

SZAKDOLGOZAT

GALOVICS ATTILA
Növényvédelmi szakmérnök

Keszthely
2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Georgikon Campus

Növényvédelmi szakmérnöki Szak

**CSONTHÉJASOK EURÓPAI SÁRGASÁG FITOPLAZMÁJÁNAK
(CA. *PHYTOPLASMA PRUNORUM*) ÉS VEKTORÁNAK, A
SZILVALEVÉLBOLHÁNAK (*CACOPSYLLA PRUNI*) VIZSGÁLATA
MAGYARORSZÁGI KAJSZIÜLTETVÉNYEKBEN**

Belső konzulens: Dr. Keresztes Balázs

Beosztás: adjunktus

Társkonzulens: Nagyné dr. Galbács Zsuzsanna

Beosztás: tudományos munkatárs

Készítette: Galovics Attila

Neptun kód: VL4PC5

Tagozat: levelező

Intézet/Tanszék: Növényvédelmi Intézet,

Növényvédelmi Tanszék

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.....	10
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	14
2.8.2. A fitoplazma fejlődésmenete	14
2.8.3. A <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> által okozott tünetek	15
2.9. VÉDEKEZÉS	16
2.10. A FITOPLAZMÁK KIMUTATÁSA.....	19
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	21
3.1. MINTAVÉTELI TERÜLETEK KIVÁLASZTÁSA.....	21
3.1.1. Balaton Fruit Kft – Balatonvilágos	21
3.1.2. Barackvirág farm, Székesfehérvár-Csala.....	22
3.1.3. Dávid Sándor – Iszkaszentgyörgy.....	24
3.2. <i>CACOPSYLLA PRUNI</i> GYŰJTÉSÉRE ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	25
3.2.1. Gyűjtés kopogtatással	25
3.2.2. A kopogtatás módja és a minták tárolása.....	26
3.2.3. A rovarminták mikroszkópos azonosítása.....	27
3.2.4. Gyűjtés színcsapdákkal	27
3.2.5. Gyűjtés hullámpapír övvel	27
3.3. NÖVÉNYI MINTÁK GYŰJTÉSE.....	28
3.3.1. Levélminták gyűjtése.....	28
3.3.2. Gyökérminták gyűjtése	29
3.4. ALKALMAZOTT LABORATÓRIUMI MÓDSZEREK	30
3.4.1. DNS tisztítás (növény- és rovar mintákból)	30
3.4.2. Agarózgél öntése és a DNS méret szerinti elválasztása agaróz gélen	31
3.4.3. Nyers növényi kivonat készítése Plant Material Lysis Kittel.....	32
3.4.4. LAMP vizsgálat.....	32
4. VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK.....	34
4.1. KOPOGTATÁSOS ROVARGYŰJTÉS EREDMÉNYE	34
4.1.1. Rovargyűjtés a balatonvilágosi ültetvényben	34
4.1.2. Rovargyűjtés a csalai ültetvényben.....	35
4.1.3. Rovargyűjtés az iszkaszentgyörgyi ültetvényben.....	37
4.1.4. Rovargyűjtés örökzöldekről.....	37
4.2. RAGACSLAPPAL ÉS HERNYÓFOGÓ ÖVVEL TÖRTÉNŐ ROVARGYŰJTÉSEK EREDMÉNYE...38	
4.2.1. Gyűjtés ragacslappal.....	38

4.2.2.	Gyűjtés hullámpapír övekkel	38
4.3.	MOLEKULÁRIS GENETIKAI MÓDSZEREKKEL VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI	39
4.3.1.	Kajszilevélből származó DNS kivonása Nucleospin Plant II. kittel.....	39
4.3.2.	Kajszilevélből származó DNS minták vizsgálata LAMP teszttel	40
4.3.3.	Kajszilevél nyers kivonat készítése Plant Material Lysis kittel	45
4.3.4.	DNS kivonás és fitoplazma vizsgálat gyökérmintákból különböző módszerekkel .	46
4.3.5.	Rovarminták fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata.....	51
5.	KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	53
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	56
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	57
7.	SZAKIRODALOM JEGYZÉKE	58
8.	ÁBRÁK ÉS TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	64
9.	MELLÉKLET	65

1. Bevezetés és célkitűzés

A fitoplazmák világszinten okoznak problémát az állókultúrákban, hiszen számos gazdaságilag jelentős növényt képesek megbetegíteni, ami nemcsak terméseszköken nyilvánul 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-es 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 tudományos nevükben a „Candidatus (Ca.)” előtagot. Az EFSY (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 növények számára. A betegség ellen nincs kidolgozott növényvédelmi technológia vagy engedélyezett növényvédő szer. Károsítására 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 szerepelt a vektor betelepülésének és egyedszám változásának 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 rend minden tagja fitofág, a *C. pruni* a csonthéjasok floémjének szívogatása mellett (RIPKA, 2008) vektora a *Candidatus Phytoplasma prunorum* kórokozónak, ami a csonthéjasok európai sárgulás fitoplazmáját (ESFY) okozza (CARRARO ÉS MTSAI, 1998).

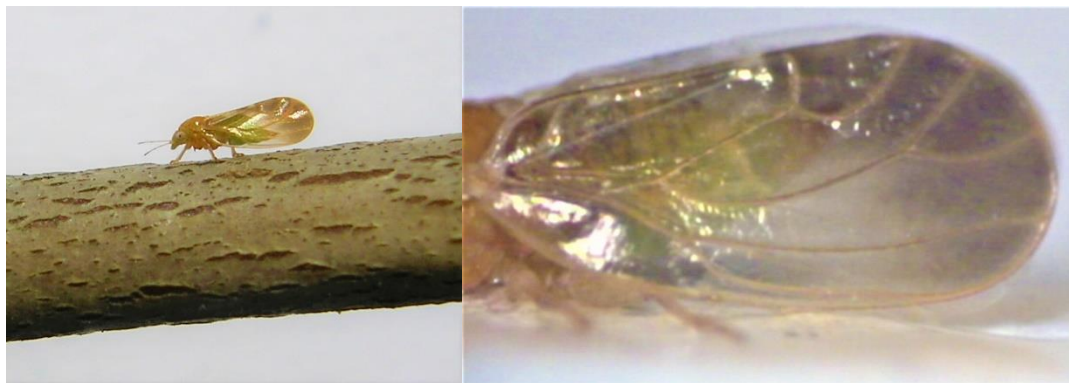
A magyar psyllid-kutatás történetében Horváth Géza tevékenysége (1880, 1886, 1897, 1907, 1915) volt jelentős. Feltárta 87 faj előfordulását az Osztrák-Magyar Monarchia határain belül. Ezek közül 52 fajt azonosítottak a mai Magyarország területén (RIPKA, 2008).

Régebbi besorolás szerint a kabócák (Homoptera) rendjének levélbolhák (Psyllinea) alrendjébe tartoztak (SOÓS, 1984), de Burckhardt 2007-es – és egyben talán a legelfogadottabb – besorolását követve a félfedeles szárnyúak (Hemiptera) rendjének, a növényi tetvek (Sternorrhyncha) alrendjének Psylloidea öregcsaládjába tartoznak (INTERNET_A3). Nevük a bolha görög megfelelőjéből származik, mely utalás arra, hogy ügyesen ugranak (RIPKA, 2010). Az eddig leírt 900.000 rovarfaj közül csaknem 95.000 a Hemiptera rendbe sorolható (GULLAN ÉS CRANSTON, 2005). Ebből mintegy 3000, melyet a levélbolhák tesznek ki (INTERNET_A1). A legújabb kutatások szerint a Psylloidea öregcsalád 6 családból áll: Calophyidae, Carsidariae, Homotomidae, Phacopteronidae, Psyllidae és Triozidae (GULLAN ÉS MARTIN, 2009; INTERNET_A2, INTERNET_A3). Kozmopoliták, a világon gyakorlatilag mindenhol fellelhetők, világszerte 235 nem több, mint 3000 faja ismert (RIPKA, 2009). A Psylloidea öregcsalád Magyarországon 4 családból (Calophyidae, Psyllidae, Trizoidae és Homotomidae), ezeken belül 21 nemből áll. A fenti családokba tartozó 68 fajt, 25 növényi család 99 gazdanövényén találták meg. Ugyan egytől egyig fitofágok, de gazdasági kártételt világviszonylatban csak mintegy 40 fajuk okoz (INTERNET_A2). A *Cacopsylla* génusz képviseli messze a legtöbb fajt, szám szerint 18-at (RIPKA, 2008; FAZEKAS ÉS MTSAI, 2022). Legközelebbi rokonaik a levéltetvek, a liszteskék és a pajzstetvek (KRISTOFFERSEN, 2003).

2.2. Levélbolhák testfelépítésének jellegzetességei

Első ránézésre leginkább kabócákra emlékeztetnek (RIPKA, 2010). Apró, törékeny 1-10 mm nagyságúak (INTERNET_A1), fejük szélessége meghaladja annak hosszúságát, melyen oldalt álló nagy szemek ülnek (HORVÁTH, 1886). A *C. pruni* 2,5-3 mm-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 (1. ábra) (RIPKA, 2010).

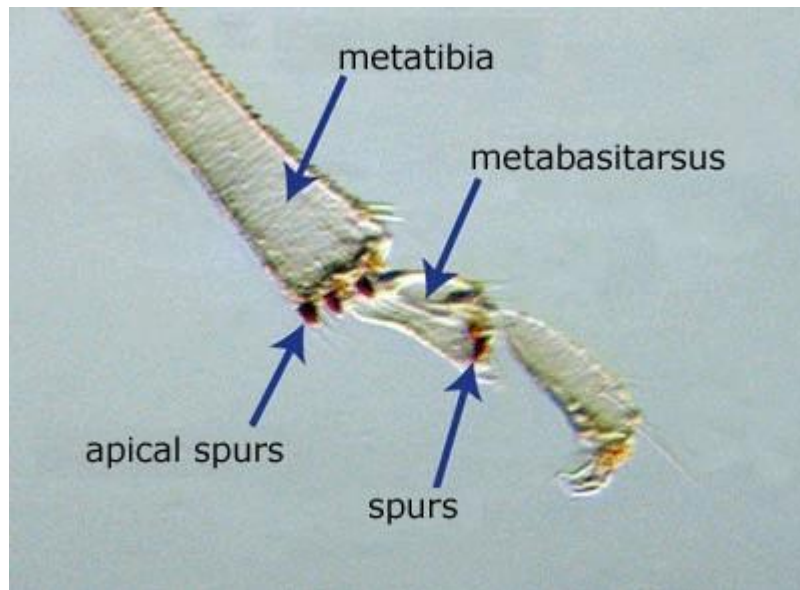
Az összetett szemek tövében eredő csápok előtt diagnosztikai bélyeg értékű pofakúpok találhatók. A csáp 10 ízű, az utolsó ízén 2 hosszabb végserte található, a *C. pruni* esetében a csápok 1,75 mm-nél rövidebbek. A tápnövény azonosításában, a színlátásban, valamint a táplálékból származó kémiai anyagok azonosításában játszanak szerepet. Az imágók mindig 2 pár erősen erezett szárnnal rendelkeznek, melyek közül az elülsők jelentősen nagyobbak, mint a hátulsók. Nyugalmi állapotban a potroh felett sátoztetőszerűen 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 határozóbélyegek. A *C. pruni* elülső szárnyai hosszabbak, mint 3 mm, jól látható csúcsi szegély nélkül, opálosan, füstszerűen sötétek, rajta narancsbarna színezettség látható, mely a szárny széle felé sötétedik (1. ábra) (BOZSIK, 2014; RIPKA, 2010; SOÓS, 1984).



1. ábra: Balra: *Cacopsylla pruni* nőstény; Jobbra: *Cacopsylla pruni* elülső szárnya. Forrás: Saját

Nem számítanak jó repülőknak, de akár 13 kilométert 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 repülnek 1,5 kilométernél messzebbre (RIPKA, 2010).

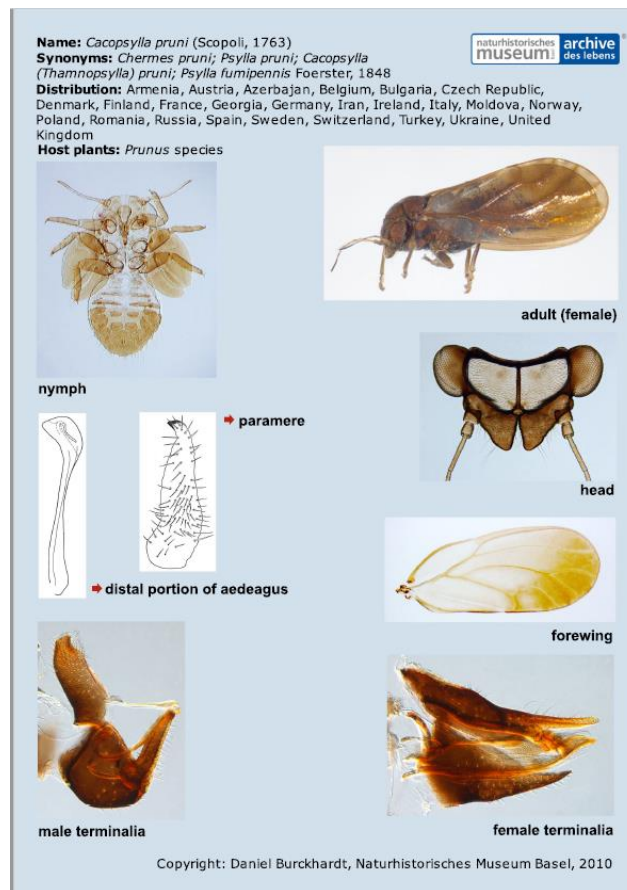
A 3 pár lábból a harmadik pár erős ugrólábbá fejlődött. A csípő erős, rajta ugrást segítő sarkantyú található. A térdhajlatnál, a lábszárvégén, valamint a lábfej első ízén további sarkantyúk találhatók, melyek amellet, hogy az ugrást segítik, a fajok meghatározásánál is jelentőséget nyernek. A hátsó lábak lábszárán térdtüske van. A *Cacopsylla* génuszra jellemző, hogy a metatarsuson 5, míg a metabasitarsuson 2 sarkantyú található (2. ábra). A hím szubgenitális lemeze csúcsi végén lekerekített, míg a nőstényé oldalról nézve folyamatosan keskenyedik (3. ábra) (RIPKA, 2010, SOÓS, 1984, BOZSIK, 2014, INTERNET_A4). A *C. pruni* fontosabb határozó bélyegeit a 4. ábra szemlélteti.



