pontosan meghatározták (Carraro et al. 2001e, Tedeschi et al. 2006, Fialová et al. 2007, Marcone et al. 2010b). Hazánkban még erről pontos adatokat eddig senki se közölt.

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

Az alanyok általában *Prunus domestica*, *P. cerasifera* és *P. salicina*. Ezen fajták többnyire nagyszámú sarjat hoznak, amelyek a *Cacopsylla pruni* kedvelt tápnövényei. Ezért a levélbolhák

visszavándorlását megelőzően gondoskodjunk az alanyсарjak eltávolításáról (Labonne és Lichou 2004 in Marcone et al. 2010).

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

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

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

A korábbi években voltak kísérletek avirulens vagy gyenge fertőzőképességű kórokozótörzsek felhasználásával történő keresztvédetség kialakítására (Morvan et al. 1986 in Marcone et al. 2010), de az ezekkel kapcsolatos adatok még hiányosak.

A célzott védekezés érdekében az ültetvények termesztési körzeteiben folyamatosan meg kell figyelni a *Carcopsylla pruni* népességváltozását: egyedszám (ivararány is), a vándorlás iránya (érkezés az ültetvényekbe, párosodási, peterakási időszak, az új nemzedék megjelenése, a vándorlás kezdete, érkezés a telelőhelyre), fontosabb populációs és fejlődési időpontok (érkezés az ültetvényekbe, párosodási, peterakási időszak, az új nemzedék megjelenése, a vándorlás kezdete, érkezés a telelőhelyre) (Bozsik 2014b).

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

2.2. Kajszi vírusbetegségei

A vírusok obligát intracelluláris paraziták, melyekből hiányoznak a fehérjeszintézis és az energiatermelés apparátusa, ezért szaporodásuk a gazdasejthez kötötten működik. Nem képesek gazdasejt nélküli szaporodásra, így esetükben, a gazdaszervezet nukleinsav és fehérje agyagcseréjét használják fel.

Felépítésüket tekintve nukleoproteidek, melyek köpenyfehérjéből, örökítő anyagukat tekintve vagy dezoxiribonukleinsav (DNS) vagy ribonukleinsav (RNS) genommal rendelkeznek (Gáborjányi 2007). Formájuk változatos, leggyakrabban ikozahedrális és helikális alakúak. Méretüket tekintve 20–200 nm átmérőjűek, megnyúlt pálcika alakú formái 100–2000 nm hosszúságúak és 10–20 nm átmérőjűek.

Számos vírus karantén köteles, amely a gyümölcsfák esetében a hosszabb élettartam miatt kiemelt jelentőséggel bír. Az alábbi táblázatban (2. táblázat) a kajszi és meggy, cseresznye növények karantén vírusbetegségeit szemléltetem, kiemelve azokat a vírusokat, melyekkel kutatásom során foglalkoztam. Mivel a kajszi rendszertanilag elég közeli rokona a meggynek, illetve cseresznyének, ezért érdemes vizsgálni lehetséges közös kórokozóikat.

2. táblázat Karantén vírusok

Gazdanövény	Karantén vírusok
kajszibarack	Alma mozaik vírus (ApMV)
	Kajszii látens vírus (ApLV)
	Szilva törpülés vírus (PDV)
	Prunus nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (PNRSV)
	Szilvahimlő vírus (PPV)
Cseresznye, meggy	Alma klorotikus levélfoltosság vírus (ACLSV)
	Alma mozaik vírus (ApMV)
	Arabis mozaik vírus (ArMV)
	Cseresznye zöld gyűrűsfoltosság vírus (CGRMV)
	Cseresznye levélsodródás vírus (CLRV)
	Cseresznye nekrotikus rózsaszínű foltosság vírus (CNRMV)
	Cseresznye aprógyümölcsűség vírus 1 és 2 (LChV1, LChV2)
	Cseresznye levélfoltosság vírus (ChMLV)
	Szilva törpülés vírus (PDV)
	Prunus nekrotikus gyűrűsfoltosság vírus (PNRSV)
	Málna gyűrűsfoltosság vírus (RpRSV)
	Szamóca látens gyűrűsfoltosság vírus (SLRSV)
	Paradicsom fekete gyűrűs vírus (TBRV)

2.2.1. A növényeket fertőző vírusok

Jelenleg több mint 1000 vírusról tudjuk, hogy képes növényeket fertőzni. A betegség kialakulása azonban a növény és vírus találkozásának nem feltétlenül következménye, mivel a

növények a legtöbb esetben képesek kivédeni a vírusfertőzés kialakulását (Pallas és García 2011).

A növényi vírusok nagy része (kb. 70 %-ban) pozitív egyszálú RNS molekulából, azaz ssRNS(+)-ból áll. Ennek köszönhetően életciklusuk és szaporodási ciklusuk is nagyon változatos lehet (Gergerich és Dolja 2006)

2.2.2. A vírusok terjedése

A növényi vírusok nem képesek aktívan átjutni a növényi kutikulán és sejtfalon, ezért bejutásuk a növényi sejtbe csak valamilyen sérülés vagy közvetítő által tud megtörténni.

A vírusok fennmaradásának kulcsfontosságú lépése, hogy újabb és újabb növényeket legyen képes megfertőzni. Terjedésének egyik módja a vegetatív szervekkel (hagymák, gumók, rizóma), vagy reproductív szaporodásának segítségével történő terjeszkedés. Viszont ritka jelenség, hogy a vírus közvetlenül a maggal (kb. 6 %), vagy még ritkább esetben pollennel jusson tovább az új növényre. A mechanikai úton való terjedés a termesztett növényeknél az oltás vagy a metszés során is megtörténhet (Horváth és Gáborjányi 1999a).

Számos vírus vektorok segítségével juthat egészséges egyedekre. A vektorokra jellemző, hogy szájszervük segítségével képesek áttörni a növény sejtfalát, emellett gyakran mozognak a növények között, mivel sok esetben a floém nedvvel vagy a gyökérrel táplálkoznak, így segítenek a vírus elterjedésében a növények között. A vektorok közé tartoznak fonálférgek, de bizonyos növénypatogén gombák is. Viszont a legjelentősebb vírusvektorok a levéltetvek és a liszteskék. (Armijo et al. 2016).

2.2.3. A vírusfertőzöttség jellemző tünetei

A vírusfertőzés látens, tünetmentes fertőzéstől, a termelékenység csökkenését okozó tünetekig változhat, végső esetben a növény elpusztulásával járhat. A leveleken általában torzulás, csavarodás, foltosság, nekrotikus léziók, lyukak, illetve szokatlan színezetű mintázatok láthatóak. A termésen méretbeli csökkenés és minőségbeli romlás, az alak torzulása, valamint egyéb változások, mint például a gyűrűsfoltosság alakulhat ki. (Horváth és Gáborjányi 1999b).

2.2.4. Plum Pox Virus (PPV)

A *plum pox virus* (PPV), azaz szilvahimlő vírus a csonthéjasok közül elsősorban a szilva, a kajszibarack és őszibarackon terjedt el, de a meggyet, a cseresznyét, a mandulát is, és a vadon

elő egyéb *Prunus* fajokat, például a kökényt is megfertőzheti. Gazdanövényei a dísnövényként ismert *Prunus* fajok is, a színes levelű sorfákon gyakran megfigyelhető ez a betegség.

A PPV fertőzése következtében a beteg fák termése jelentősen csökken, emellett a gyümölcsök minősége is romlik. A gyümölcsök értékesíthetlenné válnak, valamint ipari felhasználhatóságuk is nagymértékben csökken a megváltozott cukor-sav arány következtében. A terméshullás érzékeny szilvafajtáknál elérheti akár a 100%-ot is (Szathmáry 2009).

A kórokozót először 1933-ban azonosították Bulgáriában. Az 1960-as években írták le Magyarországon. Már azonosították jelenlétét Chilében, Indiában, Portugáliában és az Amerikai Egyesült Államokban is,

A kajszfák levelein jellegzetes világoszöld klorotikus rajzolatok jelzik a vírusfertőzést. A gyümölcsön 1-2 cm átmérőjű körök gyűrű alakban figyelhetők meg, amelyek színe az érés vége felé nekrotikussá válik. A gyűrűk gyakran bemélyednek a gyümölcs húsába. A maghéjon is megfigyelhető a klorotikus elszíneződés.

Kajszin az elsőrendű erek körül gyakran klorotikus szalagok jelennek meg, a levél széle pedig csavarodhat. A tünetek a nyári melegben maszkírozódhatnak (Németh 1979). A külső gyümölcstünetek változóak, csak egyes fajtáknál okoz súlyos tüneteket. Rendszerint a gyümölcshéjon gyűrű, félkör vagy szalag alakú elszíneződés látható, amely világos héjú fajták esetén a gyümölcs alapszínénél világosabb, jól színeződő fajtáknál világosabb vagy sötétebb.

