

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR

ELTÉRŐ VIRULENCIÁJÚ FITOPLAZMA TÖRZSEK KÖLCSÖNHATÁSÁNAK
SZEREPE A KERESZTVÉDETTSÉG KIALAKULÁSÁBAN

Doktori értekezés

Tibenszkyné Kiss Emese

MTA ATK Növényvédelmi Intézet

Budapest, 2015

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Tóth Magdolna
tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA doktora
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezető: Dr. Barna Balázs
az MTA lev. tagja
MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet,
Kóréletteni Osztály

Dr. Palkovics László
egyetemi tanár, tanszékvezető, az MTA doktora
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Növénykórtani Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2015. október 13-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi Bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Pénzes Béla, CSc, BCE

Tagjai

Hegedűs Attila, DSc, BCE

Turoczi György, PhD, SZIE

Tóth Magdolna, DSc, BCE

Veres Anikó, PhD, SZIE

Opponensek

Gáborjányi Richard, DSc, PE

Bisztray György, PhD, BCE

Titkár

Balázs Gábor, PhD, BCE

TARTALOMJEGYZÉK

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	7
1. BEVEZETÉS.....	11
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	13
2.1. A fitoplazmakutatás története és a rendszertani osztályozás alakulása.....	13
2.2. A fitoplazmák felépítése és szerkezete.....	15
2.3. A fitoplazma genom molekuláris jellemzése.....	16
2.3.1. A fitoplazmák jellemzése során leggyakrabban vizsgált gének.....	17
2.3.1.1. A hflB gén.....	17
2.3.1.2. Az imp gén.....	18
2.3.1.3. A 16S rDNS gén és egyéb riboszomális DNS szakaszok.....	18
2.3.2. Kromoszómatérképek.....	18
2.3.3. Ismert szekvenciájú fitoplazma genomok.....	19
2.4. A fitoplazmák terjedése növények között és a fertőzés mechanizmusa.....	20
2.5. A fitoplazmák átvitele és fenntartása kísérleti környezetben és in vitro.....	22
2.6. A fitoplazmafertőzés.....	22
2.6.1. Általános tünetek.....	22
2.6.2. A fitoplazmafertőzés jellegzetességei fás növényekben.....	23
2.7. A fitoplazmák detektálása.....	24
2.7.1. Egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP, Single Strand Conformation Polymorphism) vizsgálat a genetikai variabilitás kimutatására.....	24
2.8. Magyarországon előforduló gyakoribb fitoplazmás betegségek.....	25
2.8.1. Alma seprűsödés (Apple proliferation, AP).....	27
2.8.1.1. A betegség előfordulása.....	27
2.8.1.2. Tünetek.....	27
2.8.1.3. A kórokozó taxonómiája.....	28
2.8.1.4. A kórokozó terjedése.....	28
2.8.2. Körte leromlás (Pear decline, PD).....	28
2.8.2.1. A betegség előfordulása és a kórokozó taxonómiája.....	28
2.8.2.3. Tünetek.....	29
2.8.2.2. A betegség terjedése.....	29
2.8.3. Csonthéjasok Európai Sárgulása (European Stone Fruit Yellows, ESFY).....	30
2.8.3.1. A betegség előfordulása.....	30
2.8.3.2. A kórokozó taxonómiája.....	31
2.8.3.3. Tünetek.....	31
2.8.3.4. A kórokozó terjedése.....	32
2.9. Védekezési lehetőségek a fitoplazmás betegségek ellen.....	32
2.9.1. Fitoplazma-fertőzött fák tünetmentes kigyógyulása (recovery).....	33
2.9.2. A keresztvédettség, mint lehetséges védekezési eljárás.....	34
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	37
3.1. A vizsgálatok helye.....	37
3.2. Felhasznált anyagok.....	37
3.2.1. Fitoplazmacsoportok és törzsek.....	37
3.2.2. Növényi minták.....	37
3.3. A fitoplazmák fenntartása, a fertőzés menete.....	38
3.3.1. A fitoplazma törzsek fenntartása üvegházi körülmények között és a rózsameténg fertőzése.....	38
3.3.2. Fitoplazmák in vitro fenntartása.....	38
3.4. A fitoplazma törzsek virulenciájával, és kölcsönhatásaikkal kapcsolatos kísérletek.....	39
3.4.1. Rózsameténg teszt növények hajtásvastagságában bekövetkező eltérések értékelése különböző fitoplazma törzsekkel való fertőzés hatására.....	39
3.4.2. A kevert fertőzésben szerepet játszó fitoplazmák molekuláris jellemzése.....	39

3.4.2.1. DNS kivonás.....	39
3.4.2.2. Az izolált fitoplazma törzsek egyes génszakaszainak felszaporítása polimeráz láncreakcióval (PCR, Polimerase Chain Reaction).....	41
3.4.2.3. Egyszálú konformációs polimorfizmus vizsgálat (SSCP, Single Strand Conformation Polimorphism).....	42
A minták előkészítése és futtatása poliakrilamid gélben.....	42
Az ezüstoffestés menete (Lee et al., 2006):.....	43
3.4.2.4. Az 1/93 izolátum törzseinek elkülönítése valósidejű PCR-rel.....	43
3.4.2.5. Klónozás, SSCP, szekvenálás.....	44
Ligálás, klónozás, transzformálás.....	45
PCR termék tisztítása.....	46
Szekvenálás, szekvencia analízis.....	46
3.4.3. Tesztnövények keresztfertőzése, immunizálása az 1/93 avirulens törzsszel.....	46
3.4.3.1. DNS izolálás.....	48
3.4.3.2. A fitoplazma törzsek kimutatása PCR módszerrel.....	48
3.4.3.3. A különböző fitoplazma törzsek elkülönítésére használt indítószekvenciák tervezése.....	49
3.4.3.4. A különböző fitoplazma törzsek valósidejű PCR-rel való elkülönítése.....	49
3.4.3.5. SSCP analízis.....	51
4. EREDMÉNYEK.....	53
4.1. Különböző fitoplazma törzsek által okozott tünetek rózsameténg, dohány és alma növényeken.....	53
4.1.1. Tünetek rózsameténg tesztnövényen.....	53
4.1.1.1. A 'Ca. P. mali' 1/93 törzs által okozott tünetek.....	53
4.1.1.2. A 'Ca. P. mali' AT törzs által okozott tünetek.....	53
4.1.1.3. A 'Ca. P. prunorum' GSFY törzs által okozott tünetek.....	54
4.1.1.4. A 'Ca. P. pyri' PD1 törzs által okozott tünetek.....	54
4.1.1.5. A 'Ca. P. solani' STOL által okozott tünetek.....	55
4.1.1.6. A 'Ca. P. asteris' AAY1 törzs által okozott tünetek.....	55
4.1.2. Tünetek dohány tesztnövényen.....	56
4.1.3. Fitoplazma fertőzések okozta tünetek almán.....	56
4.2. Rózsameténg tesztnövények hajtásvastagságában megfigyelt eltérések különböző fitoplazma törzsekkel való fertőzés hatására.....	57
4.3. Az almafát egyidejűleg fertőző fitoplazma törzsek molekuláris jellemzése.....	59
4.3.1. A 'Ca P. mali' izolátumok variabilitásának igazolása a hflB gén analízise alapján.....	60
4.3.1.1. A PCR termékek SSCP vizsgálata.....	60
4.3.1.2. Az 1/93-as izolátum vizsgálata valósidejű PCR-rel.....	61
4.3.1.3. Az 1/93-as izolátum hflB gén szakaszának klónozása, a klónok SSCP profiljának elemzése.....	61
4.3.1.4. A hflB gén fragmentek szekvencia analízise.....	62
4.3.1.5. Az imp gén SSCP analízise.....	65
4.3.1.6. Az imp gén szekvencia analízise.....	65
4.4. Különböző virulenciájú törzsek egymásra hatásának kiértékelése molekuláris módszerekkel.....	68
4.4.1. 'Ca. P. mali' 1/93 avirulens és 'Ca. P. mali' AT virulens törzsek együttes fertőzések hatása rózsameténgen.....	68
4.4.1.1. „A” kísérleti beállítás.....	68
4.4.1.2. „B” kísérleti beállítás.....	74
4.4.1.3. „C” kísérleti beállítás.....	77
4.4.1.4. A keresztfertőzés során vizsgált 'Ca. P. mali' 1/93 és AT törzsek jelenlétének igazolása SSCP módszerrel.....	82
4.4.2. 'Ca. P. mali' 1/93 avirulens és 'Ca. P. mali' AT virulens törzsek fertőzések hatása	

dohányban.....	83
4.4.3. 'Ca. P. mali' 1/93 és egyéb fitoplazma törzsek közötti kölcsönhatások kiértékelése PCR és valósidejű PCR vizsgálatokkal.....	84
4.4.3.1. Valósidejű PCR-hez tervezett indítószekvenciák.....	84
4.4.3.2. 'Ca. P. mali' 1/93 avirulens és 'Ca. P. prunorum' GSFY virulens törzsekkel való fertőzések hatása rózsameténgen.....	86
4.4.3.3. 'Ca. P. mali' 1/93 avirulens és 'Ca. P. pyri' PD1 virulens törzsszel való fertőzés hatása rózsameténgen.....	88
4.4.3.4. 'Ca. P. mali' 1/93a virulens és 'Ca. P. solani' STOL virulens törzsekkel való fertőzések hatása rózsameténgen.....	90
4.4.3.5. 'Ca. P. mali' 1/93 avirulens és 'Ca. P. asteris' AAY1 virulens törzsekkel való fertőzések hatása rózsameténgen.....	91
5. KÖVETKEZTETÉSEK.....	93
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	103
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	106
7. SUMMARY.....	107
NEW SCIENTIFIC RESULTS.....	110
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	111
9. MELLÉKLETEK.....	137
1. Melléklet: Ábrajegyzék.....	137
2. Melléklet: Táblázatok jegyzéke.....	141
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	143

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AgNO ₃	ezüst-nitrát
AP	Apple Proliferation, almafa boszorkányseprűsödése
APS	ammónium-perszulfát
AY	Aster Yellows, őszirózsa sárgulás
AAAY	American Aster Yellows, amerikai őszirózsa sárgulás
AY-WB	Aster Yellows-Witches Broom, őszirózsa boszorkányseprűsödése
BGWL	Bermuda Grass White Leaf, Bermuda fű fehérlevelűsége
bp	bázispár
' <i>Ca. P. australiense</i> '	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma australiense'
' <i>Ca. P. mali</i> '	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali'
' <i>Ca. P. prunorum</i> '	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum'
' <i>Ca. P. pyri</i> '	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri'
' <i>Ca. P. asteris</i> '	' <i>Candidatus</i> Pyhtoplasma asteris'
' <i>Ca. P. solani</i> '	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma solani'
CTAB	hexadecil-trimetil-ammónium-bromid
DAPI	4-6-diamidino-2-fenilindol
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
ECA	enroulement chlorotique de l'abricotier, kajszi levélsodródás betegség
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESFY	European Stone Fruit Yellows, csonthéjasok európai sárgulása
FD	Flavescence Dorée, szőlő aranyszínű sárgasága
H ₃ BO ₃	bórsav
<i>hflB</i> gén	ATP függő cink proteázokat kódoló gén

<i>imp</i> gén	immunodomináns fehérjét kódoló gén
IPTG	izopropil- β -D-tiogalacto-piranozid
kbp	kilobázispár
LB	Luria-Bertani táptalaj
MgCl ₂	magnézium-klorid
MLO	Mycoplasmalike Organism, mikoplazmaszerű szervezet
MS táptalaj	Murashige-Skoog táptalaj
NaCl	nátrium-klorid
Na ₂ CO ₃	nátrium-karbonát
Na ₂ S ₂ O ₃	nátrium-tioszulfát
OY-M	Onion Yellow, hagyma sárgulás
PCR	Polymerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció
PD	Pear Decline, körte leromlás
PD-TW	Pear Decline Taiwan, körte leromlás Taiwan törzs
PVP	polivinil-poilpirrolidon
primer	indítószekvencia
PYLR	Peach Yellow Leaf Roll, őszibarack sárgulásos levélsodródása
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism, restrikciós fragment analízis
rDNS	riboszomális RNS-t kódoló DNS
rRNS	riboszomális RNS
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism, egyszálú konformációs polimorfizmus
STOL	Stolbur, sztolbur
TBE	Tris-bórsav-EDTA puffer
TE	Tris-EDTA oldat
TEMED	tetrametil-etilén-diamin

TRIS	tris-(hidroximetil)-amino-metán
WX	Western X, nyugati X-betegség
X-gal	5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-galakto-piranozid

1. BEVEZETÉS

Napjainkban egyre több gondot okoznak azok a növényeket megbetegítő kórokozók, amelyek ellen nincs kidolgozott növényvédelmi technológia, vagy engedélyezett növényvédő szer. Ezek közé tartoznak a fitoplazmák is, amelyek alaposabb megismerésére már az 1900-as évek óta folynak kutatások. Azonosításuk és jelenleg is használt elnevezésük a XX. század végén történt meg. A molekuláris módszerek térnyerésével megnőtt azoknak a kutatási lehetőségeknek a száma, amelyekkel a kórokozó életmódját, elterjedését, genomját lehet tanulmányozni. Minden új eredménnyel közelebb kerülünk ahhoz a lehetőséghez, hogy hatékonyan vehessük fel a harcot ezen kórokozócsoporttal szemben, így elkerülhetővé váljon a kultúr- és haszonnövények pusztulása.

A fitoplazmás betegségek mai ismereteink szerint több mint 300 növényfajt érintenek. A legsúlyosabb gazdasági károk a gyümölcsstermesztésben jelentkeznek, hiszen több éves, termő fákat pusztíthatnak el, vagy pedig bennük lappangva szolgálhatnak fertőzési forrásként. A gyümölcsfák életciklusa hosszú, több 10 év is lehet, ami alatt a termőre fordulástól kezdve több tonnányi termést is képesek produkálni. A betegség súlyosságát az is jelzi, hogy Magyarországon csak a kajszitermesztésben egyes területeken a fertőzöttség arányát 70-80%-osra becsülik. Hazánkban a kajszipusztulás (European Stone Fruit Yellows) mellett a legnagyobb fenyegetést a szőlő aranyszínű sárgasága (Flavescence Dorée) fitoplazmás betegség 2013-as felbukkanása jelenti. Európában a legnagyobb területen termesztett gyümölcsfaj az alma. Az almafa-seprűsödés (Apple Proliferation) fitoplazma súlyos minőségi és mennyiségi, ezáltal pedig gazdasági károkat okoz, főként Nyugat-Európában, Németország dél-nyugati részén, és a környező területeken. A betegség hazánkban kisebb jelentőségű, de az előfordulás közelsége és a kórokozó áthurcolhatósága miatt (vektorok, ellenőrizetlen szaporító anyag) fennáll a veszély, hogy nálunk is fontosabb növényegészségügyi problémává válik.

Jelen kutatásainkkal a fitoplazma-gazdanövény kapcsolatot, a fitoplazma törzsek közötti kölcsönhatásokat és a kórokozó patogenitását, valamint genomját kívánjuk feltérképezni hagyományos és molekuláris módszerekkel.

Célkitűzéseink

1. A szakirodalomban részletezett (Seemüller and Schneider, 2007) '*Candidatus Phytoplasma mali*' 1/93-as avirulens törzs feltételezett, a rokon virulens törzsek szaporodását gátló hatásának igazolása üvegházi körülmények között rózsameténg és dohány tesztnövényeken.
2. A '*Candidatus Phytoplasma mali*' 1/93-as avirulens törzs keresztvédeltséget adó hatásának ellenőrzése

- a.) azonos fajba tartozó '*Candidatus Phytoplasma mali*' AT virulens törzs,
- b.) azonos rendszertani csoportba tartozó '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' GSFY és '*Candidatus Phytoplasma pyri*' PD1,
- c.) eltérő rendszertani csoportba tartozó '*Candidatus Phytoplasma solani*' STOL és '*Candidatus Phytoplasma asteris*' AAY1 virulens törzsek

esetében.

A kísérletek célja az avirulens törzssel való immunizálás, mint lehetséges védekezési, megelőzési eljárás növényvédelmi alkalmazhatóságának alátámasztása.

3. A természetesen fertőződött almafákban megtalálható fitoplazma törzsek együttes jelenlétének kimutatása, valamint virulenciájuk és a tünetek összefüggéseinek feltérképezése molekuláris módszerekkel.

4. A '*Candidatus Phytoplasma mali*' 1/93-as izolátum jellemezése a *hflB*, illetve az *imp* gének alapján a fitoplazma-kutatásban elterjedt molekuláris módszerekkel, valamint kevésbé ismert eljárásokkal is.

Eredményeink hozzájárulhatnak a fitoplazmák által okozott tünetek megjelenésének, valamint a törzsek közötti virulenciabeli különbségek molekuláris alapjainak megértéséhez.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A fitoplazmakutatás története és a rendszertani osztályozás alakulása

A múlt század második feléig a vírusokat tartották a sárgulásos megbetegedések kórokozóinak. Ennek okai a betegség intenzív terjedése mellett a jellegzetes tünetek, valamint a rovarvektorok útján való terjedés voltak (Kunkel, 1952; Helms, 1957). A sárgulásos betegségek közé sorolták többek között az őszirózsa sárgulást, a lucerna seprűsödést és a paradicsom óriásrügy betegségeket (Samuel *et al.*, 1933; Edwards, 1935).

Először Doi és munkatársai (1967) figyeltek meg és jellemeztek elektronmikroszkóp segítségével olyan pleomorf, sejtfal nélküli egysejtűeket tünetes növények sejteiben, amelyek finomszerkezetükben és morfológiájukban leginkább a mikoplazmákhoz hasonlítottak. Megfigyelték, hogy ezek a mikoplazmaszerű szervezetek (Mycoplasmalike organism- MLO) nagy mennyiségben halmozódnak fel a háncsszövetekben és a rostacsövekben.

Már a múlt század közepén is több gazdaságilag fontos zöldségféle, gyümölcs, dísnövény, takarmánynövény, rostonövény, hideg- és mérsékelt-övi erdei fa több mint 200 betegségéért okolták ezeket a sejtfal nélküli prokariótákat. Az azóta eltelt időszakban a gazdanövénykör több száz növényfajra bővült világszerte.

A molekuláris vizsgálati technikák térnyerése során sikerült tisztázni az MLO-k helyét a prokariótákon belül, és kiderült, hogy a sárgulásos betegségeket nem vírusok, hanem egy önálló kórokozócsoport okozza. Utalva a növénymegbetegítő képességükre, 1993-ban az International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes bizottság ezeket a mikroorganizmusokat fitoplazmáknak nevezte el (Gundersen *et al.*, 1994). 1994-ben alkották meg a „*Candidatus*” (jelölt) (Murray és Schleifer, 1994) kategóriát, amely egy átmeneti taxonómiai kategóriát jelöl. Ez mindazon prokariótáknál került bevezetésre, amelyeknél több információ áll rendelkezésre a szekvencia pusztá ismereténél (pl. struktúra, anyagsere, szaporodás, természetes előfordulás, átvivő vektor), de a Koch posztulátumok alapján leírásuk nem megvalósítható, tehát amelyek jól jellemezhetők, de nem tenyésztethetők (IRPCM, 2004). Ennek értelmében a nemzetközi bizottság ajánlására egy új '*Candidatus*' faj akkor írható le, ha annak 1200 bp-nál hosszabb 16S nukleotid-szekvenciája kevesebb, mint 97,5%-os egyezőséget mutat más, korábban már leírt '*Candidatus*' fajával. Ennek megfelelően külön fajnak számítanak, amennyiben 3 kritérium teljesül velük szemben: 1. eltérő vektorok viszik át őket, 2. különböző a tápnövényük 3. bizonyított a molekuláris eltérés a két fitoplazma között.

A fitoplazmák rendszertani besorolás szerint a *Mollicutes* osztályba tartoznak, de csak távoli

rokonságban állnak a mikoplazmákkal. Nagy különbség közöttük, hogy míg a mikoplazmák állatokat és embereket is képesek megbetegíteni, addig a fitoplazmák növényeket és állatokat (rovarok) fertőznek, és mesterséges körülmények között nem képesek fennmaradni, illetve szaporodni (Lee and Davis, 1986). A mesterséges körülmények között való tenyésztésükre tett kísérletek sokáig eredménytelenek maradtak, ami jelentősen megnehezítette jellemzésüket és osztályozhatóságukat (Seemüller *et al.*, 1998). A fitoplazmák gazdanövénytől független, tiszta tenyészetben való fenntartásának legújabb lehetőségeiről Contaldo és munkatársai (2012) számoltak be, azonban a módszert mindez ideig rutinszerűen nem alkalmazzák, egyetlen kritikai hivatkozást leszámítva (Rao, 2013) más hivatkozással nem találkozunk a nemzetközi irodalomban.

Amíg nem alkalmaztak rutinszerűen DNS alapú technikákat a kórokozó pontos azonosítására, a fitoplazmák csoportosítása a megjelenő tünetek, az átvitel módja, a gazdanövénykör, valamint a kórokozó gazdanövényen belüli terjedése alapján történt. A fitoplazmák osztályozása a molekuláris azonosítás és genetikai elemzés térnyerésével egyre könnyebbé vált (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Lee and Davis, 1988; Sears and Klomparens, 1989). Lehetőség nyílt egyes DNS szakaszok PCR-rel való amplifikálására, valamint azok klónozására, és nukleotid sorrendjük meghatározására. 1989-ben történt a fitoplazmák DNS G+C tartalmának (23,0-26,2 mol%) első meghatározása, amely alapján még egyértelműbbé vált a közeli rokonsági kapcsolat a fitoplazmák és a tenyészthető mikoplazmák között (Kollar *et al.*, 1989). Néhány évvel később Neimark és Kirkpatrick (1993) a fitoplazmák genomméretét 600 és 1150 kbp közé becsülte, ami megfelel a tenyészthető mikoplazmák mérettartományának. Később Seemüller és munkatársai (1994) rámutattak arra, hogy a fitoplazmák mégsem állnak olyan közeli rokonságban a mikoplazmákkal, hanem inkább az *Acholeplasma*-k képviselői a közelebbi rokonaik.

A fitoplazmák elkülönítését kezdetben szerológiai módszerekkel végezték. Az 1990-es évek felé a figyelem középpontjába mégis a konzervatív, 16S riboszomális RNS-t kódoló 16S rDNS gén került (Woese, 1987; Weisburg *et al.*, 1989). Bizonyos fitoplazmák teljes 16S rDNS szekvenciáját meghatározták (Kirkpatrick and Fraser, 1989; Lim and Sears, 1989; Kuske and Kirkpatrick, 1992). A későbbi években kevésbé konzervatív géneket is vizsgáltak: riboszomális fehérje géneket (Lim and Sears, 1992; Gundersen *et al.*, 1994; Toth *et al.*, 1994), 16-23S rRNS spacer régiót (Kirkpatrick *et al.*, 1994), valamint a *tuf* gént (Schneider *et al.*, 1997). A 16S rDNS szakaszok alapján olyan indítószekvenciákat terveztek, amelyek a PCR, RFLP és más molekuláris eljárások során lehetővé teszik a fitoplazmák kimutatását univerzális (Kirkpatrick *et al.*, 1994) és csoport-, fajspecifikus (Ahrens and Seemüller, 1992; Lee and Davis, 1992; Namba *et al.*, 1993a; Schneider *et al.*, 1993; Maixner *et al.* 1995; Gundersen and Lee., 1996; Marccone *et al.*, 1997) formában is.

Woese (1987) a konzervatív 16S rRNS gén szekvenciának az összehasonlító elemzését javasolta, mivel ez a gén a prokarióták főbb csoportjainál általánosan alkalmazott filogenetikai marker. 1994-

ig közel 30, szinte teljes hosszúságú 16S rDNS szekvencia bázissorrendjét határozták meg. (Kirkpatrick, 1992; Namba *et al.*, 1993b; Gundersen *et al.*, 1994; Seemüller *et al.*, 1994). Schneider *et al.* (1995) ezen szekvenciák alapján sorolta csoportokba az addig ismert fitoplazmákat. Később a csoportosítás szempontjai közé bevették a kevésbé konzervatív 16-23S rDNS spacer régiót is, amelyek maximális eltérése 22% a 16S rDNS-ek 14%-ához képest (Firrao *et al.*, 2004).

Az első átfogó fitoplazma osztályozási rendszer a 16S rDNS PCR-rel felszaporított fragmentjeinek RFLP analízisén alapult (Lee *et al.*, 1998a, 2000). Ez a megközelítés jó alapot jelentett a fitoplazmák részletesebb osztályozására. Ekkor a fitoplazmákat 19 csoportra, azon belül több mint 40 alcsoportra osztották.

Murray és Schleifer (1994) munkája szerint két fitoplazma akkor sorolható két külön fajsztű taxonómiai egységbe, amennyiben a 16S rDNS szekvenciájuk hasonlósága kisebb, mint 97,5%, továbbá egyes biológiai tulajdonságaikban, mint pl. gazdanövény, vagy rovarvektor eltérnek. A legújabb filogenetikai elemzésekhez a pontosabb megkülönböztetés érdekében olyan géneket is figyelembe vesznek, mint például az *rp*, *secY*, *tuf*, *groEL* gének és a 16S-23S rRNS intergenikus spacer régió szekvenciái (<http://www.q-bank.eu/Phytoplasmas/>).

A napjainkban is leginkább elfogadott osztályba sorolást Seemüller és munkatársai végezték el 1998-ban, amikor a 16S rDNS szekvenciák alapján 20 fő filogenetikai csoportot, alcsoportot hoztak létre. További molekuláris elemzéseket követően 75 különböző fitoplazmát soroltak be ezekbe a csoportokba RFLP analízis, rDNS analízis, nukleinsav-hibridizáció és szerológiai tulajdonságok alapján. A fő csoportok közül néhány elég tág, és fajsztűn meghatározandó. Folyamatosan kerülnek besorolásra új fajok a csoportokba (Seemüller *et al.*, 1998). Így az ESFY kórokozója a 16SrX, míg az AAY és STOL törzsek a 16SrI, illetve a 16SrXII csoportokba tartoznak.

2.2. A fitoplazmák felépítése és szerkezete

A fitoplazmák alakjának jellemzése a fertőzött növények vékony metszetéből, elektronmikroszkópos vizsgálattal történik. Alakjuk pleomorf, azaz nagy változatosságot mutat. Előfordulnak kicsi, nagy, gömbölyű, hengeres, elágazó és szabálytalan formában is. Átmérőjük kisebb, mint 1 µm, a 60-100 nm-es nagyságtól kb. 1100 nm-ig terjed (Ploaie, 1973). Marwitz és Petzold (1978), továbbá Seliskar és Wilson (1981) speciális elektronmikroszkópos elemzéssel új formákat fedezett fel: elágazó, súlyzó, sarjadzó és hasadással osztódó alakokat. Hirumi és Maramorosch (1973) azt figyelték meg, hogy a kicsi, gömb alakú forma ősszel, a fertőzés vége felé van jelen, míg elágazó formában leginkább tavasszal, a fertőzés kezdeti szakaszában találkozhatunk.

A fitoplazmák szilárd sejtfallal nem rendelkeznek, egyetlen sejtjüket egy 3 rétegű, 10 nm

vastagságú citoplazmahártya határolja. A sejt közepén sötét színű, fonalas szerkezetű, erősen festődő DNS-ből álló magállomány található. A citoplazmahártyához közel található az RNS-t tartalmazó riboszómák (Ploaie, 1973; Florance and Cameron, 1978; Waters and Hunt, 1980; Viczián *et al.*, 1998b; Chapman *et al.*, 2001). Membránhoz kötött vakuólumokat és zárványtesteket csak ritka esetekben fedeztek fel sejtjükön belül (Hirumi and Maramorosch, 1973).

A fitoplazmák a növényeken belül kizárólag azok háncsszövetében szaporodnak és halmozódnak fel (Lee and Davis, 1992). Leginkább a kifejtett rostacsövekben találhatók meg a sejtfalhoz tapadva (Seemüller *et al.*, 1984). Egyes esetekben parenchima és kísérő sejtekben is megfigyelték a jelenlétüket. (Hibino and Schneider, 1970; Hirumi and Maramorosch, 1973), de McCoy (1979) szerint ez téves megfigyelés, mert a nem teljesen érett rostacsövekkel ezek összetéveszthetők.

A fitoplazmák a növény háncsszövetén kívül egyes rovarvektorok hemolimfájában is képesek felhalmozódni, illetve szaporodni (Fletcher *et al.*, 1998; Hogenhout *et al.*, 2008).

A fitoplazmák a növényekbe passzív úton kerülnek a rovarvektorok táplálkozása során, közvetlenül a rostacsövekbe, ahol ivartalan szaporodásuk és felhalmozódásuk történik. Néhány fitoplazma esetében az egyes rostasejtekben felhalmozódott fitoplazma sejtek mennyisége évszaktól, illetve a fák vegetációs állapotától is függ (Seemüller *et al.*, 1984).

A fitoplazmák növényen belüli terjedése nem teljesen tisztázott a mai napig. Elképzelhető, hogy a rostapórusok kulcsszerepet játszanak a sejtek közötti vándorlásban, de egyes megfigyelések szerint (Davis and Whitcomb, 1981) a vándorlás rostapórus nélküli sejtek között is lehetséges. Egy kísérlet alapján feltételezhető, hogy a kórokozó sejtek a plazmodezmákon át is képesek terjedni (Ulrichova and Petru, 1975), bár McCoy (1979) nem tartja valószínűnek ezt a lehetőséget a fitoplazmák plazmodezmákat meghaladó mérete miatt. Azt az állítást, hogy a fitoplazmák nem csupán a háncsszöveteken keresztül képesek terjedni alátámasztják magátviteli kísérletek eredményei egyes fitoplazmák esetében (Khan *et al.*, 2002; Cordova *et al.*, 2003), azonban ezekben az esetekben több tényező együttes vizsgálata is szükséges.