2. ábra: *Cacopsylla* génuszra jellemző hátsó láb jellegzetességei. Forrás: (INTERNET_A7)



3. ábra: Balra: *Cacopsylla pruni* felülnézetből; Jobbra: hímjének ivarkészüléke. Forrás: Saját



4. ábra: *C. pruni* meghatározó bélyegei. Forrás: (INTERNET_A6)

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 szilvalevélbolha leggyakrabban kökényen (*Prunus spinosa*), szilván (*Prunus domestica*), cseresznyeszilván vagy mirabolánon (*Prunus cerasifera* spp. *divaricana*), kökényszilván vagy damonszilván (*Prunus insitita*), zselnicemeggyen (*Prunus padus*), őszibarackon (*Prunus persicae*) valamint kajszin (*Prunus armeniaca*) táplálkozik. Legszívesebben a kökényt szívogatja (FIALOVA ÉS MTSAI, 2004). A levélbolhák a 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 szilvalevélbolha egyed található a *Prunus* fajokon, ezek a nyár elején visszarepülnek a fenyőkre és a tél beálltaig a fenyőtűkön élnek (JARAUSCH ÉS MTSAI, 2000, RIPKA, 2010, SOÓS, 1984, HORVÁTH, 1886, SÜLE 2014a, LEPRES ÉS MTSAI, 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 – akárcsak a pofakúpok és sarkantyúk esetében – a faji meghatározást segíti. A nőstény szubgenitális lemeze oldalról nézve folyamatosan keskenyedik. A nőstények – ahogy a lepkék – feromont bocsájtanak ki az ivarok egymásra találásának megkönnyítésére. Több levélbolha faj is a megtermékenyítést követően petéiket levelekbe, kéregrepedésbe, rügyek mellé, vagy virágokra rakják, de a szilvalevélbolha esetében a nőstények tojásaikat a levélnyélre és annak fonákára, illetve színére helyezik. Az egy nőstény által lerakott tojások mennyisége fajtól függően 20 és 2500 között változhat (RIPKA 2010, BOZSIK, 2014).

2.5. Életciklusuk és egyedfejlődésük

A szilvalevélbolha oligofág, egynemzedékes kártevő, de van egy viszonylag hosszú periódus, mikor közephegységek 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 történik és már a nyári időszakban fenyőfélére (elsősorban lucfenyőre) való vándorlással kezdődik (INTERNET_A5), majd kora tavasszal visszatérnek a vad és termesztett *Prunus* fajokra, ahol párosodnak és megtörténik a tojásrakás. Egyelőre nem ismeretes, hogy a fenyőféléken folytatnak-e táplálkozást (KONTSCHÁN és RIPKA, 2019). A tavaszi visszavándorlás mindig időjárás függvénye, de jellemzően márciusban következik be. Kezdetben az ültetvény környezetében található kökénybokrokra (*Prunus spinosa*) jelennek meg, melyek nyugalmi időszaka hamarabb véget ér, mint más *Prunus* fajoké, valamint a faj legkedveltebb vadon élő tápnövényének számít, majd innen vándorolnak az ültetvénybe (INTERNET_A5). Francia adatok alapján az ültetvényekből gyűjtött *C. pruni* egyedek több mint a fele alansarjakról származott. Ez azt mutatja, hogy a sarjak fontos táplálkozó- és szaporodóhelynek számítanak. A tapasztalatok szerint a diapauzából visszatérő szilvalevélbolhák populációja március-áprilisban éri el a maximumot és május első felében pusztulnak el az áttelelt és szaporodott imágók, majd az új generáció kora nyáron hagyja el az ültetvényt (LICHOU és JAY, 2012). Az ültetvénybe betelepülő levélbolhák fitoplazmával való fertőzési képességéről ellentmondásos nézetek születtek. 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%-os, míg THÉBAUD ÉS MUNKATÁRSAI (2009) Franciaországban mindössze 0,5-0,6%-os tavaszi fertőzöttségről adnak számot.

A pete a növényi szövetből nedvességet vesz fel, melyből hemimetabolizmussal fejlődő, az imágóra nem hasonlító, három pár lábú lárvá 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 lárvá 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

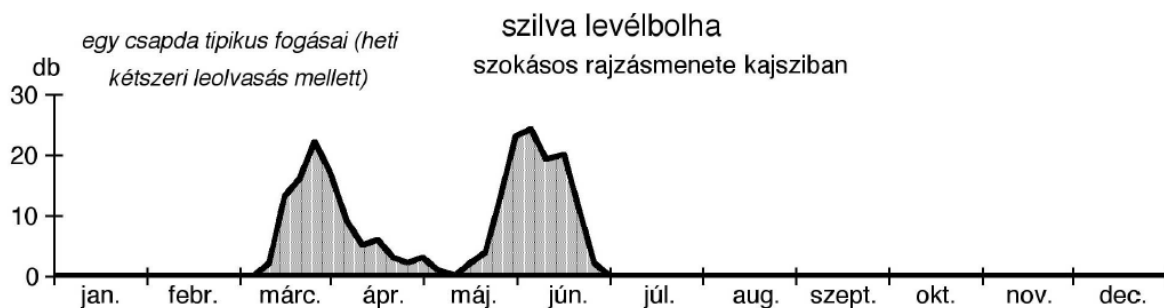
A levélbolhák lárvái, nimfái és kifejlett egyedei is növényi nedveket szívogatnak oly módon, hogy szipókájukkal a bőrszövetet megsebzik és a szállított növényi nedveket szívják a sejtközi járatokból. A legtöbb levélbolha faj imágójának a kártétele elenyésző, a *Cacopsylla pyrisuga* körtén és a *Cacopsylla mali* almafán történő nagymértékű elszaporodása hajtástorzulást okoz. Nagyobb mértékű közvetlen kártételért a lárvák a felelősek. Több fajuk esetén (például a *Cacopsylla pyri*), amennyiben a táplálkozás során felvett, főleg szénhidrát típusú táplálék mennyisége meghaladja a szükségleteiket, a felesleget kiürítik. Ezt méhek, darazsak, hangyák és legyek is gyűjthetik. A ragacsos mézharmaton korompenész gombafajok telepedhetnek meg, melyek az esztétikai kártétel mellett a fotoszintetizáló felületet jelentősen csökkenthetik (HORVÁTH, 1886; RIPKA, 2010).

2.7. A *Cacopsylla pruni* előrejelzése

A *Cacopsylla pruni* a nehezen előrejelezhető fajok közé sorolható, keveset tudunk 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 végigjárjuk az ültetvényt. A vágásokra mért ütéssekkel a levélbolhák az ág alá tartott ernyőbe hullanak. Pár év alatt tapasztalatot szerezhethetünk a betelepülés irányáról. Kora tavasszal az ültetvénybe való betelepülésük előtt célszerű az ültetvényeken kívül található kőénybokrokat vizsgálni, mert korábbi fakadása miatt ott a *C. pruni* hamarabb megjelenik.

Szintén érdemes figyelni a galagonya levélbolha (*Cacopsylla melanoneura*) megjelenését, mert ez a faj a szilvalevélbolha előtt nagyjából egy héttel jelenik meg (INTERNET_A5).

Szignalizációra szintén megfelelő eredményt adnak a ragacslapok. MERGENTHALER ÉS VICZIÁN (INTERNET_A5) javaslata szerint a sárgalapos megfigyelés a szilvalevélbolhák mind a tavaszi visszatelepülésére, rajzására, mind pedig az egyedszámuk alakulásának detektálására alkalmas. Az ATK Növényvédelmi Intézete, az általa 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 2,5-szer több *C. pruni* egyedet fogott, mint a zöldessárga (INTERNET_B10). A sárga, vagy egyéb színű színcsapdákhoz képest a fehér hatékonyabbnak bizonyul, mert szilvalevélbolhák ültetvénybe való betelepülését előbb jelzi, és a többi színnel szemben jelentősen több egyedet fog (BODNÁR ÉS MTSAI, 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 szilvalevélbolhán 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 (5. ábra) számíthatunk (INTERNET_A5, INTERNET_B10).



5. 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). A fitoplazmákat természetes közegükben a rovarok terjesztik, ezek közül a legtöbb a Cicadellidae, Cixiidae, Psyllidae, Delphacidae és Derbidae családokba tartozik (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 sokan 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, hogy a betegség terjesztői kizárólag a levélbolhák. A fitoplazma a vektor segítségével növényi szállítószövetbe jutva a növényben szétterjed, és felélve a növény tápanyagait sárgulás, sodródás és torzulás következik be, a termés minősége és mennyisége romlik, a hánccsszövet elhal, melynek következtében a fertőződött fásszárú növény részben, vagy teljesen, de menthetetlenül, gutaütésszerűen elpusztul (SÜLE, 2014a, DÉR ÉS MTSAI, 2002). A frissen elpusztult fák hánccsszövege 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 nevezték el (GUNDERSEN ÉS MTSAI, 1994). A fitoplazmák egyfajta sejtfal nélküli baktériumok, méretük 500 nm körüli, genom méretük 500 és 1000 kb közé esik (SÜLE, 2014a).

SEEMÜLLER ÉS SCHNEIDER (2004) publikációjukban rámutatnak, hogy az almafa boszorkányseprűsödését okozó *Ca. Phytoplasma mali*, a körteleromlást okozó *Ca. Phytoplasma pyri*, valamint a csonthéjasok európai sárgaságát okozó *Ca. Phytoplasma prunorum* 16S rDNS szekvenciája közel azonos. Ez alapján 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” (= jelölt) 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

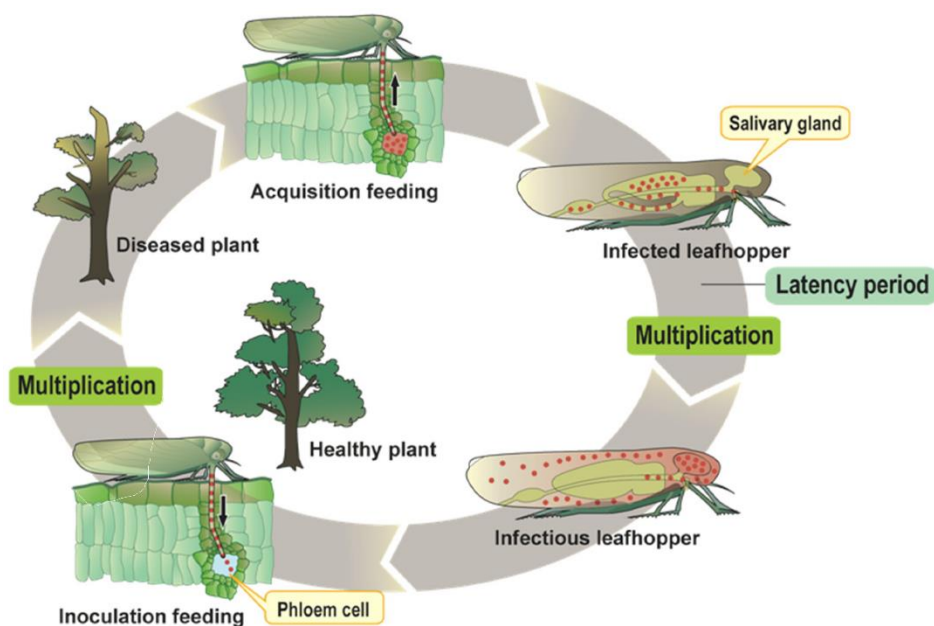
Nemzetség: Phytoplasma

Faj: Candidatus *Phytoplasma prunorum* (INTERNET_A8)

Ca. Phytoplasma prunorum nemcsak a kajsziban, 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 SASKIA (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* kórokozó *Cacopsylla pruni* általi átvitelének paramétereit. Ezek szerint a szilvalevélbolhának 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, aminek letelte után a fitoplazma már a frissen fertőzött növényből is kimutatható. A levélbolhák életük végéig megőrzik fertőzőképességüket (CARRARO ÉS MTSAI, 2001). TEDESCHI ÉS MUNKATÁRSAI (2006) arra világítottak rá munkájukban, hogy nemcsak a kifejlett rovarból, de annak lárvájából, nimfájából, sőt a petéjéből is kimutatható a *Ca. Phytoplasma prunorum*. A fitoplazmák fejlődésmenetének általános sémáját a 6. ábra szemlélteti.



6. 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 (hőszokk, 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 fajától, fajtájától és a környezeti tényezőktől egyaránt. A kajszin – „szerencsés” esetben – egész évben láthatók a tünetek. Télen a gyökerekben telel át, majd a hánccszövet 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 (7. ábra), míg más esetekben a levelek haragoszöldek és törékenyek, később petyhüdtté, fonnyadtta 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 hánccs kezdetekben narancssárgás, később világosbarna színezetű. Ha a kórokozó körkörösén elpusztította a hánccsot 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 fákön gyorsabb, idősebbek esetében lassabb pusztulást tapasztalhatunk (INTERNET_A5). A gazdasági jelentősége abban nyilvánul meg, hogy a fertőzött ültetvények éves pusztulásának mértéke 8-10%, de ez a szám akár a 25-30%-ot is elérheti (SÜLE, 2014a).



7. ábra: Sárguló, kanalasodó levelek és egészséges lombozat két szomszédos kajszin. Forrás: Saját

2.9. Védekezés

A *Cacopsylla pruni* és az általa terjesztett *Ca. Phytoplasma prunorum* ellen való védekezés a kajszii 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 MTSAL, 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 fertőzésmentes 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 fertőződést 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 népességváltozását 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 szilvalevélbolha a *Ca. Phytoplasma prunorum* egyedüli vektora.

A telepítést követően a 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 besorolású, így a kajszi virágzásakor, valamint abban az esetben, ha a gyomflórát, illetve a környékbeli kultúrákat a méhek látogatják, használata tilos (INTERNET_B18). A gyakorlat azt mutatja, hogy a méhekre nem jelölésköteles acetamiprid hatóanyag a szilvalevélbolha egyedeit is hatékonyan gyéríti (Boros Gergely szóbeli közlése; Balaton Fruit Kft).

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

Ellenben a paraffinolaj, illetve a kaolin hatékonyan tartotta távol hosszabb ideig is a levélbolha egyedeket. Magyarországon kaolin tartalmú készítmény (Surround WP) kajsziiban 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).

A fertőzött, vagy már elpusztult fákat mindenképpen gyökerestől el kell távolítani, hogy ne szolgálhassanak fertőzési forrásként. Bár a fitoplazma csak az élő fában képes életben maradni, a legyengült vagy elpusztult kajsziifák alanyai még gyakran annyira életerősek, hogy az alany képes kihajtani. A vad sarjakon a levélbolhák száma mindig több mint a kajsziifákon (LABONNE ÉS LICHOU, 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 egyedek és a kajsziifát is egyben (SÜLE, 2014b). Ha lehetőség engedi, szükséges az ültetvény környezetében fellelhető vad *Prunus* fajokat is eltávolítani (MARCONE ÉS MTSAI, 2010).