A PPV sok tápnövényű vírus, fás növények esetében elsősorban az oltványokkal terjed. Emellett maggal, virággal és levéltetvekkel is terjedhet, nem perzisztens módon (Levy et al. 2000)

A szilvahimlő terjedésének legfontosabb módjai a fertőzött szaporítóanyaggal, levéltetvekkel és a fertőzött pollennel való átvitel. A vegetatív szaporítás során történő vírusátvitel a vírus terjedésének egyik legjelentősebb módja. A vírus kisebb távolságra való terjedésében, és a járványok kialakulásában a levéltetvek játsszák a legfontosabb szerepet. A vírust leghatékonyabban terjesztő vektoroknak az *Aphis spiraecola*, *Aphis fabae* és a *Myzus persicae* tekintik, de más levéltetvek is részt vehetnek a vírus terjesztésében (Gildow et al. 2004).

A PPV a nem perzisztens vírusok közé tartozik. A vektor a vírust a szipókáján viszi át a fertőzött növényről az egészségesre. A levéltetű a felvételi szívás után azonnal fertőzőképes, nincs szükség inkubációs időre. A vektor azonban 1-2 szívás után elveszti fertőzőképességét

(Horváth, 1972). A vírus elterjedésében nagy szerepük van a PPV gazdanövényei közé tartozó különböző gyomnövényeknek, valamint a dísz és vad *Prunus* fajoknak, melyek állandó fertőzési forrásul szolgálnak (Szathmáry 2009)

2.2.5. *Cherry Virus A* (CVA)

A *Cherry Virus A*-t 1995-ben Németországban találták meg cseresznyén. Kajszin 2015-ben detektálták a vírust, Japánban. Ezt követően kimutatták a kórokozót Európa számos országában, Magyarországon is, illetve az Amerikai Egyesült Államokban és Kínában is. Elterjedését a 3. ábrán szemléltetem.



3. ábra CVA elterjedése (http4)

Kajszin általános klorotikus elszíneződés a jellemző tünet, de a kórokozó pontos meghatározása, csak PCR segítségével lehetséges. Szaporítóanyaggal terjedő vírus, vektora jelenleg nem ismert.

Jelenleg ismert gazdanövényköre a kajszi-, őszibarack, cseresznye, meggy, szilva, Japán szilva, Japán kajszi és a dízcseresznye (Marais et al. 2017).

2.2.6. Little Cherry Virus 1 (LChV1)

A LChV1 a cseresznye egyik legnagyobb kárt okozó vírus eredetű betegsége, mivel a fertőzött fa kisebb szemű, világosabb színű, illetve kevésbé ízletes gyümölcsöt terem, így értékesíthetetlen lesz a termés.

A *Little Cherry Virus1*-et először Észak-Amerikában azonosították (Nichols 1948, Reeves és Cheney 1963), ezt követően kimutatták a kórokozót Európa több országában és Japánban is (4. ábra).



4. ábra Little Cherry Virus1 elterjedése (http5)

A vírust eddig meggyen, cseresznyén, szilván, mandulán, őszibarackon, Japán díszcseresznyén azonosították. Viszont 2016 nyarán kimutatták Csehországban a kórokozó jelenlétét kajszibarackon is (Šafářová 2017).

Vektora jelenlegi kutatások alapján egy viaszos pajzstetű faj (*Phenacoccus aceris*) (Raine et al. 1986).

3. Anyag és módszer

3.1. Mintavétel

Kutatásomhoz az Érdi Gyümölcstermesztési Kutatóintézet izolátorházából, régi és új törzsültetvényéről, illetve termő ültetvényről különböző kajszibarack fajtákról gyűjtöttünk mintákat (5. ábra).

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



5. ábra Területi elhelyezkedés (http6)

Mintavételezés során gyűjtött mintákat a 3. táblázatban szemléltetem.

3. táblázat Gyűjtött minták

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

Izolátorház

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

Így azt vektormentes környezet jellemzi, kizárólag magyar fajták nőnek az izolátorházakban (6. ábra).



6. ábra Izolátorházak (http7)

Mintavétel során a mintázott egyedekről fényképeket készítettünk. A szemle során a különböző fajták egészségesnek tűntek (7. ábra).



7. ábra Izolátorházban található kajszi gyümölcsfák (saját felvételek)

Új törzsültetvény

Az új törzsültetvényt néhány éve telepítették az izolátorházakból származó magyar fajtákkal. Az állomány nagy része egészségesnek tűnt a mintavételezés során, de nagyon sok rovarkártétel volt megfigyelhető számos fán (8. ábra).



8. ábra Új törzsültetvénynél található kajszi gyümölcsfák (saját felvételek)

Öreg törzsültetvény

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

Az öreg törzsültetvényben különböző állapotú fákkal találkoztunk. Voltak betegnek, és egészségesnek látszó egyedek is (9. ábra).



9. ábra Öreg törzsültetvéynél található kajszi gyümölcsfák (saját felvételek)

Termőültetvény

A termő ültetvényen főleg francia fajtákat termesztene, de magyar fajták is megtalálhatóak. A fajtaválasztása piaci igényeknek megfelelő, a termelt gyümölcs értékesítése a Gyümölcsért TÉSZ keretein belül történik. Az itt mintázott egyedek nagy része fitoplazma fertőzésre jellemző tüneteket: sárgulás, levélsodródás mutatott (10. ábra).



10. ábra Termőültetvényenél található kajszi gyümölcsfák (saját felvételek)

3.2. DNS tisztítás

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

A DNS tisztítás menete:

1. A minta homogenizálása

2. A sejtek lízise (sejtfeltárás)

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

Ezt követően 10 percig, 65 °C-on tartjuk.

3. A minta tisztítása a törmelékektől

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

Az átfolyóhoz hozzáadunk 450 µl PC Buffert, majd vortexeljük.

4. DNS kötése az oszlophoz

A törmelékektől megtisztított, feltárt sejteket NucleoSpin Plan II oszlopra helyezzük, majd egy percig centrifugáljuk. A minta DNS tartalma ekkor az oszlophoz kötve marad.

5. Mosás

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

Mosás: 400 µl PW1 Buffert mérünk az oszlopra, majd egy percig centrifugáljuk.

Mosás: 700 µl PW2 Buffert mérünk az oszlopra, majd egy percig centrifugáljuk.

Mosás: 200 µl PW2 Buffert mérünk az oszlopra, majd egy percig centrifugáljuk.

6. DNS elúciója az oszlopról

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

Az így nyert tisztított DNS minőségét és mennyiségét 1,2% agaróz gélen való elválasztás után vizualizálva illetve Nanodrop spektrofotométeren mérve állapítottuk meg. Tisztított DNS mintáink általában megfelelő koncentrációval rendelkeztek a további vizsgálatokhoz. Pozitív kontrollként *Aster Yellow*s fitoplazmával fertőzött *Tagetes*-t használtunk.

3.3. Fitoplazma detektálás PCR-el

A PCR reakcióhoz univerzális (P1 és P7) és 16SrX csoport specifikus (fO1 és rO1) indítószekvenciákat használtunk (Danet et al. 2011), melyeket az alábbi táblázat (4. táblázat) szemléltet.

4. táblázat Fitoplazma PRC-hez használt primer párok és azok bázissorrendje

Fitoplazma	Primer párok	Bázissorrend
Univerzális	P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T
	P7	CGT CCT TCA TCG GCT CTT
16SrX	FO1(16SrX)	CGG AAA CTT TTA GTT TCA GT
	frO1(16SrX)	AAG TGC CCA ACT AAA TGA T

A reakcióelegy az alábbi összetevőkből állt 1 PCR reakcióra (5. táblázat).

5. táblázat PCR reakcióhoz használt keverék összetevői

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

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

Denaturáció: A kettős szálú DNS-t 98 °C-ra hevíti, hogy a szálak szétváljanak. A két DNS – szálát összekötő hidrogénkötések felbomlanak. Időtartam: 10 sec.

Anelláció: A DNS szálak szétválása után a hőmérséklet csökken, így a primerek hozzá tudnak kapcsolódni a DNS-szálakhoz. Ennek a hőmérséklete az alkalmazott primerektől függ, esetünkben: 55 °C. Időtartam: 10 sec.

Lánchosszabbítás: a DNS-polimeráz létrehozza a hiányzó szálát. A kapcsolódott primerrel kezd, és végigmegy a DNS szálon. A szintetizálás során a szülő nukleinsav szál szolgál templátként az új lánc szintetizálásához. A hosszabbítás hőmérséklete a DNS polimeráztól

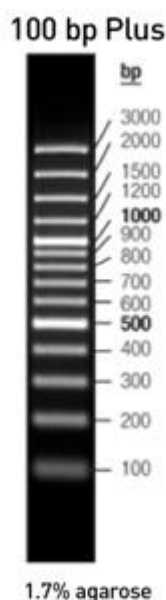
függ. A lépés időigénye egyrészt függ magától a DNS-polimeráztól, másrészt az amplifikálandó DNS szakasz hosszától. Ebben az esetben 72°C-on, melynek időtartama: 20 sec.