2.3. A fitoplazma genom molekuláris jellemzése

A fitoplazmák a *Mollicutes* osztályon belül nagy és változatos csoportot alkotnak. Ezen mikroorganizmusokkal kapcsolatos ismereteink azonban igen hiányosak, köszönhetően annak, hogy a fitoplazmák mesterséges körülmények között nem tarthatók fenn. A molekuláris módszerek térnyerésével egyre inkább feltérképezhetővé vált a fitoplazmák molekuláris biológiája. Mai ismereteink szerint a fitoplazmák a legkisebb genommérettel rendelkező (530 kbp /Bermuda grass white leaf, BGWL/ - 1350 kbp /'*Candidatus* Phytoplasma solani'/), önállóan szaporodni képes prokarióta csoport (Marcone *et al.*, 1999b; Firrao *et al.*, 2005). Ez a kis méret azzal magyarázható,

hogy számos, a túlélésükhöz szükséges anyag szintézis útja hiányzik, erősen redukálódott genomjukból hiányoznak az ATP szintézis, valamint a cukorfelhasználás kódolásáért felelős gének (Christensen *et al.*, 2005). Ezeket a hiányosságokat a kórokozó a gazdanövényéből, illetve a rovargazdákából pótolja (Bai *et al.*, 2006). Az egyes rendszertani csoportokon belül a fitoplazmák genommérete igen változékony, ami bizonyos genomi komponensek elvesztésére utal. A kis genomméret nem magyarázza azt, hogy nem tenyészthetők (Marcone *et al.*, 1999b), azonban a nagy genommal rendelkező fitoplazmákban valószínűleg lehetnek olyan gének, amelyek szükségesek az önálló és független szaporodáshoz (Neimark and Kirkpatrick, 1993). A fitoplazma genom G+C tartalma a mikoplazmákon belül is az egyik legalacsonyabb értékű (Kollar *et al.*, 1989). A mikoplazmákkal ellentétben a fitoplazmákban a triptofán aminosav kódolásáért az UGG triplet felelős (Bertaccini, 2007), míg az UGA stop kodonként funkcionál (Toth *et al.*, 1994).

A fitoplazma genomban többek között két 16S rRNS-t (Schneider and Seemüller, 1994b), riboszomális fehérjéket kódoló gének (Lim and Sears, 1992), az EF-Tu elongációs faktort kódoló *tuf* gén (Schneider *et al.*, 1997) és főbb membránfehérjéket kódoló gének (Barbara *et al.*, 1998, 2002) található. Emellett több fitoplazmában is jellemeztek extrakromoszomális elemeket, amelyek szerepe és jelentősége nem tisztázott (Davis *et al.*, 1988; Kuske és Kirkpatrick, 1990). A fitoplazmák patogenitási folyamataiban résztvevő gének, illetve egyéb általános háztartási gének jellemzése hiányos (Padovan *et al.*, 2000).

2.3.1. A fitoplazmák jellemzése során leggyakrabban vizsgált gének

2.3.1.1. A *hflB* gén

A *hflB* (vagy *ftsH*) gének olyan, baktériumok körében konzervatív, sejtmembránhoz kapcsolt, ATP-függő cink proteázokat (fehérjebontó enzimeket) kódolnak, amelyek lebontják a rossz felépítésű, és rövid életű fehérjéket, ezáltal lehetővé teszik a sejtszintű szabályozást a fehérjék stabilitásának szintjén, és hozzájárulnak a membrán- és citoplazma fehérjék minőségének megőrzéséhez (Bonas, 1994; Ito és Akiyama, 2005). Továbbá olyan membránhoz kapcsolt folyamatokban is részt vesznek, mint például a fehérje-szekréció és a membránfehérjék összeállítása. Fontos szerepük van abban, hogy a sejtek képesek legyenek adaptálódni az ozmotikus stresszhez, illetve a különböző tápanyag-összetételű környezethez (Bai *et al.*, 2006).

A legtöbb baktériummal ellentétben a fitoplazmákban nem egy, hanem 24 kópiában lehet jelen a *hflB* gén (Bai *et al.*, 2006; Arashida *et al.*, 2008). A '*Candidatus* Phytoplasma mali' AT törzsének kromoszómája 12 *hflB* gént tartalmaz (Kube *et al.*, 2008). Schneider és Seemüller (2009) a *hflB* gént, mint lehetséges virulenciafaktort vizsgálták (Beier *et al.*, 1997; Lithgow *et al.*, 2004), valamint SSCP analízissel történő törzsszintű elkülönítéssel kísérleteztek. A '*Ca. P. mali*' törzsek

variabilitásának vizsgálatához az ATP00464 jelű *hflB* gén 528 bp hosszúságú változékony fragmentumát (paralógjai: ATP00034, ATP00454, ATP00457) használták fel (Seemüller *et al.*, 2010). Később ugyanezt a gént használták fitoplazma izolátumok jellemzésére (Schneider *et al.*, 2014).

2.3.1.2. Az *imp* gén

A '*Ca. P. mali*' törzsek variabilitását az immunodomináns membránfehérje (*imp*) gének vizsgálatával is elvégezték (Berg *et al.*, 1999; Seemüller *et al.*, 2010). Az immunodomináns membránfehérjéket olyan gének kódolják, amelyek egyetlen kópiában vannak jelen, és feltételezhetően a kórokozó-gazdanövény kapcsolatban játszanak szerepet.

Az *imp* gén sokkal változékonyabb, mint a 16S rDNS gén, ezáltal az AP csoportba tartozó fitoplazmák taxonómiai kapcsolatainak, valamint genetikai változékonyságának jellemzésére különösen alkalmas (Morton *et al.*, 2003; Danet *et al.*, 2007). A 16SrX (AP) csoportba tartozó fitoplazmák ezen génjeik alapján jól elkülöníthetők (Morton *et al.*, 2003; Kakizawa *et al.*, 2009).

2.3.1.3. A 16S rDNS gén és egyéb riboszomális DNS szakaszok

A nem tenyészhető fitoplazmák a rendszertani osztályozásához a konzervatív 16S riboszomális RNS-t kódoló 16S rDNS gént választották (Weisburg *et al.*, 1989). Ennek homológiájából azonban nem lehet következtetni két faj teljes genomjának homológiájára (Seemüller *et al.*, 1998). Azok a patológiájukban eltérő, de filogenetikai szempontból hasonló fitoplazmák, amelyek 86%-nál nagyobb egyezést mutatnak a 16S rDNS szekvenciájukban, osztályozhatóak (Seemüller *et al.*, 1998). Schneider és Seemüller (1994b) megállapították, hogy a fitoplazmák két 16S rDNS gént tartalmaznak. Napjainkig több mint 800 különböző fitoplazma 16S rDNS génje került szekvenálásra (Kirkpatrick and Fraser, 1989; Lim and Sears, 1989; Kuske and Kirkpatrick, 1992; Wei *et al.*, 2007), mindazonáltal más konzervatív DNS szakaszok is alkalmasak fitoplazmák molekuláris szinten történő elkülönítésére (Bertaccini, 2007). Olyan markereket és nem konzervatív géneket is vizsgáltak, mint a riboszomális fehérje gének (Lim and Sears, 1992; Gundersen *et al.*, 1994; Toth *et al.*, 1994) és a 16-23S rRNS spacer régió (Kirkpatrick *et al.*, 1994).

2.3.2. Kromoszómatérképek

A fitoplazmák patogenitásának molekuláris szinten történő elemzéséhez a rendelkezésre álló fizikai kromoszómatérképek jelenthetnek segítséget. Az elmúlt évek során több fitoplazma fizikai kromoszómatérképét is jellemezték (Lim and Sears, 1991). Elsőként a nyugati X-betegség (WX)

kórokozójának kromoszómatérképét határozták meg, amely 675 kbp, cirkuláris, és 20 hasítóhelyet, valamint két rRNS operont tartalmaz (Firrao *et al.*, 1996). Padovan és munkatársai (2000) az édesburgonya aprólevelűség fitoplazma egy törzsének kromoszómatérképét jellemezték. A 622 kbp nagyságú genom a fitoplazmák között az egyik legkisebb méretű, amelyen a két rRNS operon hasonló pozícióban helyezkedik el, mint a WX fitoplazma genomján, valamint 16 hasítóhelyet tartalmaz. Lauer és Seemüller (2000) a '*Ca. P. mali*' AT törzsének kromoszómatérképét készítették el. A 645 kbp nagyságú genomon 13 hasítási helyet jellemeztek, valamint 2 rRNS operon, a *fus* és *tuf* gének, az *imp* gén, egy feltételezett nitroreduktáz gén, továbbá véletlenszerűen klónozott fragmentumok helyét is megállapították. Az ESFY fitoplazma fizikai kromoszómatérképét Marcone és Seemüller (2001) készítették el. Az ESFY kromoszómáját is cirkulárisként jellemezték, továbbá megállapították, hogy a jelen levő két rRNS operon nem kapcsolt. A 635 kbp nagyságú genomon 26 hasítóhelyet jellemeztek, valamint a *tuf* gént, véletlenszerűen klónozott fragmentumokat, az *imp* gént és egy feltételezett nitroreduktáz gént is feltüntettek. 2008-ban történt meg az FD fitoplazma kromoszómatérképének jellemzése (Malembic-Maher *et al.*, 2008). Az FD törzs 671 kbp nagyságú kromoszómáján 13 hasítóhelyet, és 9 genetikai markert jellemeztek.

2.3.3. Ismert szekvenciájú fitoplazma genomok

Jelenleg mindössze öt fitoplazma genomjának teljes szekvenciája ismert. Ezek között két '*Candidatus Phytoplasma asteris*' törzs található: az OY-M (Onion Yellows, hagyma sárgulás) (Oshima *et al.*, 2004) és az AY-WB (Aster Yellows-Witches Broom, őszirózsa boszorkányseprűsödése) (Bai *et al.*, 2006), valamint a '*Candidatus Phytoplasma australiense*' egy ausztrál, illetve egy új-zélandi törzse (Liefting *et al.*, 2006; Tran-Nguyen *et al.*, 2007). A '*Ca. P. asteris*' és a '*Ca. P. australiense*' a fitoplazmákon belül egy taxonómiai ágon helyezkednek el (Seemüller *et al.*, 2002). A két '*Ca. P. asteris*' törzs kromoszómájának szekvenciája nagyfokú homológiát mutat. Mind a négy említett fitoplazma kromoszómája cirkuláris (Kube *et al.*, 2008). Bár korábban a '*Ca. P. mali*' és a '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' kromoszómáját is cirkulárisnak vélték (Lauer and Seemüller, 2000; Marcone and Seemüller, 2001) Kube és munkatársai (2008) igazolták, hogy mind a '*Ca. P. mali*', a '*Ca. P. prunorum*' és a '*Candidatus Phytoplasma pyri*' lineáris kromoszómával rendelkezik, ami igen ritka a baktériumok között. Kube és munkatársai (2008) a '*Ca. P. mali*' 601 kbp nagyságú kromoszómájának szekvenciáját jellemezték, és arra a megállapításra jutottak, hogy egyes anyagcsere-folyamatok hiányoznak, valamint a glikolízis folyamata sem teljes. A '*Ca. P. asteris*'-hez képest kevesebb paralóg gént, mobil DNS elemet, valamint ABC transzportert tartalmaz, azonban a homológ rekombinációért és a javítási feladatokért felelős gének nagyobb számban vannak jelen ebben a genomban.

2.4. A fitoplazmák terjedése növények között és a fertőzés mechanizmusa

Jelenlegi ismereteink alapján a fitoplazmás betegségek növények közötti terjedése rovarvektorok, oltás, szemzés, aranka növény (*Cuscuta* sp.) és fertőzött szaporítóanyag útján történhet. Az 1900-as évek végén az átvitel más módjaival is kísérleteztek. A mechanikai úton (floémnedv injektálása, bedörzsölése) történő átvitel sikertelennek bizonyult (Valenta *et al.*, 1961; Ploaie, 1981). Szirmai (1956) a levéltetű-átvitelt igyekezett bizonyítani, feltevése azonban nem igazolódott. Ezzel szemben az általa kikísérletezett oltási módszerek a mai napig használatosak fitoplazmák fenntartására.

A fitoplazma fenntartása üvegházban rózsameténg (*Catharanthus roseus* L.) tesztnövényen történik (Dickinson *et al.*, 2013). Előnye, hogy számos fitoplazma egyszerűen fenntartható benne, és rövid időn belül intenzíven mutatja a betegségre jellemző tüneteket. Jó lehetőséget nyújt arra, hogy genetikailag azonos növényekben lehet összehasonlítani a különböző fitoplazmák által okozott tüneteket. A kórokozó genetikai állománya könnyen kinyerhető, így molekuláris vizsgálatok elvégzésére alkalmas (Bertaccini, 2007). A rózsameténgben fenntartott fitoplazmák nagy mennyiségben vannak jelen a növényben, eloszlásuk egyenletes, így a nukleinsavak, fehérjék, egyéb immunogének könnyebben hozzáférhetők (Dickinson *et al.*, 2013).

Természetesen fertőzött gazdanövényről a fitoplazmát aranka (*Cuscuta* sp.) segítségével juttatják át a tesztnövényre. A *Cuscuta* képes a fitoplazmát terjeszteni nem rokon növényfajok között, még fás és lágyszárú fajok esetében is. Jellegzetes tünetek indukálásához a fitoplazma fertőzött tesztnövényről egészséges gazdanövényre való visszajuttatása is aranka segítségével történik (Pribylova és Spak, 2013). Az arankával való fitoplazma-átvitelről már az 1960-as években beszámoltak (Valenta *et al.*, 1961; Hosford, 1968; Horváth, 1972). Marcone és munkatársai (1997, 1999a) több fitoplazmás betegség kapcsán is igazolták a kórokozó átvihetőségét aranka segítségével. Az átvitel igazolására az aranka rostacsöveit elektronmikroszkóppal vizsgálták (Dale és Kim, 1969; Hibben és Wolansky, 1970; Carraro *et al.*, 1991). A *Cuscuta* fizikailag kapcsolódik a gazdanövényhez és annak tápanyagaitól, asszimilációs termékeitől függővé válik (Jeschke *et al.*, 1994). Hausztóriumokat fejlesztve hatol be a gazdanövény sejtjeibe, ahol annak edénynyalábjaihoz kapcsolódik (Vaughn, 2003). Alapvetően a gazdanövény xylémjéhez kötődik, de bizonyos kísérletek eredményei alapján a floémhez is képes hozzákapcsolódni (Birschwilks *et al.*, 2006). Ezen kívül citoplazmatikus kapcsolat is fennállhat az aranka és a gazdanövény között (Vaughn, 2003). A fitoplazmával fertőzött arankán is kifejlődnek tünetek (Pribylova and Spak, 2013), amelyek a fitoplazmák virulenciájának megfelelően változatos intenzitásúak (Carraro *et al.*, 1991). A fitoplazma perzisztens terjedését igazolták arankában, és azt, hogy az átvitel egyes fitoplazmáknál néhány héten belül bekövetkezhet. Kimutatták, hogy a növekedés irányában

aktívabb a fitoplazma áramlása (Carraro *et al.*, 1991).

A természetben előforduló fitoplazmás megbetegedések a vektor-fitoplazma-gazdanövény kapcsolat következményei. A fitoplazmák olyan különleges csoportot alkotnak, amelyek képesek mind növényekben, mind rovarok citoplazmáján belül szaporodni (Christensen *et al.*, 2005). Mivel a fitoplazmák floémhez kötött életmódot folytatnak, terjesztésükért a floémből táplálkozó szipókás rovarok felelősek, melyek közül legnagyobb szerepe a kabócáknak és a levélbolháknak van, de egyes esetekben a tetvek, illetve a poloskák is lehetnek vektorok. A leggyakoribb vektorszervezetek a *Cicadellidae*, *Cixidae*, *Psyllidae*, *Delphacidae* és *Derbidae* családokból kerülnek ki a *Homoptera* (egyenlőszárnyú rovarok) rendből (Weintraub and Beanland, 2006). Európában Maramorosch (1953) számolt be először egy betegség, a here virágzöldülés (Clover Phyllody Phytoplasma) kabóccával történő terjedéséről. Később a sztolbur fitoplazma vektorokkal történő átvitelét írták le (Kuroli, 1970; Brcák, 1979). Német kutatók egy kabóca fajt írtak le az európai őszirózsa sárgulás fitoplazma vektoraként (Heinze and Kunze, 1955). Európa-szerte több országban is számos kabócafajt jelöltek meg az akkor még vírusoknak vélt fitoplazmák vektoraiként (Golino, 1989; Maixner *et al.*, 1995; Beanland *et al.*, 1999). Az 50-es-60-as években kabócákat, mint a kórokozó terjesztőit azonosították Európán kívül Japánban, Afrikában, az Egyesült Államokban, Kanadában és Ausztráliában. A levélbolhák vektor szerepét AP (Frisinghelli *et al.*, 2000; Tedeschi *et al.*, 2002; Tedeschi and Alma, 2004), PD (Lemoine, 1991; Davies *et al.*, 1992) és ESFY (Carraro *et al.*, 1998) fitoplazmáknál igazolták. Egy adott fitoplazma gazdaspecificitását a vektor növénypreferenciája, táplálkozási szokása (mono, oligo, polifág), illetve a gazdanövény adott fitoplazmára való fogékonysága határozza meg (Lee *et al.*, 1998b). Egy fitoplazmát általában egy, vagy néhány rovarfaj terjeszt, azonban egyes esetekben a vektor szerepét több faj is betöltheti (Alma *et al.*, 1997; Bosco *et al.*, 1997; Goodwin *et al.*, 1999). Ismert, hogy a vektorok több fitoplazma átvitelére is képesek, csak úgy, mint ahogy egy növény is lehet gazdája több fitoplazmának (Lee és Davis, 1992; Lee *et al.*, 1998a). Ennek kapcsán a növényekhez hasonlóan kimutatták egy rovar szervezetéből több fitoplazma együttes jelenlétét (Palmano és Firrao, 2000), sőt, Maramorosch (1958) kabócákban fitoplazma törzsek interakcióját is tapasztalta. Lee és munkatársai (1998b) szerint a természetben fennálló egyszeres, vagy többszörös kevert fitoplazma fertőzöttségért egy növényen belül a vektor földrajzi elterjedése és a preferált gazdanövényköre felelős. Ezzel összhangban áll az a megállapítás, mely szerint a különböző fitoplazmákat más földrajzi körülmények között más vektorok terjesztik (Brcák, 1979; Nielson, 1979).

A kórokozó a rovarok szervezetébe a fitoplazmával fertőzött növény floémnedvének szívogatása során jut be, majd idővel a legtöbb fő szervben is felszaporodik (emésztőrendszer középbél, hemolimfa, nyálmirigy) (Alma *et al.*, 1997; Fletcher *et al.*, 1998). A fitoplazma a nyálmirigyből a szájszervbe kerülve válik leadhatóvá. A lappangási idő a rovarban jellemzően 2-3 hetes, melyet

azonban a hőmérséklet is befolyásol. (Kirkpatrick, 1992; Agrios, 1997).

Alma és munkatársai (1997), Kawakita és munkatársai (2000) és Hanboonsong és munkatársai (2002) bizonyos kabócák esetében igazolták a tojással való fitoplazma átvitelt, Tedeschi és munkatársai (2006) pedig *Cacopsylla pruni* (Scopoli, 1763) esetében vetették fel ennek lehetőségét. A fitoplazmák terjesztése perzisztens módon történik, azaz a fertőzött levélbolhák életük végéig megőrzik fertőzőképességüket (Carraro *et al.*, 2001). A nimfa és imágó stádiumban is fertőzőképes rovaroknak évente egy, vagy több generációjuk fejlődik ki, és többnyire kifejlett formában telelnek át. Számos esetben igazolták azt, hogy a fitoplazma képes áttelelni a vektorszervezetben (Davis and Sinclair, 1998; Carraro *et al.*, 2001; Tedeschi *et al.*, 2003; Kiss *et al.*, 2015). A fitoplazmafertőzés a rovarok élettartamát és szaporodását előnyösen és hátrányosan is befolyásolhatja (Murrall *et al.*, 1996; Garnier *et al.*, 2001).

2.5. A fitoplazmák átvitele és fenntartása kísérleti környezetben és *in vitro*

A fitoplazmák fenntartására hagyományosan üvegházi körülmények között leginkább alkalmazott tesztnövény a rózsameténg (*Catharanthus roseus* L.), mivel szaporításuk könnyű és gyors, valamint a fitoplazmák nagymértékben képesek elszaporodni a növényben, így nyomon követésük egyszerűbb (Bertaccini, 2007). A fitoplazma tesztnövényre való átvitelére oltást alkalmaznak, de történhet aranka (*Cuscuta arvensis* Beyr. ex Engelm.), illetve rovarvektorok segítségével is (Jagoueix-Eveillard *et al.*, 2001). A rózsameténg fenntartása üvegházi körülmények között a növény optimális igényeinek figyelembe vételével valósítható meg. Lehetőség van a fitoplazmával fertőzött növények *in vitro* tenyésztésben való fenntartására is, melynek célja a fertőzések megelőzése, a kontrollált körülmények biztosítása, valamint a fitoplazma törzsek fenntartása (Jarausch *et al.*, 1999). Pontosán meghatározott összetételű táptalajon, növekedési hormonok hozzáadásával, a fertőzött növény csúcsi része jól szaporítható, és fenntartható. Mikroszaporítással sikerült fenntartani alma AP-fertőzött, (Jarausch *et al.*, 1996), szilva ESFY-fertőzött (Jarausch *et al.*, 1994), illetve körte PD-fertőzött hajtástenyészeteit (Davies és Clark, 1994). *In vitro* oltási kísérletükben Jarausch és munkatársai (1999) megfigyelték, hogy a fitoplazma átvitele csak sikeres floémkapcsolódás esetén zajlik le, valamint a fitoplazma átvitel függ az oltásban résztvevő alany, illetve nemes minőségétől, valamint az inokulumban élő fitoplazma koncentrációjától.

2.6. A fitoplazmafertőzés

2.6.1. Általános tünetek

A mai napig sem tisztázott teljesen az a kérdés, hogy mely tényezők, gének felelősek a fitoplazmák

által okozott tünetek kialakulásáért, azonban számos olyan mechanizmus ismert, amelyek szerepet játszhatnak a végső tünetegyüttes kialakításában. A fitoplazmák tünetek széles skáláját képesek előidézni, többek között sárgulást, törpülést, "boszorkányseprűsödést", virágdeformációt. (Lee *et al.*, 2000). A fitoplazmával fertőzött növények számos olyan specifikus tünetet mutatnak, amelyből a növekedésszabályozás zavaraira lehet következtetni. A fitoplazmák által indukált leggyakoribb tünetek a fillódia (a virágok helyett zöld levélszerű képződmények kifejlődése), a vireszcencia (virágrészek elzöldülése), a virágok sterilitása, az axiális rügyek proliferációja, „boszorkányseprűs” megjelenést eredményezve, az internódiumok természetellenes megrövidülése, általános törpülés (Bertaccini, 2007).

2.6.2. A fitoplazmafertőzés jellegzetességei fás növényekben

Számos lombhullató fás szárú növényenél kimutatták, hogy a fitoplazmával fertőzött növényekben a kórokozó kolonizációja a föld feletti részekben évszakonként változik. AP-vel és PD-vel fertőzött alma-, illetve körtefákban a '*Ca. P. mali*' és '*Ca. P. pyri*' kolonizációs mintázatát több éven keresztül vizsgálták, DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) festéses fluoreszcens mikroszkópos eljárással (Schaper and Seemüller, 1982.; Seemüller *et al.*, 1984). Mivel a fitoplazmák a funkcionális rostacsövekhez kötődtek, és ezek a rostacsövek az alma és a körtefák föld feletti részeiben késő ősszel, kora télen degenerálódnak, így a legtöbb esetben az AP és PD fitoplazmák „eltűnnek” a fák föld feletti részeiből. Ezzel szemben télen a gyökérben élnek tovább, ahol az intakt rostacsövek egész évben megmaradnak. A gyökerekből tavasszal, az új rostacsövek kialakulásakor indul meg a kórokozók rekolonizációja a fák föld feletti részeibe (Schaper és Seemüller, 1984).

A megbetegített fák gyökérrendszere a fák élete végéig kolonizálódott marad (Carraro *et al.*, 2004). Az AP rezisztenciával végzett átfogó vizsgálatok igazolták, hogy AP-rezisztens apomiktikus alanyokat használva a tünetek nem, vagy csak nagyon enyhe formában jelentkeztek. Seemüller és munkatársai (2010) AP-vel kapcsolatos kísérleteik során igazolták, hogy az almában együttesen több törzs is jelen lehet, amelyek eltérő virulenciával rendelkeznek. Ez esetben a törzsek közötti predominancia befolyásolja a kialakuló tünetek intenzitását, illetve a tünetmentességet.

Az ESFY fitoplazma kórokozója, a '*Ca. P. prunorum*' a fertőzött fák föld feletti hajtásaiban is képes megmaradni a nyugalmi időszakban is, miközben a teljes évben jelen van a gyökérben is. DAPI fluoreszcens és PCR vizsgálat során kimutatták, hogy tavasszal a kórokozó lassan kolonizálta a leveleket, az AP-hez és a PD-hez hasonló kolonizációs mintázatot adva. A fertőzött fák szisztemikus kolonizációját figyelték meg a júliustól késő őszig tartó időszakban (Seemüller *et al.*, 1998; Jarausch *et al.*, 1999). Kison és Seemüller (2001) PCR-rel és DAPI festéssel vizsgálták számos kísérleti és valódi *Prunus* alany ESFY fertőzésre adott válaszát. Többek között arra vonatkozó megfigyeléseket is tettek, mely szerint különbségek mutatkoztak az egyes fák gyökerének és föld

feletti részeinek kolonizációjának mértékében. A virágrészek szöveteiben nem jellemző a fitoplazmák előfordulása (Cordova *et al.*, 2003).

2.7. A fitoplazmák detektálása

A fitoplazmák detektálását kezdetben olyan problémák nehezítették, mint az alacsony koncentráció, valamint az egyenetlen eloszlás a növény rostacsöveiben (Berges *et al.*, 2000). Az áttörést a kórokozók növényen belüli elektronmikroszkópos megjelenítése jelentette, valamint az a módszer, amellyel kontrollált körülmények között juttatták át a kórokozót oltás útján tesztnövényre. Olyan DNS-hez kötődő festékeket használtak (DAPI), amelyek láthatóvá tették őket mikroszkópos vizsgálat során. Ezek a módszerek azonban nem voltak alkalmasak a fitoplazmák megkülönböztetésére. Később fitoplazma-specifikus antigének előállításával próbálkoztak. Napjainkban a széleskörűen alkalmazott nukleinsav-alapú technikák a legelterjedtebbek, amelyek alkalmasak mind növényi mintából, mind rovarokból kimutatni a kórokozó jelenlétét (Bertaccini and Duduk, 2009).

2.7.1. Egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP, Single Strand Conformation Polymorphism) vizsgálat a genetikai variabilitás kimutatására

A fitoplazmák detektálására és jellemzésére leginkább alkalmazott módszer az evolúciósan konzervatív gének, főként a 16S rDNS PCR/RFLP analízise. Ennek kiegészítésére Music és munkatársai (2008) az SSCP módszert alkalmazták, mellyel a fitoplazmák molekuláris variabilitása jobban jellemezhető. Kutatásaikban a vizsgált 16S rDNS, *tuf* és *dnaB* gének hagyományos analízise nem bizonyult alkalmasnak a polimorfizmus felderítésére, mert a nukleotidok szintjén jelen levő változások feltehetően a restrikciós hasítóhelyeken kívül estek. Ezzel szemben az SSCP módszer alkalmas volt az egy riboszomális csoportba tartozó izolátumok molekuláris variabilitásának kimutatására amellet, hogy a filogenetikai eredményeket is alátámasztotta. Schneider és Seemüller (2009) '*Ca. P. mali*' törzsek *hflB* génjének variabilitását igazolta SSCP útján. Music és munkatársai (2008) tapasztalatai alapján az SSCP módszer jóval érzékenyebb (egyetlen nukleotid eltérés esetén is informatív), és időtakarékosabb, mint a PCR/RFLP módszer, gyors eredményt ad nagy mintaszám esetén is. Az SSCP RFLP-vel szembeni további előnye, hogy alkalmas DNS polimorfizmus és pontmutációk detektálására a DNS fragmentumok bármely pozícióján (Orita *et al.*, 1989). Az elnevezés (SSCP, Single Strand Conformation Polimorphysm, egyszálú konformációs polimorfizmus) arra utal, hogy a denaturált DNS szálak vándorlási sebességét a gélben konformációs különbségek befolyásolják, ami egyben az elválasztás alapja. Az eltérő elsődleges struktúrájú, elválasztott egyszálú DNS-ek különböző struktúrába rendeződnek, és poliakrilamid

gélben eltérően mozognak megfelelő elektroforetikus feltételek mellett (Orita *et al.*, 1989). A lehetséges mutációk a mintázat eltéréseiben, vagy a mintázatot adó sávok számának változásában jelennek meg (Music *et al.*, 2008). Megállapították, hogy a denaturált szálak vándorlását befolyásolja a futtatási hőmérséklet, a puffer koncentrációja, valamint a gélben található denaturáló ágensek (Orita *et al.*, 1989). Az akrilamid gélben való futtatást követően ezüstfestési eljárással teszik láthatóvá a mintázatot Igloi (1983) módszere alapján, ami sokkal érzékenyebb az etidium-bromidos kimutatásnál.

A módszert már régóta használják az orvosbiológiai kutatások terén, de rutinszerűen alkalmazzák a növényvirológiai kutatásokban is (Rubio *et al.*, 1996). Széleskörűen alkalmazott módszer a humán örökletes betegségek klinikai diagnosztikájától kezdve (Papp *et al.*, 2007) mikrobiális szervezetek jellemzéséig (Hori *et al.*, 2006). Palacio és Duran-Vila (1999) viroid populációk vizsgálatához használtak SSCP eljárást. A különböző fitoplazma törzsek eltéréseinek vizsgálatára és pontmutációk detektálására jelenleg még nem igazán elterjedt technika (Han és Cha, 2002; Music *et al.*, 2008). Seemüller és munkatársai (2010) kevert fertőzésben szerepet játszó fitoplazma törzsek elkülönítésére alkalmazták a '*Ca. P. mali*' által megbetegített almafák vizsgálatakor.