Több olyan – egyelőre in-vitro – védekezési lehetőséggel is kísérleteznek, melyek még kidolgozásra várnak. Ilyen a hajtáscsúcstenyésztés, a hajtástenyésztés, illetve a kallusztenyésztés, melyek azon túl, hogy rendkívül körülményesek és hosszadalmasak, fennáll a más kórokozókval való fertőződés kockázata. Megfigyeltek olyan hidrogén-peroxid aktivitáshoz kötődő spontán gyógyulásokat, mikor a növény föld feletti részéből eltűnt a kórokozó. A gyógyulás mechanizmusa még nem tisztázott (CARRARO ÉS MTSAI, 2004, MUSETTI ÉS MTSAI, 2004, 2005, MARCONE ÉS MTSAI, 2010).

SALAZAR ÉS JAYASINGHE, (2001) olyan eljárást ismertet melyhez hasonlót 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. Ezek a törzsek lehetséges, hogy a jövőben felhasználhatók lesznek keresztvédettség 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 szilvalevélbolhának 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 növény megbetegedésekről 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 tenyészthetők. 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 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 visszaszorult (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 (MULLIS ÉS MTSAI, 1986).

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 ÉS SEEMÜLLER, 1992). Később a 16S és 23S rDNS-re tervezett univerzális és specifikus primerek lehetővé tették a pontosabb azonosítást, fajsztípus kimutatást (NAMBA ÉS MTSAI, 1993, GRIFFITHS ÉS MTSAI, 1999, GUNDERSEN ÉS MTSAI, 1996).

A PCR restrikciós endonukleázokkal történő hasításával azonosíthatók az egyes fitoplazma csoportok, amelyek a későbbi osztályozás alapjait tették le (LEE ÉS MTSAI, 1993). A PCR használatának hátránya, hogy a hőmérsékleti ciklusok lefuttatásához speciális készülékre van szükség, 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) 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 jól 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 (esetenként 3) primer, 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 kizsorító 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 hajtúhurokot 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 ÉS MTSAI, 2000, SALÁNKI, 2017, INTERNET_B13, INTERNET_B14, INTERNET_B15).

3. Anyag és módszer

Három helyszínen, három különböző méretű ültetvényben végeztem a vizsgálataimat. Ezek egyrészt rovarfajtaik voltak, mely során rögzítésre került az ültetvénybe betelepülő *Cacopsylla pruni* egyedszám változása, másrészt molekuláris biológiaiak, melynek keretében a levélbolhák, a kajszibarackfák és egyéb fajok leveléből és gyökeréből kivont DNS-t vagy nyers kivonatokat vizsgáltam *Ca. Phytoplasma prunorum* 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 kajszibarack. A kijelölt mintaterület 4,5 ha, kora változó, a legrégebbi telepítések 23 évesek, a pótlásokkal az ültetvény folyamatosan újul. Kiváló adottságú, a Balatontól alig 1,5 km-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 üdülőtelkek és lakóházak találhatók, melyek udvarán jellemzőek a különböző fajú fenyőfélék, ezeknek jelentősége lehet a vektorok diapauzájában. Az ültetvény ÉK oldalán egy mezővédő erdőszáv húzódik, melyben megtalálható a *Prunus cerasifera*, *Prunus mahaleb* (sajmeggy), többféle *Prunus* faj, illetve *Rhamnus cathartica*. Telepített fajták: A mintaterületen soronként 4:1 arányban Bergerouge és Late jumbo fajták váltják egymást. Az ültetvény műholdképe a 8. ábrán látható.



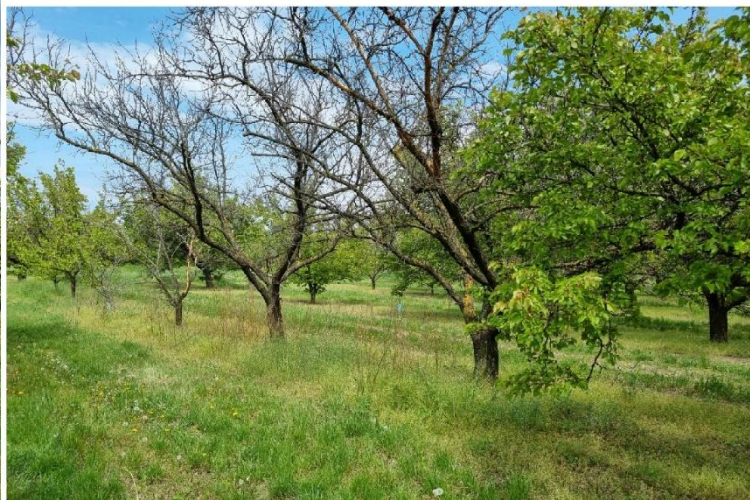
8. ábra: A balatonvilágosi ültetvény műholdképe. Forrás: (INTERNET_B16)

3.1.2. Barackvirág farm, Székesfehérvár-Csala

A székesfehérvár-csalai ültetvény (továbbiakban: Csala) Székesfehérvártól 3 km-re, északkeletre található, légvonaltól alig 1km-re a pátkai víztározótól. Az ültetvény területe 54 ha, melyből a kajszibarack 25 ha-t tesz ki, a további 29 ha-on szilvát, meggyet, szamócát és őszibarackot termelnek. A vizsgált terület nagysága 21,5 ha. A terület legmagasabb pontja 195 m, míg a legalacsonyabb 162 m-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 (10. ábra) eredményeként feltörő alanyhajtások (mirabolán sarjak) olyan mértékben vannak jelen az ültetvényben, hogy fává tudtak erősödni (9. ábra).



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



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

A kajsziültetvény 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. Az ültetvény műholdképe a 11. ábrán látható.



11. ábra: A székesfehérvár-csalai Barackvirágfarm Kft ültetvényének műholdképe.
Forrás: (INTERNET_B16)

3.1.3. Dávid Sándor – Iszkaszentgyörgy

A harmadiknak választott ültetvényre az extenzív művelése miatt esett a választás. 2019-ben telepítették, méretét tekintve a legkisebb, mindössze 78 fa alkotja. Iszkaszentgyörgy-Kisiszka területére esik, zártkerti besorolású, a szomszéd területeken hétvégi és állandó lakóingatlanok találhatók. Fekvése ÉK, K-DNy, Ny irányú, 3 sorban hármas kötésbe rendezett. Csapadéokban 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 (180 m-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 kajszfajtái: Magyar kajszi, Gönci magyar kajszi, Piroska és Pannonia. Az ültetvény műholdképe a 12. ábrán látható.



12. ábra: Dávid Sándor ültetvényének műholdképe. Forrás: (INTERNET_B16)

3.2. *Cacopsylla pruni* gyűjtésére alkalmazott módszerek

3.2.1. Gyűjtés kopogtatással

A rovarok detektálására 65 cm átmérőjű, véka formájú, fehér vászonból készült, szabvány kopogtatóernyőt (13. ábra), 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. októberében 25 cm széles hullámpapír öveket helyeztem ki az ültetvényekbe, valamint a közeli fenyők törzsére (14. ábra). 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 LAMP -teszttel vizsgáltam a fitoplazma jelenlétét a rovarban.



13. 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.

A csalai helyszínen 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 vizsgálatát mellet 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. Egyrészt magasságuk és kiterjedésük legtöbbször jelentősen meghaladta azt a méretet, amit kézi eszközökkel, vagy akár létráról is elvégezhettem volna. Másrészt 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*)
- Ezüstfenyő (*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 kopogtató ernyőt az ág alá tartjuk, majd egy nagyjából 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 különböző levélbolha fajok szabad szemmel is jól láthatók, átlagosan 2,5-3 mm nagyságúak, a *C. pruni* narancssárga szárnyszínével jól kitűnik az egyéb levélbolha fajok közül. Apró méretük miatt begyűjtésükhöz optimális rovarszippantót használni, mert bármilyen más módszer használata esetén elugranak, vagy megsérülhetnek. A felszippantott rovarokat egy kisméretű zacskóba ürítjük, majd a zacskó belsejébe grafitral írt azonosító (etikett) cédulát helyezünk. A rovarok elkábítására etil-acetáttal átitatott papírzsebkendő darabot használunk és ne vattát, ugyanis abba könnyen belegabalyodnak, illetve benne elbújhatnak. Végezetül a zacskót csomóval zárjuk le. Az illékony etil-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 MATE Georgikon Campusának Növényvédelmi Tanszékéről származó, gyakorló sztereomikroszkóp 6,3 x 1,6 nagyítása bizonyult. Az azonosítást követően a rovarmintákat 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, mely az erdősávtól néhány méterre húzódott. A megfigyelési időszak augusztus végéig tartott.

3.2.5. Gyűjtés hullámpapír övvel

A vegetációs idő végén hullámpapír öveket helyeztem ki az ültetvényekbe, a közeli fenyőfélékre (erdei-, fekete- és lucfenyő), illetve a mezővédő erdősávba is. Arra voltam kíváncsi, hogy a levélbolhák igénybe veszik-e és elsősorban melyik élőhelyen a kihelyezett téli menedéket. A kajszikra nagyjából 50 cm törzsmagasságban kerültek ki a 25 cm széles övek (14. ábra), melyeket műanyag kötőzsineggel szorítottam a törzsre. A fenyőfélék esetében az öveket fejmagasságban tekertem a fák törzsére (14. ábra). A mezővédő erdősáv esetén a burjánzó növényzet miatt törzsre nem lehetett a hullámpapírt felerősíteni, így ebben az esetekben vastagabb ágakat tekertem körbe. Leszedésükre 2023 februárjában került sor, 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 hullámpapír övben keresnek téli menedéket, úgy a diapauzából felébredve a zacskóban láthatóvá válnak.



14. 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 másodika között került sor. A családi mintaterület esetében a levélminták gyűjtése 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 erdősávban 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 négy 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 (15. ábra), 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 spray-vel 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



15. ábra: Pusztuló kajszi a balatonvilágosi ültetvényben. Forrás: Saját

A kategóriákba sorolás alapját a TARCALI ÉS KÖVICS (2009) által felállított látható szimptomák szerinti besorolás képezte. A kajsziokról származó minták I-VI. tüneti besorolást kapták, míg a mezővédő erdősávból származó egyéb fajok – melyek nem mutattak tüneteket – az I. kategóriát. A mintákat a mintázás ideje alatt hűtőtáskában, majd a MATE Növényvédelmi Intézetbe történő elszállításig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam, ezt követően a laborban feldolgozásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolták a mintát.

3.3.2. Gyökérminták gyűjtése

Mivel a fitoplazma a növény vegetációs időszakának végén a gyökérbe húzódik vissza, ezért a gyökérmintákat a termő kajsziák 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 volt 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 hajszálgököket, 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 általánosságban 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 teszttel végeztük a fitoplazma detektálást.

3.4. Alkalmazott laboratóriumi módszerek

A rovarmintákat, az erdősávból gyűjtött levélmintákat, illetve a kajszifák 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 teszttel végeztem.

3.4.1. DNS tisztítás (növény- és rovar mintákból)

A DNS kivonást NucleoSpin Plant II (MACHEREY-NAGEL) kittel végeztem (felhasználási útmutatója a melléklet fejezetben olvasható). A kit tartalmazta mindazon puffereket és szűrőket, amik a DNS tisztításhoz szükségesek. A kiten kívül szükségesek 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 RNÁzt, mellyel a mintában fellelhető RNS-t bontattam el, így biztosítva, hogy csak DNS legyen a mintákban. A mintákat 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 pipettáztam, majd 5 percig centrifugáltam. Az átszűrt folyadékot átöntöttem 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe, hozzáadtam 450 µl PC puffert és homogenizáltam. A folyadékból 700 µl-t átpipettáztam, 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, végül 700 µl PW2 puffert adagoltam hozzá, amit újabb 1 perc centrifugálás követett. Az átfolyót leöntöttem és itatóspapíron a szűrőn és a szűrőtartón lévő mosóanyagot leittam. Újabb 200 µl PW2-t mértem a szűrőre, majd 2 perc centrifugálás után a szűrőt újra leittam. 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 25 µl-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 méret szerinti elválasztása agaróz gélen

Az agaróz gél közvetlenül a futtatás előtt készítettem el. 8x15 cm-es üveglapra beállítottam a „fésűt”, ami a zsebeket készíti az agaróz gélbe. A talpas lombikban tárolt agarózhoz annyi desztillált vizet öntöttem, hogy nagyjából 1 cm-re lepje 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 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 (~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 Etídium-bromiddal festett, 1,2 %-os agaróz gélre vittem fel. A festékekkel kevert DNS-ből 6 µl-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 növényi kivonatot (crude extractot) készítettem a mintákból. A levelek egy részének szétőrzsöléséhez a Plant Material Lysis Kit-ben található erős műanyag csövet használtam, melyben a cső átmérőjéhez igazodó csapágygolyó van (Ø: 10 mm). A levelekből 2x2 cm-es darabokat, a gyökérmintákból pedig 3-4 db 3 cm-es darabot előzetesen szikével kisebb darabokra vágtam a könnyebb feltárás érdekében, majd a csövekbe helyeztem, hozzáadtam 1 ml lízis puffert és lezártam. A minta típusától függően 1-5 percig vortexeltem, amíg a minta szöveteit teljesen széttronsoltam. A kit tartalmaz a szükséges folyadékminta 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 specifitását: két külső primert (F3 és B3) és két belső kettős primert (FIB és BIP) (1. táblázat).

1. táblázat: LAMP teszthez használt indítószekvenciák bázissorrendjei. Forrás: (DE JONGHE ÉS MTSAI, 2016)

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 kajsziбарack mintából tisztított DNS-t, míg negatív kontrollként steril desztillált vizet használtam. Ezt követően 21 µl LAMP mixet adtam a mintákhoz. A vizsgálatot az 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 az amplifikált DNS-t a minták egy részénél ellenőrzésképpen 1,2%-os agaróz gélen is elválasztottam.