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

3.4. Nested PCR

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

A fragmentek méretének becslésére a mintákkal egy gélen elválasztott GeneRuler DNA Ladders markert használtam (11. ábra).



11. ábra 100 bp Plus marker beosztása

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

3.5. PCR termékek izolálása agaróz gélből és tisztítása

A kiválasztott minták PCR termékeit 1,2% agaróz gélen elválasztottuk, majd a megfelelő méretű terméket kivágtuk az agaróz gélből. A termék láthatóvá tételére UV fényt, a kivágáshoz steril szikét használtunk.

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

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

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

3.6. RNS kivonás

Az RNS kivonást Gambino és munkatársai (Gambino et al. 2008) által kidolgozott leírás alapján végeztem.

1. A kb. 200 mg-os növényi mintákat dörzscsészékben eldörzsöltem, majd 850 µl 65 °C-os CTAB tartalmú extrakciós puffert és 17 µl β-merkaptóetanolt mértem rájuk.
2. Eppendorf csövekbe öntöttem a mintákat és 10 percre 65°C-os vízfürdőbe helyeztem őket.
3. Ezt követően 850 µl kloroform-izoamilalkoholt pipettáztam rájuk, majd óvatos forgatás után 10 percig 4 °C-on centrifugáltam (10 000 rpm).
4. Új csövekbe 800 µl kloroform-izoamilalkoholt pipettáztam, amire a felülúszót mértem.

5. Ismét 10 percig 4 °C-on centrifugáltam (10 000 rpm).
6. 450-500 µl- felülúszót 250 µl 9M-os LiCl-ra mértem. Óvatos forgatást követően 30 percre jégre tettem, majd 4 °C-on 20 percig centrifugáltam (13 000 rpm).
7. Ezután a felülúszót leöntöttem, majd 450 µl 65 °C-ra előmelegített SSTE oldatot mértem a csövekbe.
8. Vortexeltem, majd hozzáadtam 450 µl kloroform-izoamilalkoholt. 10 percig 4 °C-on centrifugáltam a mintákat (10 000 rpm).
9. Ezt követően 400 µl felülúszót mértem 280 µl izopropanolt és 30 µl 4M-os Na-acetátot tartalmazó csövekbe.
10. Forgattam, majd 20 percig 4 °C-on centrifugáltam (13 000 rpm).
11. A csapadékot 1 ml 70 %-os etanollal mostam.
12. 5 percig 4 °C-on centrifugáltam, majd az alkoholt óvatosan leöntöttem róla és 10 percig SpeedVac-ban szárítottam.

A visszaoldást 25 µl ultratiszta vízben (MQ) végeztem.

3.7. cDNS készítése

A kivont RNS-ekből több egyed RNS-ét tartalmazó keveréket (poolt) készítettem. Az izolátorház mintáiból három, az új törzsültetvény mintáiból négy, a régi törzsültetvény esetében két, a termőültetvényből pedig egy poolt készítettem.

A poolozott RNS templátokról reverz transzkripció segítségével komplementer cDNS-t készítettem, ehhez a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Thermo Scientific) használtam. A minták töménységét Nanodrop készüléken megmértem, ezt követően minden csőbe 500 ng-nak megfelelő templátot pipettáztam.

A csövekbe 0,25 µl random primert mértem és annyi MQ vizet adtam hozzá, amennyi 3,12 µl végtérfogatra egészítette ki az oldatot. Vortexelés után a csöveket centrifugáltam, majd 5 percre 65 °C-os vízfürdőbe, majd jégre raktam őket.

Ezt követően mix-et készítettem mintánként 1 µl 5x Reakciós pufferből, 0,25 µl Ribolock RNáz inhibitorból, 0,5 µl 10mM dNTP-ből, és 0,25 µl Revertaid reverz transzkriptáz enzimből. A denaturált, jégen tartott mintákhoz ebből a keverékből adtam 2 µl-t, majd a következő reakciót hajtottam végre:

25 °C → 10 perc

42 °C → 60 perc

45 °C → 10 perc

70 °C → 10 perc

Az elkészített cDNS-t tízszeresre hígítottam, melyet az RT-PCR alapú vírustesztekben használtam fel.

3.8. Vírus-specifikus PCR

A PPV teszteléséhez az alábbi keveréket készítettem a mintákhoz: 3 µl Phire Buffer (5×), 0,75 µl Forward (PPV_P1) primer (10 µM), 0,75 µl Reverz (PPV_P2) primer (10 µM), 0,3 µl dNTP (10 mM), 0,3 µl Phire Enzyme és 9,4 µl MQ.

A reakcióhoz az alábbi primereket használtam (6. táblázat).

6. táblázat PPV vírus kimutatására alkalmas PCR reakcióhoz használt primerek

Vírus	Primer párok	Bázissorrend
PPV	PPV_P1(9534)r	ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC
	PPV_P2(9292)F	CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA

A reakcióhoz az alábbi protokollt alkalmaztam:

98 °C	→ 30 másodperc	
98 °C	→ 10 másodperc	} 40×
62 °C	→ 10 másodperc	
72 °C	→ 20 másodperc	
72 °C	→ 1 perc	

A CVA teszteléséhez az alábbi keveréket készítettem a mintákhoz: 3 µl Phire Buffer (5×), 0,75 µl Forward (5420) primer (10 µM), 0,75 µl Reverz (6791) primer (10 µM), 0,3 µl dNTP (10 mM), 0,3 µl Phire Enzyme és 9,4 µl MQ.

A CVA kimutatásához használt primerek (7. táblázat).

7. táblázat A CVA vírus kimutatására alkalmas PCR reakcióhoz használt primerek

Vírus	Primer párok	Bázissorrend
CVA	CVAMP-Fm(5400)	ATG TCG ATC ATA CCA GTY AAG
	CVAMP-Rm(6791)	TTA CCT GCA CCA ACY AC

A reakcióhoz az alábbi protokollt alkalmaztam:

98 °C	→ 30 másodperc		
98 °C	→ 10 másodperc	}	40×
62 °C	→ 10 másodperc		
72 °C	→ 20 másodperc		
72 °C	→ 1 perc		

A LChV-1 teszteléséhez az alábbi keveréket készítettem a mintákhoz: 3 µl Phire Buffer (5×), 0,75 µl Forward (LCHV1_9493T) primer (10 µM), 0,75 µl Reverz (LCHV1_10289R) primer (10 µM), 0,3 µl dNTP (10 mM), 0,3 µl Phire Enzyme és 9,4 µl MQ.

A reakcióhoz használt primerek az alábbiak (8. táblázat).

8. táblázat A LChV-1 vírus kimutatására alkalmas PCR reakcióhoz használt primerek

Vírus	Primer párok	Bázissorrend
LChV1	LChV1(9493)F	GTT GTT AGA TTC CGT CAT TAR
	LChV1(10288)R	CAG TCG AAC TAC CAA GCG TTC

A reakcióhoz az alábbi protokollt alkalmaztam:

98 °C	→ 30 másodperc		
98 °C	→ 10 másodperc	}	40×
51 °C	→ 70 másodperc		
72 °C	→ 20 másodperc		
72 °C	→ 1 perc		

3.9. Northern-blot

A Northern-blot technikával RNS molekulákat a nukleinsavak bázispárosodásán alapuló hibridizációs technikával analizálunk. Ez az eljárás elővigyázatosságot igényel, mivel az RNS rendkívül bomlékony. A RNS mintákhoz denaturáló gélt készítettünk, a mintákhoz 90 ml gél

szükséges. A gélt 9 ml 10×MAE pufferből, 1.35 g agarózból, 66 ml desztillált vízből, 15 ml formaldehidből készítettük.

A desztillált vizet agarózzal forraltuk, majd 60 °C-ra lehűtve adtuk hozzá a 10×MAE puffert és a formaldehidet.

A mintákat az alábbi módon kezeltük egy minta esetén: 2 µl 10×MAE, 3,5 µl formaldehid és 10 µl formamid.

4,5 µl RNS templáthoz 15,5 µl mintakezelőt adtunk, majd vortexeltük, és 15 percig denaturáltuk 65 °C-on, majd hozzáadtuk a 2 µl FDE festéket.

10 µl mintát vittünk fel a géltre, majd a gélt MAE-s pufferben választottuk el 90 V-on, 2-3 órán keresztül.