2.8. Magyarországon előforduló gyakoribb fitoplazmás betegségek

A fitoplazmáknak tulajdonított betegségek világszerte számos növényfajt veszélyeztetnek. Több mint 300 betegséget tulajdonítanak fitoplazmáknak, melyek több száz lágyszárú és fásszárú dísz- és haszonnövényfajt érintenek (Hoshi *et al.*, 2007).

Hazánkban először Szirmai János tett említést 1956-ban az akkor még vírusnak vélt fitoplazmáról, mint a fűszerpaprika kórokozójáról. A következő néhány év során dohányról és burgonyáról (Petróczy, 1958, 1962), paradicsomról, paprikáról, dohányról és szintén burgonyáról (Gáborjányi és Lönhárd, 1967) jelentettek sztolburos megbetegedést, sőt, burgonyán többször járványszerűen is fellépett a betegség. A hazai szőlőültvényekben a megjelenő jellegzetes tünetek kapcsán az 1990-es években indult meg egy átfogó felmérés, melynek eredményeként fehér és vörös fajtnál is igazolták a sztolbur fitoplazma jelenlétét. Ezt később molekuláris módszerekkel is igazolták (Varga *et al.*, 2000). A kórokozó molekuláris azonosítása az 1990-es évek végéhez köthető, amikor Viczián és munkatársai (1998a) paprikáról, paradicsomról, petrezselyemről, repcéről, hólyagos habszegfűről és csattanó maszlagról izolált fitoplazmát azonosítottak molekuláris módszerekkel. A következő években számos zöldség- és gyomnövényből izoláltak sztolburt (Viczián *et al.*, 1998a), valamint az AAY kórokozóját (Fodor *et al.*, 1999). Némethy és munkatársai (2001) számos dísz- és gyomnövényben mutattak ki fitoplazma fertőzöttséget. Ács és munkatársai (2010) igazolták, hogy a szőlőt és burgonyát támadó fitoplazma folyamatos fennmaradásáért többek között a hazánkban igen

gyakori aranka gyomnövény tehető felelőssé (Ács *et al.*, 2010).

A kajszipusztulás tüneteiről már a XX. század elején is érkezett jelentés (Schilberszky, 1913), akkor azonban a betegség okozóiként a *Valsaria insitiva* (TODE) CES. & DE NOT. (syn. *Cytospora rubescens* FR.), valamint a *Monilinia laxa* (ADERH. & RUHLAND) HONEY (syn. *Sclerotinia cinerea* SCHRÖT.) kórokozókat nevezték meg. A betegség lefolyása, illetve a védekezési lehetőségek tisztázatlanok voltak. Az akkor említett tünetek mai ismereteink szerint az ESFY-re utalhatnak. Magyarországon az ESFY által kajsziültetvényekben okozott tünetekre Süle és munkatársai figyeltek fel az 1990-es évek elején (nem közölt adat). Később a tüneteket mandulán is megfigyelték, valamint több kajsziültetvényben a fák tömeges pusztulását tapasztalták. Ennek kapcsán kezdték meg a kórokozó azonosítását, melyet ESFY fitoplazmaként határoztak meg (Süle *et al.*, 1997, Viczián *et al.*, 1997). Az ősziarack fitoplazmás betegségét hazánkban Németh és munkatársai (2001) jelentették először, az ezredfordulón, valamint ekkor igazolták a fitoplazma jelenlétét hazai sajmelegy génbanki állományban (Varga *et al.*, 2001).

Viczián (2002) jellegzetes tüneteket figyelt meg kelkáposztán, fejeskáposztán, vöröskáposztán, karfiolon, valamint pohánkán, amelyekből az izolált kórokozót '*Ca. P. asteris*'-ként azonosította, utóbbit hazánkban elsőként. Dísznövények között bársonyvirágon már a 2000-es évek körül jelentettek jellegzetes tüneteket köztéri bársonyvirág-kiültetésekből, valamint szaporítóanyagtelepekről, azonban a '*Ca. P. asteris*' kórokozó molekuláris azonosítása csak 2014-ben történt meg Magyarországon (Kiss *et al.*, 2014). Az AAY elterjedése zöldségnövényeken leginkább Pest és Fejér megyében jelentős.

A körtét támadó kórokozók között jelentős szerepe van a körte leromlást okozó fitoplazmának (Pear decline, PD). A tünetek intenzitása függ mind az alanytól, mind a nemestől (Davies és Clark, 1994). Magyarországon 1976-ban Németh végzett kísérleteket fitoplazma oltással való átvitelével kapcsolatban fogékony 'Vilmos' körte fajtán (Németh, 1979). Azóta jelentős PD megbetegedésről hazánkban nem érkezett jelentés.

Az AP hazánkban elterjedt, de nem jelentős betegsége az almának (Németh, 1979). Először Del Serrone és munkatársai (1998) jelentették az alma seprűsödés csoportba tartozó fitoplazmák megjelenését magyarországi körteültetvényekről. Ezzel egyidőben számoltak be fitoplazmák magyarországi körtéről történő molekuláris azonosításáról, valamint a PD és AP fitoplazmák együttes előfordulásáról. Magyarországon a legújabb, komoly veszélyeket rejtő betegség a fitoplazma által okozott szőlő aranyszínű sárgasága (Flavescence dorée), amely hazánkban karantén listán szerepel. A betegséget 2013-ban észlelték a badacsonyi borvidéken, jöllehet annak vektorát, az első amerikai szőlőkabócát már 2006-ban csapdázták (NÉBIH, 2013). A szőlőtermesztést a sztolbur fitoplazma jelenléte is veszélyezteti.

2.8.1. Alma seprűsödés (Apple proliferation, AP)

2.8.1.1. A betegség előfordulása

Nyugat-Európában az almát érintő egyik legjelentősebb, gazdaságilag is fontos fitoplazmás betegség az alma seprűsödés (Apple proliferation, AP). A kórokozót először Olaszország északi területén izolálták (Rui *et al.*, 1950), majd a következő évtizedekben a legtöbb európai országban megjelent. Napjainkban kontinensünk szinte összes országában megtalálható, de a legnagyobb gondot Olaszország északi területein, Németország déli felén, valamint Nyugat-Franciaországban jelenti (CABI/EPPO, 2013). A veszélyeztetett zóna déli határa egészen Görögország északi részéig terjed

(Canik és Ertunc, 2007; Sertkaya *et al.*, 2008). Németh (1979) tüneti megfigyelései alapján az AP hazánk almaültetvényeiben is igen elterjedt, sőt hazai körteültetvényekből is kimutatták PD-vel keverten 'Williams' és 'Esperen's Bergamotte' fajtákról (Del Serrone *et al.*, 1998), azonban komolyabb gazdasági jelentősége egyelőre nincsen.

2.8.1.2. Tünetek

Az AP tünetei, melyek lehetnek specifikusak, esetenként aspecifikusak is, megfigyelhetők almafa hajtásain, a fák levelein, a terméseken, valamint a gyökereken is. A betegség első tüneteiként nyár végén, ősszel levélpirosodás figyelhető meg. A következő évben a hajtások végén „boszorkányseprűhöz” hasonló elváltozások jelenhetnek meg, amely az apikális dominancia hiányának következménye. Gyengébb hajtások csúcsain levélrozetták figyelhetők meg. A fertőzött fák legtöbb levelén megnagyobbodott, sűrűn fogazott pálhalevelek jelennek meg (Seemüller, 1990; Bertaccini, 2007; Seemüller *et al.*, 2010). A tünetek intenzitását tekintve jelentős különbségek figyelhetők meg a különböző alanyok, valamint almafajták esetében. A betegség a fa termésének mennyiségét és minőségét is hátrányosan befolyásolja. Egy gyümölcs súlya fertőzött fán akár 30-60%-kal is csökkenhet. A beteg, ízetlen, halvány, apró gyümölcsök kocsánya jóval hosszabb, mint az egészséges terméseké. A beteg fa levelei halványak, világoszöldek, klorotikusak is lehetnek, és igen fogékonyá válnak lisztharmat-fertőzéssel szemben. Megfigyelések alapján a késői életkorban megfertőződött fák, amelyek gyökérszete is jól fejlett, kevésbé szenvednek a betegségtől, valamint a felépülési esélyük is nagyobb (Kunze, 1989; Seemüller, 1990; Bertaccini, 2007). A kórokozó a gyökerekben telel át, és tavasszal, az új floém képződésekor terjed szét a növényben. Esetenként előfordul, hogy a tünetek nem jelennek meg. Ez a növény újrafertőződésének elmaradásával hozható összefüggésbe, azonban a gyökérben ilyen esetekben is jelen lehet a kórokozó (Seemüller *et al.*, 1984 és 2010; Carraro *et al.*, 2004).

2.8.1.3. A kórokozó taxonómiája

A betegséget a '*Ca. P. mali*' okozza, amely a jelenlegi rendszertan szerint, a 16S rDNS szekvencia alapján történő csoportosításnak megfelelően, a 16SrX csoport tagja. A kórokozó az azonos rendszertani csoportba tartozó PD (Pear Decline), ESFY (European Stone Fruit Yellows), PYLR (Peach Yellow Leaf Roll) és PDTW (Pear Decline Taiwan) kórokozóival szoros rendszertani rokonságban áll. A 16S rDNS gén vizsgálataival igazolták, hogy Európa különböző országaiból származó AP izolátumok között a szekvencia-egyezőség 99,9 és 100% között van (Seemüller és Schneider, 2004).

Egy átfogó, 12 éves vizsgálat során Seemüller és Schneider (2007) az AP fitoplazma törzseket 3 csoportba sorolták azok virulenciája alapján (nem, vagy enyhén fertőző, közepesen fertőző, súlyosan fertőző). Megállapításaik szerint, míg az erősen virulens törzsek komoly károkat okoztak a fa fejlődésében és vigorában, addig az avirulensnek vélt törzsekkel fertőzött fák szabad szemmel szinte megkülönböztethetetlenek voltak az egészséges fáktól (Seemüller *et al.*, 2010).

2.8.1.4. A kórokozó terjedése

Természetes körülmények között a kórokozót a floémnedvvel táplálkozó szűrő-szívó szájszervű levélbolhák terjesztik. Két legfőbb vektora a nyári almafelevélbolha (*Cacopsylla picta* Förster) és a galagonyalevélbolha (*Cacopsylla melanoneura* Förster) (Jarausch *et al.*, 2003), amelyek életmódjuk és elterjedésük tekintetében kismértékben különböznek egymástól. Krczal *et al.* (1988) és Tedeschi és Alma (2006) a *Fiebertiella florii* Stål kabócafajt is megemlítik, mint lehetséges, az átvitelért felelős fajt Németország és Piemont térségéből. A legtöbb, AP által veszélyeztetett területen mindkét levélbolha faj megtalálható (Carraro *et al.*, 2001; Jarausch *et al.*, 2003; Mattedi *et al.*, 2007), azonban Olaszország észak-nyugati régiójában a galagonyalevélbolha terjedt el (Tedeschi *et al.*, 2002). Az említett levélbolhák perzisztens úton terjesztik a betegséget, és a tél során is megtartják fertőzőképességüket (Tedeschi *et al.*, 2003; Jarausch *et al.*, 2004; Tedeschi and Alma, 2004; Mattedi *et al.*, 2007).

2.8.2. Körte leromlás (Pear decline, PD)

2.8.2.1. A betegség előfordulása és a kórokozó taxonómiája

A körte legveszélyesebb fitoplazmás betegsége a körte leromlás (Pear Decline, PD), amely Európában és Észak-Amerikában a legjelentősebb, de egyes beszámolók szerint minden olyan környéken megtalálható világszerte, ahol a nemes körtét (*Pyrus communis* L.) termesztik (Seemüller *et al.*, 1992). A jelzett területeken kívül a betegség jelen van az Európán kívüli földközi-

tengeri régióban is, valamint szórványosan megjelenik az Egyesült Államokban is. A betegség hazánkban is egyre nagyobb mértékben veszélyezteti a körteültetvényeket. Legnagyobb veszélye abban rejlik, hogy *P. communis* oltványokban a betegség évekig tünetmentesen lappanghat. A megbetegedett fák levélereinek szűk rostacsöveiben a fitoplazma nagy mennyiségben lehet jelen, míg a másodlagos rostacsövekben igen kis arányban fordul csak elő (Schneider, 1977).

A körte leromlás kórokozója a '*Ca. P. pyri*', amely az alma seprűsödés (16SrX) csoportba sorolható Seemüller rendszerezése alapján (Lee *et al.*, 2000; Seemüller és Schneider, 2004), ahol a csoportba tartozó más fitoplazmákkal közel 99%-os homológiát mutat. A fajon belüli homogenitás Európán belül igen magas, 99,9-100% (Seemüller és Schneider, 2004).

2.8.2.3. Tünetek

A betegség megjelenésének három formája ismert: hirtelen pusztulás, lassú elhalás és a levelek vörösre színeződése, amely a levelek hullámosodásával jár együtt. Általánosságban a beteg fákon kevés, ősszel vörösre színeződő apró levél található. A jellegzetesen kanalasodó levelek a szokásosnál hamarabb hullanak le (Del Serrone *et al.*, 1998). A tipikus tünetek közé tartozik továbbá a szezonon kívüli virágzás, esetleg termésképződés, valamint esetenként boszorkányseprűsödés is megjelenik az axiális rügyek idő előtti kihajtásának köszönhetően (Osler és Loi, 1986; Osler *et al.*, 1996).

Több évtizedes tapasztalat alapján valószínűsíthető, hogy a '*Ca. P. pyri*' az összes *Pyrus* nemzetségbe tartozó fajt képes megbetegíteni (Seemüller *et al.*, 1998; Seemüller *et al.*, 2008). Megfigyelték, hogy a tünetek típusa függ a fajtától, valamint az alanytól is (Del Serrone *et al.*, 1998). Németh (1979) oltással történő fertőzéses kísérleteket végzett fogékony 'Williams' fajtán, ahol a molekuláris módszerek hiányában a tünetek kialakulásából következtetett a fertőzöttségre.

2.8.2.2. A betegség terjedése

A PD terjedéséért a levélbolhák tehetők felelőssé (Jensen *et al.*, 1964; Carraro *et al.*, 1998; Frisinghelli *et al.*, 2000; Tedeschi *et al.*, 2002). Európában három levélbolha található meg a körtén: *Cacopsylla pyri* (L.), *Cacopsylla pyricola* (Förster) és a *Cacopsylla pyrisuga* (Förster). A *C. pyricola* vektor szerepét Európán belül az Egyesült Királyság területén igazolták először (Davies *et al.*, 1992). Franciaországban (Lemoine, 1991), Olaszországban (Carraro *et al.*, 1998) és Spanyolországban (Garcia-Chapa *et al.*, 2005) fő vektorként a *C. pyri*-t azonosították. A *C. pyrisuga* fitoplazma átviteli képessége nem igazolt. Európa északi területein a *C. pyricola*, míg a középső és a déli területeken a *C. pyri* elterjedtebb. Mindkét faj oligofág, a *Pyrus* nemzetségbe tartozó fajokon fordulnak elő (Burckhardt, 1994; Lauterer, 1999).

Az említett körtelevélbolhák a körtén, vagy a környező növényeken telelnek át, és mivel egész életük során megőrzik fertőzőképességüket, az áttelelő nemzedék már a tavaszi táplálkozáskor is fertőzhet (Blomquist and Kirkpatrick, 2002; Carraro *et al.*, 2001), de a téli nyugalom során a kórokozó átvitelét nem tapasztalták (Carraro *et al.*, 2001).

2.8.3. Csonthéjasok Európai Sárgulása (European Stone Fruit Yellows, ESFY)

2.8.3.1. A betegség előfordulása

Európában Franciaország területén 1924-ben számoltak be először komoly kajszipusztulásról (Chabrolin, 1924). A betegséget 1965-ben nevezték el kajszik levélsodródás betegségről (ECA, *enroulement chlorotique de l'abricotier*, ACLR 'apricot chlorotic leafroll',) (Morvan és Castelain, 1965). Morvan és munkatársai (1973) mikoplazmákhoz hasonló szervezeteket figyeltek meg elektronmikroszkóp segítségével fertőzött kajszik háncsszövetében. Ennek ellenére a kajszik pusztulását az 1970-es években még gomba és baktérium kórokozókhoz hozták összefüggésbe (Klement, 1977), napjainkra a molekuláris diagnosztika elterjedésével azonban világossá vált, hogy a pusztulások hátterében a fitoplazmák állnak, míg az egyéb- gomba, illetve baktérium- kórokozók csak másodlagos szerepet játszanak a betegség kialakulásában (Süle, 2012a, b). A betegség a *Prunus* fajokon megjelenő tüneteket okozó, genetikailag nagyon hasonló fitoplazmák után az ESFY elnevezést kapta (Lorenz *et al.*, 1994). Napjainkra már valószínűsíthetően a betegség mindazon európai területeken jelen van, ahol csonthéjasokat termesztnek, beleértve az Európán kívül eső mediterrán térséget is (Seemüller és Foster, 1995; Jarausch *et al.*, 2000; Danet *et al.*, 2007). Európán kívül először Törökországból jelentették az ezredfordulón, amikor több *Prunus* fajt is leírtak gazdanövényként (Jarausch *et al.*, 2001). Európa déli vidékéről ezidáig nem jelentették a betegség fellépését, ami a vektor kedvelt gazdanövényeinek hiányával magyarázható (Steffek *et al.*, 2012). Az Egyesült Államokban egy másik fitoplazma csoport (X disease) károsítja a csonthéjasokat (Pénzes *et al.*, 2003).

Magyarországon Süle és munkatársai 1992-ben figyelték meg először (nem közölt adat), habár a jellegzetes tünetekre már a XX. század elején is felhívták a figyelmet (Schilberszky, 1913). Később a fák tömeges pusztulásának vizsgálata során a fitoplazmás betegségre jellemző tüneteket mutató fákból '*Ca. P. prunorum*' jelenlétét igazolták molekuláris módszerekkel (Süle *et al.*, 1997; Viczián *et al.*, 1997). Jelenleg hazánkban a legfőbb kajszitermesztő körzeteket is veszélyeztető kórokozóként tartjuk számon, a legnagyobb gondot Budapest térségében, Pest, Fejér, Somogy, Borsod-Abaúj-Zemplén és Bács-Kiskun megyékben okozza. A gönci kajszitermesztő körzetben nagy arányban pusztuló kajszik kórokozójának molekuláris azonosítása során szintén a '*Ca. P. prunorum*' fitoplazmát sikerült azonosítani (Tarcali *et al.*, 2014).

2.8.3.2. A kórokozó taxonómiája

A 16S rDNS analízise alapján a kórokozó, a '*Ca. P. prunorum*' (Seemüller and Schneider, 2004), is a 16SrX csoportba tartozik, mint az alma seprűsödés (AP), körte leromlás (PD), vagy az őszibarack sárgulásos levélsodródása (PYLR) (Schneider és Seemüller, 1994b; Seemüller *et al.*, 1994; Seemüller *et al.*, 1998; IRPCM, 2004). Molekuláris vizsgálatok (Southern blot hibridizáció, RFLP, riboszomális és nem riboszomális DNS PCR termékeinek szekvencia analízise) rávilágítottak, hogy genetikai tulajdonságait tekintve a '*Ca. P. prunorum*' Európa szerte igen homogén mikroorganizmus. (Ahrens *et al.*, 1993; Lorenz *et al.*, 1994; Kison *et al.*, 1997; Jarausch *et al.*, 1998, 2000; Seemüller *et al.*, 1998; Seemüller and Schneider, 2004). Azonban a kórokozónak több olyan törzse is ismert, amelyek eltérő virulenciával rendelkeznek (Kison és Seemüller, 2001). A tünetek változékonysága feltehetően valamilyen gazdanövény-patogén kölcsönhatástól függ (Jarausch *et al.*, 2000).

2.8.3.3. Tünetek

A tünetek a fa szinte minden részén jelentkeznek. Fiatal fák esetében a kórokozó szisztemikusan fertőzi az egész fát. A virágok torzulnak, az egészséges fákra jellemző 5 szíromlevél helyett 6-8 szíromlevél is megjelenhet. A fiatal levelek kúpszerűen a színük felé kanalasodnak. Egyes ágak, vagy az egész fa lombzata hirtelen sárgulni kezd, de bizonyos esetekben ez a sárgulás nem jelentkezik, a levelek haragoszöldek, merevek, törékenyek lesznek. A fa kérgét lehántva a háncsszövet narancssárgás elszíneződése, barnulása tapasztalható. A kórokozó körben elpusztítja a háncsszövetet, s ez vezet a fa hirtelen, gutaütésszerű elhalásához. A fitoplazmás pusztulás során nem figyelhető meg mézgaképződés. Idősebb fák esetében a fertőződés általában először csak a fa egyes ágain következik be, és azok pusztulnak el, de a kórokozó továbbterjed a növény többi részébe, és bekövetkezik a teljes pusztulás. Enyhébb teleken megfigyelhető a fertőzött fák kihajtása, virágzása. A jellemző tünetek legintenzívebben kora tavasszal virágzás előtt, valamint nyár végén mutatkoznak: gyakori a rövidhajtásokon található kezdetleges rügyek burjánzása és a virágnylás az idős fás részeken. A fertőzés a megbetegedett fa körül körkörösén terjed tovább, s ezt a fák ilyen irányú pusztulása is jól jelzi (Carraro *et al.*, 1998, Mergenthaler *et al.*, 2014).

A fitoplazma ősszel a kórokozó a gyökerekbe húzódik vissza és ott telel át. Tavasszal az új háncsszövetek képződésekor megindul a fitoplazmák felfelé terjedése. Ez viszonylag lassú folyamat (3-20 mm/nap), és a fa teljes kolonizációja nyár végére, ősz elejére következik be. Az eddigi ismeretek alapján az első tünetek új ültetvényekben általában a 3.-4. évtől figyelhetők meg (Marccone *et al.*, 2010).

A kórokozó természetes körülmények között kizárólag a *Prunus* nemzetség fajait fertőzi. Olyan

betegségek kiváltásában is szerepe van, mint a kajszi (*Prunus armeniaca* L.) klorotikus levélsodródása, a japánszilva (*P. salicina* Lindl.) leptonekrózisa, az őszibarack (*P. persica* (L.) Batsch), nemes szilva (*P. domestica* L.), mandula (*P. dulcis* (Mill.) D.A.Webb) és japáncseresznye (*P. serrulata* Lindl.) sárgulása és leromlása. A kórokozó a legsúlyosabb károkat kajszin, valamint japánszilván okozza, ahol a fertőzési arány akár a fogékony alanyok 50%-át is érintheti (Marcone *et al.*, 2010).

2.8.3.4. A kórokozó terjedése

Az '*Ca. P. prunorum*' terjedése alapvetően kétféle módon történhet, fertőzött szaporítóanyaggal, illetve rovarvektorok útján. A kórokozó vektora a szilvalevélbolha (*Cacopsylla pruni* Scopoli) (Carraro *et al.*, 1998; Jarausch *et al.*, 1999; Carraro *et al.*, 2001; Weintraub and Beanland, 2006; Fialová *et al.*, 2007). A rovar magyarországi elterjedésével kapcsolatban nincsenek pontos adatok, de a legtöbb kajszitermesztő körzetből már jelentették (Vas, Somogy, Pest, Borsod-Abaúj-Zemplén megyék). Begyűjtése azonban nehézkes, leginkább mirobalánon fordul elő, amit sok esetben használnak alanyként a kajszitermesztésben. A szilvalevélbolha túlevelű fajokon telet át imágó formájában. Az áttelelő nemzedék a tél folyamán is megőrzi fertőzőképességét, így a kora tavasszal visszatelepülő egyedek is képesek a fitoplazma átadására (Kiss *et al.*, 2015).

2.9. Védekezési lehetőségek a fitoplazmás betegségek ellen

Napjainkban még nem ismert olyan növényvédelmi megoldás, amellyel a már fitoplazmával fertőzött fák gyógyíthatók.

Az 1990-es évek elején antibiotikus kezelésekkel próbálták visszaszorítani a kórokozót. Tetraciklin származékokkal biztató kísérleti eredmények születtek, mind szabadföldön, mind *in vitro* körülmények között (Davies és Clark, 1994). A kezelés megszüntetésével azonban a fitoplazmák újra szaporodásnak indultak, ez a lehetőség tehát csak átmeneti megoldást nyújtott, gyakorlati alkalmazásra nem volt alkalmas. A tetraciklinek alkalmazását azonban betiltották a humángyógyászatban betöltött szerepük miatt. Kuroli 1970-ben és Douglas 1993-ban penicillinszármazékokkal kísérletezett, eredménytelenül.

A hőkezelést (30-37°C-os vízfürdős kezelés, több héten, hónapon át), mint a vegetatív részek fitoplazmáktól való mentesítésének lehetőségét a mai napig alkalmazzák szaporítóanyag-anyatelepeken (Salazar és Javasinghe, 2001). A kezeléssel kapcsolatosan felmerül a vegetatív növényi részek életképességbeli csökkenésének kockázata, ez az oka annak, hogy napjainkban kevés helyen alkalmazzák ezt a mentesítési eljárást.

Vírusmentesítési eljárások között elterjedt az *in vitro* hajtáscsúcstenyészetek létrehozása, és melegvízes, vagy kemoterápiás kezelése (Sanchez *et al.*, 1991; Faccioli, 2001; Faccioli és Colalongo, 2002), illetve az *in vitro* oltással (micrografting) való mentesítés is (Cupidi és Barba, 1993).

Fitoplazma mentes növényanyag előállítására rendelkezésünkre állnak olyan módszerek is, mint az *in vitro* hajtáscsúcstenyészet (Sears és Klomparens, 1989), kallusztenyészet (Möllers és Sarkar, 1989), és hajtástenyészet (Dai *et al.*, 1997). Az *in vitro* mentesítés hátránya a rendkívül hosszú és körülményes nevelési idő, valamint az egyéb kórokozókval való fertőződés veszélye.

Fitoplazma-mentesítésre szőlő esetében alkalmaznak meleg vízes kezelést (Bianco *et al.*, 2000), de a növény érzékenysége miatt az eljárás igen kockázatos. Chalak *et al.* (2005) különböző *in vitro* technikákkal (*in vitro* tenyészet szárból hőkezeléssel és anélkül, antibiotikumos kezeléssel különböző koncentrációban, hajtáscsúcstenyészet hőkezeléssel és anélkül, *in vitro* oltás) kísérleteztek mandulán '*Candidatus Phytoplasma phoenicium*' eliminálására. Arra a következtetésre jutottak, hogy a tenyészetekből nem volt kimutatható a fitoplazma, azonban kérdéses, hogy valóban mentessé váltak-e, vagy pedig fennáll a visszafertőződés kockázata. Ezeken túl a különböző technikák a növény fiziológiai állapotát is jelentősen rontották.

Megfigyelték, hogy a fitoplazmás megbetegedések sokkal gyakrabban fordulnak elő elhanyagolt veteményesekben és gyümölcsösökben, mint ápolt területeken, ültetvényekben. (Viczián *et al.*, 1998a). Ennek okai a kétéves és évelő rezervoár gyomok jelenléte, valamint a vektorok szabad jelenléte lehetnek (Viczián *et al.*, 1998b).

Megoldást nyújthat egyes fajok esetében rezisztens fajták nemesítése. Az almát fertőző '*Ca. P. mali*' visszaszorítása érdekében tett intézkedésekkel kapcsolatban Bisognin és munkatársai (2008) a legígéretesebbnek a rezisztens almaalanyok használatát vélik, ami a fitoplazma kolonizációjának évszakonkénti változása következtében (télen kizárólag a gyökérben található meg a kórokozó) megelőzheti a betegség kialakulását.

A fent említett kezelések azonban csak átmeneti megoldást nyújtanak, iparszerű, gyakorlati alkalmazásra nem alkalmasak. Ezért a hangsúlyt a megelőzésre és a terjedés megakadályozására kell fektetni, valamint különös figyelemmel kell alkalmazni az integrált növényvédelmi eljárásokat, továbbá engedhetetlen az ellenőrzött, egészséges szaporítóanyag használata (Viczián *et al.*, 1998b; Süle, 2012b, 2014; Kiss *et al.*, 2014).

2.9.1. Fitoplazma-fertőzött fák tünetmentes kigyógyulása (recovery)

Bizonyos gyümölcsfák esetében megfigyeltek olyan eseteket, melynek során egyes, természetes úton fitoplazmával fertőződött fák, amelyek erős, jellegzetes tüneteket mutattak, a megfigyelést

követő években nem mutatták a jellegzetes tüneteket. Alma, és szőlő esetében is előfordult ilyen típusú spontán “kigyógyulás”, amely a tünetek megszűnésében mutatkozik meg. Ennek oka pedig az lehet, hogy az adott növény föld feletti részéből eltűnik a kórokozó (Carraro *et al.*, 2004). Musetti és munkatársai (2004, 2005) mind alma, mind szőlő és kajszi esetében kimutatták, hogy a fitoplazmák által okozott tünetekből való kigyógyulás a floém szövetekben lokalizált hidrogén-peroxid felhalmozódásával hozható összefüggésbe. Musetti és munkatársai (2007) arra is rámutatott, hogy a kigyógyult szőlőben kialakuló hosszútávú, szövetspecifikus hidrogén-peroxid felhalmozódás nem csupán a kórokozó mennyiségét csökkentheti, hanem a további fertőzéseket is megelőzheti. A szőlőlevél plazmolemmában megnövekedett mennyiségű hidrogén-peroxid mellett alacsony kataláz és aszkorbát-peroxidáz szintet mértek az egészséges, illetve a beteg növényhez képest. A kigyógyulás mechanizmusa molekuláris és biokémiai szinten még nem tisztázott (Marccone *et al.*, 2010).