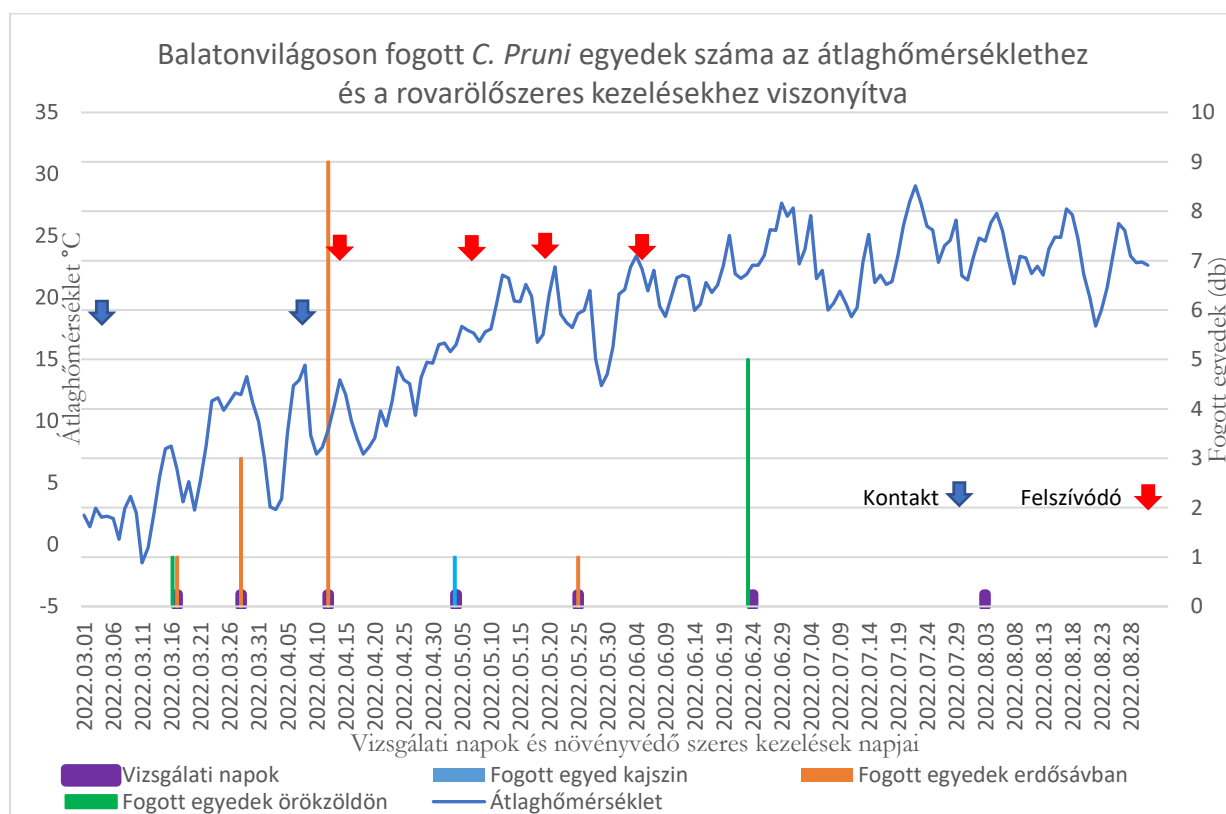
4. Vizsgálati eredmények és értékelésük

4.1. Kopogtatásos rovargyűjtés eredménye

2022-ben Iszkaszentgyörgyön és Balatonvilágoson 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-e és augusztus 8-a között csak az ültetvény közelében található mezővédő erdősávban és zártkertek örökzöldjein voltak fellelhetők. Az összes fogás 21 szilvalevélbolha volt, ebből egy példányt márciusban, ötöt pedig júniusban a közeli zártkertek kerítése mentén található *Thuja orientalis*-ról gyűjtöttem. A mintavételi napok évszakra jellemző hőmérsékletűek voltak, naposak, szélcsendesek vagy gyengén szelesek. A 2022-es évi szilvalevélbolha fogási adatokat a 16. ábra tartalmazza.



16. ábra: Balatonvilágoson fogott *C. pruni* egyedek létszámváltozása.

2023. februárjában és márciusában is két alkalommal mintáztam az ültetvényt. Mind február 20-án, mind pedig február 27-én tömeges volt a *Cacopsylla peregrina* jelenléte, míg a *Cacopsylla pruni* fajból 2 egyedet fogtam az ültetvényben kopogtatással (17. ábra), egyet az ültetvényen kívüli mezővédő erdősávban *Prunus cerasifera* fán, 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.



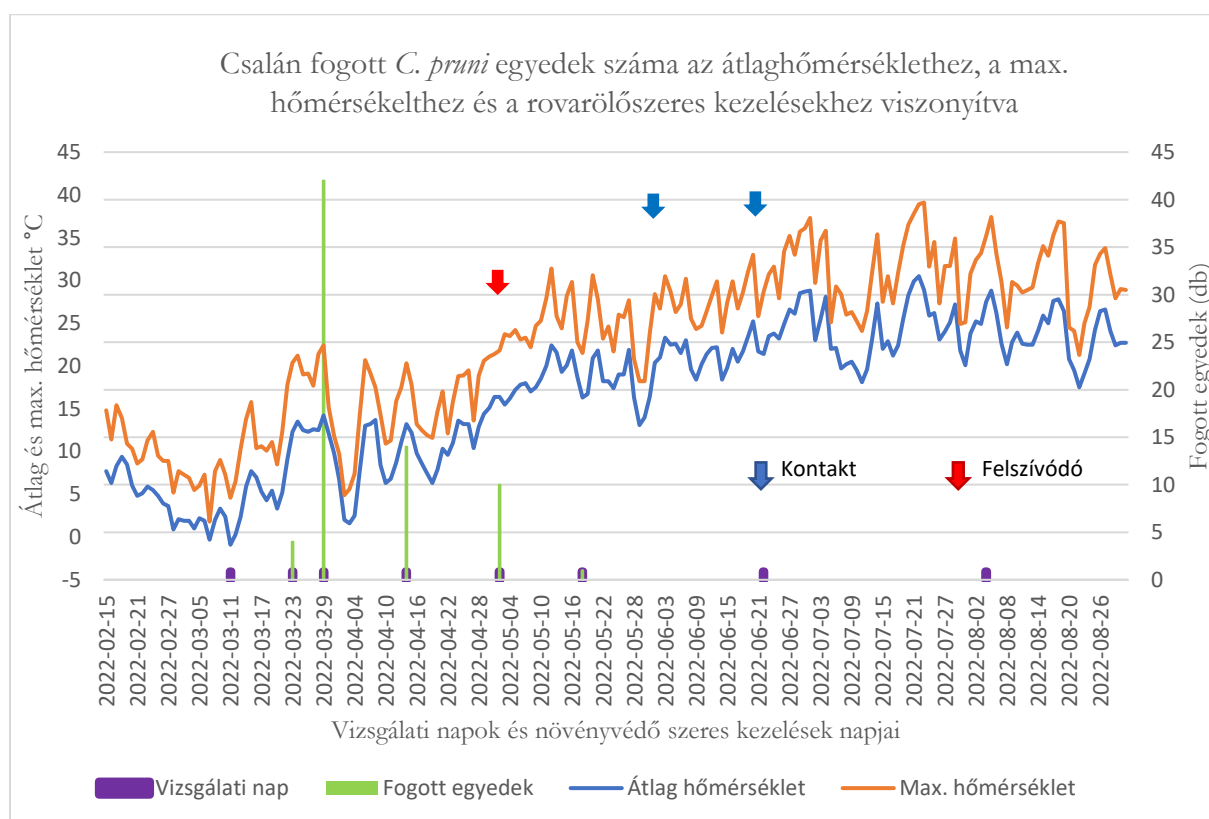
17. ábra: *C. peregrina* nőstény és hím, alul: *C. pruni* nőstény és hím. Forrás: Saját

4.1.2. Rovargyűjtés a családi ültetvényben

A családi ültetvényben a 2022-es vegetációs periódus során 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 emelkedést mutatott. Március 23-án az ültetvény ÉNy-Ny-i szélén már fogtam 4 egyedet, ekkor az átlaghőmérséklet 12°C felett volt, majd március végén kezdtek az ültetvénybe a szilvalevélbolhák 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 családi ültetvényben az utolsó példányt.

A családi 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 kajsziban kizárólag fungicides kezelést és gyomirtást végeztek. A diagramon a fogások számából jól látszik a növekvő, koratavaszi populáció, mely zavartalanul tudott az ültetvénybe betelepülni a rovarölőszeres kezelések hiánya miatt. A 2022-es évi szilvalevélbolha fogási adatokat a 18. ábra tartalmazza.



18. ábra: Csalán fogott *C. pruni* egyedszámváltozása.

Összehasonlítva a családi és a balatonvilágosi rovarölőszeres kezelés időzítésének hatékonyságát a családi ültetvény más károsítók ellen időbeni, de a *C. pruni* egyedek ellen megkésített első kezelése a betelepülő levélbolha populációra már befolyással nem volt, azok – amennyiben fertőzöttek voltak fitoplazmával – a szívogatásuk során azt a növényi floembe átadták. A májusi, júniusi kezelésekkel 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 ültetvényből való elvonulását követően Balatonvilágoson és Csalán az ültetvények közelében található örökzöldeket kopogtattam, mert szakirodalmi adatok szerint a szilvalevélbolha a nyugalmi periódusát tūlevelűeken tölti.

A balatonvilágosi ültetvénytől légvonalban 2 km-re, keletre található az Alsótekeresi Faiskola, ahol két alkalommal jártam végig az eladásra termelt örökzöldeket. Vizsgáltam többek között tujafélét, ezüstfenyőt, borókafajokat, fekete- és erdei fenyőt, cédrusfélét és tiszafát is. A kajsziültetvény közvetlenül a balatonvilágosi nyaralókkal szomszédos. 2022. kora márciusában, majd májustól augusztus végéig rendszeresen vizsgáltam a legközelebbi utcák örökzöld fajait, melyek főleg luc- és ezüstfenyőből, 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* (16. ábra, zöld oszlopokkal jelölve).

A csalai ültetvénytől alig 1 km-re, DK-i irányba 5 ha területű feketefenyő erdő található. 2022. június elejétől augusztus végéig vizsgáltam a fák talajról is elérhető ágait kopogtatással. A 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 márciusától augusztusáig 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 nagyszámú 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 törmelékkel (szíromhullás), számos érdektelen fajt is gyűjtöttek (Csalán nagyszámú légy ragadt a csapdádba 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

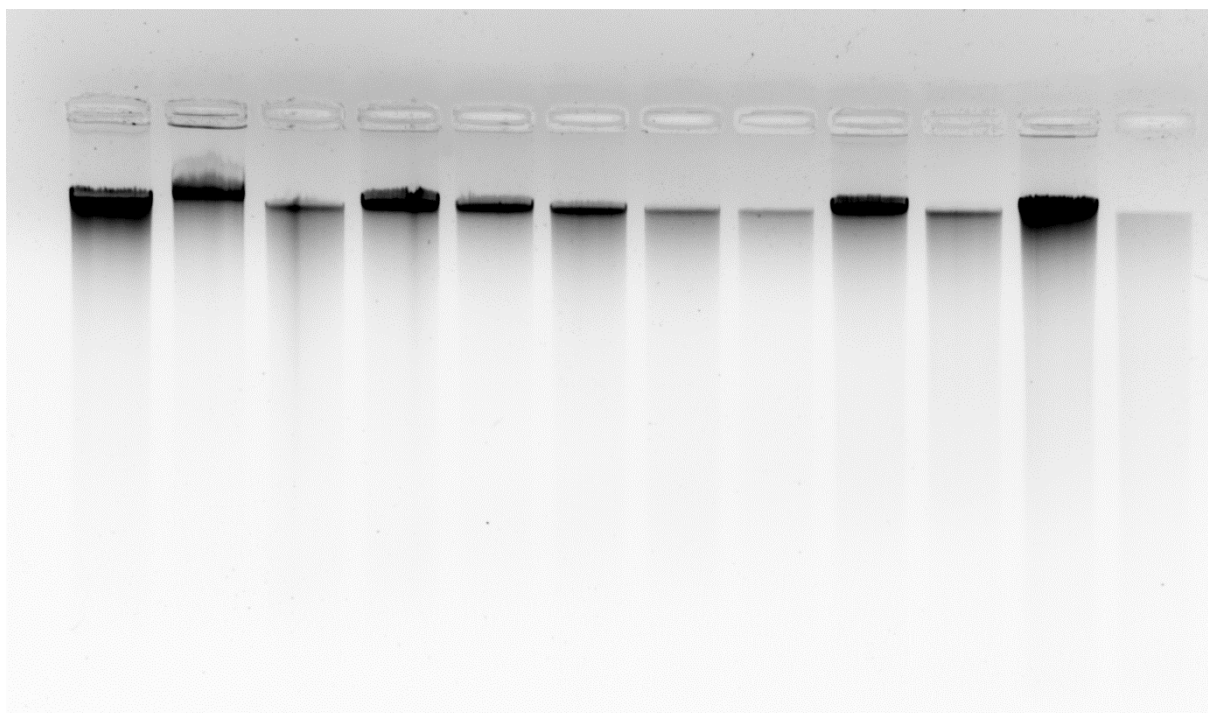
A hullámpapír övek kihelyezésére 2022. október elején került sor. A 25 cm széles hullámpapír csíkokat Csalán és Balatonszentgyörgyön kajszi- és mirabolán sarjak törzsére, illetve az ültetvények közelében található örökzöldek (erdei- és feketefenyő, lucfenyő) törzsére helyeztem ki. A több mint fél éves kint létet az időjárás által igénybevetett hullámpapír övek nehezen bírták, az esőzések és az erős szél többet is letépett a fák törzséről. A megmaradt öveket február végén távolítottam el, és mintatekercsenként 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 diapauzási idejük alatt.

4.3. Molekuláris genetikai módszerekkel végzett vizsgálatok eredményei

4.3.1. Kajszelevélből származó DNS kivonása Nucleospin Plant II. kittel

Kajszi levelekből NucleoSpin Plant II. kittel végeztem 80 mintán DNS kivonást. A minták a gyűjtés során egyedi azonosítókat kaptak. A csalai terület déli feléről gyűjtött minták EP/ kezdetű, mintaterületenként I-V-ig számozott kódot, az északi részről gyűjtött minták ŐB/ jelölést, mintaterületenként VI-VIII-ig számozott jelölést kaptak. Balatonvilágoson BV/ jelöléssel 6 mintaterületet alakítottam ki. Az ültetvényen belül X-XIV., míg az ültetvényen kívüli mezővédő erdősáv mintái XV. sorszámot kaptak. Az iszkaszentgyörgyi gyűjtés mintái DS jelölésűek. A 80 mintázott fa az alábbi arányban oszlik el a 3 ültetvény között: 56 levélminta származott a csalai ültetvényből, 21 minta Balatonvilágosról, 3 pedig Iszkaszentgyörgyről.

A levélmintákból származó NucleoSpinnel történő DNS tisztítás eredményes volt, a NucleoSpin kit alkalmas jó minőségű DNS kivonására, amit alátámasztott az agaróz gélen gélelektroforézissel történt gélfuttatás is (19. ábra).