Blottolás

Az üveglapra 2 db Whatmann szűrőpapírt helyeztünk, amelyet két végén 20×SSC oldatban megmerítettünk. Majd üvegpipettával átsodortunk, ezt követően ráhelyezzük a gélt, amely oldalait egyenesre vágtuk, és oldalról folpackkal leszigeteltük. Ezt követően ráhelyeztük a membránt (Hybond N), melyet előtte 20×SSC-ben áztattunk. Majd 3 db Whatmannt helyeztünk rá, majd sok papírtörölközővel takartuk le, végül lesúlyoztuk.

Hibridizáció

A filtereket 65°C-on prehibridizáltuk. A prehibridizálás alatt elkészítettem a radioaktívan jelölt próbát, Decalabel Kit segítségével, a következőképpen:

5 µl 5×Buffert, 1 µl PCR terméket és 19 µl desztillált vizet összemértünk. Majd a keveréket 10 percig forraltunk, ezután jégre helyeztük. Ezt követően a keverékből 1,5 µl-t, 3 µl CTP-vel és 0,5 µl Klenow DNS-sel összemértünk, majd izotópban 37 °C- os vízgőzbe raktunk. Ezután hozzáadtuk a 2 µl dNTP-ét, majd jégre helyeztük. Végül 5 percig forraltuk, és jégre raktuk.

Ezt követően az elhasznált prehibridizációs folyadékot leöntöttük, majd a próbát hibridizációs pufferbe raktuk, úgy öntöttük rá a membránra.

Mosás és exponálás

2× SSC-vel (0,1%) mostuk 5 percig, majd folpackba csomagoltuk, a membránt kazettába helyeztük, ami nem engedi át a radioaktív sugárzást, majd röntgen filmet helyeztünk rá. Ezt követően exponáltuk, majd sötét szobában előhívtuk a filmet.

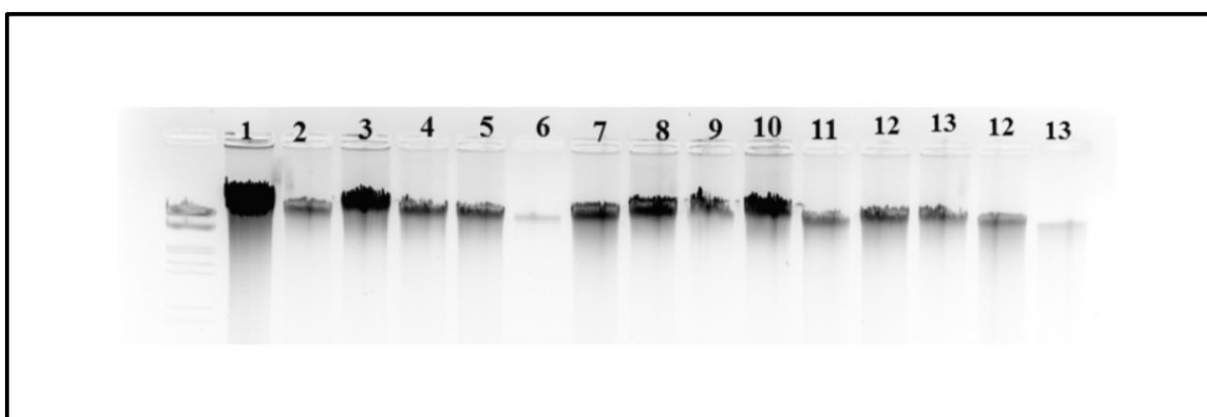
4. Eredmények

4.1. Az ültetvény fitoplazma fertőzöttsége

4.1.1. DNS kivonás

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

A módszer jól működött a csonthéjas mintákon (12. ábra), segítségével egy levélből 150-500 ng/μl DNS-t nyertünk ki.



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

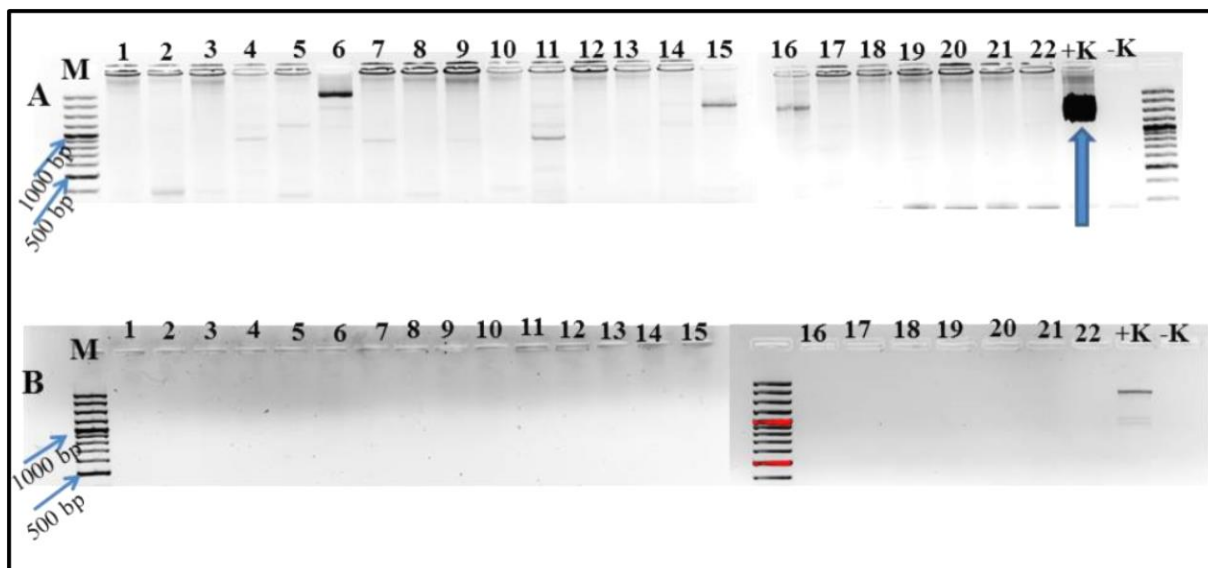
4.1.2. Izolátorház fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

Kutatásom során 22 darab minta fitoplazma fertőzöttségét szerettem volna megvizsgálni.

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

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

A PCR reakciók eredményeképpen az alábbi eredményeket kaptuk (13. ábra).



13. ábra Az izolátorháznál gyűjtött minták DNS kivonásainak nested PCR analízise A/P1/P7 általános fitoplasma specifikus B/fO1/rO1 16SrX csoportspecifikus indítószekvenciákat használva. Az fO1/rO1 primerekkel végzett PCR reakcióhoz a P1/P7 primerekkel amplifikált termékek szolgáltak templátként.

M: Marker: 100 bp Plus

+K: *Aster Yellow* fitoplazmával fertőzött *Tagetes* DNS kivonatát használtuk.

-K: templát helyett desztillált vizet használtunk.

Vizsgálatunkból az derült ki, hogy az izolátorházból gyűjtött minták fitoplasma mentesnek tekinthetők.

Összegezve a kapott eredményeket a 9. táblázatban szemléltetem.

9. táblázat Izolátorházból származó minták eredményeinek összegzése

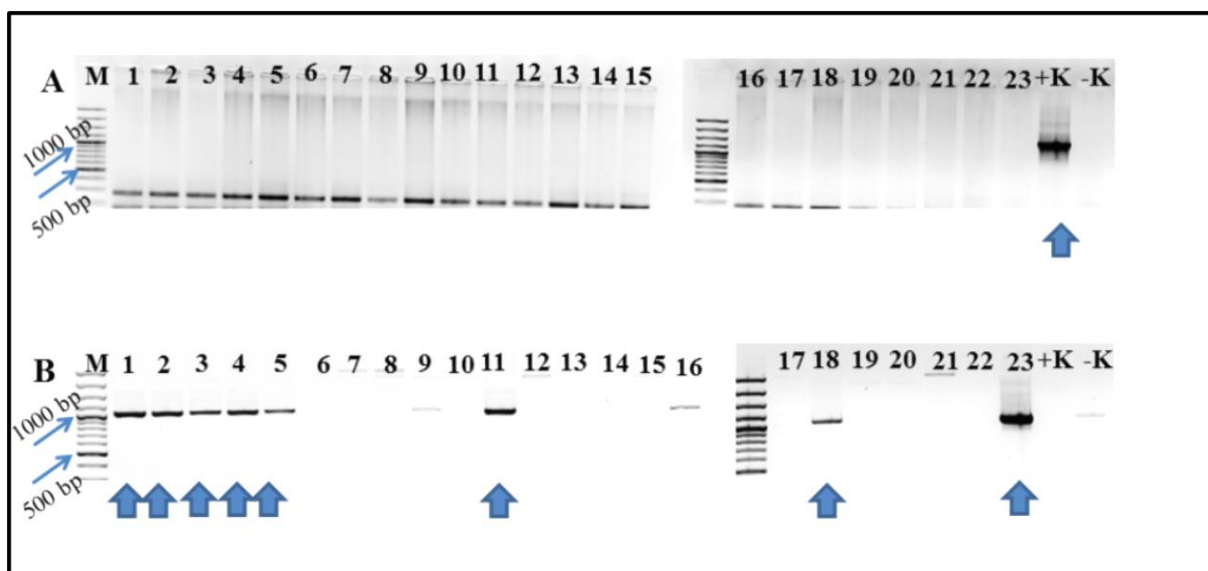
	Izolátorház	Univerzális fitoplazma PCR	16SrX
1	Ceglédi óriás 1/1	-	-
2	Bergeron 1/5	-	-
3	Ceglédi óriás 1/9	-	-
4	Ceglédi arany 1/13	-	-
5	Harcot 1/17	-	-
6	Ceglédi bíbor 1/21	-	-
7	Ceglédi bíbor 1/23 T	-	-
8	Gönci magyar 1/25	-	-
9	Rakovszky 1/30	-	-
10	Maliga kajszí MK132 2/1	-	-
11	Budapest 2/5	-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