2.9.2. A keresztvédettség, mint lehetséges védekezési eljárás

Bizonyos fitoplazma fertőzések esetében megfigyelték, hogy a megfertőződést követő első évek után a jelentkező tünetek intenzitása csökken, akár teljesen meg is szűnhetnek rövidebb-hosszabb időre. Ezt követően ismét visszatérhetnek súlyos tünetek formájában (Seemüller *et al.*, 1984; Carraro *et al.*, 2004). Ez a jelenség főként a 'Ca. P. mali' fertőzésekor tapasztalható, amellyel kapcsolatban kimutatták, hogy eltérő virulenciával rendelkező törzsek együttesen is jelen lehetnek a növényben, ezzel okozva a bekövetkező ingadozást a tünetek megjelenésében (Seemüller *et al.*, 2010). A különböző törzsek között fellépő antagonizmusnak köszönhetően elképzelhető, hogy az eredetileg virulens törzs kismértékben, vagy teljesen visszaszorul (Seemüller *et al.*, 1984; Seemüller *et al.*, 2011).

A vírusok között jelentkező keresztvédettség jelenségével számos korábbi leírásban is találkozhatunk (Kunkel, 1955; Valenta, 1959a, b; Morvan és Castelain 1982; Castelain *et al.*, 1997), de fitoplazmák -amelyeket akkor még vírusoknak véltek- között fellépő antagonista hatással kapcsolatban is találhatók feljegyzések már a múlt század közepe óta. Valenta (1959a) AY törzsek között fellépő antagonista határról írt. Kunkel (1955) és Freitag (1964) a megjelenő tünetek alapján feltételezett kölcsönös gátló hatást 'Ca. P. asteris rokon törzsei között. Keresztfertőzéses kísérletükben az elsőnek oltott fitoplazma általában gátolta a kihívó szaporodását, amelyet 1-2 héttel később oltottak rá. Morvan és Castelain (1982) fogalmazták meg először a keresztvédettség definícióját fitoplazmákra nézve, mely szerint egy avirulens, vagy gyenge törzzsel való előfertőzés (immunizálás) gátolhatja egy, általában közeli rokonságban álló virulens törzs által okozott tünetek kifejlődését. Castelain és munkatársai (1997) az ESFY-vel szembeni keresztvédettség lehetőségeit

vizsgálva úgy találták, hogy az "immunizáló faktor" hosszú éveken át stabil marad, és könnyen átvihető egy másik kajszi szövetébe oltással, ahol szintén működőképesé válik.

Megfigyelték, hogy azok a növények, amelyek egyféle vírust már tartalmaznak, általában védekezést mutatnak más, közeli rokonságban álló vírussal szemben, távoli rokonságban álló vírussal szemben azonban nem védettek. Azonban ez a védekezés változékonyságot mutathat közeli rokonsági kapcsolatban álló vírusok között. Kunkel (1955) kísérletei alapján két amerikai AY törzs gátló hatással lehet egymásra a kísérleti növényekben. Megfigyelték, hogy a gátló hatás egymással szemben nem csupán növényekben, hanem a rovarvektorban is érvényesül (Maramorosch, 1958). Kunkel (1955) felvetése szerint a keresztvédekezés mechanizmusa a rokon törzsek azonos táplálékigényén alapul, mely szerint az elsőként jelen levő fitoplazma elfogyasztja a következő elől az annak szaporodásához és fennmaradásához szükséges tápanyagot. Ez a gondolat azt feltételezi, hogy a távoli rokonságban álló törzsek más tápanyagot igényelnek a szaporodáshoz. Nem tisztázott, hogy a növény honnan szerzi az immunitást: a kórokozó általi korábbi fertőzésből, vagy a jelenlegi, ill. korábbi fertőzésből, amit egy, a kórokozó közeli rokona okozott. Ennek értelmében a keresztvédekezés megléte függ a fertőzött növény új fertőzésre adott reakciójától. A szerző tapasztalatai alapján egy bizonyos vírus által fertőzött növény általánosan védett a kórokozó közeli rokonával szemben, de a távolabbi rokonával szemben nem.

A keresztvédekezési reakció helyi, vagy részleges, illetve teljes formában jelentkezhet. A reakció a fertőzéssel szemben a védekezést és a fertőzés utáni elterjedés elleni védelmet foglalja magába specifikus és hatékony módon. Bizonyos kísérletek reménykeltő eredményeket adtak, mivel az immunizált növényeken a fertőzést követően csak legfeljebb enyhe tünetek jelentek meg, míg a védetlen, nem immunizált növények elpusztultak (Castelain *et al.*, 1997; Marcone *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2014). A molekuláris módszerek térnyerésével lehetővé vált a fitoplazmák növényen belüli előfordulásának pontos kimutatása, ezáltal a gátló hatás nyomon követése. Annak ellenére, hogy a keresztvédekezés jelensége régóta ismert, a mai napig nem született helytálló elmélet a mechanizmust illetően.

Schneider és munkatársai (2014) molekuláris módszerekkel igazolták, hogy a '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens törzssel indukált keresztvédekezés során nem csupán a tünetek kifejeződése gátlódik, hanem a virulens törzs mennyisége is a kimutathatósági szint alá csökken. Seemüller és Schneider (2007) a '*Ca. P. mali*' számos törzsének osztályozását végezte el azok fertőzőképessége alapján, és további vizsgálatok során igazolták, hogy közülük néhány nem csupán avirulens, hanem antagonistá hatással is bírhat. Schneider és munkatársai (2014) többéves szabadföldi és laboratóriumi kísérlet során igazolták, hogy a '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens törzse előfertőzés esetén képes teljesen visszaszorítani a rokon '*Ca. P. mali*' AT virulens törzset kísérleti körülmények között. A szerzők a '*Ca. P. mali*' 1/93 törzset vizsgálva azt figyelték meg, hogy mind AT, mint ESFY, mint PD törzsek

ellen a gátló hatás abban az esetben a leghatékonyabb, ha a növényt immunizáljuk az avirulens törzssel. Kísérleti tapasztalatok alapján kiderült, hogy az antagonista törzs alacsony mennyiségben való jelenléte nem elegendő ahhoz, hogy a virulens törzset visszaszorítsa.

ESFY fertőzött ültetvényekben Franciaországban és Olaszországban olyan hipovirulens, oltással átvihető törzseket találtak, amelyek immunizáló hatással rendelkeztek (Morvan *et al.*, 1986, 1991; Cornaggia *et al.*, 1995; Ermacora *et al.*, 2010). A '*Ca. P. prunorum*' izolátumok virulenciabeli eltérései is megemlítésre kerültek (Cornaggia *et al.*, 1995; Kison és Seemüller, 2001). Ermacora és munkatársai (2010) '*Ca. P. prunorum*' hipovirulens törzsek azonosítását végezték el szabadföldi kajszai ültetvényekben, ahol hipovirulens törzsek keresztvédettségre való felhasználhatóságát tesztelték. Igazolták, hogy az aszimptomatikus jelenség gazdanövényhez kötött. Összefüggés van az enyhén virulens törzsek alacsony koncentrációban lévő jelenléte és a tünetmentesség között kigyógyult fában (hipovirulens törzsek), valamint megfigyelték a súlyos tüneteket indukáló törzsek nagy koncentrációban való jelenlétét tünetmentes, de fertőzött fában (hipervirulens törzsek) (Ermacora *et al.*, 2010).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgálatok helye

A kísérletek egy részét Budapesten, a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézetében állítottuk be és végeztük el, míg számos vizsgálat helyszíne a németországi Julius Kühn Institut volt, Dossenheimben. Az almával kapcsolatos kísérletek növényi anyaga a dossenheimi kutatóintézet kísérleti ültetvényében állt rendelkezésünkre.

3.2. Felhasznált anyagok

3.2.1. Fitoplazmacsoportok és törzsek

A kísérletekhez szükséges fitoplazmacsoportokat és törzseket Dr. Erich Seemüller (Julius Kühn Institut, Dossenheim, Németország) biztosította számunkra. A fitoplazma törzseket *Catharanthus roseus* L. (rózsameténg) és *Nicotiana occidentalis* H.-M. Wheeler (közönséges dohány) tesztnövényeken tartottuk fenn; egy részüket a Növényvédelmi Intézet üvegházában, Budapesten, a többi a dossenheimi kutatóintézet klimatizált üvegházában, Németországban.

A kísérletekben alkalmazott törzsek (1. táblázat) közül az 1/93-as törzs avirulens, az AT, GSFY, PD1, STOL, AAY1 törzsek pedig virulensek.

1. táblázat. A kísérletek során használt fitoplazma törzsek és rendszertani besorolásuk

Izolátum	Betegség	Kórokozó	Taxonómiai csoport*
1/93	Alma seprűsödés (apple proliferation, AP)	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali'	16SrX
AT	Alma seprűsödés (apple proliferation, AP)	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali'	16SrX
GSFY	Csonthéjasok európai sárgulása (European stone fruit yellows, ESFY)	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum'	16SrX
PD1	Körte leromlás (Pear Decline, PD)	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri'	16SrX
STOL	Sztołbur (Stolbur, STOL)	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma solani'	16SrXII
AAY1	Őszirózsa sárgulása (Aster Yellows, AY)	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris'	16SrI

*Seemüller csoportosítása alapján (1998)

3.2.2. Növényi minták

A keresztvédelemmel kapcsolatos üvegházi kísérleteket rózsameténg (*C. roseus*) és dohány (*N.*

occidentalis) teszt növényeken hajtottuk végre. Az almán (*Malus domestica* Borkh. 'Golden Delicious') végzett kísérletekhez a fertőzött növényeket polikarbonát házban, illetve a dossenheimi kutatóintézet szabadföldi kísérleti ültetvényében neveltük.

3.3. A fitoplazmák fenntartása, a fertőzés menete

3.3.1. A fitoplazma törzsek fenntartása üvegházi körülmények között és a rózsameténg fertőzése

A kórokozót üvegházban rózsameténg és dohány teszt növényeken tartottuk fenn. A teszt növények fertőzött hajtásait az állomány frissítése és megőrzése céljából 6-8 havonta egészséges növényre oltottuk át. Hagyományos ékoltást alkalmaztunk, melynek során a fertőzött növényről leválasztott 6-7 cm-es, kevés leveles, ék alakban vágott hajtáscsúcsot helyeztük az egészséges növényen ejtett „V” alakú bemetszésbe. Az oltás helyét univerzális lezáró fóliával rögzítettük, majd a vágási felületek összeforradásáig, két hétig, párás környezetet biztosítottunk a növény számára. A növények az akklimatizációt követően kerültek végleges helyükre az üvegházban.

A fertőzött almafákról a kórokozót aranka (*Cuscuta* spp.) segítségével vittük át rózsameténg (*C. roseus*), valamint dohány (*N. occidentalis*) teszt növényekre, amelyeket klimatizált üvegházakban tartottunk fenn. Az aranka hajtásait elsőként a fertőzött növényre tekertük, majd két hónap elteltével az új hajtásokat az egészséges teszt növényre vezettük át.

3.3.2. Fitoplazmák *in vitro* fenntartása

A fitoplazma törzsek fenntartását rózsameténgben és almában *in vitro* körülmények között is folytattuk az állomány fertőzésmentesen tartása céljából. Ehhez a különböző fitoplazma törzsekkel fertőzött, illetve egészséges növények hajtáscsúcsi részéről körülbelül 4 cm-es, levéltelen, de rüggyel rendelkező darabokat választottunk le, majd 70%-os etanolba mártottuk, végül desztillált vízzel leöblítettük. Ezután 50-szeres hígítású Clorox oldatban fertőtlenítettük 10-15 perces lassú rázatással. Ezt követően a mintákat 4-5 alkalommal 1-1 percig mostuk steril desztillált vízzel. A növénydarabokat steril szűrőpapíron leszárítottuk, majd hormontartalmú táptalajba állítottuk. A tenyészeteket steril körülmények között fényszobában tartottuk 12 órás fotoperiódussal, éjjel 25°C, nappal 28°C mellett. A tenyészeteket 10-15 naponta friss táptalajra helyeztük. A gyökeresedésig indol-vajsavat is adtunk a táptalajhoz, a gyökeresedést követően ezt elhagytuk, és a citokinin mennyiségét növeltük a hajtásfejlődés elősegítésére.

Az *in vitro* nevelt növények fenntartásához használt táptalaj összetétele:

Plant agar	500 mg
MS táptalaj*	490 mg

NZ amin**	100 mg
szacharóz	3000 mg
desztillált víz	100 ml

*Murashige és Skoog, 1962

**Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA

A sterilizált táptalajhoz gyökeresítés esetén 38 mg/ml indol-vajsavat, hajtásképzés esetén 3 mg/ml kinetint adtunk. A táptalaj pH-ját 5,7-re állítottuk be.

3.4. A fitoplazma törzsek virulenciájával, és kölcsönhatásaikkal kapcsolatos kísérletek

3.4.1. Rózsameténg tesztnövények hajtásvastagságában bekövetkező eltérések értékelése különböző fitoplazma törzsekkel való fertőzés hatására

Körülbelül fél éves, dugványról szaporított rózsameténg növényekre külön-külön oltottunk 1/93 (1/93fi, 1/93id), AT („at”), PD1 („pd”), AAY1 („aay”), STOL („stol”) törzseket (1. táblázat). Két havi rendszerességgel mértük növényenként 10-10 tünetes hajtás átmérőjét a hajtáscsúcshoz közel, valamint vizuális úton megállapítottuk a tünetek intenzitásának mértékét a fertőzést követő 6. hónaptól kezdve, egy 1/93-as (1/93id) törzsszel kezelt növényt pedig a fertőzést követő 12. hónaptól kezdve mértünk. A mért adatok kiértékeléséhez PASW statisztikai programcsomagot (Allen és Bennett, 2010). használtuk, az összehasonlítást egytényezős véletlen varianciaanalízissel végeztük el. A szórások egyezőségét Levene's tesztel néztük meg, az átlagok páronkénti összehasonlítását Post Hoc tesztben Tukey-próbával végeztük el.

3.4.2. A kevert fertőzésben szerepet játszó fitoplazmák molekuláris jellemzése

'*Ca. P. mali*'-val természetesen fertőződött, 10 évnél idősebb almafákról származó hajtásokkal oltottunk egészséges almafákat, amelyeket azután több éven át figyelemmel kísértünk. A mesterségesen megfertőzött almafákat szabadföldi kísérleti telepen, továbbá fűtetlen üvegházban tartottuk fenn a dossenheimi kutatóintézet területén. Jelen kísérletben a '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens és 17/93 enyhén virulens törzsekkel fertőzött fákat vizsgáltuk.

3.4.2.1. DNS kivonás

DNS izoláláshoz és a további molekuláris vizsgálatok elvégzéséhez körülbelül 0,5 g növényi mintát

használtunk fel. A rózsameténg levelének főerét, gyökerét, a dohány levelének főerét, illetve a szárának háncsszövetét, míg az almafa gyökerének, illetve az adott évi, ceruzavastagságú hajtásának háncsszöveti részét, esetenként a levélgyeget dolgoztuk fel.

DNS izolálásához a "Doyle and Doyle"-féle (Doyle és Doyle, 1990) tisztítási módszert alkalmaztuk.

"Doyle and Doyle" kivonóoldat:

- 12,5 g CTAB (cetil-trimetil-ammónium-bromid)
- 140 ml 5 M NaCl (40,98 g)
- 20 ml 0,5 M EDTA (3,72 g)
- 50 ml 1 M TRIS (tris-hidroximetil-aminometán) (pH 8) (6,05 g)
- 5 g PVP-40 (polivinil-polipirrolidon)

Desztillált vízzel 500 ml-re kiegészítettük, a pH-t 8,0-ra állítottuk be. Közvetlenül felhasználás előtt az oldathoz β -merkaptó-etanolt (1 ml/500 ml) vagy nátrium-biszulfitot (10 mg/ml) adtunk.

"Low TE" oldat:

- 10 mM Tris-HCl
- 0,1 mM EDTA

pH 8,0

A DNS kivonás menete:

- A növény feldolgozandó részéből 0,5 g-ot dörzsmozsárba tettünk. Ehhez 1 ml, 60°C-os vízfürdőben felmelegített kivonó oldatot adtunk, majd eldörzsöltük.
- A homogenizátumokat 2 ml-es Eppendorf csőbe áttöltöttük, majd 30 percen keresztül 60°C-os vízfürdőben inkubáltuk.
- A törmeléket 5 percen át 12000 rpm-mes centrifugálással ülepitettük, majd a felülúszót tiszta Eppendorf csövekbe töltöttük át.
- 1:1 arányban kloroform-izoamil alkohol (24:1) keverékét adtunk hozzá, és az elegyet összeforgattuk, majd 5 percen át 8000 rpm-en ülepitettük.
- A felső fázist óvatosan tiszta Eppendorf csőbe pipettáztuk. A DNS-t 2:3 arányú izopropanollal kicsaptuk. Alapos összerázást követően 5 percen keresztül 12000 rpm-en, 4°C-on centrifugálással ülepitettük.
- A pelletként kicsapódott DNS-t megtartottuk, a felülúszót leöntöttük. Az üledéket kb. 200 μ l

70%-os etanollal mostuk, és 5 percig 12000 rpm-en 4°C-on centrifugáltuk.

- A felesleges etanolt leöntöttük, a pelletet beszárítottuk, majd 50 µl steril desztillált vízben, vagy 50 µl „Low TE” oldatban visszaoldottuk.
- A DNS oldatot -20°C-on tároltuk.

3.4.2.2. Az izolált fitoplazma törzsek egyes génszakaszainak felszaporítása polimeráz lánreakcióval (PCR, Polimerase Chain Reaction)

Kevert fertőzés vizsgálatánál a *hflB* gén 528 bp hosszúságú ATP00464-es szakaszát az AP specifikus fhflB3_1/rHflB_3 (Jarausch *et al.*, 1994) indítószekvencia-párokkal, míg az *imp* gén egy szakaszát a szintén AP specifikus f318B_seq/r318B_seq (Kube *et al.*, 2008) párok alkalmazásával szaporítottuk fel (2. táblázat).

2. táblázat: A fitoplazma törzsek PCR-es kimutatása során alkalmazott indítószekvenciák

Indítószekvencia neve és iránya	Cél DNS	Szekvencia (5' → 3')	Reakció paraméterek
fhflB3_1	<i>hflB</i> gén	TTCTAGCTATTCATCGTGAA	denaturáció: 95°C-3 min felszaporítás (35 ciklus): 95°C-1 min, 48°C-1 min, 66°C-1 min befejezés: 66°C-5 min
rhflB3	<i>hflB</i> gén	CGGCGCGATTAGTAGCTCC	
f318B_seq	<i>imp</i> gén	GGACTTATGGAACGAAATCAACAAA	denaturáció: 95°C-3 min felszaporítás (35 ciklus): 95°C-1 min, 52°C-1 min, 66°C-1 min befejezés: 66°C-5 min
r318B_seq	<i>imp</i> gén	AAGCTTTTATTTCAAATCTAAAGCAG	

A polimeráz lánreakció mintánként 25 µl reakcióelegyben zajlott. Az elegy a következőket tartalmazta: 10x Puffer (Fermentas), dNTP-k (10 µM egyenként), 5-5 pmol mindkét indítószekvenciából, desztillált víz, 0,6 U Taq Polimeráz enzim (Fermentas, Invitrogen). A reakció körülményeit a 2. táblázat tartalmazza. A negatív kontroll templatjaként steril desztillált vizet használtunk. Az elegyhez 1 µl-t adtunk a minta DNS-ből templatként. A PCR reakciókhoz

Németországban Stratagene Robocycler 40 PCR Machine készüléket, Magyarországon MJ Research PCT-200 Thermal Cycler készüléket használtunk. A reakció kiértékeléséhez a PCR termékeket GelRed-et tartalmazó 1%-os agaróz gélben futtattuk meg, 25 percen keresztül 100V-os feszültség mellett, majd a mintázatot UV fényben tettük láthatóvá.

3.4.2.3. Egyszálú konformációs polimorfizmus vizsgálat (SSCP, Single Strand Conformation Polimorphism)

A minták előkészítése és futtatása poliakrilamid gélben

Egy mintán belüli több fitoplazma törzs variabilitását egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP) elemzéssel vizsgáltuk, amely alkalmas két törzs nukleotid sorrendjében megtalálható kis különbségek detektálására is. Az előzőekben elvégzett PCR során kapott amplifikációs termékekből 5 µl-t használtunk fel, melyhez 15 µl denaturációs puffert kevertünk, 10 percen keresztül 95°C-on inkubáltuk, majd jégen hirtelen lehűtöttük. A denaturált termékből a DNS koncentrációtól függően mintánként 3-8 µl-t vittünk fel a 10%-os poliakrilamid gél zsebeibe. Az elválasztás gél-elektroforézissel, 1 x TBE pufferben zajlott 4°C-on állandó 200 V-os feszültség mellett, körülbelül 6 órán keresztül. A keletkezett mintázatot ezüsfestési eljárással tettük láthatóvá (Igloi, 1983).

Denaturáláshoz használt SSCP puffer összetétel (50 ml): 48 ml formamide (99%)
2 ml Na₂EDTA (0,5 M)
0,025 g xylene cyanole
0,025 g brómfenolkék

10%-os poliakrilamid gél összetétele (20 ml, 4 gélhez): 5,0 ml akrilamid metilén-bisz-akrilamid (40%) (29:1 oldat)
13 ml desztillált víz
2,0 ml 10x TBE
150 µl ammónium-perszulfát (10%)
25 µl TEMED
50 µl brómfenolkék

10x TBE puffer (1 l): 108 g TrisHCl
55 g H₃BO₃
40 ml Na₂EDTA (0,5 M)

Az ezüstfestés menete (Lee *et al.*, 2006):

- Az elválasztás befejeztével szétszereltük a futtatótálcát, majd a gélről óvatosan leválasztottuk az első, majd a hátsó üveglapot. A gélt az egyik sarkában megjelöltük, majd egy tálcába helyeztük.
- 100 ml 10%-os ecetsav hozzáadásával folyamatos enyhe rázatással 20 percig denaturáltuk.
- Ezt követően a gélt háromszor öblítettük át alaposan desztillált vízzel. A vizet minden öblítés után óvatosan leöntöttük.
- Ezután enyhe rázatás közben a gélt 3 percen keresztül 100 ml 1%-os salétromsavban áztattuk.
- A gélt ismét háromszor öblítettük át desztillált vízzel. Az öblítéseket követően a vizet óvatosan leöntöttük.
- A gélt enyhe mozgítás közben 30 percen keresztül 100 ml ezüstnitrát oldatban inkubáltuk.
- 30 perc elteltével a gélt alaposan átöblítettük.
- A gélre 100 ml nátriumkarbonát oldatot öntöttünk, és figyeltük a mintázat megjelenését.
- A mintázat megjelenését követően a reakciót 100 ml 5%-os ecetsav hozzáadásával leállítottuk.

Ezüstnitrát oldat: 100 mg ezüstnitrát (AgNO_3)

150 μl formaldehid (37%)

100 ml desztillált víz

Nátriumkarbonát oldat: 3 g nátriumkarbonát (Na_2CO_3)

150 μl formaldehid (37%)

4 μl nátrium-tioszulfát ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (200 mg/ml)

100 ml desztillált víz

3.4.2.4. Az 1/93 izolátum törzseinek elkülönítése valósídejű PCR-rel

A kevert fitoplazma fertőzés kimutatása multiplex valósídejű láncreakció során történt Bio-Rad iCyclers IQ gépben. A templát amplifikációjához az fhf1B-RT/rhf1B-RT1 (Schneider és Seemüller, 2009) indítószekvencia-párt használtuk (3. táblázat). Az 1/93-as izolátum két törzsének elkülönítésére specifikusan tervezett Cy5-jelölt, valamint FAM-jelölt TaqMan próbákat alkalmaztunk. A rózsameténgyet kolonizáló törzset Cy5-jelölt (5'-CTAGGTGGTAAAAGAGGTGGT-3'), a dohányt fertőző törzset FAM-jelölt (5'-

TTAGGTGGTCGAAGAGGAGGA-3') próbával detektáltuk (Seemüller *et al.*, 2010). A PCR reakcióelegy a következőket tartalmazta 50µl-es végtérfogatban: 2,5 U Taq polimeráz enzim (Amplicon), 1x puffer 3 mM MgCl₂-vel (Amplicon), 0,2 mM dNTP-k, 0,4 µM mindkét indítószekvenciából, 0,2 µM mindkét próbából, 1 µl DNS templát.

A valósídejű PCR során a mintáinkat ismétlésekkel végeztük. A kiértékelésnél azt a Ct értéket vettük figyelembe, amelynél az egyes minták először adtak mérhető fluoreszcens szignált.

3. táblázat: Fitoplazma törzsek valósídejű PCR-rel történő elkülönítésére alkalmazott indítószekvenciák

Indítószekvencia neve és iránya	Cél DNS	Szekvencia (5' → 3')	Reakció paraméterek
fhflB-RT	<i>hflB</i> gén	AAATTAAATGCTCCTTGTGTGTT	denaturáció: 95°C-5 min felszaporítás (40 ciklus): 95°C-30 sec, 55°C-30 sec
fhflB-RT-1	<i>hflB</i> gén	ATCACAATAATACCTTGAGATGG	

3.4.2.5. Klónozás, SSCP, szekvenálás

Kevert fertőzés vizsgálatánál azon mintákat, amelyek egyrészt komplex SSCP profilt mutattak, másrészt valósídejű PCR során is igazolódott több törzs együttes jelenléte, további molekuláris elemzéseknek vetettük alá.

A kiválasztott minták megfelelő DNS szakaszának felszaporítását követően a felszaporított *hflB* és *imp* gén fragmentumokat pGEM-T Easy vektorba (Promega, Madison, WI) ligáltuk, majd ezt a konstrukciót használtuk fel *Escherichia coli* XL1 Blue kompetens sejtek (Stratagene, La Jolla, CA) transzformálásához. Kolónia PCR során az fhflB3_1/rHflB3, illetve a f318B_seq/r318B_seq indítószekvencia-párok felhasználásával szaporítottuk fel az inszertet tartalmazó rekombináns plazmidokat a korábban alkalmazott paraméterek mellett. A kapott PCR termékből 7-15 darabot ismét SSCP analízisnek vetettük alá. Az SSCP mintázatok alapján kiválasztott klónokat LB táptalajon felszaporítottuk. A rekombináns plazmid DNS-t Plasmid Miniprep KIT (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével tisztítottuk ki a gyártó által megadott protokoll alapján. A klónozott inszertek M13 klónozó primer segítségével kerültek szekvenálásra Göttingenben, Németországban. A PCR termékek szekvenálásához az fhflB3_1/rHflB3, illetve a f318B_seq/r318B_seq indítószekvenciákat használtuk.

Ligálás, klónozás, transzformálás

Ligálási reakció: 5 µl 2x Rapid Ligation Buffer

0,5 µl pGEM-T Easy Vector

3,5 µl PCR termék

1 µl T4DNA Ligase

10 µl

- A ligáláshoz az elegyet a gyártó (Promega) utasításait követve összemértük, hozzáadtuk a PCR terméket, majd egy órán át szobahőmérsékleten tartottuk. Ezután az elegyet egy éjszakán át +4°C-on ligáltuk.
- A következő napon a ligátumokból 10 µl-nyi mennyiséget steril szűrőpapírra cseppentve háromnegyed órán át hűtőszekrényben sótalanítottuk.
- Transzformáláshoz a -80°C-on tárolt kompetens sejteket (XL-Blue) jégen kiolvasztottuk, majd hozzáadtuk a sótalanított ligátumhoz. A sejteket 2,5 kV-n transzformáltuk. Az elektroporációt követően az elegyhez 500 µl SOC folyékony táptalajt adtunk, szuszpenzáltuk, és 15 ml-es műanyag csőbe töltöttük át. Vízszintes rázatással 37°C-on egy órán keresztül szaporítottuk a sejteket.
- Az elegyből 5 µl, 20 µl, valamint 100 µl-nyi mennyiséget kentünk ki ampicillint (250 µl/500 ml), IPTG-t (80 µl/500 ml) és X-Gal-t (750 µl/500 ml) tartalmazó LB táptalajra, majd egy éjszakán át 37°C-on sötétben inkubáltuk.
- A másnapra kifejlődött kék, illetve fehér színű kolóniák közül a fehérek közül mintánként 10-15 darabot választottunk ki, melyekből egy pipettahegynyi mennyiséget PCR során felszaporítottunk. A PCR körülményei az eredeti PCR-rel megegyeztek. Az így felszaporított klónokat 1%-os agaróz gélben történő futtatással ellenőriztük.
- A pozitív eredményt adó PCR termékek közül kiválasztottunk 7-15 darabot, és ezeket SSCP analízisnek vetettük alá. Az egyes mintákon belül az SSCP gében eltérő mintázatot mutató klónokból 1-1 darabot felszaporítottunk. A felszaporításhoz 30 ml folyékony LB táptalajba tettünk 15 µl ampicillint, majd ennek 3-3 ml-éhez adtunk egy pipettahegynyi mennyiséget a kiválasztott kolóniákból. 16 órás, 37°C-on történő intenzív (200 rpm) rázatást követően a plazmidokat Plasmid Miniprep KIT (Qiagen) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően, majd szekvenáltattuk.

LB- táptalaj: 10 g Bacto-tryptone

5 g élesztőkivonat

5 g NaCl

1000 ml desztillált víz

pH 7,0 beállítása után 15 g agartadtunk hozzá (folyékony LB esetében nem). Ezt követően autoklávoztuk.

SOC táptalaj: 20 g bakto-tripton

5 g élesztő kivonat

0,5 g NaCl

10 ml 250 mM KCl

1000 ml desztillált vízben, ,

pH 7,0 beállítását követően autoklávoztuk, majd 20 mM steril glükóz oldatotadtunk hozzá.

PCR termék tisztítása

A rekombináns plazmid DNS-t plazmid miniprep kit segítségével kitisztítottuk (Qiagen, Hilden, Németország) a gyártó utasításainak megfelelően.

Szekvenálás, szekvencia analízis

A minták szekvenálása az M13 indítószekvencia alkalmazásával történt. A kapott szekvenciák egymáshoz és a referencia adatbázisban található szekvenciákhoz való igazítását Clustal X2 (Thompson *et al.*, 1994) program segítségével végeztük el. A filogenetikai összehasonlítást és törzsfán való ábrázolását a MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) szoftver segítségével hajtottuk végre, neighbor-joining paraméterekkel, valamint bootstrap tesztek alkalmazásával. Az elágazások távolságát az „average pathway method” segítségével ábrázoltuk.