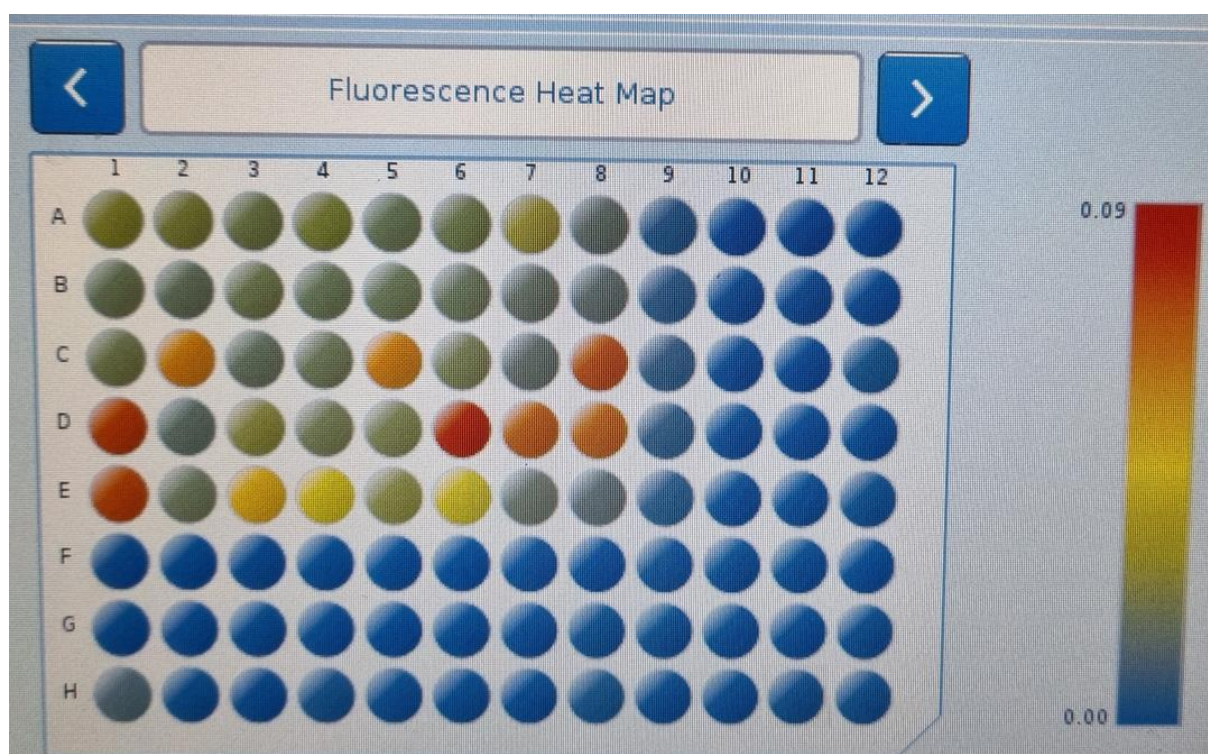
19. ábra: Levélmintákból tisztított DNS futtatása.

4.3.2. Kajszelevélből származó DNS minták vizsgálata LAMP teszttel

A vegetációs időben látható szimptómák alapján értékelt 80 kajszi egyed 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, mely az amplifikálás alatt valós idejű grafikonon mutatja a várható eredményt, míg a folyamat befejeztével fluoreszcens hő térképen (heat map), színek alapján teszi láthatóvá a fitoplazma koncentrációjának erősségét (20. ábra). A heat map színjelöléseket (zöldtől a vörösig) 5 kategóriába soroltam (2. táblázat).

2. táblázat: qPCR heat map színekódolás

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



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

A kapott eredményeket összevettem a tüneti besorolásokkal, majd ezeket táblázatos formában értékeltem (3. táblázat). 60 vizsgált mintából 10 minta esetében mutatott ++++ jelerősséget, 2 esetben ++, négyszer ++ és 3 esetben +. Összesen 19 mintánál volt kimutatható a fitoplazma jelenléte. Ebből 15 levélminta származott kajszi fákról, míg 4 minta a mezővédő erdősávból, vagy mirabolán alanyasarjról. A többi minta negatívnak bizonyult. A vizsgált 15 pozitív kajsziminta LAMP vizsgálat (qPCR készülékben végzett) eredményből 7 kajszifa a vegetációs időben mutatott szimptómák alapján tünetmentes volt, további 1-2-2-3 fa (összesen 8) pedig a II, III, IV, V tüneti besorolásba tartozott, vagyis a tünetek szemmel is jól láthatók voltak, és ezt a vizsgálatok is visszaigazolták. A látszólag tünetmentes fák esetében a *Ca. Phytoplasma prunorum* kórokozóra mutatott pozitív LAMP vizsgálat eredménye előrevetíti a fák jövőben bekövetkező korábbi pusztulásának lehetőségét.

3. táblázat: Levélminták fitoplazma fertőzöttségének eredményei összevetve a látható tünetekkel.

minta szám	Minta származása	Tünet	qPCR	LAMP vizsgálat értékelése
ŐB VI/1	Kajszi	I	+	pozitív
ŐB VI/10	Kajszi	I	+	pozitív
ŐB VIII/6	Kajszi	I	++	pozitív
BV X/1	Kajszi	I	++++	pozitív
BV X/2	Kajszi	I	++++	pozitív
BV X/3	Kajszi	I	++++	pozitív
BV XIV/3	Kajszi	I	+++	pozitív
ŐB M1	Mirabolán	I	++++	pozitív
BV XV/2	Prunus sp	I	++++	pozitív
BV XV/3	Sajmeggy	I	++	pozitív
BV XV/4	Mirabolán	I	++++	pozitív
BV XI/3	Kajszi	II	+++	pozitív
ŐB VII/8	Kajszi	III	+++	pozitív
ŐB VIII/1	Kajszi	III	++++	pozitív
BV XII/3	Kajszi	IV	++++	pozitív
BV XIV/2	Kajszi	IV	++++	pozitív
BV XI/2	Kajszi	V	++++	pozitív
BV XIII/2	Kajszi	V	+++	pozitív
EP I/11	Kajszi	V	+	pozitív

A kiválasztott 60 mintából 19 lett pozitív, míg 41 negatív, vagyis azokban nem találtam meg a fitoplazma X csoportjának a génjét. A 41 negatív eredményű kajsziából több mint a fele (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, 4 esetben pedig több elhalt ág is volt a kajszikon. Ezen fák esetében vagy nagyon kis koncentrációban volt jelen a fitoplazma, amit a LAMP vizsgálat már nem tudott kimutatni, vagy a tüneteket nem a *Ca. Phytoplasma prunorum* jelenléte okozta. A negatív eredményű, de erősen tünetes fákból célszerű lenne a vizsgáltot megismételni *Pseudomonas syringae pv syringae* baktériumra is.

Ültetvényekre lebontva a levélvizsgálatok eredményeit, az 56 csalai mintából 38-ból tisztítottam DNS-t, ezekből összesen 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 (4. táblázat).

4. táblázat: A csalai levélminták qPCR-rel végzett vizsgálatainak pozitív eredményei.

Ültetvény	Minta száma	Minta származása	Tünet	qPCR	LAMP vizsgálat értékelése
Csala	ŐB VI/1	kajszi	I	+	pozitív
Csala	ŐB VI/10	kajszi	I	+	pozitív
Csala	ŐB VIII/6	kajszi	I	++	pozitív
Csala	ŐB M1	Mirabolán	I	++++	pozitív
Csala	ŐB VII/8	kajszi	III	++	pozitív
Csala	ŐB VIII/1	kajszi	III	++++	pozitív

A csalai 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 kajsziről származtak. A 28 mintát leszűkítettem 19-re, eltávolítva azoknak az egyedeknek egy részét, melyek egészségesnek látszottak, így már fele-fele arányban voltak a betegnek látszó és egészséges egyedek. Az ilyen minták LAMP vizsgálatát követően a minták 100%-a bizonyult a fitoplazma X csoportjára negatívnak. Vagyis ezeknél az egyedeknél tapasztalható pusztulások valószínűleg nincsenek összefüggésben a *C. pruni* és az általa hordozott *Ca. Phytoplasma prunorum*mal. A Bergerouge fajta (minta szám: ŐB...) a fitoplazmával szemben kevésbé bizonyult ellenállónak. 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 kajsziminta eredménye mutatott fitoplazma fertőzöttséget.

Egy ültetvényen belül vizsgált 2 eltérő fajtájú kajszi 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 (lásd: 4.3.5. Rovarminták fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata fejezet) a fajták közötti eltérő fogékonyságnak kiemelkedő szerepe lehet.

A balatonvilágosi ültetvényből 21 mintából 19 került bevizsgálásra, melyből 15 minta származott kajszikból, 4 pedig a mezővédő erdősáv különböző fájáról. A kajszifáknál ebből 9 esetben bizonyosodott be, hogy a mintákban megtalálható a fitoplazma X csoport génje, míg az erdősávot alkotó fák mindegyike kivétel nélkül pozitív eredményt adott (5. táblázat). A pozitív kajszi mintákból 4 a vegetációs időben történt felmérés során tünetmentesnek mutatkozott, 1 esetben mutatkoztak tünetek 1 ágon, 2-2 esetben a kajszik egy, illetve több ágán mutatkozott pusztulás. 4 minta – amelyek a mezővédő erdősávból származtak – szintén pozitív eredményt mutattak. A balatonvilágosi ültetvény esetében fajta-összehasonlításra nem volt lehetőségem.

5. táblázat: A balatonvilágosi levélminták LAMP vizsgálatainak pozitív eredményei.

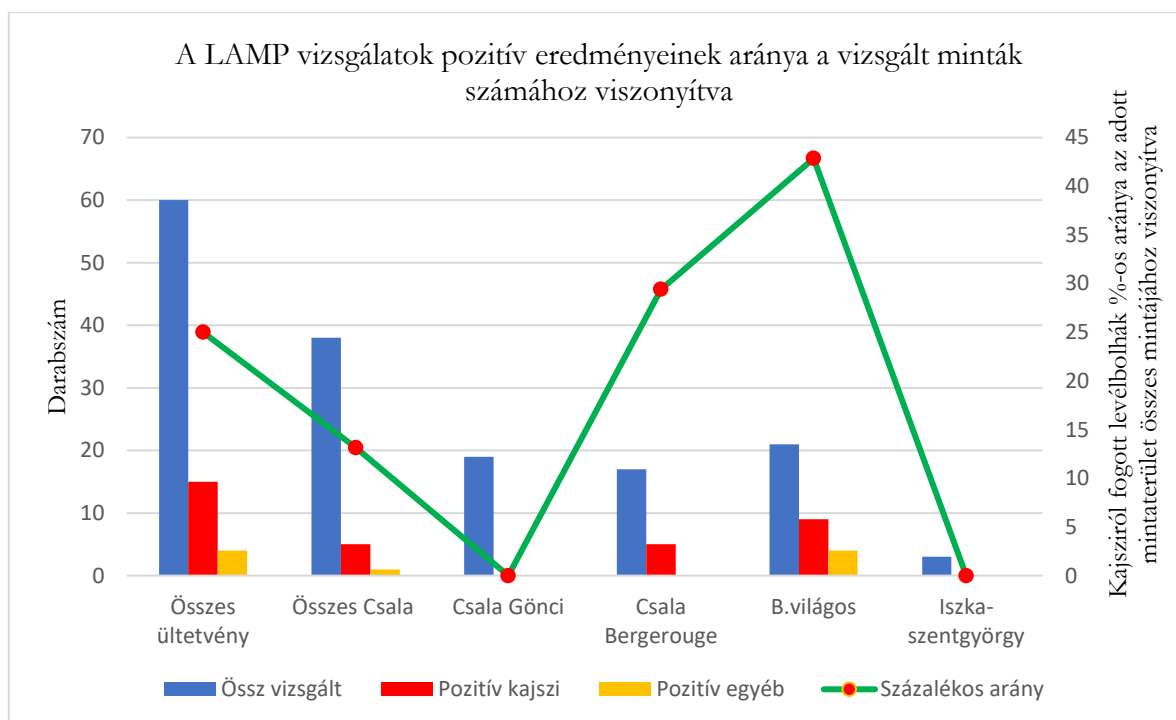
Ültetvény	Minta száma	Minta származása	Tünet	qPCR jelerősség	LAMP vizsgálat értékelése
Balatonvilágos	BV X/1	kajszi	I	+++++	pozitív
Balatonvilágos	BV X/2	kajszi	I	+++++	pozitív
Balatonvilágos	BV X/3	kajszi	I	+++++	pozitív
Balatonvilágos	BV XI/2	kajszi	V	+++++	pozitív
Balatonvilágos	BV XI/3	kajszi	II	++	pozitív
Balatonvilágos	BV XII/3	kajszi	IV	+++++	pozitív
Balatonvilágos	BV XIII/2	kajszi	V	+++	pozitív
Balatonvilágos	BV XIV/2	kajszi	IV	+++++	pozitív
Balatonvilágos	BV XIV/3	kajszi	I	+++	pozitív
Balatonvilágos	BV XV/1	Varjútövis	I	+	pozitív
Balatonvilágos	BV XV/2	Prunus sp.	I	+++++	pozitív
Balatonvilágos	BV XV/3	Sajmeggy	I	++	pozitív
Balatonvilágos	BV XV/4	Mirabolán	I	+++++	pozitív

Az iszkaszentgyörgyi ültetvény esetében 3 mintaterületről származó levélmintákat vizsgáltam meg. A vegetációs periódus során minden egyed egészségi állapota kiváló volt, amit a LAMP vizsgálatok is visszaigazoltak. Minden minta eredménye fitoplazma tekintetében negatívnak bizonyult.

A negatív eredmények adódhatnak fajta jellegből (minden fajta magyar volt), vagy kaolinnal, mint növényvédőszerrel történt vizsgálatokra alapozva a feltételezést, előfordulhat, hogy a szilvalevelbolhák távolmaradása a közeli mészkőbányából szálló finom por fák felületére rakódó takarásának köszönhető. A mészkő por egyrészt zavarhatja a színlátásukat, másrészt a tojásrakásukat. Multispektrális kamerával felszerelt drónnal való felvételezéssel a visszavert fény

hullámhossza összehasonlítható lenne olyan ültetvényekben készült felvételekkel, ahol nincs jelen ilyen mértékben a mészkőpor. A vizsgálatra a lomblevelek megjelenését követően lenne lehetőség, napfényes és szélcsendes időben, többnapos, vagy hetes csapadékmentes időt követően. Multispektrális kamerával felszerelt drón rendelkezésre áll, de a vizsgálat lefolytatására és értékelésére jelen dolgozatban már nem lesz lehetőségem.

A három ültetvény kajszi fajtából származó levélminták átlagosan 25%-os arányban tartalmaztak fitoplazmát. Amíg azonban sem a családi ültetvény Gönci fajtáról származó minták, sem az iszcaszentgyörgyi minták nem tartalmaztak fitoplazmát, addig a balatonvilágosi mintaterületről származó levélminták 43 %-ban bizonyultak fertőzöttnek (21. ábra).