4.1.3. Új törzsültetvény fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

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

Ezt követően a PCR-ből kapott terméket használva templátként újabb nested PCR reakciókat mértünk össze, melyhez 16SrX csoport specifikus (fO1 és rO1) indítószekvenciákat használtunk.

A PCR reakciók eredményeképpen az alábbi eredményeket kaptuk (14. ábra).



14. ábra Az új törzsültetvényen gyűjtött minták DNS kivonásainak nested PCR analízise A/P1/P7 általános fitoplazma specifikus B/fO1/rO1 16SrX csoport specifikus indítószekvenciákat használva. Az fO1/rO1 primerekkel végzett PCR reakcióhoz a P1/P7 primerekkel amplifikált termékek szolgáltak templátként.

M: Marker: 100 bp Plus

+K: *Aster Yellow* fitoplazmával fertőzött *Tagetes* DNS kivonatát használtuk.

-K: templát helyett desztillált vizet használtunk.

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

Az érzékenyebb primereket (fO1/rO1) használva viszont már találtunk fitoplazmát a mintákban. Megfigyelhető, hogy a 23 db mintából 8 db minta volt fertőzött fitoplazmával az új törzsültetvény esetében (10. táblázat).

10. táblázat Új törzsültetvényből származó minták eredményeinek összegzése

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

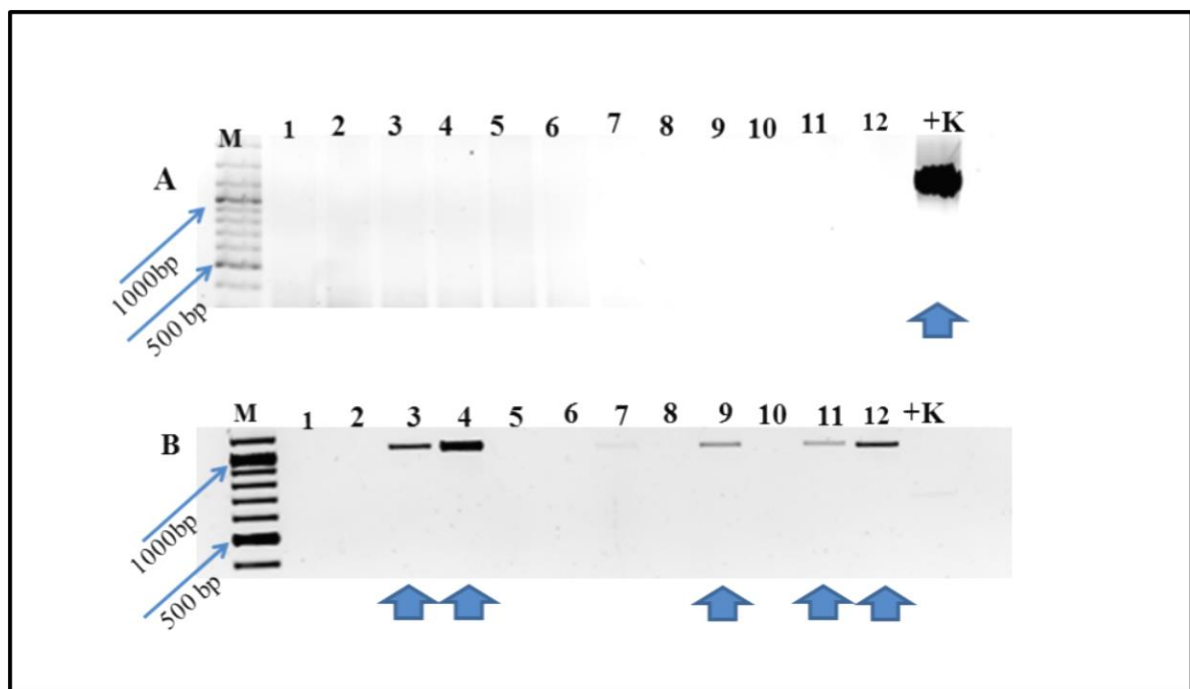
4.1.4. Öreg törzsültetvény fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

Kutatásomhoz az öreg törzsültetvényről 12 darab mintát vontam be vizsgáltaimhoz.

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

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

A PCR reakciók eredményeképpen az alábbi eredményeket kaptuk (15. ábra).



15. ábra. Az öreg törzsültetvénynél gyűjtött minták DNS kivonásainak nested PCR analízise A/P1/P7 általános fitoplazma specifikus B/fO1/rO1 16SrX csoport specifikus indítószekvenciákat használva. Az fO1/rO1 primerekkel végzett PCR reakcióhoz a P1/P7 primerekkel amplifikált termékek szolgáltak templátként.

M: Marker: 100 bp Plus

+K: Aster Yellow fitoplazmával fertőzött *Tagetes* DNS kivonatát használtuk.

-K: templát helyett desztillált vizet használtunk.

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

Eredményeinket az 11. táblázatban szemléltetem.

11. táblázat Öreg törzsültetvényből származó minták eredményeinek összegzése

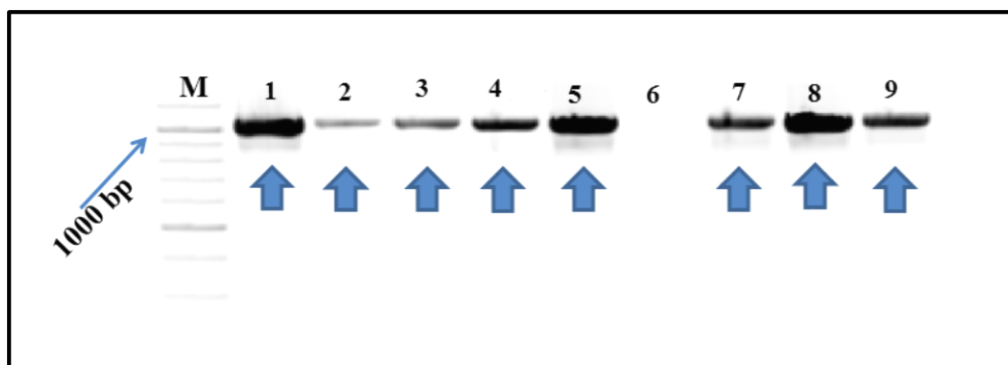
	Öreg törzsültetvény (ÖT)	Univerzális fitoplazma PCR	16SrX
1	beteg	-	-
2	Pannónia	-	-
3	Pannónia 17/40	-	+
4	Ceglédi bíbor 18/45	-	+
5	Ceglédi bíbor 18/42	-	-
6	Gönci magyar 19/40	-	-
7	Budapest 23/42-45	-	-
8	Korai piros 27/38-40	-	-
9	Mk132 29/27-40	-	+
10	Harmat 30/37	-	-
11	Cseresznye Rita 29/35	-	+
12	Korai piros 27/36-40	-	+

4.1.5. Termőültetvény fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

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

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

Az fO1 és rO1 primerekkel vizsgált PCR reakció az alábbi eredményeket adta (16. ábra).



16. ábra A termőültetvénynél FO1/rO1 16SrX csoport specifikus indítószekvenciákat használva. Az fO1/rO1 primerekkel végzett PCR reakcióhoz a P1/P7 primerekkel amplifikált termékek szolgáltak templátként.

M: Marker: 100 bp Plus

+K: *Aster Yellow* fitoplazmával fertőzött *Tagetes DNS* kivonatát használtuk.

-K: templát helyett desztillált vizet használtunk.

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

Összegzésképpen a 12. táblázatban szemléltetem a termőültetvény mintáiból kapott eredményeket.