3.4.3. Tesztnövények keresztfertőzése, immunizálása az 1/93 avirulens törzssel

Keresztfertőzés vizsgálatához dugványról szaporított, körülbelül 8 hónapos rózsameténg növényeket használtunk fel, melyeket üvegházban tartottunk fenn. Minden növényt 2-3, egymástól nagyjából azonos távolságra lévő helyen oltottunk az avirulens 1/93 törzset tartalmazó hajtással, majd szintén 3, egymástól azonos távolságra lévő hajtásra oltottunk virulens törzssel (AT, GSFY, PD1, STOL, AAY) fertőzött hajtásokat. Az AT törzssel végzett kísérleteket párhuzamosan 3 különböző beállításban végeztük, míg a többi esetben egy kísérletet folytattunk.

Az AT törzssel folytatott kísérletek "A" beállításában az avirulens (immunizáló) törzssel való oltást követően 2,5, a „B” beállításban 3 hónap múlva fertőztünk a virulens (kihívó) törzssel (előfertőzés). Vizsgáltuk az egyidejűleg történt fertőzések hatását is (egyidejű fertőzés). A 3. kísérleti beállításban ("C") a két fertőzés között 4 hónap telt el. Minden kísérletben 3-3 kontroll növényt alkalmaztunk, amelyeket külön-külön fertőztünk az adott kísérletben érintett törzsekkel. Ezen kívül kísérletenként 3-3 fertőzetlen kontroll növényt is fenntartottunk. Mindhárom kísérleti beállításban az utolsó fertőzést követően meghatározott időközönként történt a mintavétel mintegy 3 éven át. A mintákat az oltás helyéhez képest meghatározott helyekről választottuk (oltott hajtásról, az oltási pont alatti elágazásról, illetve az oltás helyétől távol eső hajtásról), a "B" kísérletben a mintavételt az oltás helyéhez képest véletlenszerűen végeztük. Egyes esetekben a gyökerekből is történt mintavétel. Minden egyes mintavételi időpontban gyűjtöttünk mintát a kontroll növényekről is. A növényeken ez idő alatt a jellegzetes tünetek kialakulását is figyelemmel kísértük, valamint molekuláris módszerekkel ellenőriztük a fitoplazmák jelenlétét.

GSFY, PD1, STOL és AAY1 törzsekkel történt felülfertőzés esetében egyszeresen fertőzött növényeket használtunk pozitív kontrollként. A fenntartás körülményei megegyeztek a korábban részletezett móddal. Az 1/93 és GSFY törzsekkel keresztfertőzést a hazai laboratóriumban 8, a németországi laboratóriumban 6 biológiai ismétléssel végeztünk, az oltások között 3 hónap telt el. Az ESFY-vel felülfertőzött hazai mintáink értékelését havonta végeztük a fertőzés nyomon követése céljából. A Németországban fenntartott növényekről a fertőzést követő 5. és 8. hónapban vettünk mintát. A többi törzssel való kísérletek során 3 alkalommal végeztünk mintavételt rendszeres időközönként a kihívó törzssel való fertőzéstől számított 3. hónaptól. A mintavétel a hajtás csúcsi részéből, az oltás helyéhez közelről történt. A '*Ca. P. mali*' 1/93 és '*Ca. P. pyri*' PD1 törzsekkel történő fertőzést 6 biológiai ismétlésben végeztük. A kezelések során a rózsameténg teszt növényeket először az 1/93-as avirulens törzssel oltottuk, majd minden esetben 5 hónappal később történt meg a felülfertőzés a PD1 virulens törzssel. Pozitív kontrollként az immunizáló (1/93) és a kihívó (PD1) törzsekkel külön-külön oltott 2-2 rózsameténget használtunk. A mintavétel 2 időpontban, 4, illetve 7 hónappal a kihívó törzssel való fertőzést követően történt, véletlenszerű helyekről. A fitoplazma fertőzöttséget molekuláris módszerekkel értékeltük.

A keresztvédettséget dohány (*N. occidentalis*) teszt növényben is vizsgáltuk rózsameténgről átvitt '*Ca. P. mali*' 1/93-as avirulens törzssel. Magról nevelt, 8 hetes növényeket immunizáltunk az 1/93-as törzssel, majd 3, illetve 6 hét elteltével oltottuk a növények másodlagos hajtásaira a kihívó, virulens '*Ca. P. mali*' AT törzset. Vizsgálatainkat két ismétlésben végeztük ugyanolyan beállítások mellett. Havonta, összesen 3 alkalommal vettünk mintát a kihívó fertőzést követő 4-6. héttől kezdve. Növényenként 3-3 mintát vettünk, amelyeket az oltási helyektől egyenlő távolságból, az AT törzssel

fertőzött hajtásról, illetve az AT-oltás alól gyűjtöttünk. Az utolsó mintavételi időpontban gyökérmintákat is vizsgáltunk.

A fitoplazma átvitelét rózsameténg és dohány között aranka (*Cuscuta campestris* Yuncker) faj segítségével hajtottuk végre. Ebben az esetben a fertőzött növényre futtatott arankát egészséges növény köré tekertük, majd 6 hónap elteltével elválasztottuk a növényeket. A fitoplazma átjutásának sikerességét PCR vizsgálattal ellenőriztük. A továbbiakban a fitoplazmák azonos növényfajok közötti átvitelét ékoltással végeztük.

3.4.3.1. DNS izolálás

A DNS izolálás menete megegyezik a 3.4.2.1. fejezetben részletezett módszerrel.

3.4.3.2. A fitoplazma törzsek kimutatása PCR módszerrel

A keresztfertőzéses kísérletek során a különböző fitoplazmák jelenlétét fhflB3_1/rhflB3 (Jarausch *et al.*, 1994) AP specifikus, fSTOL/rSTOL (Maixner *et al.*, 1995) STOL specifikus, valamint fAY/rAY AY specifikus indítószekvenciákkal végzett polimeráz lánreakció segítségével mutattuk ki (4. táblázat).

4. táblázat: A keresztvédetségben használt fitoplazma törzsek egyes génszakaszainak felszaporítására használt indítószekvenciák

Indítószekvencia neve és iránya	Cél DNS	Szekvencia (5' → 3')	Reakció paraméterek
fhflB3_1	<i>hflB</i> gén	TTC TAG CTA TTC ATC GTG AA	denaturáció: 95°C-3 min felszaporítás (35 ciklus): 95°C-1 min, 48°C-1 min, 66°C-1 min
rhflB3	<i>hflB</i> gén	CGG CGC GAT TAG TAG CTC C	befejezés: 66°C-5 min
fSTOL	16S rDNS	GCC ATC ATT AAG TTG GGG A	denaturáció: 94°C-2 min felszaporítás (35 ciklus): 94°C-30 sec, 58°C-30 sec, 72°C-30 sec
rSTOL	16S-23S spacer	AGA TGT GAC CTA TTT TGG TGG	befejezés: 72°C-6 min
fAY	16S-23S spacer	GCA CGT AAT GGT GGG CAC TT	denaturáció: 94°C-3 min felszaporítás (35 ciklus):

rAY	16S-23S spacer	CGA AGT TAG GCC ACC GGC TTT	94°C-1 min, 55°C-1 min, 72°C-1 min befejezés: 72°C-4 min
-----	----------------	--------------------------------	--

A polimeráz láncreakció mintánként 25 µl reakcióelegyben zajlott. Az elegy a következőket tartalmazta: 10x Puffer (Fermentas), dNTP-k (10 µM egyenként), 5-5 pmol mindkét indítószekvenciából, desztillált víz, 0,6 U Taq Polimeráz enzim (Fermentas, Invitrogen). A reakció körülményeit a 4. táblázat tartalmazza. A negatív kontroll templatjaként steril desztillált vizet használtunk. Az elegyhez a minta DNS-ből 1 µl-t adtunk templatként. A PCR reakciókhoz Németországban Stratagene Robocycler 40 PCR Machine készüléket, Magyarországon MJ Research PCT-200 Thermal Cycler készüléket használtunk. A reakció kiértékeléséhez a PCR termékeket GelRed-et tartalmazó 1%-os agaróz gélben futtattuk meg 25 percen keresztül 100 V-os feszültség mellett, majd a mintázatot UV fényben tettük láthatóvá.

3.4.3.3. A különböző fitoplazma törzsek elkülönítésére használt indítószekvenciák tervezése

PD1 és GSFY törzsek valósidejű PCR-rel történő kimutatására a rendelkezésünkre álló indítószekvenciákat kívántuk optimalizálni, így új indítószekvenciákat terveztünk. Az indítószekvenciákat az NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) nemzetközi adatbázisban megtalálható szekvenciák alapján terveztük a Primer3 primer design (v. 0.4.0) program (Rozen and Skaletsky, 1999) tervezőprogram segítségével. A tervezés során a lehetséges primerek specifitását a BLAST (Altschul *et al.*, 1997) programmal teszteltük összehasonlítva a GenBankban található kompatibilis szekvenciákkal. A reakcióhoz megfelelő olvadási hőmérsékletet gradiens PCR során optimalizáltuk.

3.4.3.4. A különböző fitoplazma törzsek valósidejű PCR-rel való elkülönítése

Rózsameténgben és dohányban egy mintán belül az immunizáló 1/93 és kihívó AT törzsek elkülönítését valósidejű láncreakcióval, Bio-Rad iCyclers IQ készülékben végeztük. A templat amplifikációjához az fhf1B-RT/rhf1B-RT1 indítószekvencia-párt használtuk. Az AT és 1/93 törzsek elkülönítéséhez specifikusan tervezett Cy5-jelölt, valamint FAM-jelölt TaqMan próbákat alkalmaztunk. Az 1/93 törzset Cy5-jelölt (5'-CTAGGTGGTAAAAGAGGTGGT-3'), az AT törzset FAM-jelölt (5'-TTAGGTGGTCGAAGAGGAGGA-3') próbával detektáltuk. A PCR reakcióelegy a következőket tartalmazta 50 µl-es végtérfogatban: 2,5 U Taq polimeráz enzim (Amplicon), 1x puffer 3 mM MgCl₂-vel (Amplicon), 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM mindkét indítószekvenciából, 0,2 µM mindkét próbából, 1µl DNS templat.

ESFY, valamint PD virulens törzseivel történt felülfertőzés esetében a kórokozók növényen belüli

szaporodását szintén valósídejű PCR reakcióval követtük nyomon C-1000 Thermal Cycler, CFX96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad) készülékben. A reakcióhoz nem specifikus SYBR Green fluorescens festéket, valamint fitoplazma törzsspecifikus indítószekvencia-párokat használtunk. Az 1/93 avirulens törzset a fhfIB-RT/rhfIB-RT-1 (Schneider és Seemüller, 2008) indítószekvencia-pár amplifikálta. Az ESFY felszaporítására az fECA-RT/rECA-RT indítószekvencia-párt használtuk, amelyet az ECA1/ECA2 (Jarausch *et al.*, 1998) primerpárok módosításával terveztünk meg a Primer3 primer design (v. 0.4.0) program (Rozen and Skaletsky, 2000) segítségével. A PD1 törzs felszaporítására használt specifikus, valósídejű PCR-hez használható indítószekvenciákat (fPD-RT/rPD-RT) szintén a fent említett program segítségével terveztük (5. táblázat). A valósídejű PCR reakcióelegye a következőket tartalmazta 20 µl-es végtérfogóban: 1x KAPA™ SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x) (Kapa Biosystems), 0,2 µM mindkét primerből, 1 µl templát DNS. A reakció körülményeit az 5. táblázat tartalmazza. A valósídejű PCR során a mintáinkat ismétlésekkel végeztük. A kiértékelésnél azt a Ct értéket vettük figyelembe, amelynél az egyes minták először adtak mérhető fluoreszcens jelet.

5. táblázat: Az immunizáló és a kihívó fitoplazma törzsek elkülönítésére használt indítószekvenciák valósídejű PCR során

Indítószekvencia neve és iránya	Cél DNS	Szekvencia (5' → 3')	Reakció paraméterek
fhfIB-RT	<i>hflB</i> gén	AAATTAATGCTCCTTGTGTGTT	denaturáció: 95°C-5 min felszaporítás (40 ciklus): 95°C-30 sec, 55°C-30 sec
rhfIB-RT-1	<i>hflB</i> gén	ATCACAATAATACCTTGAGATGG	
fECA_RT	nem riboszómális*	AATCAAAGAACTAACACATTGG	denaturáció: 95°C-5 min felszaporítás (40 ciklus): 95°C-30 sec, 50°C-30 sec
rECA_RT	nem riboszómális*	TGACTCATTATTAATTGTAACATTTTG	
fPD_RT	<i>hflB</i> gén	GGTGGTAATTTTCAGGAGGTTCC	denaturáció: 95°C-5 min felszaporítás (40 ciklus): 95°C-30 sec, 55°C-30 sec
rPD_RT	<i>hflB</i> gén	TCGGCGCGATTAGTAGCTCCA	

* nitroreduktáz-szerű fehérjét kódoló génszakasz

3.4.3.5. SSCP analízis

Rózsameténgből izolált fitoplazma törzsek azonosítását az SSCP mintázatok alapján is elvégeztük, amely alkalmas a két törzs nukleotid sorrendjében megtalálható kis különbségek detektálására. Ehhez az 1/93 + AT törzsekkel fertőzött növényekből kapott és felszaporított fitoplazma DNS-ek *hflB* gén szakaszát használtuk fel. Olyan esetekben, ahol az SSCP mintázat kevert fertőzésre (mindkét törzs egyidejű jelenlétére) utalt, a PCR során amplifikált *hflB* génszakaszokat pGEM plazmidba klónoztuk, majd a kapott klónokat vetettük alá SSCP analízisnek a 3.4.2.3. fejezetben ismertetett eljárásokkal megegyezően. Az SSCP mintázatok alapján különítettük el az 1/93 és az AT törzseket.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Különböző fitoplazma törzsek által okozott tünetek rózsameténg, dohány és alma növényeken

4.1.1. Tünetek rózsameténg teszt növényen

Üvegházi körülmények között az adott fitoplazma törzsre jellemző tünetek rózsameténg teszt növényen a kontroll törzssel való fertőzést követően 2-3 hónap múlva jelentek meg. A tünetek intenzitásában jelentős eltéréseket tapasztaltunk az egyes törzsek között. Az eltérések többnyire a levél és a virág elszíneződésében, deformációjában, valamint a növény vigorának változásában jelentkeztek. A fertőzetlen növények tünetmentesek maradtak (1. ábra)

4.1.1.1. A 'Ca. P. mali' 1/93 törzs által okozott tünetek

Az 1/93 avirulens törzssel való *önálló* fertőzés hatására a teszt növények teljes tünetmentességét, vagy csak nagyon enyhe tünetek megjelenését tapasztaltuk. Egyes esetekben a pozitív kontroll törzssel való fertőzést követően 4 hónappal enyhe levélsárgulás a levelek és a virágok csekély méretbeli csökkenése és a levél szélének hullámosodása volt megfigyelhető (1. ábra). A következő 8 hónapban a tünetek kismértékben felerősödtek, azonban a növény virágzása folytonos maradt. Mintegy 3 évvel a fertőzést követően alig volt észrevehető eltérés az egészséges kontroll és az 1/93 törzssel fertőzött növények között a vizuális diagnosztika alapján.

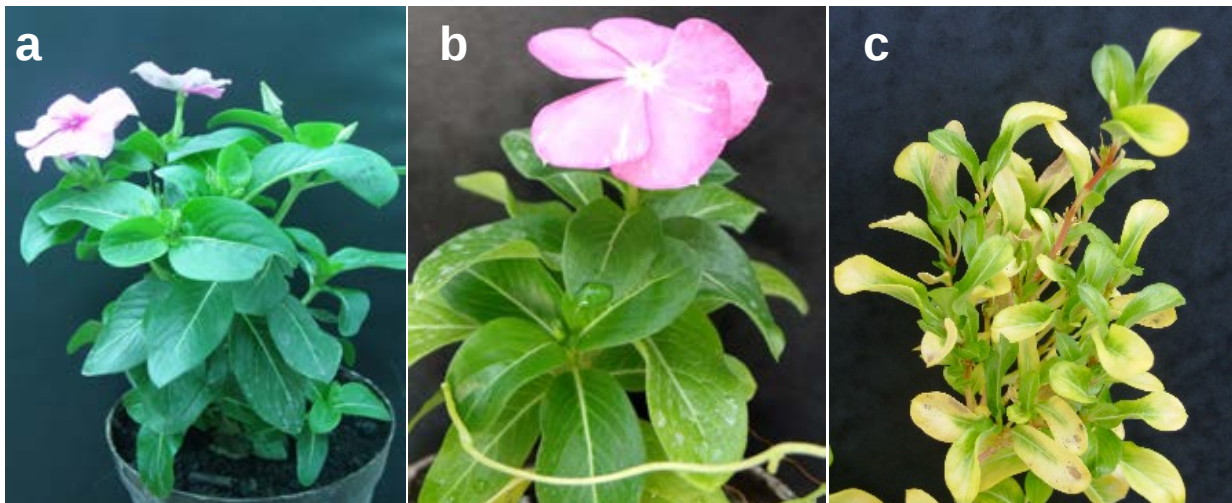
4.1.1.2. A 'Ca. P. mali' AT törzs által okozott tünetek

Az AT törzssel történő *önálló* fertőzés hatására a jellegzetes tünetek, így a levelek sárgulása és erőteljes hullámosodása, méretbeli csökkenése, valamint az apró virágok megjelenése már körülbelül 3 hónappal a fertőzést követően jelentkeztek (1. ábra). Jellemző volt, hogy a virágzás már 8-10 hónappal az átvitelt követően leállt. A 3 éves megfigyelési időszak végén az AT törzssel fertőzött rózsameténg teszt növények vagy elpusztultak, vagy erőteljes tüneteket mutattak.

Az 1/93-as törzssel történő *immunizálás* esetén az AT törzssel végzett felülfertőzést követően egy évvel az AT törzs okozta tünetekhez hasonló, de annál enyhébb mértékű szimptomák alakultak ki. Megfigyeltük a levelek szélének jellegzetes hullámosodását, a levél, valamint a virágok méretének kismértékű csökkenését, valamint az ízközök enyhe fokú rövidülését. A levelek a kontroll növényekhez képest halványabbak voltak. Ezek a tipikus tünetek a felülfertőzést követő 3. évben eltűntek, csupán enyhe méretbeli eltérés, illetve a levelek világosabb árnyalata volt megfigyelhető az immunizált növényeken.

Egyidejű fertőzés esetén a tünetek megjelenésének üteme, intenzitása és jellege ugyanolyan volt, mint az AT törzssel fertőzött pozitív kontroll növények esetében megfigyeltek.

Amennyiben a fertőző törzs ráoltását követően történt meg az avirulens törzssel való fertőzés, az AT törzsre jellemző tünetek szintén erőteljesen fejeződtek ki (Seemüller, szóbeli közlés).



1. ábra. A: egészséges, b: '*Ca. P. mali*' 1/93-as törzssel fertőzött c: '*Ca. P. mali*' AT törzssel fertőzött rózsameténg.

4.1.1.3. A '*Ca. P. prunorum*' GSFY törzs által okozott tünetek

A '*Ca. P. prunorum*' GSFY törzse által *önállóan* fertőzött rózsameténgen az egészségestől eltérően a levelek halványzöldek, esetenként világos barnásak voltak. A legjellegzetesebb elváltozásokat a virágokon figyeltük meg: a beteg virágok kisméretűek, fejletlenek maradtak, és a normálisnál halványabb árnyalatúak, vagy világoszöld színűek voltak (2. ábra). A tünetek körülbelül 3 hónap elteltével váltak erőteljessé.

A '*Ca. P. mali*' 1/93 törzssel történő *immunizálás* esetén a GSFY törzssel történő felülfertőzést követő 1-2 éves időszakban a fentebb említett erőteljes tünetek nem, vagy csak kismértékben fejeződtek ki. A vizsgálati időszak végére csupán a levelek enyhe sárgás elszíneződését figyeltük meg. Egyidejű fertőzés esetén azonban a GSFY törzssel történő fertőzésre jellemző tünetek jelentek meg.

4.1.1.4. A '*Ca. P. pyri*' PD1 törzs által okozott tünetek

A '*Ca. P. pyri*' PD1 virulens törzs által *önállóan* fertőzött rózsameténgen kialakult tünetek enyhék voltak. A legszembetűnőbb változások a hajtások rövidülésében, a levelek törpülésében, sárgulásában, a virágok elszíntelenedésében jelentkeztek a fertőzést követő 4-6 hónapon belül.

A '*Ca. P. mali*' 1/93 törzssel történő *immunizálás* esetén a kialakuló tünetek alapján nem lehetett egyértelműen következtetni az 1/93-as, vagy a PD1 törzs dominanciájára.

4.1.1.5. A '*Ca. P. solani*' STOL által okozott tünetek

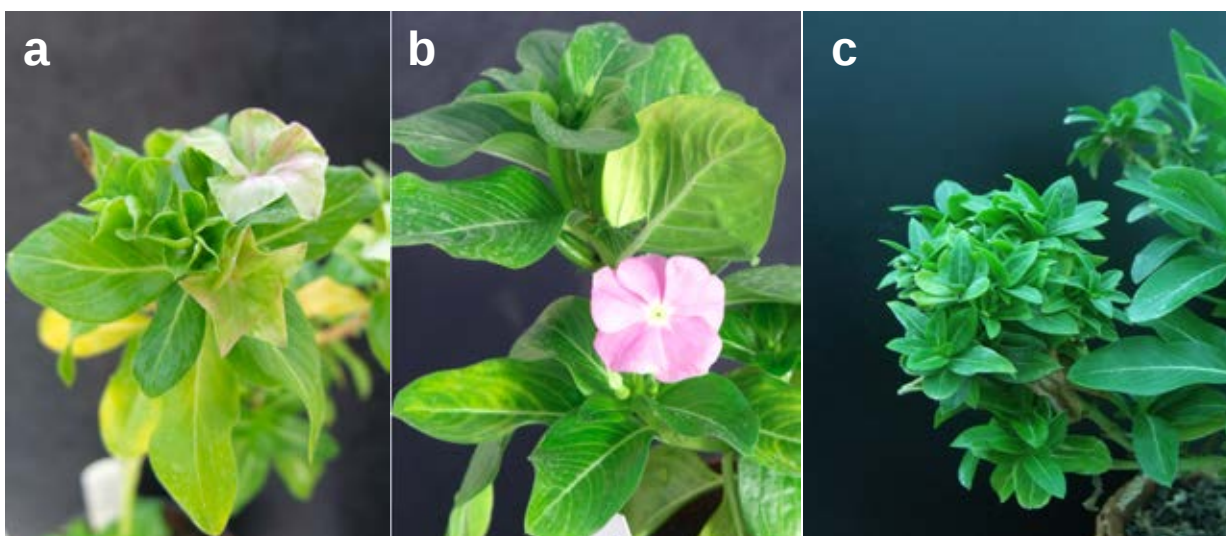
A '*Ca. P. solani*' STOL virulens törzssel való *önálló* fertőzés hatására már 2-3 hónap elteltével jelentkeztek szemmel látható tünetek mind a leveleken, mind a virágokon, valamint a növény vigorát is hátrányosan befolyásolta a fertőzés. A levelek erős deformációt mutattak, szélük erősen hullámossá vált, színük sötétzöldről halványzöldre, sárgásra fakult (2. ábra).

Hasonló tüneteket tapasztaltunk abban az esetben is, amikor a növényt az 1/93-as törzssel *immunizáltuk*. *Egyidejű fertőzés* esetén az említett tünetek szintén kialakultak.

4.1.1.6. A '*Ca. P. asteris*' AAY1 törzs által okozott tünetek

A vizsgált törzsek közül a legintenzívebb, szemmel látható tünetek '*Ca. P. asteris*' AAY virulens törzsének *önálló* fertőzése hatására alakultak ki rózsameténgen. A jellegzetes szimptómák már két hónappal a fertőzést követően észlelhetők voltak. A jelentősen megrövidült internódiumoknak köszönhetően a levelek a hajtások végén csoportosan álltak. A virágok elleveledtek, helyettük a hajtáscsúcsokon csoportosuló, zöld színű levelek fejlődtek (2. ábra). A növény vigora lecsökkent, a hajtások az egészséges kontrollhoz képest vékonyabbak, gyengébben fejlettek voltak.

A tünetek '*Ca. P. mali*' 1/93 törzssel való *immunizálás*, illetve *egyidejű fertőzés* esetén is hasonló intenzitással fejeződtek ki, és jelentősek maradtak a kísérleti megfigyelési periódus végéig.



2. ábra. A: '*Ca. P. prunorum*' GSFY törzssel, b: '*Ca. P. solani*' STOL törzssel c: '*Ca. P. asteris*' AAY1 törzssel fertőzött rózsameténg.

4.1.2. Tünetek dohány tesztnövényen

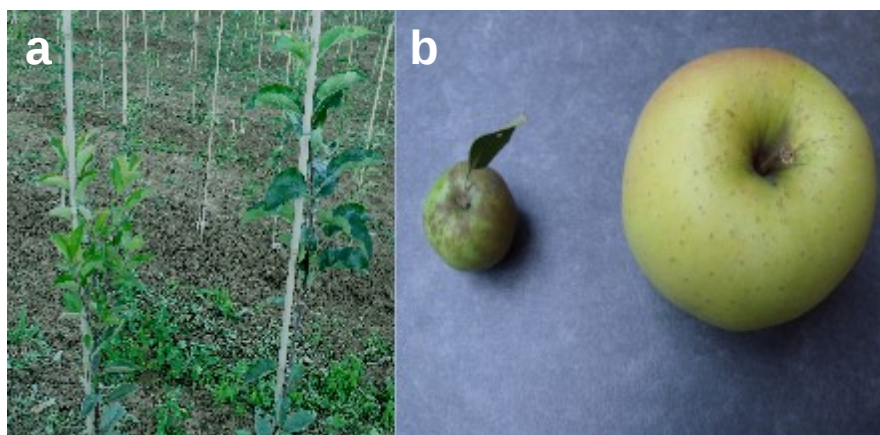
A '*Ca. P. mali*' 1/93-as törzssel való *önálló* fertőzés esetén a dohány levelei sárgulásos tüneteket mutattak, a levélerek megvastagodtak és barnultak. A virág mérete csökkent 2-3 hónappal a fertőzést követően. Önálló AT fertőzés hatására erőteljes tünetek jelentkeztek már 1-2 hónappal a fertőzést követően, majd néhány hónap elteltével a növények elpusztultak (3. ábra). Az 1/93 törzssel való *immunizálás* és AT törzssel való felülfertőzés esetén levélsárgulást és a levelek főérének megvastagodását tapasztaltuk. Az egészséges kontroll növények tünetmentesek maradtak.



3. ábra. '*Ca. P. mali*' AT törzs által okozott tünetek dohányon.

4.1.3. Fitoplazma fertőzések okozta tünetek almán

A szabadföldi körülmények között nevelt almafákon a '*Ca. P. mali*' AT törzs által okozott tünetek szembetűnők voltak. Feltűnő volt a hajtásvégek ízközeinek rövidülése, az úgynevezett boszorkányseprűs tünetek kialakulása, megnagyobbodott pálhalevelek kifejlődése, illetve a kisméretű, hosszú kocsányú termések megjelenése (4. ábra).

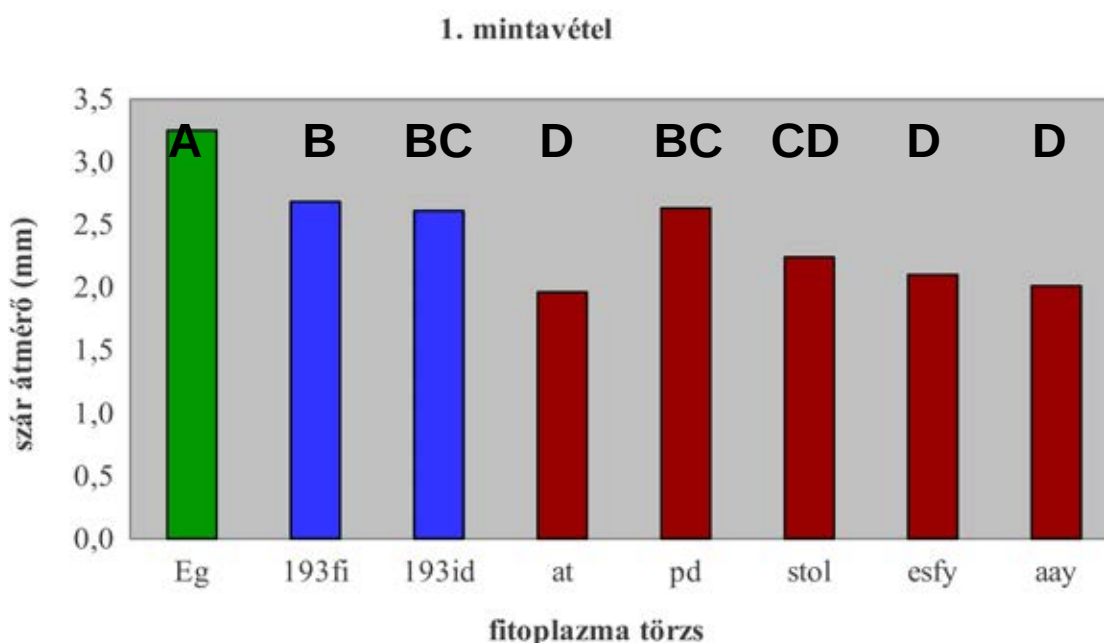


4. ábra. '*Ca. P. mali*' AT törzs által okozott tünetek almafán és alma termésen; a: tünetes fa és egészséges fa, b: tünetes termés, egészséges termés.

4.2. Rózsameténg teszt növények hajtásvastagságában megfigyelt eltérések különböző fitoplazma törzsekkel való fertőzés hatására

A különböző fitoplazma törzsek egymáshoz viszonyított virulenciáját értékelve szemmel látható különbségeket tapasztaltunk egészséges, valamint fertőzött rózsameténg növények között. A különbségek a hajtás átmérőjének változékonyságában is jelentős mértékben megmutatkoztak.