21. ábra: A LAMP vizsgálatok pozitív eredményeinek aránya a vizsgált minták számához viszonyítva.

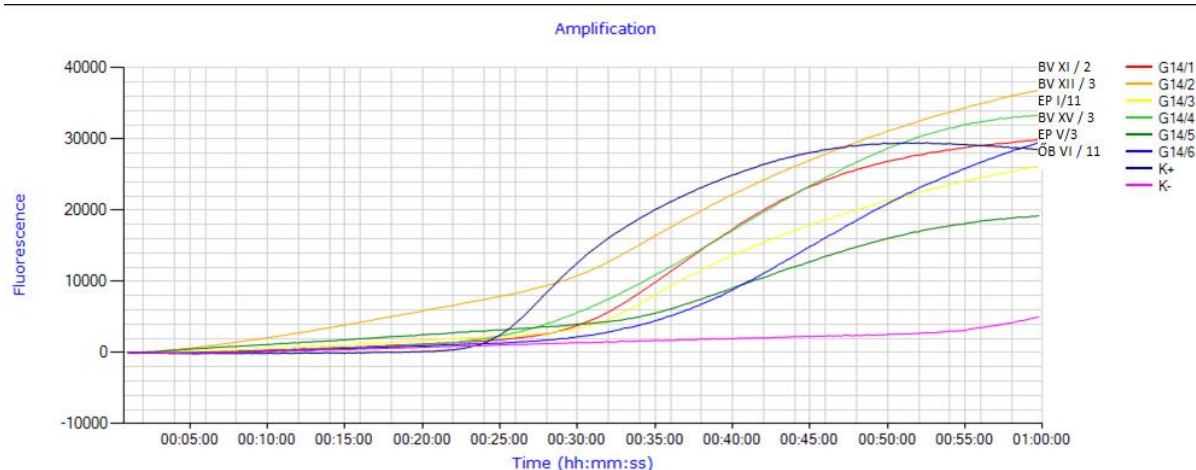
4.3.3. Kajszelevél nyers kivonat készítése Plant Material Lysis kittel

6 kajszelevél 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 nyers kivonatot készítettem, a kapott kivonatot pedig az Optigene Genie III készülékkel vizsgáltam.

A csalai ültetvényből 3, a LAMP vizsgálat alapján negatív, de erős tüneti szimptomákat (V. kat.) mutató kajszikát választottam, míg a balatonvilágosi ültetvényből 2, a LAMP vizsgálattal pozitív és fitoplazmára szintén erős tüneteket (IV, V) mutató kajszira esett a választásom. A 6. minta a balatonvilágosi mezővédő erdőszávból származó sajmeggy volt. Az izotermális amplifikálást követően mind a 6 minta eredménye visszaigazolta a fitoplazma jelenlétét (6. táblázat; 22. ábra). A nyers növényi kivonatból történő fitoplazma kimutatás megbízhatóan mutatja a fitoplazma jelenlétét, sőt olyan minták esetében is működött, melyek a NucleoSpin Plant II-vel történő DNS tisztítás és LAMP vizsgálat során negatívnak bizonyultak.

6. táblázat: Levélminták feldolgozása nyers kivonat LAMP-pal való vizsgálatával.

Ültetvény	Minta szám	Minta származása	Tünet	qPCR heat map	Crude levélből
Csala	EP I/11	kajszi	V	Negatív	Pozitív
Csala	EP V/3	kajszi	V	Negatív	Pozitív
Csala	ŐB VI/11	kajszi	V	Negatív	Pozitív
Balatonvilágos	BV XI/2	kajszi	V	++++	Pozitív
Balatonvilágos	BV XII/3	kajszi	IV	++++	Pozitív
Balatonvilágos	BV XV/3	Sajmeggy	I	++	Pozitív



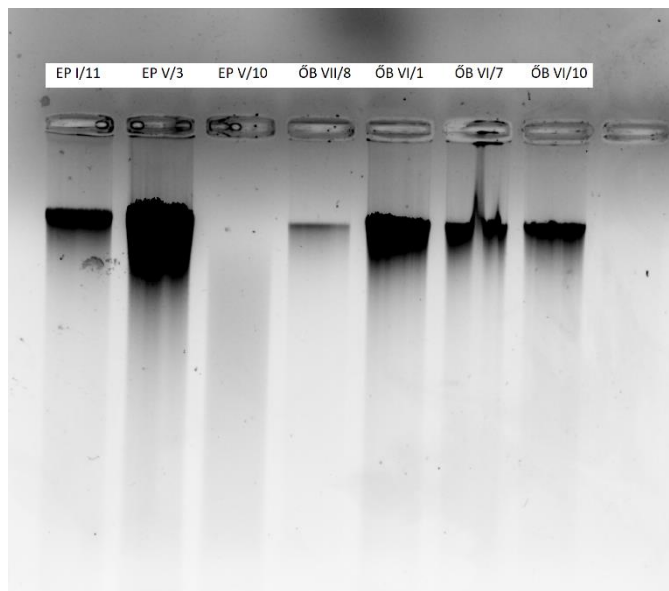
22. ábra: Levélminták analízise Optigene Genie III. készülékkel.

4.3.4. DNS kivonás és fitoplazma vizsgálat gyökérmintákból különböző módszerekkel

A kajszi levelekből történő eredményes fitoplazma vizsgálatot követően további mintákat kívántam gyűjteni, hogy más módon is igazolhassam a levélvizsgálatok eredményeit. Kíváncsi voltam, hogy a levelek fitoplazma eredményei gyökérmintákból tisztított DNS LAMP vizsgálatával is igazolható-e, ezért a kajszik téli, nyugalmi időszakában a csalai és balatonvilágosi ültetvényekből gyökérmintákat gyűjtöttem.

Vizsgálattal azt kívántam igazolni, hogy a téli nyugalmi időszakban a fitoplazma a gyökérrészekbe húzódik vissza, így a levélvizsgálatok eredménye alapján fertőzöttnek ítélt fák gyökérzetében kimutatható a fitoplazma jelenléte. A gyökérminták DNS kivonására is a NucleoSpin Plant II kitet használtam.

A NucleoSpin Plant II kittel 7 kajszifa gyökeréből vontam ki DNS-t, melyeket a csalai ültetvényből gyűjtöttem. 4 kajsziból származó minta a tüneti szimptómák alapján több ágon is elszáradás (V.) tünetét mutatta, de a LAMP vizsgálat során negatív eredményt hozott. 2 minta a vegetációs időben tünetmentesnek bizonyult, de a LAMP vizsgálat fitoplazma jelenlétét mutatta, míg egy minta esetében a LAMP 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 (23. ábra). A gyökérminták DNS-ének amplifikációját a Optigene Genie III-mal végeztem.



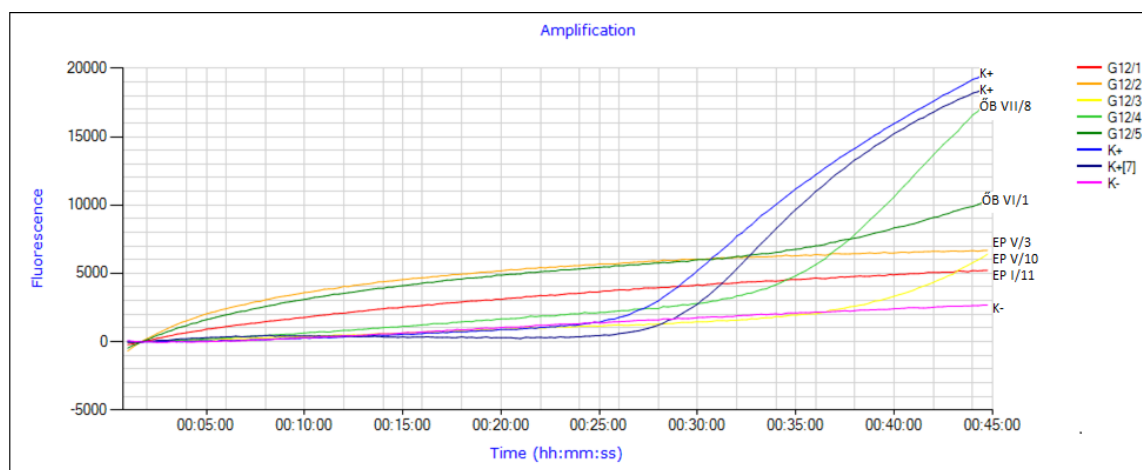
23. ábra: Gyökérmintákból származó DNS futtatása agarózon.

Az olyan fák esetében, ahol a LAMP teszttel vizsgált levélminták pozitív eredményt adtak (3db ŐB jelű minta), ott a gyökerekben is kimutatható volt a fitoplazmából származó DNS. Két esetben a negatív LAMP vizsgálatot a gyökérvizsgálati eredmények is megerősítették (EP I/11 és EP V/3) és szintén negatív eredményt adtak (7. táblázat, 24. ábra).

7. táblázat: Csalai kajszi gyökérminták analízise Optigene Genie III. készülékkel.

Ültetvény	Minta szám	Minta származása	Tünet	levélminta qPCR heat map	Gyökérminta LAMP
Csalá	EP I/11	kajszi	V	Negatív	Negatív
	EP V/3	kajszi	V	Negatív	Negatív
	EP V/10	kajszi	V	Negatív	Pozitív
	ŐB VI/7	kajszi	V	Negatív	Pozitív
	ŐB VI/1	kajszi	I	+	Pozitív
	ŐB VI/10	kajszi	I	+	Pozitív
	ŐB VII/8	kajszi	III	++	Pozitív

Ha fajta szinten értékelem a kapott eredményeket, akkor a Gönci magyar kajszi fajtából (EP) származó gyökér minták 2/3-ában nem tudtam kimutatni a *Ca. Phytoplasma prunorum* DNS-t, míg a Bergerouge fajta (ŐB) vizsgálata minden gyökérminta esetében tartalmazta a fitoplazma DNS-ét. A gyökérminták LAMP vizsgálatával kapott eredmények megerősítik a levélvizsgálatokat.



24. ábra: Csalai kajszi gyökérminták grafikus analízise.

A gyökérmintákat a balatonvilágosi ültetvényből is gyűjtöttem, de ezeknél a mintáknál a Plant Material Lysis kitet használtam, mert kíváncsi voltam, hogy a gyökerekből származó nyers növényi nedvből is kimutatható-e a fitoplazma.

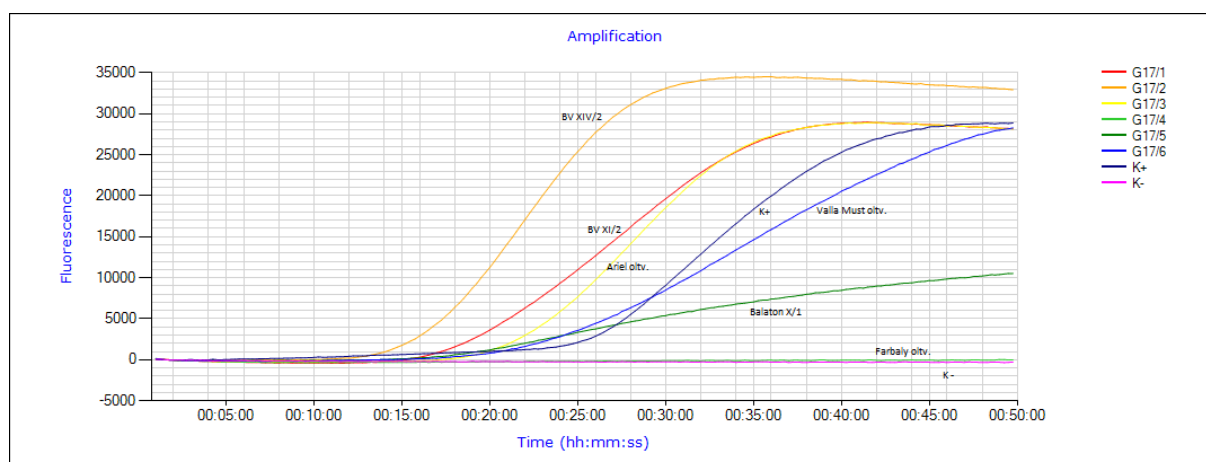
Az idősebb, már termő kajszikból származó 8 minta kiválasztásánál szempont volt, hogy a szimptómák alapján egyaránt legyen tünetmentes és erős fertőzést mutató minta is, melyek a LAMP vizsgálat során pozitív eredményt adtak a fitoplazma fertőzöttségre. További 1 minta negatív volt,

mind a tüneteket illetően, mind pedig a LAMP teszt eredmény alapján. Ezen kívül 1 mintát választottam, amit LAMP tesztel egy technikai hiba miatt nem sikerült értékelni (8. táblázat, 25. és 26. ábra).

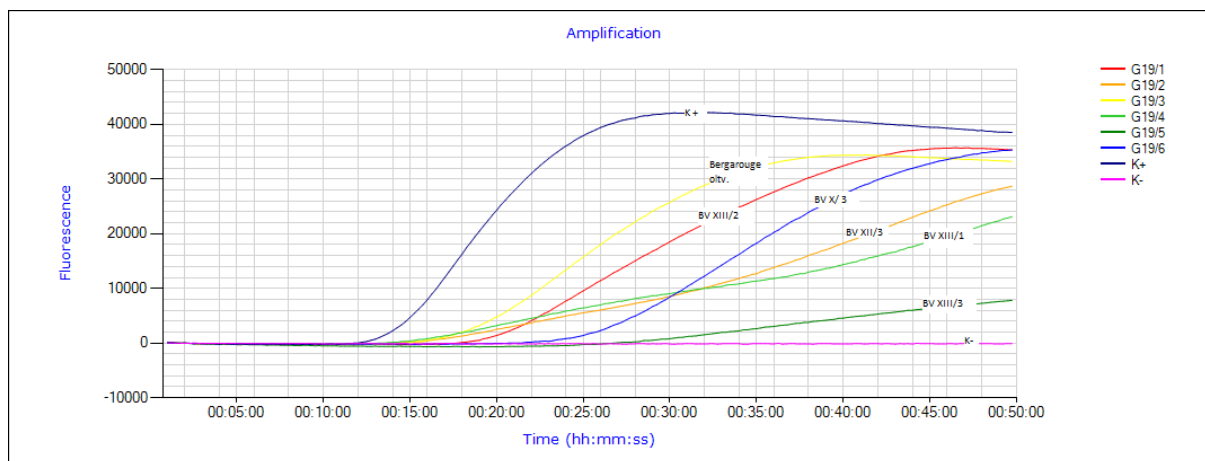
8. táblázat: Balatonvilágosi kajszi gyökérminták elemzése Optigene Genie III készülékkel.