12. táblázat Termőültetvényből származó minták eredményeinek összegzése

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

4.1.6. Tisztított minták szekvenálása

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

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

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

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

Tehát a BLAST program segítségével kigyűjtött szekvenciákat bemásoltuk a Clustal Omega programba, amely elkészítette az illesztéseket. A csillaggal jelölt részek teljes egyezést jelentenek a szekvenciák között, ahol nincs csillag ott bázispár eltérés van, egy vagy több szekvenciában is.

A szekvencia illesztéshez nemcsak az adatbázisból kigyűjtött szekvencia darabokat használtuk fel, hanem a termőültetvényről származó mintáinkról (T1, T5, T9), általunk amplifikált fO1 és rO1 primerekkel készített PCR termékek szekvenciáját is. A szekvenálás eredménye alapján egyértelmű, hogy '*Ca. Phytoplasma prunorum*' van a mintánkban, mivel 99%-os egyezést mutat az adatbázisban található izolátumok szekvenciájával (17. ábra).

T9_16S	TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
T5_16S	TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
DQ011588.1_pyri_16S	TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
AJ542543.1_pyri_16S	TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
CU469464_mali_16S	TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
T1_16S	TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
AM933142.1_prunorum_16S	TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
AJ575105.1_prunorum_16S	TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
AJ575106.1_prunorum_16S	TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
AJ542544.1_prunorum_16S	TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA
JF730310.1_prunorum_16S	TTCTTTTATTAAAGAAGAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAA

T9_16S	TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
T5_16S	TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
DQ011588.1_pyri_16S	TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ542543.1_pyri_16S	TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
CU469464_mali_16S	TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
T1_16S	TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AM933142.1_prunorum_16S	TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ575105.1_prunorum_16S	TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ575106.1_prunorum_16S	TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
AJ542544.1_prunorum_16S	TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT
JF730310.1_prunorum_16S	TTTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTCTATGGTATAAGTTCAACGCT

T9_16S	ATGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
T5_16S	ATGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
DQ011588.1_pyri_16S	ATGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
AJ542543.1_pyri_16S	ATGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
CU469464_mali_16S	ATGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
T1_16S	ATGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
AM933142.1_prunorum_16S	ATGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
AJ575105.1_prunorum_16S	ATGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
AJ575106.1_prunorum_16S	ATGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
AJ542544.1_prunorum_16S	ATGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT
JF730310.1_prunorum_16S	ATGTGTAGCGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCT

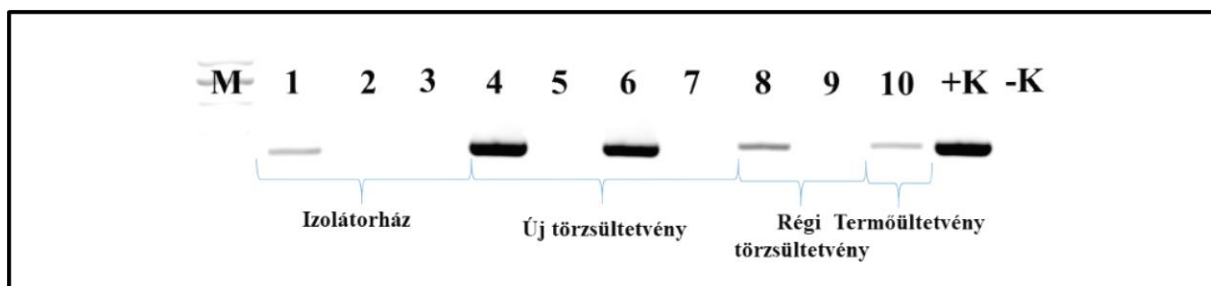
17. ábra Az NCBI adatbázisban megtalálható '*Ca Phytoplasma prunorum*', '*Ca Phytoplasma pyri*' és '*Ca Phytoplasma mali*' és az érdei termőültetvényről származó minták szekvenciáinak illesztése Clustal Omega programmal.

4.2. Vírusdiagnosztikai eredmények

Az RNS kivonást követően a mintákat csoportosítva az izolátorház mintáiból három, az új törzsültetvény mintáiból négy db, a régi törzsültetvény esetében kettő, a termőültetvényből pedig egy poolt készítettem. A poolokból cDNS-t készítettem és ezeket teszteltem az adott vírusok jelenlétére PCR reakcióval az adott vírusra specifikus indítószekvenciákat használva.

4.2.1. PPV

A szilvahimlő vírus vizsgálatát követően az alábbi eredményeket kaptam (18. ábra).



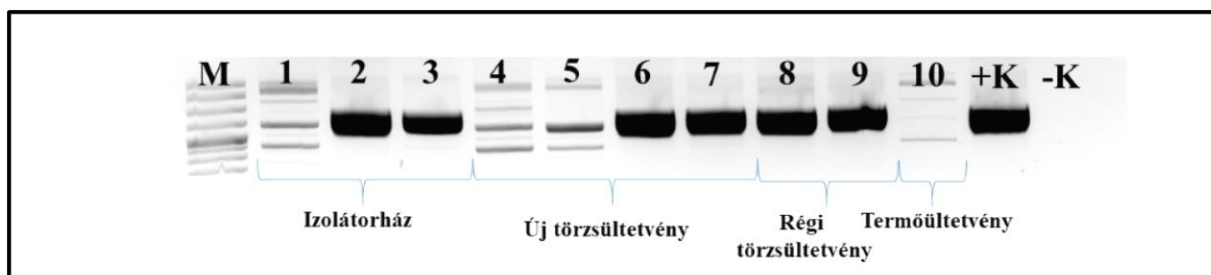
18. ábra A szilvahimlő vírus jelenléte az adott ültetvényekben.

M: 1000bp marker, +K: PPV-vel fertőzött Tuleu Gras törzsültetvényből származó szilva -K: desztillált víz

A kapott eredményekből jól látszik, hogy már az izolátorházban is jelen van a PPV vírus. Az új törzsültetvény mintáiból két pool esetében is erős PPV fertőzöttséget mutatnak az eredmények. A régi törzsültetvényben és a termőültetvényben is kimutatható a kórokozó.

4.2.2. CVA

A *Cherry Virus A*-ra tesztelt PCR vizsgálat eredményeit a 19. ábrán szemléltetem.

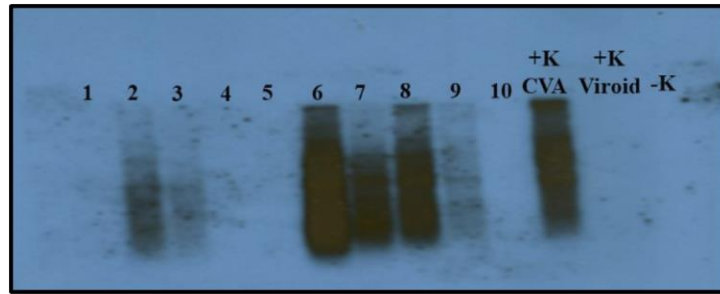


19. ábra A *Cherry Virus A* vírus jelenléte az adott ültetvényekben.

M: 1000bp marker, +K: CVA-val fertőzött Pannónia kajszi, -K: desztillált víz

A PCR eredmények azt mutatják, hogy az izolátorház, az új és az öreg törzsültetvény is meglehetősen fertőzött a CVA vírussal, egyedül a termőültetvény tekinthető a kórokozótól mentesnek.

Northern Blot-tal is elvégeztük a *Cherry Virus A*-ra a vírusesztelést, ennek eredményei a 20. ábrán láthatóak.



20. ábra Northern Blot eredménye

A Northern Blottal kapott eredmények teljes mértékben megegyeztek a PCR vizsgálattal kapott eredményekkel.

4.2.3. LChV1

A *Little Cherry Virus 1* esetében az alábbi eredményeket kaptuk (21. ábra).

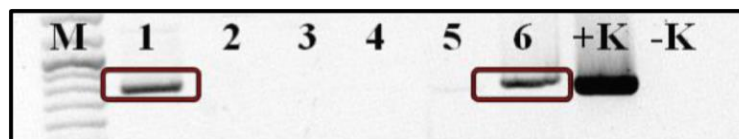


21. ábra A *Little Cherry Virus 1* jelenléte az adott ültetvényekben.

M: 1000bp marker, +K: LChV1-el fertőzött Magyar kajszi, -K: desztillált víz

A PCR eredményéből jól látszik, hogy a régi törzsültetvényben megtaláltuk a *Little Cherry Virus 1*-et, melyet kajszin a tavalyi évben detektáltak először hazánkban.

A poolok közül kiválasztottuk a 8. poolt, melyben megtaláltuk a *Little Cherry Virus1-et*, ennek egyedi RNS mintáiból ismételt cDNS-t készítettünk, ezt követően PCR reakciót hajtottunk végre. Ennek eredményei a 22 ábrán láthatóak.