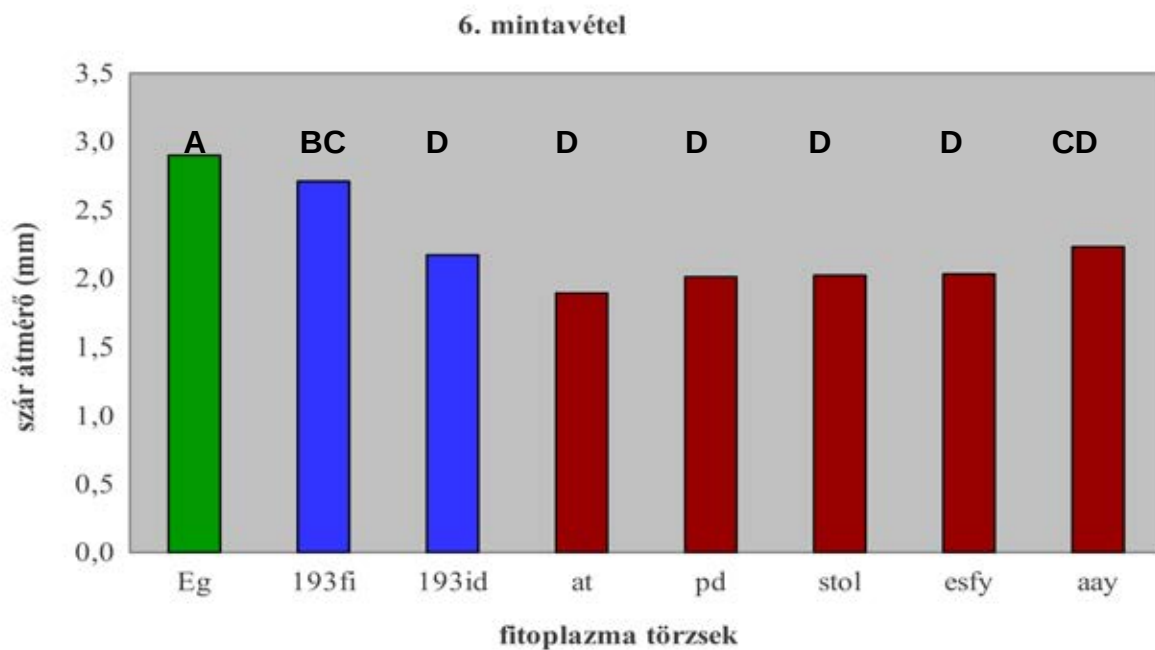
Az első mérésre a fertőzést követő 6. (az 1/93id minta esetében a 12.) hónapban került sor. A mérési adatok páronkénti összehasonlítása során 4 csoportot (A, B, C, D) alakítottunk ki a szár átmérőjében jelentkező szignifikáns eltérések alapján (5. ábra). Az egészséges, nem fertőzött teszt növény szárának átmérője jelentős eltérést mutatott a többi csoporthoz képest. Ezen növények szárának átmérője meghaladta a 3 mm-t. Az 1/93 avirulens törzssel fertőzött növény (1/93fi) hajtása jelentősen vastagabb volt (2,3-3 mm), mint a virulens törzssel fertőzött növényeké. A legkisebb átmérőjű hajtásokat az erősen virulens AT, STOL, ESFY és AAY fitoplazma törzsekkel való fertőzés hatására mértük. Az 1/93id (2,4-3 mm), pd (2,3-2,8 mm) és stol (2-2,6 mm) jelölésű minták csak kismértékben térnek el az 1/93fi, illetve az at (1,7-2,2 mm), esfy (1,7-2,4 mm) és aay (2-2,3 mm) jelű mintáktól.



5. ábra. A fertőzést követő 6. (az 1/93id minta esetében a 12.) hónapban mért adatok páronkénti összehasonlítása során kialakult csoportok a szár átmérőjének átlagos mérete, valamint a szórások

alapján. Az A, B, C, D jelölések a szignifikáns eltérések alapján való csoportosítást jelentik. Az egészséges minta zöld, az avirulens törzssel fertőzött minta kék, a virulens törzsekkel fertőzött minták bordó színnel jelöltek. A kezelések balról jobbra: „Eg”: fertőzetlen kontroll, „1/93fi”: 'Ca. P. mali' 1/93 avirulens törzssel fertőzött rózsameténg, a fertőzést követő 6. hónapban, „1/93id”: 'Ca. P. mali' 1/93 avirulens törzssel fertőzött rózsameténg, a fertőzést követő 12. hónapban, „at”: 'Ca. P. mali' AT törzssel fertőzött rózsameténg, „pd”: 'Ca. P. pyri' PD törzssel fertőzött rózsameténg, „stol”: 'Ca. P. solani' STOL törzssel fertőzött rózsameténg, „esfy”: 'Ca. P. prunorum' GSFY törzssel fertőzött rózsameténg, „aay”: 'Ca. P. asteris' AAY1 törzssel fertőzött rózsameténg.

A fertőzést követő 18. (1/93id esetében a 24.) hónapban történt mintavétel eredményeinek páronkénti összehasonlításából kapott adatok alapján a legvastagabb hajtásokkal a nem fertőzött kontroll növények rendelkeztek, ebben az esetben a szárak átmérője 2,4 és 3,4 mm között változott, átlagosan 2,9 mm volt. Ehhez képest kismértékben különböztek a fiatal, 1/93 törzssel fertőzött növények, melyek szárának átmérője átlagosan 2,7 mm (2,4-3,1 mm) volt. Hasonló vastagságú hajtásokkal rendelkeztek az idős 1/93, AT, PD1, STOL és ESFY, valamint az AAY1 törzssel fertőzött növények. Az 1/93id minta esetében a kis átmérő inkább a növény előregedésének, mint a fitoplazma virulenciájának volt betudható (6. ábra).



6. ábra. A fertőzést követő 18. (az 1/93id minta esetében a 24.) hónapban mért adatok páronkénti összehasonlítása során kialakult csoportok a szár átmérőjének átlagos mérete, valamint a szórások alapján. Az A, B, C, D jelölések a szignifikáns eltérések alapján való csoportosítást jelentik. Az

egészséges minta zöld, az avirulens törzssel fertőzött minta kék, a virulens törzsekkel fertőzött minták bordó színnel jelöltek. A kezelések balról jobbra: „Eg”: fertőzetlen kontroll, „1/93fi”: '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens törzssel fertőzött rózsameténg, a fertőzést követő 18. hónapban, „1/93id”: '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens törzssel fertőzött rózsameténg, a fertőzést követő 24. hónapban, „at”: '*Ca. P. mali*' AT törzssel fertőzött rózsameténg, „pd”: '*Ca. P. pyri*' PD1 törzssel fertőzött rózsameténg, „stol”: '*Ca. P. solani*' STOL törzssel fertőzött rózsameténg, „esfy”: '*Ca. P. prunorum*' GSFY törzssel fertőzött rózsameténg, „aay”: '*Ca. P. asteris*' AAY1 törzssel fertőzött rózsameténg.

Az egy éves vizsgálati periódus minden, kéthavonkénti mintavételi időpontjában jelentős eltérést mutatott az egészséges és a fitoplazmával fertőzött tesztnövények hajtásainak átmérője. Az AAY1, GSFY és STOL, valamint AT és PD1 virulens törzsek hatására jelentős mértékben csökkent a szárvastagság. Az avirulens 1/93 törzssel fertőzött növények szára minden mintavételi időpontban vastagabb volt, mint a virulens törzsekkel fertőzött növényeké, azonban némileg vékonyabb, mint a kontroll növényeké. Az avirulens 1/93 törzssel fertőzött fiatal növény hajtásának átmérője (2,3-4,6 mm) átlagosan csupán 12-14%-kal volt vékonyabb, mint az egészséges növény hajtásai (2,6-5,3 mm). Az idősebb, 1/93-mal fertőzött növény (1,9-4,6 mm) esetében sem tapasztaltunk jelentős eltérést, ebben az esetben 14-27%-kal bizonyultak vékonyabbnak a hajtások a fertőzetlen kontrollhoz képest. Erősebb virulenciát mutató törzsek esetében nagyobb eltérést tapasztaltunk a szárát mértében a kontroll növényekhez képest. Ez az érték PD (1,9-4 mm) törzs esetén 25-27%, AT esetén (1,7-3,6 mm) 32-35%, STOL (1,7-4,2 mm) törzsnél 21-35% volt. Az legnagyobb eltérést AAY (1,4-3,5 mm) és GSFY (1,7-3,5 mm) törzsek hatására mértük, előbbi esetben 34-46%-ot, utóbbi esetben pedig 34-35%-ot.

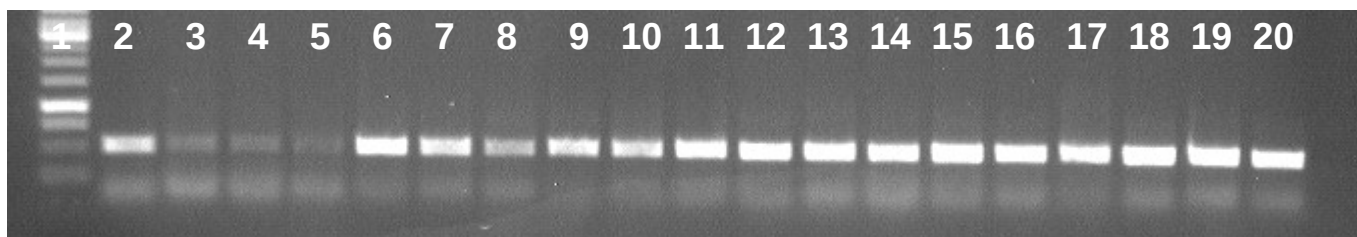
4.3. Az almafát egyidejűleg fertőző fitoplazma törzsek molekuláris jellemzése

Az almafákban a '*Ca. P. mali*' avirulens és virulens törzsei is megtalálhatók. Korábbi megfigyelések során a boszorkányseprűs jellegzetes tünetek időnként megjelentek, majd pedig tünetmentes időszakok következtek (Seemüller, szóbeli közlés). Ez a tüneti variabilitás azt a feltételezést indukálta, hogy az avirulens és a virulens törzsek predomináciájában változékonyság áll fenn. A mintagyűjtéskor tapasztalt tünetek utaltak az adott törzs virulenciájára. Az erős tüneteket mutató fákból AT, a tünetmentesekből 1/93 törzset, illetve komplexet, az enyhe tüneteket mutató fákból vegyesen mindkét törzset, illetve komplexet izoláltuk. A kevert fertőzés nyomon követéséhez a *hflB* és az *imp* gének analízisét végeztük el, valamint vizsgáltuk az 1/93-as izolátum genetikai változékonyságát.

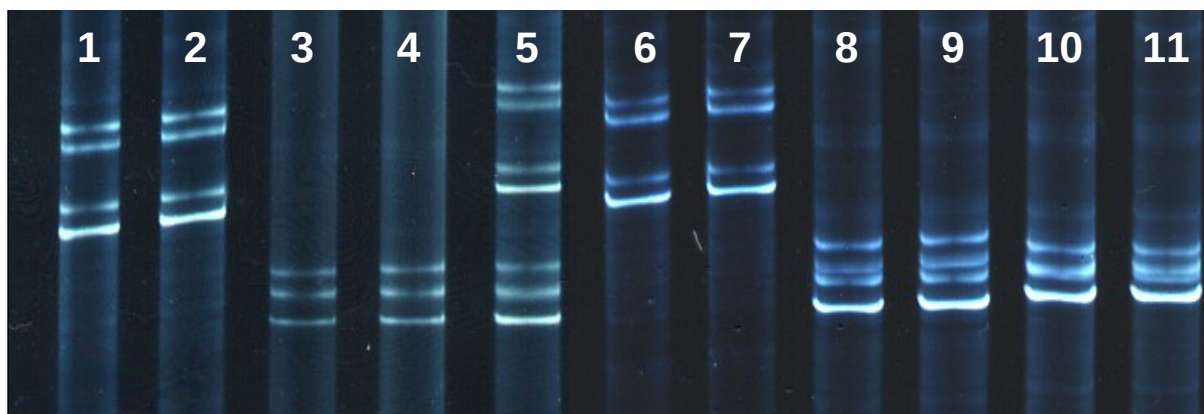
4.3.1. A '*Ca. P. mali*' izolátumok variabilitásának igazolása a *hflB* gén analízise alapján

4.3.1.1. A PCR termékek SSCP vizsgálata

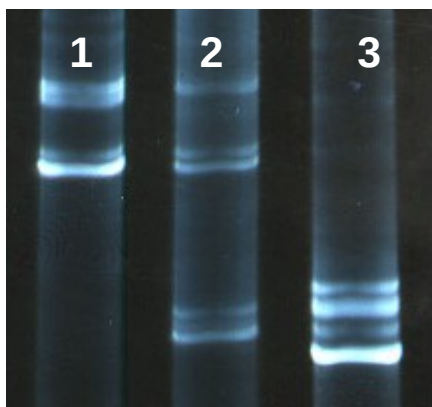
A '*Ca. P. mali*' törzsek együttes jelenlétének kimutatásaként a kórokozó DNS-ét izoláltuk almafa hajtásából és gyökeréből. A PCR során az egyes minták 528 bp hosszúságú *hflB* gén szakaszait szaporítottuk fel (7. ábra). A pozitív eredményt adó mintákat SSCP analízisnek vetettük alá. Az izolátumokat SSCP profiljuk alapján csoportosítottuk. Egyes izolátumok 3 csoportba rendeződő, 2-7 sávós mintázatot adtak. Jellemzően a komplex profilt adó fák 10 évesnél idősebbek voltak. Az 1/93-as izolátum esetében 3 fő mintázatot, valamint egy 4. profilt tapasztaltunk, amely egy 1/93-mal egyszeresen fertőzött, tünetmentes, szabadföldi alma gyökeréből származott (8. ábra). Összetett profilt tapasztaltunk a 17/93-as izolátum esetében is (9. ábra). (Schneider és munkatársai (2014) más izolátumokat is vizsgált, amelyek között előfordultak egyszeres mintázatot adó, de komplexebb profillal rendelkező minták is.) Seemüller és Schneider (2007) csoportosítása alapján mindkét izolátum enyhén virulens, vagy avirulens. (Hasonlóan komplex profilt tapasztaltak még 3 izolátum esetében, melyek között közepesen virulens, illetve erősen virulens izolátumok is előfordultak.) Az 1/93-as izolátum variabilitását figyeltük meg, miután dohányra, illetve rózsameténgre való átjuttatás során PCR termékeik SSCP mintázata eltért egymástól (8. ábra). Ezzel ellentétben az almafából izolált AT törzs SSCP profilja mind rózsameténgben, mind dohányban felszaporítva megegyezett.



7. ábra. A PCR során felszaporított 528 bp hosszúságú *hflB* gén szakaszok. 1: 1 kb méretmarker (Fermentas), 2-19: '*Ca. P. mali*' 1/93-as törzs izolátumai.



8. ábra. A '*Ca. P. mali*' izolátumok *hflB* fragmentjeinek SSCP profilja. 1-5: 1/93-as izolátum almából, 6-7: 1/93-as izolátum rózsameténgből, 8-9: 1/93-as izolátum dohányból, 10: AT izolátum rózsameténgből, 11: AT izolátum dohányból.



9. ábra. A '*Ca. P. mali*' 17/93-as izolátum *hflB* gén fragmentjének SSCP profilja.

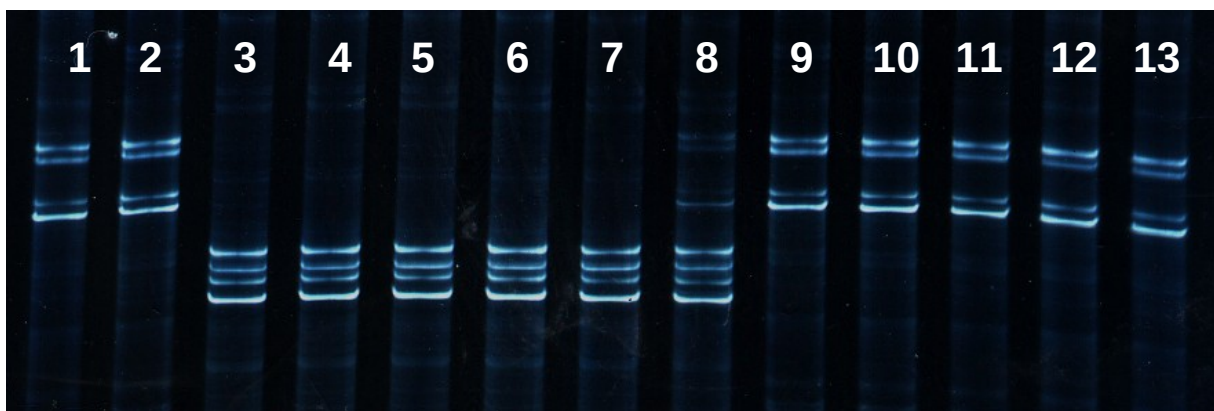
4.3.1.2. Az 1/93-as izolátum vizsgálata valósídejű PCR-rel

Az 1/93-as törzssel fertőzött 7 db rózsameténg, 8 db dohány, 7 db alma mintát vizsgáltunk valósídejű PCR-rel az SSCP eredmények kiegészítésére. Mind a rózsameténg, mind a dohány, mind az alma esetében azt tapasztaltuk, hogy a jellemző SSCP mintázatok összhangban voltak a valósídejű PCR során kapott eredményekkel. A valósídejű PCR során kapott ciklusszámok pozitív eredmény esetén 19,8 és 30,8 közé estek. A dohányban előforduló 1/93 törzset (1/93Tab) az AP specifikus indítószekvenciára tervezett specifikusan jelölt, FAM fluoreszcens festékkal jelölt próba detektálta, amely a rózsameténgben található 1/93-as törzset (1/93Vin) nem szaporította fel. Az 1/93Vin törzset a Cy5 fluoreszcens festékkal specifikusan jelölt próba detektálta, amely a dohányban lévő törzset nem mutatta ki. Alma esetében minden mintánál az SSCP profilnak megfelelő eredményt kaptunk, felső sávok esetén az 1/93Vin törzset detektáltuk, alsó sávú profilnál az 1/93Tab törzset, komplex profilnál pedig mindkét törzs felszaporodott a kimutathatósági határ fölé.

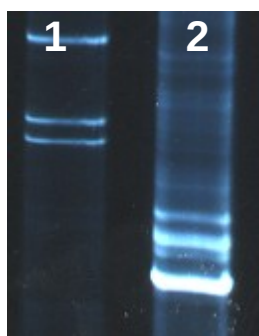
4.3.1.3. Az 1/93-as izolátum *hflB* gén szakaszának klónozása, a klónok SSCP profiljának elemzése

A komplex SSCP profilt mutató mintákban lévő kevert fertőzések jelenlétének igazolásához klónoztuk az 1/93 és a 17/93 törzsek PCR termékeit. A klónozott inszertek PCR termékéből mintánként 9-15 darabot választottunk ki, és poliakrilamid gélben futtatva, majd ezüstfestést követően elemeztük a profiljukat. A komplex profillal rendelkező 1/93-as és 17/93-as izolátumok

főleg heterogén, de néhány esetben homogén mintázatot adtak. Az egyes törzsekre jellemző profil csoportok eloszlása nem volt egyenletes, utalva arra, hogy az egyes genotípusok a fertőzött fában egyenlőtlenül fordulnak elő (10., 11. ábra).



10. ábra. Klónozott *hflB* gén fragmentek 'Ca. P. mali' által fertőzött almából. 1-13: Az almából izolált 1/93-as törzs *hflB* fragmentjének klónozását követően kapott különböző profilok.



11. ábra. A 'Ca. P. mali' 17/93-as törzsének klónozott *hflB* gén fragmentumaira jellemző SSCP mintázatok.

4.3.1.4. A *hflB* gén fragmentek szekvencia analízise

Az 1/93 és 17/93-as izolátumok *hflB* génjének klónozott inszertjeit nukleotid sorrendjük meghatározását követően filogenetikai elemzésnek vetettük alá az egyes minták SSCP profiljainak megfelelően. A 12. ábra a minták egymáshoz viszonyított genetikai távolságát mutatja filogenetikai törzsfán ábrázolva. Referenciaként a 'Ca. P. mali' AT, AP15 és GDH törzseket használtuk. A klónozott inszertek meghatározott nukleotid szekvenciái az nemzetközi adatbázisban (www.ncbi.nlm.nih.gov) FN658541, FN658563-FN568571, FN568578, FN568585, FN568590-FN568606 azonosítókkal szerepelnek. Azon szekvenciák genetikai variabilitása, amelyek 2, vagy 3-féle (komplex) SSCP profillal rendelkeztek, a filogenetikai törzsfán való elhelyezkedésben is megmutatkozott. A fő SSCP profiloknak megfelelően az 1/93-as és a 17/93-as izolátumok klónozott

inzertjei jól elkülönülnek a törzsfán (ez igaz volt a kutatócsoport által szekvenált, szintén komplex SSCP profillal rendelkező 3/93, 10/93, 14/93 izolátumokra is /nem közölt adat/), 2 fő csoportot, illetve egy fő csoporton belül 2 alcsoportot alkotva. A két fő csoport közötti nukleotid sorrendbeli eltérés kevesebb, mint 4%.

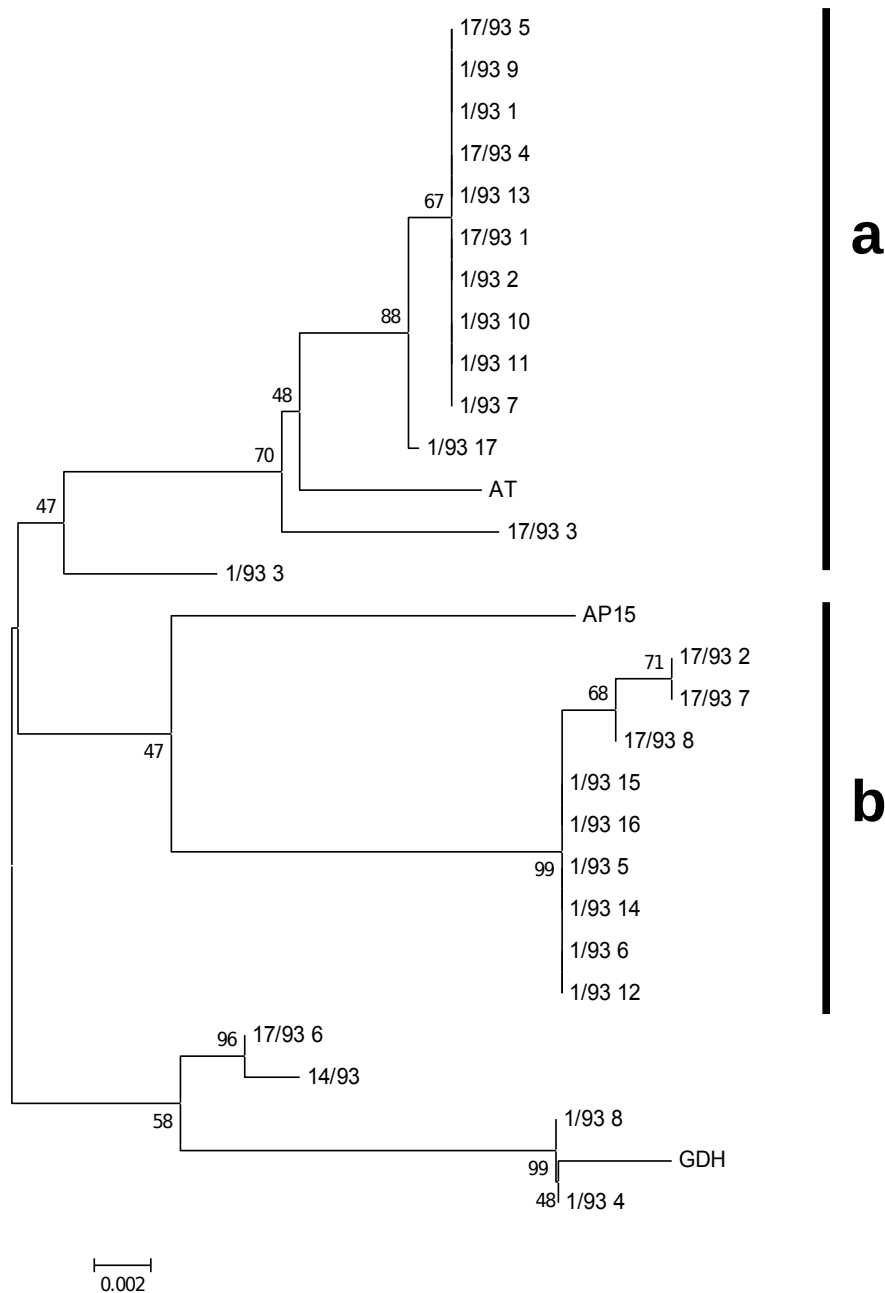
Az almafáról rózsameténgre, illetve dohányra átvitt 1/93-as törzs SSCP profilja a két tesztnövényben eltérést mutatott. A két tesztnövényből izolált 1/93-as törzs (1/93Vin-rózsameténgből, 1/93Tab- dohányból) *hflB* gén szakasza 97%-os egyezőséget mutatott (12. ábra).

1/93Vin	1	TTTCTAGCTATTCATCGTGAATCAGGTAACTTAATTCTAAATCTTTAATTACTTCCAAA	60
1/93Tab	1	TTTCTAGCTATTCATCGTGAATCAGGTAACTTAATTCTAAATCTTTAATTACTTCCAAA	60
1/93Vin	61	CAAAAATCCCTTTTCACCTTCAAGATGTGGCTGGGAATACGGAAGAAAAGAAGAGATG	120
1/93Tab	61	CAAAAATCCCTTTTCACCTTCAAGATGTGGCTGGGAATACGGAAGAAAAGAAGAGATG	120
1/93Vin	121	ACCGAATTAATTGATTTTTTAAAACAACCACAAAATACGAAACCATAGGGGCTGCCATT	180
1/93Tab	121	ACCGAATTAATTGATTTTTTAAAACAACCACAAAATACGAAACTATAGGGGCTGCCATT	180
1/93Vin	181	CCGAAGGGCGTTTTATTAGAAGGACCACCGGAACTGGTAAAACCTTTATTAGCCAAAGCT	240
1/93Tab	181	CCGAAGGGTGTTTTTATTAGAAGGACCACCGGAACTGGTAAAACCTTTATTAGCCAAAGCT	240
1/93Vin	241	TTAGCGGGTGAAGCTAACGTTCCCTTTTTTTGCTGCTTCAGGTTTCGGAATTTGTGGAAATG	300
1/93Tab	241	TTAGCGGGTGAAGCCAATGTTCCCTTTTTATGCTGTTTCAGGTTTCGGAATTTGTGGAAATG	300
1/93Vin	301	TATGTAGGTGTAGGCGCTTCCAGAGTCAGAAAATTGTTTAAAGAAGCGAAATTAATGCT	360
1/93Tab	301	TATGTAGGTGTAGGCGCTTCCAGGGTTAGAAAATTGTTTAAAGAAGCGAAATTAATGCT	360
1/93Vin	361	CCTTGTGTGTTATTTATTGATGAAATTGATGTTCTAGGTGGTAAAGAGGTGGTAATTCT	420
1/93Tab	361	CCTTGTGTGTTATTTATTGATGAAATTGATGTTTAGGTGGTCGAAGAGGAGGAATTCT	420
1/93Vin	421	TCAGGCGGCAATCAAGAAAAGATCAAACCTTTAAATCAACTTTTAACCGAAATGGATGGT	480
1/93Tab	421	TCAGGCGGCAATCAAGAAAAGATCAAACCTTTAAATCAACTTTTAACCGAAATGGATGGT	480
1/93Vin	481	TTTACCCCATCTCAAGGTATTATTGTGATTGGAGCTACTAAT	522
1/93Tab	481	TTTACCCCATCTCAAGGTATTATTGTGATTGGAGCTACTAAT	522

12. ábra. A rózsameténgben, illetve a dohányban előforduló, almafáról átvitt 1/93-as izolátum *hflB* gén szakaszának szekvenciabeli egyezőségei. A szekvenciák közötti eltérések az ábrán piros színnel vannak jelölve.

A filogenetikai csoportok alapján kitűnt, hogy az 1/93-es és 17/93-as törzsek közeli rokonsági kapcsolatban állnak, az egyik fő csoporton belül egy elágazáson helyezkednek el a 17/93_3-as, 1/93_3-as és az 1/93_17-es izolátumokat leszámítva, illetve a másik elágazáson a szekvenciabeli

eltérésük kevesebb, mint 4%. Ezen két elágazásba tartozó klónok az AT, illetve az AP15 törzsekhez közel helyezkednek el, amelyek 96,6%-os egyezőséget mutatnak. A tünetes hajtásról származó törzsek szekvenciái (1/93_8 és 1/93_4) jól elkülönülnek, és 99,6%-os homológiát mutatnak az erősen virulens GDH törzsszel (13. ábra). Ezzel szemben a többi izolátum almán enyhe tüneteket, vagy tünetmentességet előidéző törzsekre utal. Az izolátumok heterogén szekvenciáinak filogenetikai távolságát tekintve, illetve a különböző csoportok nagyfokú szekvenciabeli egyezőségét figyelembe véve utalnak a '*Ca. P. mali*' 2-3 törzsének egy fán belüli együttes jelenlétére.



13. ábra. A '*Ca. P. mali*' izolátumok filogenetikai távolságainak ábrázolása a klónozott 528 bp hosszúságú *hflB* génszakaszokról. A szekvenciák több törzsszel keverten fertőzött fákról származnak.

Az AT, AP15, valamint a GDH törzsek szerepelnek referenciaként. A különböző számok az izolátumot és annak klónjait jelölik. Az elágazáson szereplő számok az elágazás valószínűségét jelölik százalékos formában, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis során kaptunk. Az a, illetve b jelölés az 1/93-as és a 17/93-as izolátumok klónozott inzertjeinek fő csoportjait mutatják.