	Minta szám	Minta származása	Tünet	Levél qPCR heat map	Gyökérminta LAMP	Gyökérminta LAMP értékelése
Balatonvilágosi	BV X/1	kajszi	I	+++++	+	Pozitív
	BV X/3	kajszi	I	+++++	++	Pozitív
	BV XI/2	kajszi	V	+++++	++	Pozitív
	BV XII/3	kajszi	IV	+++++	++	Pozitív
	BV XIII/1	kajszi	I	hiba	++	Pozitív
	BV XIII/2	kajszi	V	+++	++	Pozitív
	BV XIII/3	kajszi	I	negatív	-	Negatív
	BV XIV/2	kajszi	IV	+++++	++	Pozitív

A gyökerekből származó DNS amplifikációt követően azok a minták, melyek a LAMP vizsgálat során 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 LAMP vizsgálat során, a gyökér vizsgálat során is negatív eredményt adott (BV XIII/3). Az a minta, amit hiba miatt nem sikerült értékelni LAMP vizsgálattal, a gyökéranalízist követően pozitív eredményt adott. A Plant Material Lysis kit a gyökerekből származó nyers növényi kivonat is alkalmas templát a LAMP vizsgálatához. A gyökérminták vizsgálata ez esetben is egyezett a levélvizsgálati eredményekkel mind pozitív, mind negatív tekintetben.



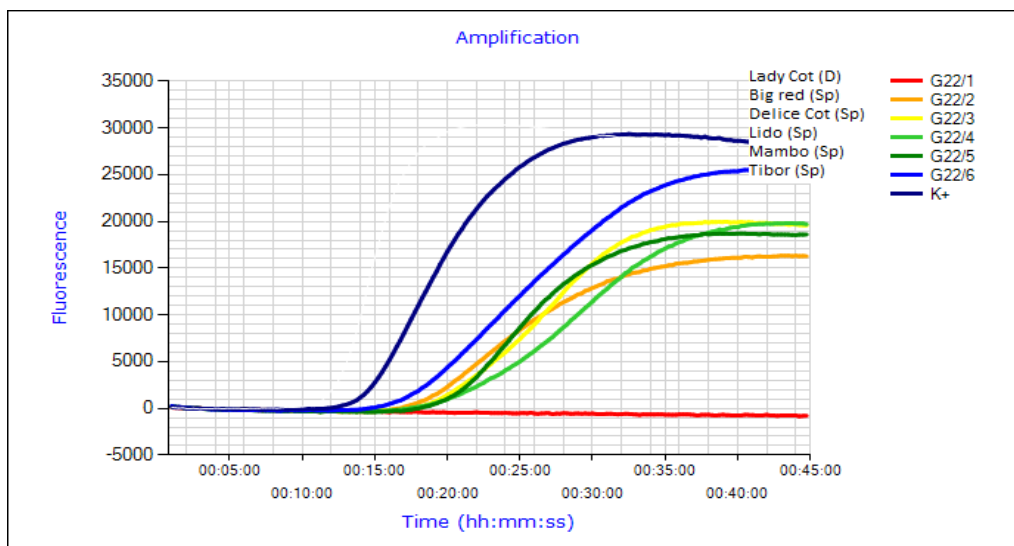
25. ábra: Balatonvilágosi kajszi gyökérminták grafikus analízise 1.



26. ábra: Balatonvilágosi kajszi gyökérminták grafikus analízise 2.

A balatonvilágosi mintagyűjtés alkalmával sikerült telepítésre váró oltványokból is gyökérmintákat gyűjteni, melyekből szintén a Plant Material Lysis kittel készítettem nyers növényi kivonatot LAMP vizsgálat céljára.

Az oltványok vizsgálata két alkalommal történt, első alkalommal 4 magyar előállítású mintából, majd 1 német és 5 spanyol előállítású oltványból vettem gyökérmintákat. Mivel az idősebb kajszi gyökérmintáinak esetében a Plant Material Lysis kit jól használhatónak bizonyult, így az oltványok esetében is ezt kívántam használni. A szikével való darabolással történő előkészítést és Plant Material Lysis kittel való nyers kivonat készítését követően a növényinedv mintákat LAMP reakcióban teszteltem. Az eredményeket a kapott grafikonok alapján értékeltem (27. ábra). Mivel a vegetációs időben az oltványokról levélminták szedésére nem volt lehetőség, így az eredményeket nem tudtam viszonyítani más mérésekhez. A 10 minta vizsgálatából 2 minta lett negatív (Farbaly: magyar, LadyCot: német), míg a többi 3 magyar előállítású minta, valamint a spanyol minták egyértelműen tartalmazták a fitoplazma X csoportjára jellemző DNS-t (9. táblázat).

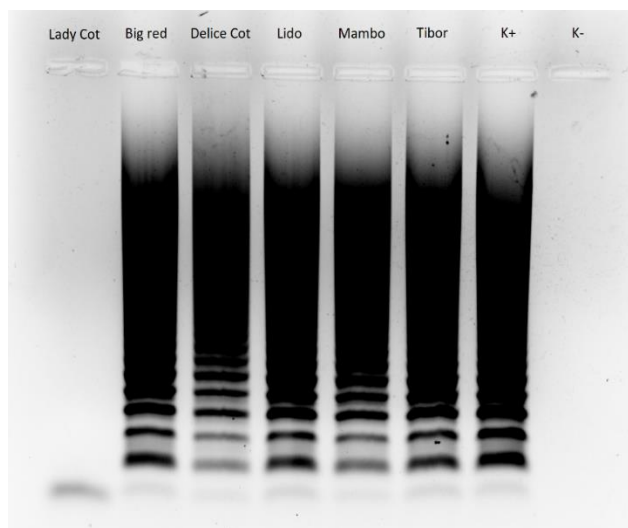


27. ábra: Német és spanyol előállítású oltványok gyökérmintáinak grafikus analízise.

A német és spanyol mintákat az analízist követően 1,2 %-os agaróz gélen elválasztottam (28. ábra). Az eredmény összhangban van az Optigene készüléken mért adatokkal. Célszerű lenne ezeknél az oltványoknál a telepítést követő további vizsgálat és a pusztulások figyelemmel kísérése.

9. táblázat: Oltványok LAMP vizsgálatának eredménye.

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



28. ábra: Oltványokból kivont DNS futtatása agaróz lemezen.

4.3.5. Rovarminták fitoplazma fertőzöttségének vizsgálata

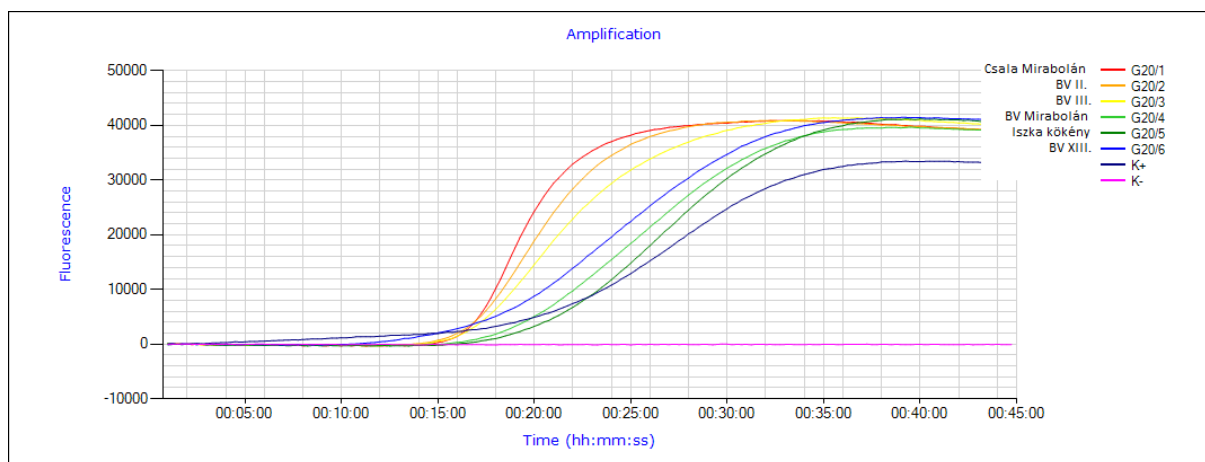
A levélbolhák fitoplazma fertőzöttség céljából végzett kopogtatásos gyűjtése során a *Cacopsylla pruni* egyedek mellett *C. peregrina* levélbolhák is előkerültek. Mivel a növényi minták nagy százalékban mutattak fitoplazma fertőzöttséget, kíváncsi voltam, hogy a különböző ültetvényekből és különböző fajú növényekről gyűjtött levélbolhák milyen százalékos arányban fertőződtek a fitoplazmával. A gyűjtött rovarmintákból is NucleoSpin Plant II kittel vontam ki DNS-t. SÜLE (2014a) a *Cacopsylla pruni* fitoplazma fertőzöttségének vizsgálatakor vizsgálatonként 10 levélbolha elegyből végzett PCR analízist. Mivel mintaterületenként sem a 2022 évi gyűjtéseimből, sem a kora tavaszi 2023-as gyűjtéseimből nem állt ilyen sok egyed rendelkezésemre, ezért 1, illetve 2 rovarból képzett mintaalapokból tisztítottam DNS-t. A rovarok esetében NucleoSpinnel történő DNS kivonáshoz nem volt szükség folyékony nitrogénben való előzetes homogenizálásra, de a vizsgálat többi része megegyezett a leveleknél és gyökereknél alkalmazott módszerrel. A 11 vizsgált rovarmintából 7db *C. pruni* és 4db *C. peregrina* minta volt. Utóbbiakat a kora tavaszi mintázás során nagy számban sikerült gyűjteni. A kivonást követően, a fitoplazma kimutatást LAMP tesztel, a detektálást Optigene Genie III készülékkel végeztem. A LAMP vizsgálat eredménye azt mutatta, hogy minden vizsgált levélbolha mintája fajtól függetlenül *Ca. Phytoplasma prunorum* fertőzöttnnek bizonyult (10. táblázat).

10. táblázat: Rovarminták analízise Optigene Genie III. készülékkel.

Gyűjtés helye	Gazdanövény	Gyűjtés ideje	Faj	Gyűjtött darabszám	LAMP eredmény
Csala	Kajszi	2022	<i>C. pruni</i>	1	pozitív
Csala	Mirabolán sarj	2023.febr	<i>C. peregrina</i>	12	pozitív
Csala	Mirabolán sarj	2023.febr	<i>C. pruni</i>	2	pozitív
Csala	Mirabolán sarj	2023.febr	<i>C. pruni</i>	2	pozitív
Balatonvilágos	Kajszi	2023.febr	<i>C. pruni</i>	1	pozitív
Balatonvilágos	Kajszi	2023.febr	<i>C. pruni</i>	1	pozitív
Balatonvilágos	Kajszi	2023.febr	<i>C. peregrina</i>	12	pozitív
Balatonvilágos	Kajszi	2022	<i>C. peregrina</i>	7	pozitív
Balatonvilágos	Mirabolán sarj	2023.febr	<i>C. pruni</i>	1	pozitív
Balatonvilágos	Prunus sp.	2023.febr	<i>C. peregrina</i>	12	pozitív
Iszkaszentgyörgy, 1km az ültetvénytől	Kökény	2023.febr	<i>C. pruni</i>	1	pozitív

Ezt követően a vizsgálatot megismételtem nyers kivonatok vizsgálatával is. A nyers rovar kivonatokból végzett LAMP vizsgálat eredménye alapján minden vizsgált rovarminta tartalmazta a fitoplazma DNS-t (29. ábra).

Mind a NucleoSpinnel történő DNS tisztítás, mind pedig a nyers kivonatból történő LAMP vizsgálat alkalmas módszernek bizonyult arra, hogy a kivonatokból a fitoplazma jelenlétét izotermális amplifikációval igazoljam. Már 1-2 rovarból álló mintából is sikerült kimutatnom a fitoplazma DNS-t. Az eredmények jól mutatják, hogy mind a szilvalevélbolha, mind a vándor levélbolha 100%-ban pozitív volt a fitoplazma tekintetében. Irodalmi adatok híján további kutatást igényelne, hogy a *Cacopsylla pruni* fajon kívül van-e más vektora a *Ca. Phytoplasma prunorum*nak, mert az eredmények arra utalnak, hogy a szilvalevélbolhán kívül egyéb levélbolha fajok is nagy eséllyel terjeszthetik a kórokozót.



29. ábra: Rovarminták LAMP vizsgálatának grafikus ábrázolása.

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* gomba 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 ültetvényekben és a levélbolhákban, mind makroszkópos, mind molekuláris genetikai módszerekkel. Vizsgálataimmal arra kerestem válaszokat, hogy az általam választott ültetvényekben tapasztalható pusztulások összefüggnek-e a *Cacopsylla pruni* vektor jelenlétével, és az általa terjesztett *Ca. Phytoplasma prunorum* kórokozóval.

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 a legtöbb ültetvényben ott van, még akkor is, ha látható tüneteket nem okoz.

Kutatásom során többféle gyűjtési és laboranalitikai 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 időigényes és a hatékonyságot az időjárás (szél, csapadék) befolyásolja. A színes ragacs lapos megfigyelés sok kártevő detektálásában 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 legkevésbé ismert szakasza a diapauzálás helye. Számos publikáció említi a fenyőfélékre való visszahúzódásukat, de ezt sem kopogtatással, sem hernyóövek kihelyezésével nem sikerült döntően bizonyítanom.

A levél-, gyökér- és rovarmintákból történő DNS kivonására és a fitoplazma jelenlétének igazolására több molekuláris genetikában használt módszert és eszközt is kipróbáltam. A tisztított DNS-ből és nyers növényi kivonatokból LAMP vizsgálatot végeztem, amely alkalmasnak bifitoplazmafitoplazma kimutatására. A laborszintű felhasználásra mind a NucleoSpin Plant II kit DNS tisztításra való felhasználása, mind a Plant Material Lysis kit nyers kivonat készítésre való felhasználása megfelelőnek bizonyult.

Akárcsak az DNS amplifikációjának nyomonkövetésére használt Roche Light Cycler 96, vagy az Optigene Genie III készülékek. A vizsgálatok kapcsán sikerült a különböző módszereket összehasonítanom. A NucleoSpin Plant II. kit használata a DNS kivonás során jelentős munkaerőt és munkaidőt köt le, a Roche Light Cycler 96 gazdaságos üzemeltetéséhez pedig nagyobb mintaszám szükséges. A Plant Material Lysis kittel ellenben gyorsan tudtam nyers növényi kivonatot kinyerni levél, gyökér és rovarmintákból, melyből az Optigene Genie III készülék megbízhatóan mutatta ki a fitoplazma jelenlétét. Laboratóriumon kívül, üzemi használatra is kiválóan alkalmasak, mert rövid a betanulási és mintafeldolgozási idő és kevés mintával is gazdaságosan alkalmazhatók.