22. ábra A Pool8 *Little Cherry Virus1*-re tesztelt eredményei

M: 1000bp marker, +K: LChV1-el fertőzött Magyar kajszi, -K: desztillált víz

Az eredményekből jól látható, hogy az öreg Törzsültetvényben két mintából is sikerült kimutatni a *Little Cherry Virus1* jelenlétét, így jól látható, hogy hazánkban is jelen van a kórokozó a kajszi fákban is.

4.2.4. Vírusdiagnosztikai eredmények összegzése

A PPV, CVA és LChV1 vírusra kapott eredményeinket az alábbi táblázatban (13. táblázat) összegeztem.

13. táblázat Vírusdiagnosztikai eredmények

Sorszám	Ültetvény	PPV	CVA	LChV1
1	Izolátorház I.	(+)		
2	Izolátorház II.		+	
3	Izolátorház III.		+	
4	Új törzsültetvény I.	+		
5	Új törzsültetvény II.			
6	Új törzsültetvény III.	+	+	
7	Új törzsültetvény IV.		+	
8	Öreg törzsültetvény I.		+	+
9	Öreg törzsültetvény II.		+	
10	Termőültetvény	(+)		

Az eredményekből jól látszik, hogy a vizsgálatunkba bevont három vírus - PPV, CVA és LChV1 – mindegyike megtalálható volt az általunk mintázott érdei ültetvényekben. Legnagyobb számban a *Cherry Virus A* volt jelen a mintákban, viszont a szilvahimlő vírus (PPV) is jelentősen elterjedt az ültetvényekben. Illetve a *Little Cherry Virus 1*-et is sikerült kimutatni két mintában is az öreg törzsültetvényben.

5. Következtetések, javaslatok

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

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

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

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

A vírusdiagnosztikai eredményekből jól látszik, hogy a kajszit több vírus is képes megfertőzni, ezért érdemes lenne a szilvahimlő vírus mellett a *Cherry Virus A*, illetve a *Little Cherry vírus1*-et is vizsgálni a szaporítóanyag előállításakor, mivel az utóbbi a cseresznye és a meggy esetében

az egyednek mentesnek kell lennie a kórokozótól, hogy értékesíthető legyen (14/2017. (III. 23.) FM rendelet), azt viszont nem tudni, hogy a kajszi fákra való jelenléte milyen hatással van a fákra, esetlegesen a termésre, ezt a későbbiekben érdemes lenne tovább vizsgálni.

Hazánkban nagy gazdasági jelentőséggel bír a mezőgazdaságon belül a gyümölcstermesztés, ezért kiemelkedően fontos lenne hatóságilag szabályozni a szaporító anyagok árusítását, illetve az import szaporító anyagok ellenőrzése is elengedhetetlen feladatnak kellene lennie, mivel csak egészséges szaporító anyag használatával lehet hosszú távon minőségileg és mennyiségileg is megfelelő terméket előállítani.

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

6. Összefoglalás

Dolgozatomban bemutattam a fitoplazmákról, különös figyelmet fordítva a '*Ca. Phytoplasma prunorum*'-ra, illetve a PPV, CVA és LChV1 vírusokról írt legfontosabb magyar és külföldi szakirodalmakat.

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

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

A fitoplazma mellett a vírusokat is érdemes figyelemmel kísérni a kajszi esetében, mivel az eredményekből jól látszik, hogy jelen vannak az ültetvényben. A PPV és a CVA jelenléte jelentősnek mondható az ültetvényben, illetve a Little Cherry Virus-1 kórokozót is megtaláltuk két mintában. A PPV jól ismert zárlati kórokozó a kajszi esetében, viszont a *Little Cherry Virus-1-ről* 2017-ig nem volt ismert, hogy fertőzi a kajszit, ez a kórokozó a cseresznye és meggy esetében karantén kórokozónak számít. Jelenleg nem ismert, hogy ezen vírusok jelenléte milyen hatással lehet a gyümölcsfák állapotára, illetve a termés minőségére vagy mennyiségére.

A szaporító anyag ellenőrzésének elengedhetetlen feladatnak kellene lennie az új ültetvények létrehozásakor. Emellett a vektorok szerepét is fel kellene mérni az adott ültetvényeken. Ajánlott lenne tanulmányozni a különböző vektorok populációdinamikáját, és ellenük ki kellene dolgozni egy integrált növényvédelmi technológiát. Továbbá javasolt lenne az ültetvények környezetében felmérni a különböző lehetséges fertőzőforrásokat is, mind a fitoplazma, mind a vírusok esetében, mivel a vadon élő gazdanövényekről is bekerülhetnek az ültetvénybe a kórokozók.

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

7. Irodalomjegyzék

- Audergon, J. M. (1997): Prospects for breeding apricot for resistance to diseases: sharka, bacteria and apricot chlorotic leafroll. *Italus Hortus*, 4, 24-28.
- Bai, X., Zhang, J. H., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, A.J., Shevchenko, D.V., Tsukermant, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., Hogenhout, S. A. (2006): Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J. Bacteriol.*, 188: 3682-3696.
- Boudon-Padieu, E. és Maixner, M. (1998): Grapevine yellows: current knowledge and control methods. *Bulletin de l'O.I.V.*, 71809-810:572-607.
- Bozsik A. (2014) Gondolatok a csonthéjasok fitoplazmás pusztulásáról – rovarász szemmel *Agrártudományi Közlemények*, 2014/62.: 30-34. p.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P. (2001): Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *Eur. J. Plant Pathology*, 107.: 695-700. p.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K. Asuyama, H. (1967): Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches-broom, aster yellows, or paulownia witches-broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*, 33: 259-266. p.
- Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltrinieri, S., Windsor, H.M., Windsor, D. (2012): Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea* 51.: 607–617. p.
- Danet J. L., Balakishiyeva G., Cimerman A., Sauvion N., Marie-Jeanne V., Labonne G., Lavina A., Batille A., Krizanac I., Skoricić, Ermacora P., Jarausch W., Foissac X. (2011): Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination *Microbiology*, 157: 438–450 p. Davis, M. J., & Whitcomb, R.F. (1981): Fastidious bacteria of plant vascular tissue and invertebrates (including so called rickettsia-like bacteria). *The Prokaryotes: A Handbook on Habits, Isolation, and Identification of Bacteria*. Heidelberg, Springer-Verlag, 2172-2188. p.
- Davis, R.E. és Sinclair, W.A. (1998): Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88 (12): 1372-1376. p.
- Fialová, R., Navrátil, M., Lauterer, P., Navrkalová, V. (2007): 'Candidatus Phytoplasma prunorum': the phytoplasma infection of *Cacopsylla pruni* from apricot orchards and from overwintering habitats in Moravia (Czech Republic). *Bulletin of Insectology*, 60.: 183-184.
- Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520-525. p.
- Gáborjányi R. és Király Z. (2007) Molekuláris növénykórtan *Agroinform Kiadó*, 21. p.
- Horváth J. (1972): Vírusátvitel levéltetvekkkel (aphidofil vírusok). 147–195. p. In: *Növényvírusok, vektorok, vírusátvitel*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 515 p.

- Horváth J. és Gáborjányi R. (1999) Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek, Mezőgazda Kiadó, 68-74. p.
- Jarausch, W., Eyquard, J.P., Lansac, M., Mohns, M., Dosba, F. (2000): Susceptibility and tolerance of new French *Prunus domestica* cultivars to European stone fruit yellows phytoplasma. J. Phytopathol., 148, 489-493. p.
- Jenser G., Süle S., Szita É. Tarján V.J. (2009) A füstösszárnyú körte-levélbolha (*Cacopsylla pyri* Linnaeus) elleni védekezés újabb követelményei és lehetőségei. Növényvédelem 45: 595-603.
- Kirkpatrick, B.C., Smart, C., Gardiner, S., Gao, J.L., Ahrens, U., Maurer, R., Schneider, B., Lorenz, K.H., Seemüller, E., Harrison, N., Namba, S., Daire, X. (1994): Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. IOM Letters, 3: 228-229. p.
- Kiss, E., Mergenthaler, E., Kiss, B. Viczián, O. (2015): A csonthéjasok európai sárgulása (ESFY) magyarországi terjedésének háttérben álló okok. In: Horváth, J., Haltrich, A., Molnár, J. 61. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2015. február 17-18., 60. p.
- Lee, I-M., Gundersen, D.E., Davis, R.E., Chiykowski, L.N. (1992): Identification and analysis of a genomic strain cluster of mycoplasmalike organisms associated with canadian peach (eastern) X-disease, Western X-disease and clover yellow edge. J. Bacteriol., 174: 6694-6698. p.
- Lee, I-M., Hammond, R.W., Davis, R.E., &Gundersen, D.E. (1993): Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. Phytopathol., 83: 834-842. p.
- Lorenz, K-H., Dosba, F., Poggi-Pollini, C., Llacer, G. &Seemüller, E. (1994): Phytoplasma diseases on *Prunus* species in Europe are caused by genetically similar organisms. Z. Pflanzenk. Pflanzen., 101: 567-575. p.
- MARCONI, C., JARAUSCH, B. & JARAUSCH, W. (2010): Candidatus *Phytoplasma prunorum*, the causal agent of European stone fruit yellows: an overview. Journal of Plant Pathology (2010), 92.: 19-34.
- Németh M. (1979): A csonthéjas termésűek vírusbetegségei. Gyümölcsfák vírusos, mikoplazmás és rikettsiás betegségei, Mezőgazdasági Kiadó, 199-422. p.
- Nichols CW (1948). Survey for little cherry disease in Idaho in 1948. Plant Disease Reporter, 32:434. p.
- Nickel, H. (2003): The leafhoppers and Planthoppers of Germany (Hemiptera, Auchenorrhyncha): Patterns and strategies in a highly diverse group of phytophagous insects. Pensoft Publishers, Sofia – Pensoft Publishers, Sofia-Moscow.: 460. p.
- Palmano, S. és Firrao, G. (2000): Diversity of phytoplasmas isolated from insects, determined by a DNA heteroduplex mobility assay and a length poly 16S-23S rDNA spacer region analysis. J. Appl. Microbiol. 89(5):744-50. p.
- Raine, J.; McMullen, R.D.; Forbes, A.R. (1986) Transmission of the agent causing little cherry disease by the apple mealybug *Phenacoccus aceris* and the dodder *Cuscuta lupuliformis*. Canadian Journal of Plant Pathology 8, 6-11. p.