4.3.1.5. Az *imp* gén SSCP analízise

Az 1/93 és 17/93-as izolátumokat az *imp* gén tulajdonságai alapján is megvizsgáltuk. Az 1/93-as törzssel fertőzött rózsameténgből, dohányból és almából összesen 9, a 17/93-as törzssel fertőzött almából 3 mintát vizsgáltunk. Az *imp* gén analízise során is kevert fertőzésekre utaló jeleket tapasztaltunk. Kétféle SSCP mintázatot kaptunk. A felső minták csupán enyhe eltérései miatt az *imp* gén nem bizonyult megfelelőnek ahhoz, hogy megkülönböztetésre használjuk. 1/93Vin és 1/93Tab *imp* gént vizsgálva is eltérő mintázatot kaptunk. A *hflB* génhez hasonlóan itt is az 1/93Vin profil az alma profil felső részével megegyező mobilitással rendelkezik, az 1/93Tab pedig az alma alsó profiljával.

A mintákat klónoztuk, majd SSCP során vizsgáltuk a rekombináns klónok profilját, melyeknek több mint 60%-a homogén, 1/93Vin-nek, vagy 1/93Tab-nak megfeleltethető mintázatot mutatott.

4.3.1.6. Az *imp* gén szekvencia analízise.

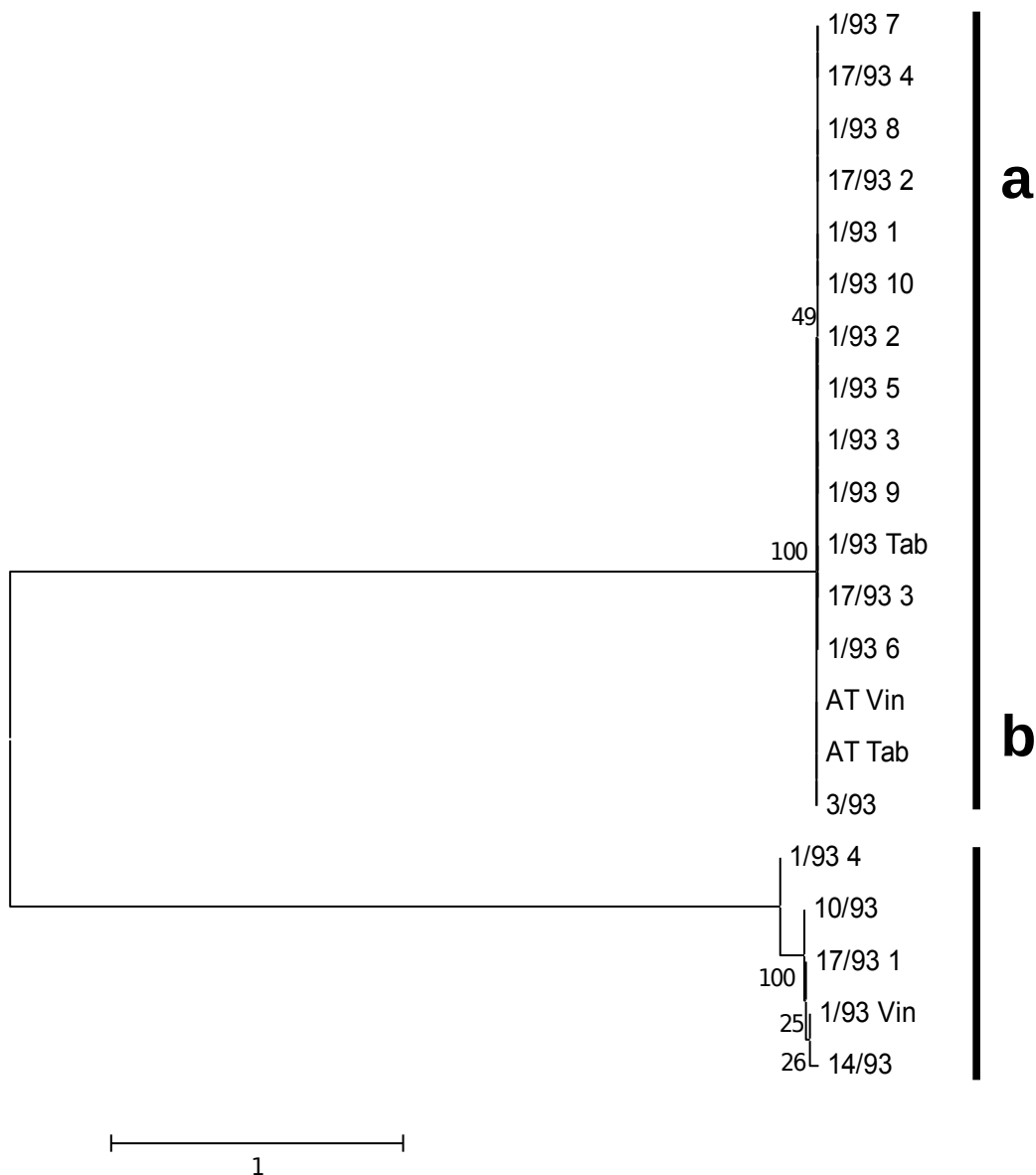
A rózsameténgből és dohányból izolált 1/93-as törzs (1/93Vin- rózsameténgből, 1/93Tab-dohányból) *imp* gén szakasza 87%-os egyezőséget mutatott (14. ábra).

1/93Vin	1	ATGGAAGCAAATCAACAAAAAAAATACTTATAGGTGTTGGTTCAGTTGTTGGTGCTTTA	60
1/93Tab	1	ATGGAAGCAAATCAACAAAAAAAATACTTATAGGTGTTGGTTCAGTTGTTGGTGCTTTA	60
1/93Vin	61	GTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTTCATCAAAAGTAAA	120
1/93Tab	61	GTTTTATATTTAATTTTAGCTTGGTCTATTAGTTTCTGGCCTTTTTTCATCAAAAGTAAA	120
1/93Vin	121	CAACAAATTTTTACTGATGAATTTAGCAAATAACATTTGACACTGAAGTAGCAGAAACA	180
1/93Tab	121	CAAGAAATTTTT--GATGATCTTAGCAAATAACATTTGAAAATGAAGTAGCAGAAACA	177
1/93Vin	181	AATGCCATTTTTAATAAAACACTACCAGCTGATAGAAATCAAAATATTTAAAGAAGATTTT	240
1/93Tab	178	AATACCATTTTTAGTAAAACAGCA--A-CTGAGAGAAA-AAA-A-TTTAAAGAAGAAATTT	231
1/93Vin	241	ATGGCTAAAAAAGTTAATAAATTGGTCTGAATGGGCTGATCAATTAATTGAACCAAAAATT	300
1/93Tab	232	ATAGATAAAAAAGTTAATAAATTGGTCTGAATGGGCTAATAAATTAATAACACCAAAAATT	291
1/93Vin	301	ACTGAAGGCGATAAAAAGCATCTTTTGATTAGCCTTTGAATCATTGGGAAAAATTA	360

1/93Tab	292	ACTGAAGGCGATAAAA	CAACATCTTATAATT	CAGCCGTTGAATCATTG	AAAAATTACA	351
1/93Vin	361	GTCAACCAAG	AATTATTAGCAAAACAT	GACGAATCTTTTTT	TGAAAGCAGACACTAATAAA	420
1/93Tab	352	GACAACCAAA	AAATCATTAGTAGAACAT	AACGACGATTTTTT	TGAAAGCAGACACTAATAAA	411
1/93Vin	421	GCCACAGTTCAA	GGTGAAATAAAAATTATCATTG	ACGAATACCCAAAATTTAAAACACAA		480
1/93Tab	412	ACCACAGTTCAA	AAATGAAATAAAAATTATCATTG	AGAATACCCAAAATTTAAAACACAA		471
1/93Vin	481	ATAAAA	ACTGCTTTAA	AATTTG		501
1/93Tab	472	ATAAAA	ACTGCTTTAG	AATTTG		492

14. ábra. A rózsameténgben, illetve a dohányban előforduló, almafáról átvitt 1/93-as izolátum *imp* gén szakaszának szekvenciabeli egyezőségei. A szekvenciák közötti eltérések az ábrán piros színnel vannak jelölve.

A klónozott *imp* génszakaszok, valamint a PCR termékek szekvenciái a filogenetikai törzsfán két fő ágon találhatóak (15. ábra). Az 1/93-as és a 17/93-as törzsek elhelyezkedésüket tekintve hasonlóságot mutatnak a *hflB* gén elemzésekor tapasztaltakkal. Az *imp* gén esetében az egy elágazáson belül található szekvenciák homogénebbek (99,6-100%), mint a *hflB* gén esetében, azonban a két fő elágazás közötti különbség mintegy 11%. A szekvenciák az NCBI nemzetközi adatbázisban (www.ncbi.nlm.nih.gov) az alábbi azonosítókkal szerepelnek: FN658472- FN658474, FN658479- FN658501.



15. ábra. A '*Ca. P. mali*' izolátumok filogenetikai távolságainak ábrázolása a klónozott 528 bp hosszúságú *imp* génszakaszokról. A szekvenciák több törzssel keverten fertőzött fákról származnak. Az AT, AP15, valamint a GDH törzsek szerepelnek referenciaként. A különböző számok az izolátumot és annak klónjait jelölik. A megszekvenált PCR termékek a fitoplazma törzs, illetve a gazdanövény nevének rövidítésével (Vin- rózsameténg, Tab- dohány) szerepelnek. Az elágazáson szereplő számok az elágazás valószínűségét jelölik százalékos formában, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis során kaptunk. Az a, illetve b jelölés az 1/93-as és a 17/93-as izolátumok klónozott inzertjeinek fő csoportjait mutatják.

4.4. Különböző virulenciájú törzsek egymásra hatásának kiértékelése molekuláris módszerekkel

4.4.1. '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens és '*Ca. P. mali*' AT virulens törzsek együttes fertőzések hatása rózsameténgen

Rózsameténgen 3 különböző időpontban állítottunk be keresztfertőzéses kísérletet, és ezeket külön-külön értékeltük. A mintavétel a második (ún. kihívó) törzssel végzett fertőzéstől számított fél év múlva kezdődött, és mintegy 2 éven át tartott.

4.4.1.1. „A” kísérleti beállítás

Az „A” jelű kísérleti beállítás esetén 3 biológiai ismétlést alkalmazva kaptuk meg azokat a ciklusszámokat, amelyek valósidejű PCR során igazolták a tesztnövényre oltott törzsek jelenlétét, vagy azok hiányát. A magas Ct értékek a vizsgált kórokozó alacsony koncentrációjára utalnak. Esetünkben a 35 ciklusszámot követően felszaporításra került mintákat negatívnak tekintettük, de már 30 ciklusszám fölött is bizonytalannak tekinthető az eredmény. Az eredményeket előfertőzött növényeknél, illetve egyidejű fertőzésben külön-külön értékeltük, valamint folyamatosan vizsgáltuk a pozitív és negatív kontroll növényeket is. Előfertőzés esetén az avirulens és a virulens törzsekkel való fertőzés között 2,5 hónap telt el.

Előfertőzés

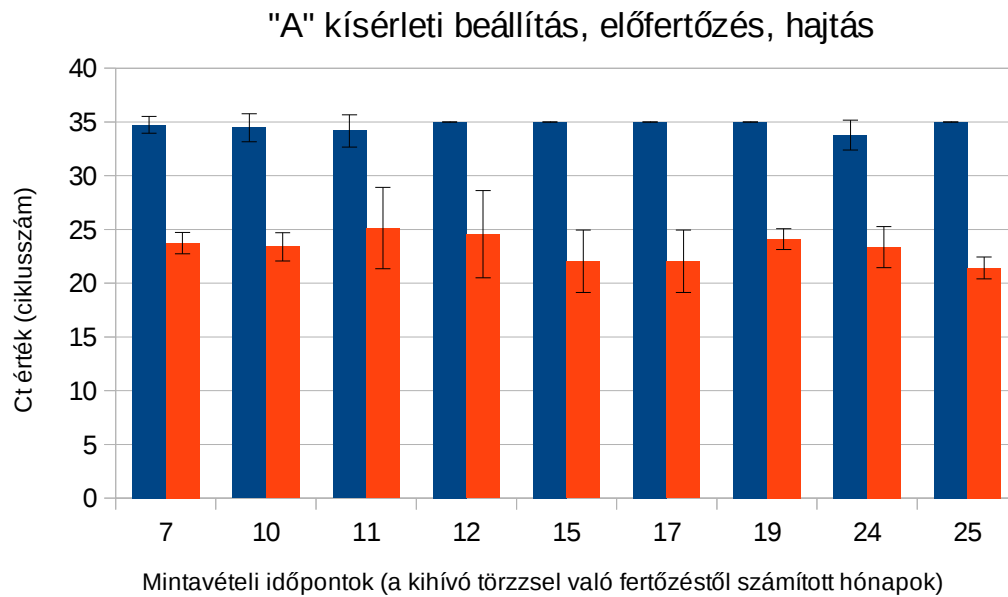
Az első „A” kísérletben a véletlenszerűen gyűjtött hajtások közül mindből sikerült kimutatni az avirulens 1/93 törzset 7 hónappal a felülfertőzést követően. Az 1/93 törzset tartalmazó hajtásból vett pozitív minták aránya a 25 hónapos vizsgálati ciklus során 92 és 100% között volt. A virulens AT törzs a mintavételi ciklus egyik időpontjában sem volt detektálható. A hajtásból vett mintákhoz hasonlóan a gyökérből izolált fitoplazma DNS minták közül az 1/93 törzset tartalmazók aránya mind a négy mintavételi időpontban, a 15. és a 24. hónapok között 80-100%-os arányú volt. Az AT törzs csak a gyökérminták 11%-ában volt kimutatható a fertőzést követő 15. hónapban, az 1. mintavételi időpontban. A többi időpontban az AT törzs már nem volt jelen detektálható mértékben (6. táblázat).

6. táblázat. Az "A" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén tapasztalt 1/93 és AT törzsek aránya a hajtásban, illetve a gyökérben. A hónapok a kihívó fertőzéstől számított mintavételi időpontokra utalnak. "n.v.": nem vizsgált.

Hónapok	Előfertőzés – pozitív detektálás aránya (%)				
	hajtás		gyökér		
	1/93	AT	1/93	AT	
7	100	0	n.v.	n.v.	
10	100	0	n.v.	n.v.	
11	92	0	n.v.	n.v.	
12	92	0	n.v.	n.v.	
15	92	0	89	11	
17	100	0	100	0	
19	100	0	100	0	
24	100	0	80	0	
25	100	0	n.v.	n.v.	

A 16. ábra a különböző mintavételi időpontokban mért átlagos ciklusszámokat ábrázolja az immunizáló és a fertőző törzs összehasonlításában a szórások bemutatásával. Mindhárom ismétlésben szembetűnő különbségeket tapasztaltunk a két törzs között a valósídejű PCR során kapott kimutathatósági küszöbértékek (Ct) alapján. Az 1. mintavételi időponttól kezdve a kísérlet végéig az 1/93-as törzs folyamatosan és nagy koncentrációban volt jelen a vizsgált növényi részekben. A törzs pozitív detektálása szinte minden esetben a 20. és a 25. ciklus között történt, az átlagos értékek a 22-23. ciklusszámok voltak. A szórások a 11. és 12. hónapban voltak magasak, ezekben az esetekben egy-egy minta csupán a 27-28. ciklus között volt detektálható. A kapott ciklusszámok alapján a kísérleti növényekben levő 1/93 törzs mennyiségében nem fedeztünk fel sem csökkenő, sem növekvő tendenciát, mennyiségük egyenletesnek volt mondható.

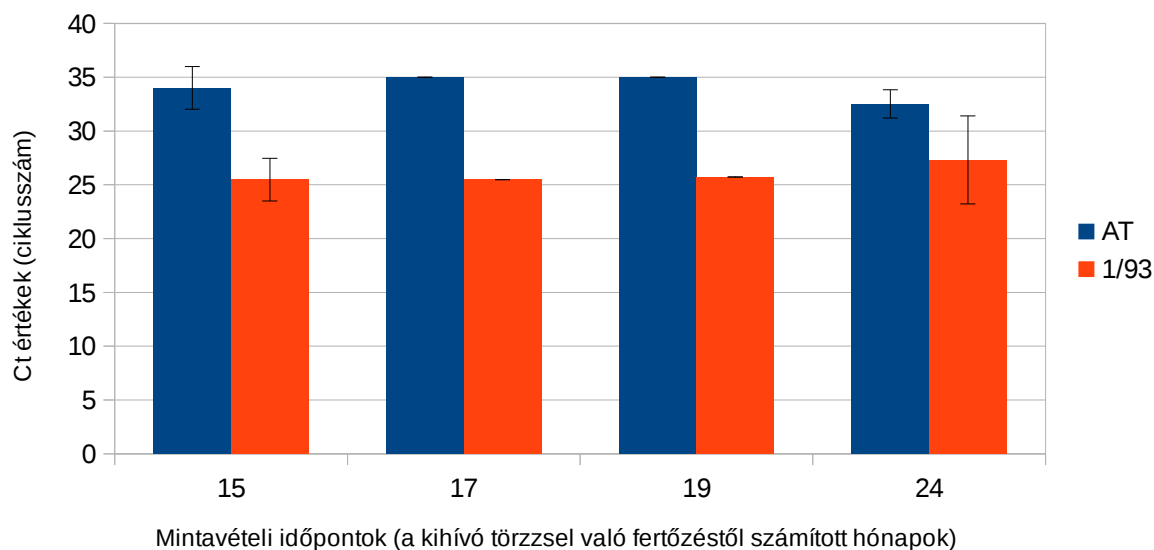
Az AT törzs kimutatása esetében a hajtásoknál sem az első, sem az utolsó, sem a többi köztes mintavételi időpontban sem kaptunk pozitív eredményt. A detektálás 3 esetben a 34. ciklusban, a többi esetben egyáltalán nem következett be, amely arra utal, hogy az AT törzs mennyisége nem érte el a kimutathatósági szintet.



16. ábra. Az "A" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén a hajtásban előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.

A gyökér 1/93-as törzs, illetve AT törzs általi kolonizációjának vizsgálata 4 időpontban történt. Eredményeink hasonlóak, mint a hajtásnál tapasztaltak. A 15., 17., 19. és 24. havi mintavételek esetében az 1/93 törzs minden alkalommal jól kimutatható volt, a fluoreszcens jelet átlagosan a 25-27. ciklusokban mértük, ettől kiugróan eltérő értékeket csupán az utolsó mintavételi időpontban tapasztaltunk. (A különbség azonban nem tekinthető szignifikánsnak.) AT törzs esetében pedig a ciklusszámok minden esetben 35 körüliek voltak, így az AT jelenléte kizárható (17. ábra). Egyes esetekben egyik törzs sem volt detektálható, ezt kísérleti hibának tudtuk be, ezért az ilyen értékeket az eredmények értékelésekor kizártuk.

"A" kísérleti beállítás, előfertőzés, gyökér



17. ábra. Az "A" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén a gyökérben előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.

A csak 1/93, vagy csak AT törzzsel fertőzött pozitív kontrollok, illetve a fertőzetlen negatív kontroll esetén a várt eredményt kaptuk. Negatív kontrollok között nem kaptunk pozitív eredményt, míg az egy fitoplazma törzzsel fertőzött növényekből következetesen kimutatható volt az adott fitoplazma törzs.

Egyidejű fertőzés

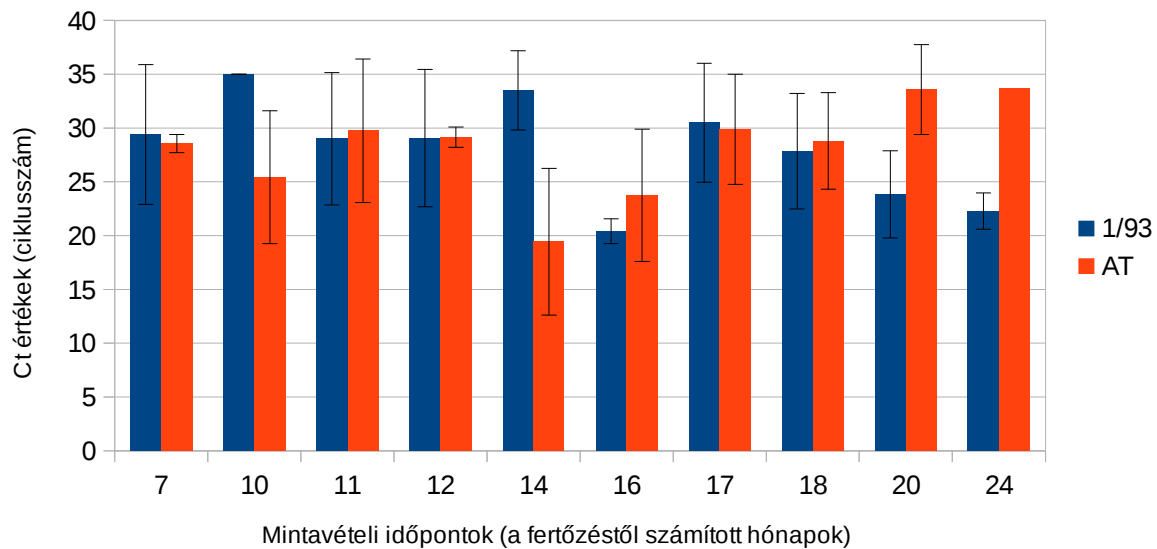
Az immunizáló törzs pozitív detektálásainak aránya a 7-24 hónapos mintavételi ciklus második felében növekvő tendenciát mutatott. A hajtásról vett minták esetében az első mintavételi időpontban mindkét törzs egyenlő arányban, a növények 50%-ában volt jelen. Az AT mennyisége a mintavételi ciklus végéhez közelítve némiképp csökkenő tendenciát mutatott, azonban még a 24. hónapban is mérhető volt 10%-os arányban. Gyökér esetében a 14. és a 20. havi mintavételi időpontban is igen magas, 67-100%-os arányban volt kimutatható az 1/93 törzs, viszont az AT ennél is magasabb, 83-100%-os arányban adott pozitív eredményt (7. táblázat).

7. táblázat. Az "A" kísérleti beállításban, egyidejű fertőzés esetén tapasztalt 1/93 és AT törzsek aránya a hajtásban, illetve a gyökérben. A hónapok a kihívó fertőzéstől számított mintavételi időpontokra utalnak. "n.v.": nem vizsgált.

Hónapok	Egyidejű fertőzés – pozitív detektálások aránya (%)			
	hajtás		gyökér	
	1/93V	AT	1/93V	AT
7	50	50	n.v.	n.v.
10	0	100	n.v.	n.v.
11	48	36	n.v.	n.v.
12	50	46	n.v.	n.v.
14	17	100	67	83
16	100	75	n.v.	n.v.
17	44	44	n.v.	n.v.
18	70	60	n.v.	n.v.
20	90	10	100	100
24	100	10	n.v.	n.v.

A teljes mintavételi ciklus időpontjaiban mért adatokat végignézve azt tapasztaltuk, hogy mind az AT, mind az 1/93-as törzs változó, egymástól többnyire független mennyiségben van jelen a vizsgált növények hajtásában. Az 1. mintavételi időpontban, (7 hónappal a fertőzést követően) mindkét törzs a kimutathatóság alsó határán mozgott, azonban az AT törzs ismétlései között találhatunk olyan mintákat, amelyek már a 23. ciklus körül is pozitív eredményt adtak. Az 1/93-as törzs majdnem a teljes mintavételi ciklus folyamán kimutatható volt a hajtásból véletlenszerűen vett mintákból, azonban a mért Ct értékek szórása meglehetősen széles tartományban mozgott. A fertőzéstől számított 20. és 24. hónapban az avirulens törzset egy eset kivételével nem sikerült detektálnunk. Az AT minták Ct értékei alapján, az 1/93-as törzs csökkenő mennyiségével ellentétben, viszonylagos növekedést figyelhettünk meg, hiszen a kísérleti időszak első felében a törzset átlagosan a 28. ciklus körül tudtuk detektálni, míg a kísérleti időszak 2. felében átlagosan már a 22-31. ciklus között kaptunk pozitív eredményt. Sok esetben a két törzs hasonló mennyiségét tapasztaltuk. A 10. és a 14. hónapban az avirulens törzs nagy mennyiségben volt jelen, míg a virulens törzs mennyisége sok esetben nem volt mérhető. A 20. és a 24. hónapokban az 1/93 avirulens törzs nagyobb mennyiségéhez az AT virulens törzs minimális, vagy egyes esetekben detektálhatósági szint alatti mennyisége párosult (18. ábra).

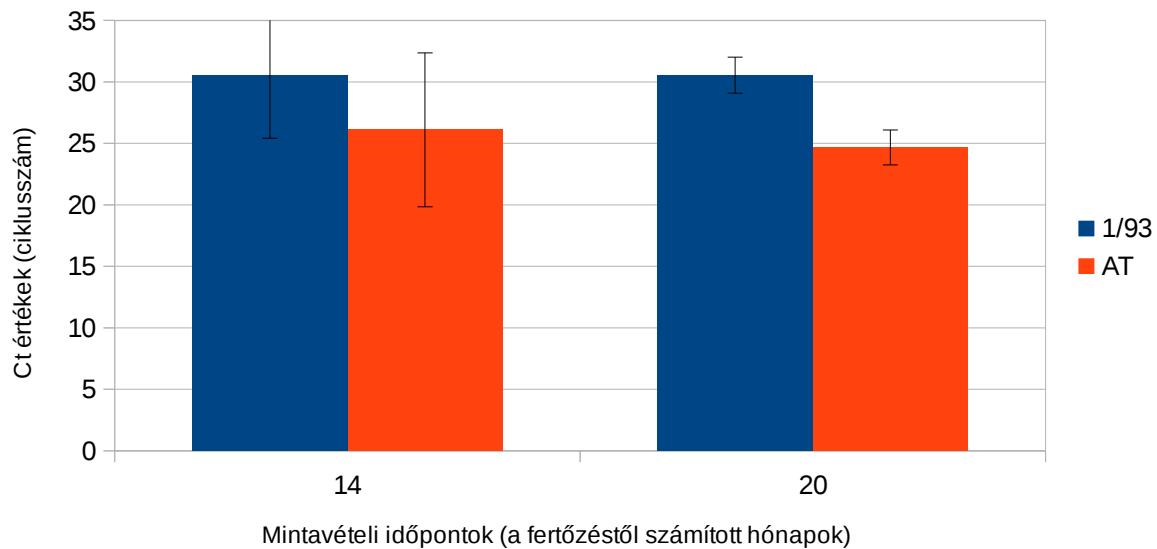
"A" kísérleti beállítás, egyidejű fertőzés, hajtás



18. ábra. Az "A" kísérleti beállításban, egyidejű fertőzés esetén a hajtásban előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.

A gyökerekből a fertőzést követő 14. és 20. hónapokban történő mintavétel eredményei a 19. ábrán láthatóak. Az első időpontban az 1/93 törzset a 25. ciklus körül sikerült detektálni magas szórás mellett. Ez az érték hasonló maradt a 20. hónapra is, bár jóval alacsonyabb szórási értékekkel. Az AT törzs 14 hónappal a fertőzést követően nagy szórás mellett egyes esetekben a 25. ciklusban is kimutathatónak bizonyult. A fitoplazma DNS a 20. hónapban átlagosan a 30. ciklus körül érte el a küszöbértéket alacsony szórás mellett.

"A" kísérleti beállítás, egyidejű fertőzés, gyökér



19. ábra. Az "A" kísérleti beállításban, egyidejű fertőzés esetén a gyökérben előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.

A csak 1/93, vagy csak AT törzssel fertőzött pozitív kontrollok, illetve a negatív kontroll esetén a várt eredményt kaptuk. Negatív kontrollok között nem kaptunk pozitív eredményt, míg az egyszeresen fertőzött növényekből megbízhatóan kimutatható volt az adott fitoplazma törzs.

Mintavétel helye szerinti detektálás

Előfertőzött növények esetében megfigyeltük, hogy a 2. mintavételi időponttól kezdve a mintavétel helye nem befolyásolta az eredményeket. Mind az AT oltási helytől távol eső, mind a közeli mintavételi pontok, valamint az oltás helyéről vett minta is AT-re negatív, 1/93-as törzsre pedig pozitív eredményt adott.

Egyidejű fertőzés esetén viszont a mintavétel helyének jelentősége volt. Az oltott hajtásról vett minták arra a törzsre nézve mutattak pozitív eredményt, amely törzssel oltva lettek, azonban az oltási pontoktól távol található helyekről vett minta véletlenszerűen volt pozitív vagy a virulens, vagy az avirulens törzsre. Ez a megfigyelés jellemző volt a teljes mintavételi periódusra. Jellemző volt az AT törzsnek a jelenléte a vizsgált növény azon hajtásában, amely az AT törzsre jellemző enyhe, vagy erősebb tüneteket mutatott.

4.4.1.2. „B” kísérleti beállítás

A „B” kísérleti beállításnál 5 biológiai ismétlést alkalmaztunk. A mintegy 2 éves kísérleti periódus során 10 alkalommal vettünk mintát. Ebben a kísérleti beállításban csak előfertőzést alkalmaztunk,

ahol az avirulens (1/93) és virulens (AT) törzsekkel való fertőzés között 3 hónap telt el. Az avirulens, illetve a virulens törzsek szaporodását valósídejű PCR-rel követtük nyomon a felszaporítási ciklusszámok alapján. A valósídejű PCR-rel kapott eredményeinket egyes esetekben SSCP módszerrel is alátámasztottuk.