Az általam vizsgált ültetvényekben tapasztalt tüneti szimptómák alapján a fák eltérő mértékben fertőződtek a fitoplazmával, de a LAMP vizsgálatok ezt nem minden esetben igazolták ugyanilyen mértékben. Az eltérés adódhatott más kórokozó által történt fertőződésből, vagy a fajták eltérő érzékenységből. 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 rovar vizsgálatok során nem csak *C. pruni*, de *C. peregrina* egyedek fitoplazma fertőzöttségét is vizsgáltam. A LAMP vizsgálatok 100%-ban mutattak fitoplazma fertőzöttséget mindkét fajra. További kutatást igényelne, hogy valóban a *C. pruni* faj-e az egyetlen rovarfaj, ami vektora lehet a *Ca. Phytoplasma prunorum* kórokozónak.

Vizsgálataim során lehetőségem nyílt telepítés előtt álló kajszi oltványokról való minták gyűjtésére, és molekuláris genetikai módszerekkel való vizsgálatukra. A vizsgált minták 80%-ának esetében a fitoplazma jelenléte igazolható volt. A termőkorú fertőzött fák kivágásának a javaslata a probléma gyors orvoslása irányába mutat, de addig, amíg előzetes vizsgálatok nélkül állítunk elő, vagy importálunk az országba fertőzött oltványokat és azokból hozunk létre új ültetvényeket, ez okafogyott intézkedés. A vizsgálati 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 gyógyíthatók, 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 érzékenységének mértéke nem minden esetben támogatják a jó választást.

Célszerű lenne egy átfogóbb vizsgálatot végezni a különböző kajszifajták fitoplazmával szembeni toleranciáját illetően. A termőkorú ültetvényekben a vektor elsősorban a mirabolán sarjajtásokon fordul elő. A kipusztult, de alanyról újrachajtott 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 ezek a fajok felhasználhatók rövid távú előrejelzésre, ugyanis mind a kökény, mind a mirabolán, akár több héttel is hamarabb fakad, mint a kajszi és ezeket a levélbolha előszeretettel keresi fel. Február végétől mind az ültetvényben, mind ültetvényen kívül keresnünk kell az áttelelt egyedeket. Az ültetvényekben megfigyelésre alapozott kora tavaszi kontakt kezeléssel, valamint a károsító egyedszámváltozásának – akár kopogtatással – való nyomon követésével, majd ismételt kontakt, végül a virágzást követően felszívódó rovarölőszeres kezelésekkel a károsító ültetvényben való jelenléte jól szabályozható. Valószínűsíthető, hogy a balatonvilágosi ültetvényben végzett gyakoribb rovarölőszeres kezelés is hozzájárult ahhoz, hogy az ültetvény területén csak néhány szilvalevélbolhát sikerült fognom. Az alumínium-szilikát (kaolin) használatának, mely kajsziban már több nyugat-európai országban engedélyezett, a mielőbbi magyarországi engedélyezésével a védekezési módszerek kiszélesíthetők lennének.

A kajszi kileveledésével tovább kívánom vizsgálni, hogy az iszkaszentgyörgyi ültetvény levélbolha mentessége és a közeli kőbánya porterhelése között van-e összefüggés. Erre multispektrális kamerával szerelt drónnal végeznék további kutatást, vizsgálva, hogy a mézskőpor bevonat milyen mértékben változtatja meg az elnyelt és visszavert fény tulajdonságait. Amennyiben lehetséges, a kapott eredményeket összevetném Surround WP-vel (kaolin) kezelt ültetvény fényelnyelő/visszaverő képességével.

6. Összefoglalás

A kajszi termesztése a legnehezebb növénytermesztési és növényvédelmi feladatok egyike. 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 kockázatosá 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 fitoplazmamentes szaporítóanyag létrehozását és értékesítését. A jelentéktelennek 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 kozmopoliták, fitoplazmával anélkül képesek fertőződni, hogy látható tüneteket produkálnának. 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 fertőzőtség 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. Aszemrevételezéssel történő fertőzőtség megállapítása és a tényleges fertőzőtség között nem egyértelmű az összefüggés, mivel az egyes pusztuló egyedekből a fitoplazma fertőzőtség nem volt kimutatható annak ellenére, hogy a fa súlyos tüneteket mutatott.

A védekezés kulcspontja az ellenőrzött vírus és fitoplazmamentes szaporítóanyag, a korai betelepülő rovarvektorok elleni vegyszeres (engedélyezés esetén Al-szilikátos), előrejelzésre alapozott védekezés, a beteg fák eltávolítása, és mindenekelőtt a feltörő alanyсарjak 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.

Külön köszönet illeti Szabó József ügyvezetőt és Németh Zsoltot a Szabó Farm Kft munkatársát, Borsos Gergely cégvezetőt és Antyipenkó Beáta növényvédelmi szakirányítót, a Balaton Fruit munkatársait, Dávid Sándort, valamint Simon Lászlót az Alsótekeresi Faiskola vezetőjét, akik minden kérdésemre a legjobb tudásuk szerint igyekeztek válaszolni. Nélkülük és az ültetvényeik nélkül ez a szakdolgozat nem valósulhatott volna meg.

A legnagyobb hálával társkonzulensemnek, Nagyné dr. Galbács Zsuzsannának, a MATE Növényvédelmi Intézet Genomikai Kutatócsoport tudományos munkatársának, valamint dr. Várallyay Évának, a MATE Növényvédelmi Intézet Genomikai Kutatócsoport tudományos tanácsadójának tartozom, akik egy telefonhívásra felajánlották a segítségüket, a szaktudásukat, és rendelkezésemre bocsátották az intézet technológiáját.

Nem feledkezhetem el a köszönetnyilvánításomban családomról sem, akik a legnagyobb türelemmel viseltettek irántam, és maximálisan támogattak dolgozatom elkészítésében.

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.

De Jonghe, K., De Roo, I. and Maes, M. (2016): Fast and sensitive on-site isothermal assay (LAMP) for diagnosis and detection of three fruit tree phytoplasmas. *European Journal of Plant Pathology*, 147 (4): 749-759.

Dér Zs., Péntes B. és Orosz A. (2002): Kajsziültetvényben előforduló kabócák. A Solanaceae növény család fontosabb fajainak (burgonya, paradicsom, paprika, dohány) időszzerű 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): Hypo and hyper-virulence in apricot trees infected by European stone fruit yellows. *Julius Kuhn-Archiv*, 427: 197.
- Fazekas, I., Kontschán, J. and Ripka, G.** (2022): The first occurrence of the family Homotomidae (Hemiptera: Psylloidea) and *Homotoma ficus* (Linnaeus, 1758). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 57 (2): 139-147.
- 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.
- Griffiths, 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*. Magyar Tudományos Akadémia, Budapest, XXI. kötet, 291-320.
- Jarausch, B., Mühlenz, 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* 55 (6): 261-265.

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., 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*, (54): 5.: 197-203.

Lichou, J. et 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.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986): Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(0): 263–273.

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): 1-7.

Ocskó Z. (2023): Növényvédő szerek, terménynövelő anyagok I. Centrál Dabasi Nyomda Zrt.

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). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 43 (1): 121-142.

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

Ripka G. (2010): Levélbolhák, Agroiinform 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. (1984): Kabócák. In: Móczár L. (szerk.): Állathatározó I., 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, Gy. (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: 34-41.

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.

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: HOLLIS, D (2002): Superfamily Psylloidea Jumping Plantlice, Lerps. Australia Biological Resources Study. Australian Faunal Directory. www.environment.gov.au/biodiversity/abrs/online-resources. 2023.03.06.

Internet_a2: 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>. 2023.03.06.

Internet_a3: BURCKHARDT, D (2007): Fauna Europaea: Psylloidea. Fauna Europaea version 1.3., Taxon Details. www.faunaeur.org. 2023.02.20.

Internet_a4: <https://www.dlr.rlp.de/Psylliden-english/Key/Adults/genera>. 2023.03.20.

Internet_a5: Mergenthaler Emese/Viczián Orsolya: Rovarokkal terjedő betegségek
<https://magyarmezogazdasag.hu/2022/01/19/rovarokkal-terjedo-betegsegek>.
 2023.03.23.

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). 2023.03.20.

Internet_a7: www.dlr.rlp.de/Psylliden-english/Morphology/hind-leg. 2023.03.20.

Internet_a8: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/34065>. 2023.03.06.

Internet_a9: https://plos.figshare.com/articles/figure/_Life_cycle_of_phytoplasmas_/416226.
 2023.02.18.

Internet_b10:
www.csalomoncsapdak.hu/5kartevoklatinnevszerint/pdf fajonkentik/cacopsyllapruniszilv_alevelbolha.pdf. 2023.04.07.

Internet_b11: <https://www.biokontroll.hu/a-kaolin-reszecske-filmtechnologia-hatekonysaga-a-fuestoesszarnyu-koerte-levelbolha-elleni-vedekezesben/>. 2023.03.12.

Internet_b12: <https://www.magro.hu/agrarhirek/biologiai-megoldas-korte-levelbolha-es-a-dioburok-furolegy-ellen-promo/>. 2023.03.12.

Internet_b13: Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Tutorial:
<https://www.youtube.com/watch?v=L5zi2P4lggw>. 2023.03.19.

Internet_b14: Loop mediated isothermal amplification (LAMP) protocol explained.
<https://www.youtube.com/watch?v=UJE9SBMrh20>. 2023.03.19.

Internet_b15:
https://hu.frwiki.wiki/wiki/Amplification_isotherme_m%C3%A9di%C3%A9e_par_les_boucles. 2023.03.19

Internet_b16: <https://www.mepar.hu/mepar>. 2023.04.01.

Internet_b17: <http://szabofarm.hu/Gazdasag>. 2023.03.02

Internet_b18: <https://portal.nebih.gov.hu/-/a-novenyvedo-szerek-csoportositasa-a-kornyezeti-kockazat-szerint>. 2023. 04. 25.

8. Ábrák és táblázatok jegyzéke

1. ábra: Balra: <i>Cacopsylla pruni</i> nőtény; Jobbra: <i>Cacopsylla pruni</i> fedőszárnya.....	7
2. ábra: <i>Cacopsylla</i> génuszra jellemző hátsó láb jellegzetességei.....	8
3. ábra: Balra: <i>Cacopsylla pruni</i> felülnézetből; Jobbra: <i>Cacopsylla pruni</i> hím nemi készüléke.....	8
4. ábra: <i>C. pruni</i> meghatározó bélyegei.....	9
5. ábra: Szilva levélbolha rajzásmenete.....	12
6. ábra: A növényi tetvek által terjesztett fitoplazma fejlődésmenete.....	15
7. ábra: Sárguló, kanalasodó levelek és egészséges lombozat két szomszédos kajszin.....	16
8. ábra: A balatonvilágosi ültetvény műholdképe.....	22
9. ábra: Fává erősödött Mirabolán alany Csalán.....	23
10. ábra: Egymás után pusztuló különböző korú kajszik Csalán.....	23
11. ábra: A székesfehérvár-csalai Barackvirágfarm Kft ültetvényének műholdképe.....	23
12. ábra: Dávid Sándor ültetvényének műholdképe.....	24
13. ábra: Kopogtató ernyő.....	25
14. ábra: Hullámpapír öv feketefenyőn és kajszin.....	28
15. ábra: Pusztuló kajszik a balatonvilágosi ültetvényben.....	29
16. ábra: Balatonvilágoson fogott <i>C. pruni</i> egyedek létszámváltozása.....	34
17. ábra: <i>C. peregrina</i> nőtény és hím, alul: <i>C. pruni</i> nőtény és hím.....	35
18. ábra: Csalán fogott <i>C. pruni</i> egyedszámváltozása.....	36
19. ábra: Levélmintákból tisztított DNS futtatása.....	39
20. ábra: A qPCR fluoreszcens hőterképe alapján mutatott első 36 eredmény.....	40
21. ábra: A LAMP vizsgálatok pozitív eredményeinek aránya a vizsgált minták számához viszonyítva.....	44
22. ábra: Levélminták analízise Optigene Genie III. készülékkel.....	45
23. ábra: Gyökérmintákból származó DNS futtatása agarózon.....	46
24. ábra: Csalai kajszi gyökérminták grafikus analízise.....	47
25. ábra: Balatonvilágosi kajszi gyökérminták grafikus analízise 1.....	48
26. ábra: Balatonvilágosi kajszi gyökérminták grafikus analízise 2.....	49
27. ábra: Német és spanyol előállítású oltványok gyökérmintáinak grafikus analízise.....	50
28. ábra: Oltványokból kivont DNS futtatása agaróz lemezen.....	50
29. ábra: Rovarminták LAMP vizsgálatának grafikus ábrázolása.....	52
1. táblázat: LAMP teszthez használt indítószekvenciák bázissorrendjei.....	32
2. táblázat: qPCR heat map színekódolás.....	40
3. táblázat: Levélminták fitoplazma fertőzöttségének eredményei összevetve a látható tünetekkel.....	41
4. táblázat: A csalai levélminták qPCR-rel végzett vizsgálatának pozitív eredményei.....	42
5. táblázat: A balatonvilágosi levélminták LAMP vizsgálatának pozitív eredményei.....	43
6. táblázat: Levélminták feldolgozása nyers kivonat LAMP-pal való vizsgálatával.....	45
7. táblázat: Csalai kajszi gyökérminták analízise Optigene Genie III. készülékkel.....	47
8. táblázat: Balatonvilágosi kajszi gyökérminták elemzése Optigene Genie III készülékkel.....	48
9. táblázat: Oltványok LAMP vizsgálatának eredménye.....	50
10. táblázat: Rovarminták analízise Optigene Genie III. készülékkel.....	51

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**



NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: GALOVICS ATTILA
A Hallgató Neptun kódja: VL4PC5
A dolgozat címe: Csonthéjasok európai sárgaság fitoplazmájának (*Ca. Phytoplasma prunorum*) és vektorának, a szilvalevélbolhának (*Cacopsylla pruni*) vizsgálata magyarországi kajszüültetvényekben
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék neve: Növényvédelmi Intézet, Növényvédelmi Tanszék, Keszthely

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

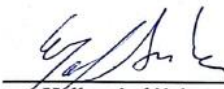
Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: 2023. év április hó 26. nap


Hallgató aláírása

KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

A GALOVICS ATTILA (hallgató; Neptun azonosítója: VL4PC5) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*²

Kelt: 2023. év április hó 26. nap



Belső konzulens