- Reeves L; Cheney PW, 1963. Flowering cherries as symptomless hosts of little cherry virus. In: Institute of Plant Pathology of the University of Bologna, Italy, eds. Proceedings of the Fifth European Symposium on Fruit Tree Virus Disease, Bologna, Italy, 108-114. p.
- Samuel, G., Bald, J.G. & Eardley, C.M. (1933): Big bud, a virus disease of the tomato. *Phytopathology*, 23: 641-653. p.
- Sears, R., Band, B., & Kirkpatrick, C. (1994): Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *American Society for Microbiology News*, 60: 307-312. p.
- Seemüller, E., Schneider, B., Maurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K.H., Furraro, G., Avinent, L., Sears, B.B., Stackebrandt, E. (1994): Phylogenetic classification of phytopathogenic Mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 440-446. p.
- Seemüller E., Marcone C., Lauer U., Ragozzino A. Göschl M. (1998) Current status of molecular classification of the phytoplasmas *Journal of Plant Pathology* (1998), 80 (1), 3-26 p.
- Seemüller E, Schneider B, (2004) 'Candidatus *Phytoplasma mali*', 'Candidatus *Phytoplasma pyri*' and 'Candidatus *Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4):1217-1266. p.
- Sinha, R. C. (1960): Comparison of ability nymph and adult *Delphacodes pellucida ricius*, to transmit wheat streak virus. *Virology* 10:344-352. p.
- Süle S., Viczián, O. és Péntes, B. (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása. *Kertészet és Szőlészet*, 45.: 8-11. p.
- Süle S. (2003): A kajszi baktériumos és fitoplazmás betegségei.. 282-291. p. In: Kajszi. (Eds.) Péntes, B. - Szalay, L. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Süle S, Jenser, G., és Szita, É. (2007): Management of pear decline caused by *Candidatus Phytoplasma pyri* in Hungary. *Bulletin of Insectology* 60: 319-320. p.
- Süle S. (2014): Kajszipusztulás és az ellene való védekezés. *Növényvédelem*, 50 (1): 23-25. p.
- Szirmai J. (1956): Új vírusbetegség hazánkban. *Agrártudomány*, 8: 351-354. p.
- Tedeschit, R., Visentin, C., Alma, A. Bosco, D. (2003): Epidemiology of apple proliferation (AP) in northwestern Italy: evaluation of the frequency of AP-positive psyllids in naturally infected populations of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *Ann. Appl. Biol.*, 142: 285-290. p.
- Torres, E., Martin, M. P., Paltrinieri, S., Vila, A., Masalles, R., Bertaccini, A. (2004): Spreading of EFSY phytoplasmas in stone fruit in Catalonia (Spain). *J. Phytopathology*, 152: 32-437. p

Internetes hivatkozás

- Armijo, G., Schlechter, R., Agurto, M., Muñoz, D., Nuñez, C., Arce-Johnson, P. (2016) Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27066032> (2017. szeptember)

- Dér Zs., Péntes B., Orosz A. (2003): Kajsziültetvényben előforduló kabócák. <http://www.cabi.org/ISC/FullTextPDF/2012/20123408581.pdf> (2017. szeptember)
- Gergerich S. C. és Dolja V. V. (2006) Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/Forms/DispForm.aspx?ID=9>, (2017. szeptember)
- Gildow F, Damsteegt V, Stone A, Schneider W, Luster D, Levy L. (2004). Plum pox in north america: identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread. <https://naldc.nal.usda.gov/download/745/PDF>, (2017. szeptember)
- Horváth Cs., A gönci kajszi megmentése, Kertészet és Szőlészet (2015) 44. szám <http://magyarmezogazdasag.hu/2015/10/28/gonci-kajszi-megmentese>, (2017. szeptember)
- Kövics Gy. és Tarcali G. (2015): A csonthéjasok növekvő veszélyben? <http://agroforum.hu/hirek/csonthejasok-novekvo-veszelyben> (2017. szeptember)
- Levy, L., Damsteegt, V., Scorza, R. and Kolber, M. (2011) Plum Pox Potyvirus Disease of Stone Fruits <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/pages/plumpoxpotyvirus.aspx> (2017. szeptember)
- Marais A., Candresse T., Svanella-Dumas L, & w. Jelkmann Cherry virus A https://openagrar.bmelforschung.de/servlets/MCRFileNodeServlet/Document_derivate_00008977/Cherry%20virus%20A.pdf;jsessionid=98168165B9DBDA3ADC24D96EDBEF814B (2017. szeptember)
- Nyitray L. (2013) Géntechnológia és fehérjemérnökség http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/Gentechnologia/Gentechnologia_e-book.pdf (2017. szeptember)
- Pallas V. & García JA. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900418> (2017. szeptember)
- Šafářová D. Faure C., Candresse T., Navrátil M., Marais A. (2017) First Report of Little cherry virus 1 Infecting Apricot in the Czech Republic <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-09-16-1289-PDN> (2017. szeptember)
- Szatmáry E. (2009) Különböző természetes és mesterséges rekombináns szilva himlő vírus (Plum Pox Virus, PPV) izolátumok jellemzése http://phd.lib.uni-corvinus.hu/385/1/szathmary_erzsebet.pdf (2017. szeptember)
- Szatmáry E. (2009) Különböző természetes és mesterséges rekombináns szilva himlő vírus (Plum Pox Virus, PPV) izolátumok jellemzése http://phd.lib.uni-corvinus.hu/385/1/szathmary_erzsebet.pdf (2017. szeptember)

Egyéb források:

http1: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/34065>

http2: <http://ujkarositok.weebly.com/european-stone-fruit-yellows-phytoplasma-esfy-csontheacutejasok-eruoacutepai-saacutergulaacutesa-fitoplazma.html>

http3: <http://www.potatovirus.com/index.cfm/page/pvyinfo/aphidinfo.htm>

http3:<http://www.flickrriver.com/photos/34878947@N04/14082599766/>

http3:<http://macroid.ru/showphoto.php?photo=158552&lang=en>

http3:[http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Cuscuta_campestris_\(Golden_Dodder\).htm](http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Cuscuta_campestris_(Golden_Dodder).htm)

http4: <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=44379>

http5: <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=443797&dsID=16072&loc=global>

http6, http7: https://www.google.com/maps/d/viewer?mid=1h5TEk21-3sAMvfl5L-5Qxzx70ks&hl=en_US&ll=47.34896356772229%2C18.868350058921806&z=15

http8: www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17462

http9:https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012757_RevertAid_Reverse_Transcriptase_UG.pdf

14/2017. (III. 23.) FM rendelet a gyümölcs szaporítóanyagok előállításáról és forgalomba hozataláról

8. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

9. Mellékletek

1. melléklet 16S rDNS alapján megállapított csoportokba tartozó fitoplazmák csoportosítása (Seemüller 1998)

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

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

NYILATKOZAT

Alulírott _____, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Növényorvos MSc szak végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy diplomadolgozatomban egyoldalas összefoglalója felkerüljön a Kar / Intézet honlapjára. A digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető intézetben, illetve a kialakításra kerülő Kari központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

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

Gödöllő, _____ év _____ hó _____ nap

hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmak korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom.

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

Gödöllő, _____ év _____ hó _____ nap

konzulens aláírása

intézetigazgató aláírása