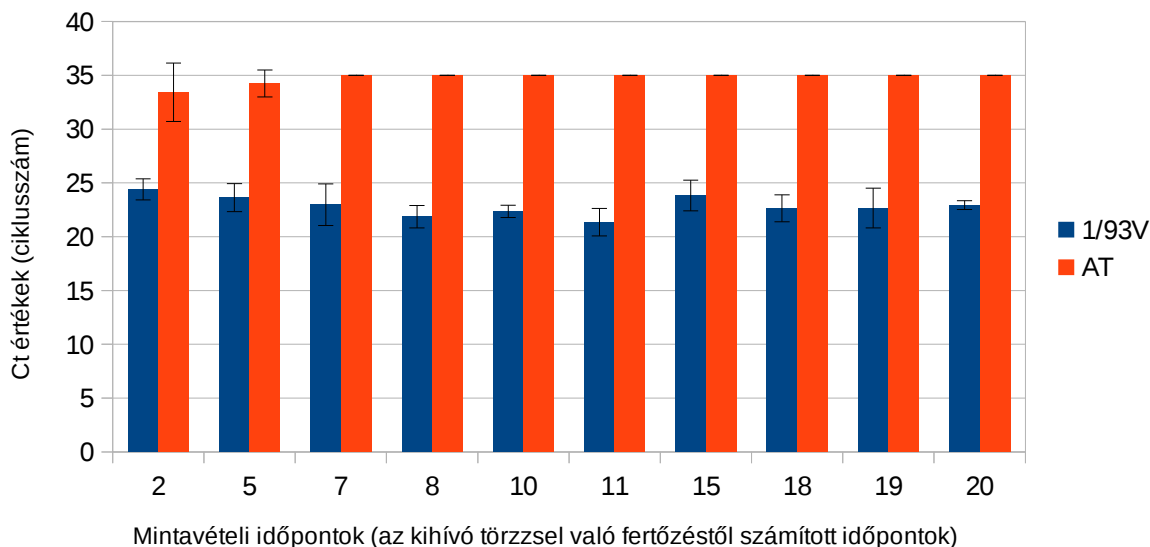
Előfertőzés

A "B" kísérleti beállításban a teljes vizsgálati periódus alatt kimutatható volt az AT, illetve az 1/93 törzsek jelenléte az egyszeresen fertőzött pozitív kontroll tesztnövényekből. A negatív kontrollban nem detektáltuk fitoplazma jelenlétét. Keresztfertőzés esetén az immunizáló törzssel való oltást követően 3 hónappal került sor a kihívó törzssel való fertőzésre. Mintavételt a kihívó AT törzssel való fertőzést követően 2, 5, 7, 8, 10, 11, 15, 18, 19 és 20 hónappal végeztünk a hajtás hánccsszövetéből. Az 1/93-as avirulens törzs mennyisége az összes mintavételi időpontban a kimutathatósági határon belül volt, a 21. és a 24. ciklus között, alacsony szórás mellett. A kihívó törzssel való fertőzést követő 2. hónapban az AT törzs jelenléte detektálható volt a 24., illetve a 29. ciklusban. Ekkor ugyanabban a növényben az 1/93 törzssel oltott hajtáson az 1/93-as törzs jelenlétét igazoltuk. Az 5. hónapban véletlenszerű hajtásról vett mintákból egységesen az 1/93 törzs jelenlétét mutattuk ki. A 8. hónapban az AT törzssel oltott hajtásokon enyhe, az AT törzsre jellemző tünetek mutatkoztak, ennek ellenére a valósídejű PCR során az 1/93-as törzset detektáltuk a 20-23. ciklusok között. A kérdéses esetekben az egyes minták hflB gén szakaszait felszaporító PCR során kapott termékeket a valósídejű PCR-nél érzékenyebb SSCP analízisnek vetettük alá. Az SSCP profil mind a 2., mind a 8. mintavételi hónapban az 1/93-as törzs jelenlétét igazolta. A 11., 15., 18., 20. hónapokban az AT törzssel oltott hajtások már nem, vagy esetenként minimális mértékben mutattak levélhullámosodást és sárgulást. Ezekből a hajtásokból nem mutattuk ki az AT jelenlétét, ellenben az 1/93-as törzs már a 21. ciklus során elérte a kimutathatósági szintet. SSCP analízis során az 1/93-as törzsre jellemző profilt kaptuk. Az említett időpontokban mind az oltások helye fölül, illetve azoktól távol eső helyekről vett mintákban csak az avirulens törzs volt detektálható, a 22-24. ciklusok között (8. táblázat, 20. ábra).

8. táblázat. A "B" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén tapasztalt 1/93 és AT törzsek aránya a hajtásban, illetve a gyökérben. A hónapok a kihívó fertőzéstől számított mintavételi időpontokra utalnak. "n.v.": nem vizsgált.

Hónapok	Előfertőzés – pozitív detektálások aránya (%)			
	hajtás		gyökér	
	1/93V	AT	1/93V	AT
2	100	0	n.v.	n.v.
5	100	0	n.v.	n.v.
7	100	0	n.v.	n.v.
8	100	0	n.v.	n.v.
10	100	0	100	0
11	100	0	n.v.	n.v.
15	100	0	100	0
18	100	0	100	0
19	100	0	n.v.	n.v.
20	100	0	n.v.	n.v.

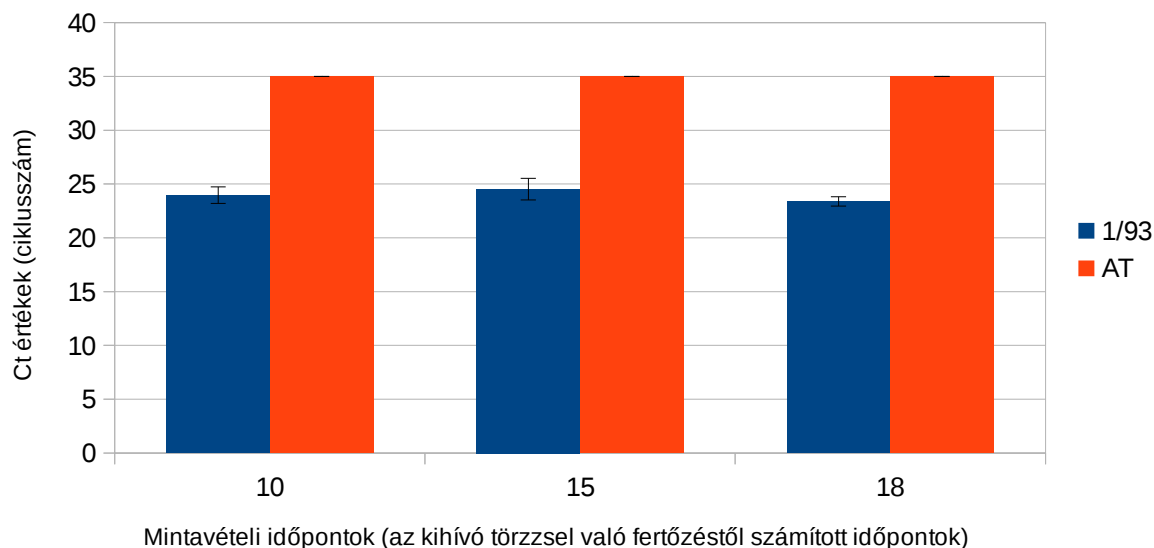
"B" kísérleti beállítás, előfertőzés, hajtás



20. ábra. A "B" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén a hajtásban előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.

Az immunizált növények gyökereiből a kihívó törzssel való fertőzéstől számított 10., 15. és 18. hónapokban vettünk mintát. Az 1/93-as törzs mindhárom időpontban a 23-24. ciklusban érte el a kimutathatósági küszöbértéket, míg az AT törzs mennyisége a kimutathatósági szint alatt volt (21. ábra). A minták SSCP profilja az 1/93-as törzsre jellemző mintázatot adta.

"B" kísérleti beállítás, előfertőzés, gyökér



21. ábra. A "B" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén a gyökérben előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatóság a ciklusszám alapján.

A 18. hónapban mind az 1/93-as törzssel, mind az AT törzssel fertőzött növények az adott fitoplazmára jellemző tünetet mutatták. Az összes mintavételi időpontban a kontrollként használt növények hajtásaiból és gyökereiből vett mintákban a fertőző törzs mennyisége a kimutathatósági tartományon belül volt. Negatív kontroll esetén nem kaptunk mérhető fluoreszcens jelet.

4.4.1.3. „C” kísérleti beállítás

Előfertőzés

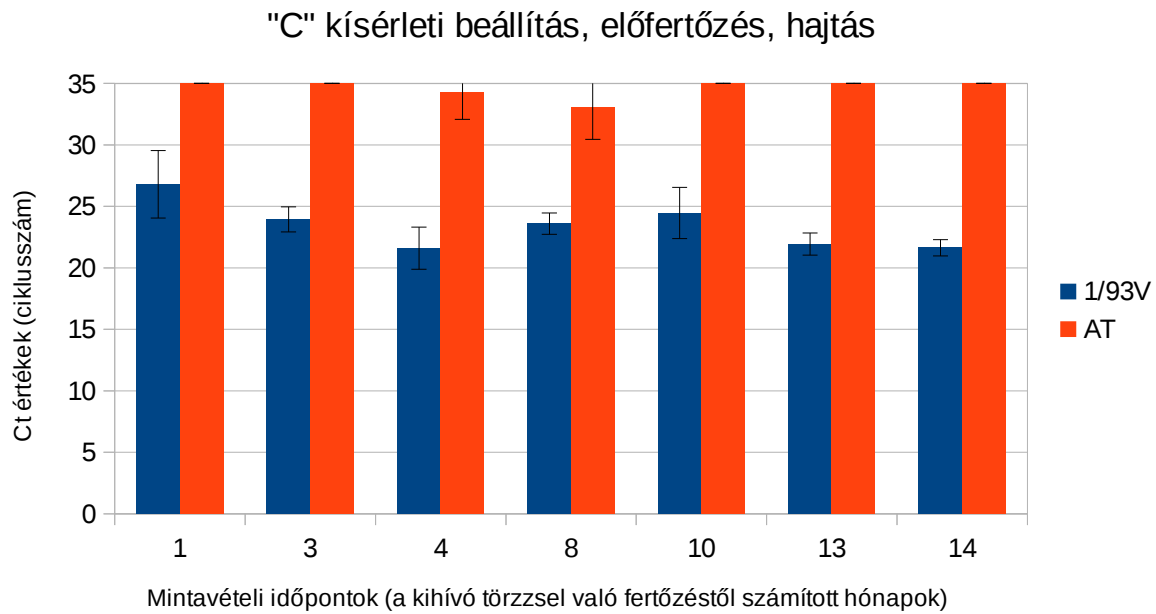
A "C" kísérleti beállításban 3 biológiai ismétléssel dolgoztunk, egyidejűleg és előfertőzött növényekkel. Előfertőzés esetén az immunizáló (1/93) és a kihívó (AT) törzsekkel való fertőzés között 4 hónap telt el. A mintavétel a kihívó törzssel való fertőzést követő 1. hónaptól kezdve 7 időpontban történt.

A vizsgálati periódus alatt az 1/93-as avirulens törzs koncentrációjának növekedését tapasztaltuk. Míg 1 hónappal a virulens törzssel való fertőzés után a kimutathatósági szintet a 27. ciklusban érte el, a 13., 14. hónapokban már átlagosan a 22. ciklusban volt detektálható. Az AT törzs már 1 hónappal a fertőzést követően sem volt kimutatható 1-2 ismétlés kivételével, alacsony szórás érték mellett. Ezt követően csak a 8. hónapban mutattuk ki 2 minta esetében az AT törzs jelenlétét. A 4. hónapban a mintavétel az 1/93, valamint az AT törzsekkel oltott hajtások alól történt. Két olyan

minta esetében, amelyek az AT törzssel fertőzött, enyhe levélhullámosodást mutató hajtásból származtak, még a 20. ciklus előtt kimutatható volt az AT törzs jelenléte, valamint az SSCP profil is az AT törzs mintázatát adta. Ugyanezen növények, oltási ponttól távol eső helyéről vett mintáiban a valósidejű PCR során csak az 1/93-as törzs volt felszaporítható, valamint az SSCP során is az 1/93-as törzsre jellemző mintázatot kaptuk. A 8. hónap mintáit az AT törzssel fertőzött hajtásról vettük, de ekkor már csak a 30. ciklus körül volt detektálható az AT törzs, míg az 1/93-as törzs a 25. ciklus előtt kimutatható volt (9. táblázat, 22. ábra). A 10. hónaptól kezdve a teszt növényeken nem figyeltük meg az AT törzsre jellemző levélhullámosodást. A 13. és 14. hónapokban már az AT hajtásról vett mintákból is csak az 1/93-as törzs volt kimutatható, amelyet az SSCP vizsgálat eredményei is megerősítettek.

9. táblázat. A "C" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén tapasztalt 1/93 és AT törzsek aránya a hajtásban, illetve a gyökérben. A hónapok a kihívó fertőzéstől számított mintavételi időpontokra utalnak. "n.v.": nem vizsgált.

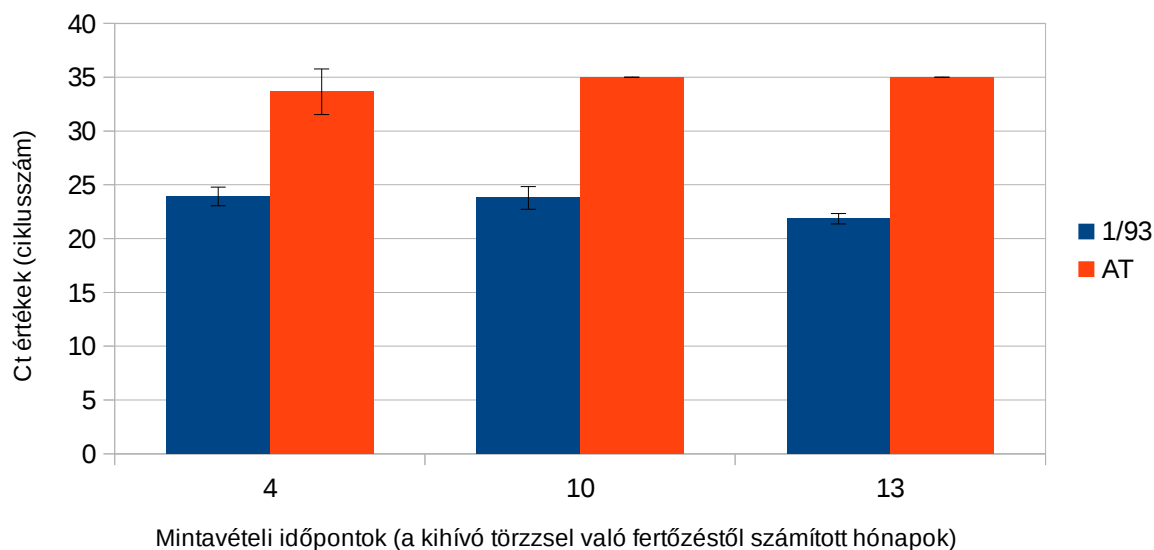
Hónapok	Előfertőzés – pozitív detektálás aránya (%)			
	hajtás		gyökér	
	1/93V	AT	1/93V	AT
1	100	0	n.v.	n.v.
3	100	0	n.v.	n.v.
4	100	10	100	0
8	100	0	n.v.	n.v.
10	100	0	100	0
13	100	0	100	0
14	100	0	n.v.	n.v.



22. ábra. A "C" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén a hajtásban előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.

Gyökérnél azt tapasztaltuk, hogy az 1/93-as törzs mennyisége a kihívó törzssel való fertőzést követő 4. hónaphoz képest a 13. hónapra nőtt, előbbi esetben a 24., utóbbiban a 22. ciklusban érte el a kimutathatósági küszöbértéket. Ugyan az AT törzs a 4. hónapban átlagosan a 35. ciklus előtt volt mérhető, de elhanyagolható mennyiségben, 10, illetve 13 hónappal a fertőzést követően már nem volt detektálható mennyiségben a növényben (23. ábra). Eredményeinket az SSCP analízis eredményeivel is alátámasztottuk.

"C" kísérleti beállítás, előfertőzés, gyökér



23. ábra. A "C" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén a gyökérben előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.

Az AT és 1/93 külön-külön felszaporítható volt minden pozitív kontroll növényről izolált mintában.

Egyidejű fertőzés

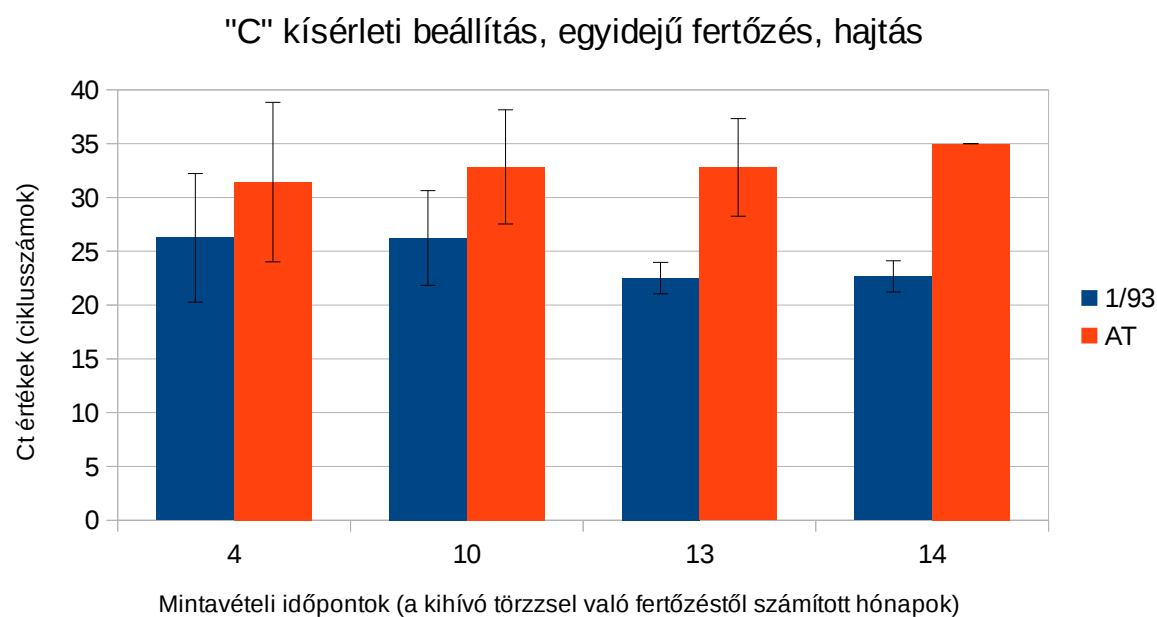
Az 1/93 és az AT törzsekkel egyidejűleg fertőzött rózsametégek hajtásából a fertőzést követő 4., 10., 13. és 14. hónapokban, gyökeréből a 10. és 13. hónapokban vettünk mintát.

A hajtás mintáinak vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az 1/93-as avirulens törzs a 4., 10. hónapokban még csak 70-80%-os arányban volt jelen a növényben, de a 13., 14. hónapokra már minden mintából kimutathatóvá vált. Ezzel ellentétesen a virulens AT törzs még a 13. hónapban is detektálható volt, a minták 20%-ában volt jelen. Egy hónappal később már nem tudtuk kimutatni a jelenlétét, de kérdéses, hogy valóban teljesen visszaszorult-e a törzs a növényben. A gyökérmintákban a fertőzést követő 10. hónapban a két törzs nagyságrendileg azonos arányát tapasztaltuk. Az 1/93-as törzs a 13. hónapban már minden mintából kimutatható volt, az AT törzs jelenlétét egy minta esetében sem igazoltuk (10. táblázat).

10. táblázat. A "C" kísérleti beállításban, egyidejű fertőzés esetén tapasztalt 1/93 és AT törzsek aránya a hajtásban, illetve a gyökérben. A hónapok a kihívó fertőzéstől számított mintavételi időpontokra utalnak. "n.v.": nem vizsgált.

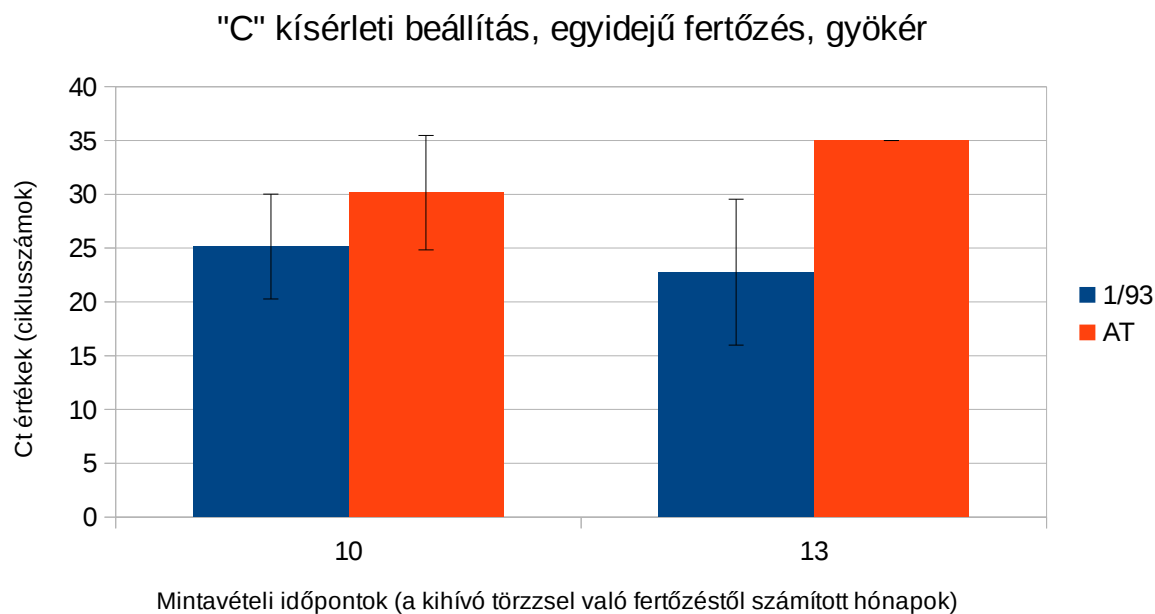
Hónapok	Egyidejű fertőzés – pozitív detektálások aránya (%)			
	hajtás		gyökér	
	1/93V	AT	1/93V	AT
4	80	20	n.v.	n.v.
10	70	10	70	50
13	100	20	100	0
14	100	0	n.v.	n.v.

A ciklusszámok tekintetében a 4. mintavételi hónapban meglehetősen nagy szórást tapasztaltunk mindét törzs esetében. A 24. ábrán jól nyomon követhető az 1/93-as törzs felszaporodása. A 14. hónapban a detektálás már a 22. ciklusban történt alacsony szórás mellett. A hónapok előrehaladtával az AT törzs mennyisége lecsökkent, a 14. hónapban már nem tudtuk kimutatni. A 4. hónapban az AT hajtásról vett minták egységesen az AT törzs jelenlétét mutatták, amelyet az SSCP profil is megerősített. Az 1/93-as hajtásokból az 1/93-as törzs volt detektálható azonos SSCP profil mellett. Azokban az esetekben, amikor a mintavétel az oltás helyétől távolabb esett, mindkét törzs kimutatható volt változó arányban.



24. ábra. A "C" kísérleti beállításban, egyidejű fertőzés esetén a hajtásban előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.

A gyökérmintákat két időpontban vizsgáltuk. A fertőzéstől számított 10. és 13. hónapban átlagosan a 25. ciklus előtt volt detektálható az 1/93-as törzs magas szórás mellett, míg az AT törzs jelenlétét csak 10 hónappal a fertőzést követően tudtuk igazolni a 25. ciklus után (25. ábra). Ahol valósidejű PCR során az AT törzset tudtuk detektálni, AT-ra jellemző SSCP mintázatot kaptunk.



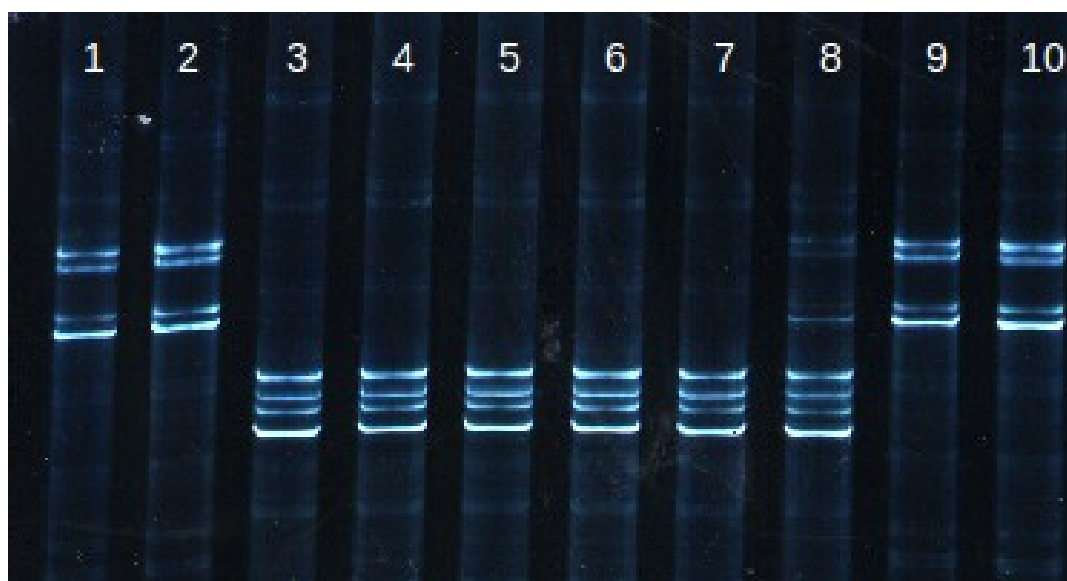
25. ábra. A "C" kísérleti beállításban, egyidejű fertőzés esetén a gyökérben előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.

Egyszeresen 1/93-as törzssel fertőzött kontroll növényből az 1/93-as, AT törzssel fertőzött növényből az AT törzs jelenlétét mutattuk ki.

4.4.1.4. A keresztfertőzés során vizsgált '*Ca. P. mali*' 1/93 és AT törzsek jelenlétének igazolása SSCP módszerrel

A hflB3_1/hflB3 indítószekvencia-párral felszaporított 528 bp hosszúságú, klónozott *hflB* génszakasz egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP) analízise során az 1/93 avirulens törzs elkülöníthetőnek bizonyult a gél futási sávjának alsó régiójában elhelyezkedő 4 sáv mintázat alapján. Ez a mintázat nagymértékben különbözött a virulens AT törzs profiljától. Az utóbbi esetben a futási sáv középső részén volt látható két egymástól elkülönülő 2-2 sávból álló profil. A törzsspecifikus mintázatok alapján a módszer alkalmasnak bizonyult az 1/93 és AT törzsek elkülönítésére, valamint az adott törzs jelenlétének, vagy hiányának kimutatására. Azokban az

esetekben, amikor az 1/93 kimutatható volt, de az AT nem, az SSCP profil megfelelt az egyszerűen, 1/93 törzssel fertőzött minták profiljának. Egyidejű fertőzéskor kapott eredményeink SSCP profilja vegyes volt, mind az AT törzsre, mind az 1/93 törzsre jellemző mintázatok megjelentek (26. ábra).



26. ábra: SSCP mintázatok a *Ca. P. mali* *hflB* 464-es génjének klónozásából. 1-2: AT, 3-4: 1/93, 5-7: 1/93+AT előfertőzéssel, a gátlásra utaló mintázattal, 8-10: 1/93+AT egyidejű fertőzéssel, a sikertelen gátlásra utaló mintázattal (véletlenszerűen választott, valósídejű PCR-rel pozitív eredményt adó minták)

4.4.2. '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens és '*Ca. P. mali*' AT virulens törzsek fertőzések hatása dohányban

A keresztvédettséget dohányban két kísérleti beállításban értékeltük, melynek során az elsőben 3, a másodikban 6 hét telt el az avirulens 1/93 törzssel való előfertőzés, illetve a virulens AT törzssel történő felülfertőzés között.

Az első kísérleti beállításban a kihívó törzssel való fertőzést követő 6., 8., 10. és 13. hónapokban, a hajtásokon véletlenszerű helyekről származó mintákból minden esetben csak az 1/93-as törzs jelenlétét igazoltuk valósídejű PCR során. Az 1/93-as törzs átlagosan a 18-25. ciklusok között érte el a kimutathatósági szintet. Ezekben a mintákban nem volt detektálható az AT törzs jelenléte. Ezzel szemben az AT törzssel fertőzött hajtásról vett mintákban a 6. és a 8. mintavételi hónapban még domináns volt az AT törzs jelenléte, és a mennyisége csupán a 14. hónapban csökkent teljesen a kimutathatósági határ alá. Hasonlóakat figyeltünk meg az AT törzssel fertőzött hajtások alól vett minták esetében is, ekkor azonban a 10. hónaptól nem volt jelen az AT törzs, míg az 1/93-as törzs minden mintából kimutatható volt (11. táblázat). Az avirulens, illetve a virulens törzsek kimutathatósága a 2. kísérleti beállításban is hasonló volt, azzal a különbséggel, hogy az AT törzssel

fertőzött hajtásokról és az azok alól gyűjtött minták esetében az AT törzs mennyisége már a kihívó fertőzést követő 8. hónapban a kimutathatósági szint alá csökkent (12. táblázat).

Pozitív kontrollok esetében csak az 1/93, illetve az AT törzset sikerült detektálnunk mindkét kísérleti beállításban az összes mintavételi időpontban.

A gyökérben a 3. hónapban vizsgáltuk a fitoplazma jelenlétét. Immunizált növények gyökerében az 1/93-as törzs 100%-ban jelen volt, míg az AT törzset egyetlen esetben sem mutattuk ki.

11. táblázat. Az 1/93 és az AT törzsek jelenlétének aránya dohány tesztnövényben az avirulens törzssel végzett 3 hetes előfertőzésben.

Az 1/93 és az AT törzsek jelenlétének aránya (%)						
Mintavételi hónap	Véletlenszerű helyről		AT törzssel fertőzött hajtásról		AT törzssel fertőzött hajtás alól	
	1/93	AT	1/93	AT	1/93	AT
6	100	0	29	71	71	29
8	100	0	50	50	93	7
10	100	0	93	7	100	0
13	100	0	100	0	100	0

12. táblázat. Az 1/93 és az AT törzsek jelenlétének aránya dohány tesztnövényben az avirulens törzssel végzett 6 hetes előfertőzésben.

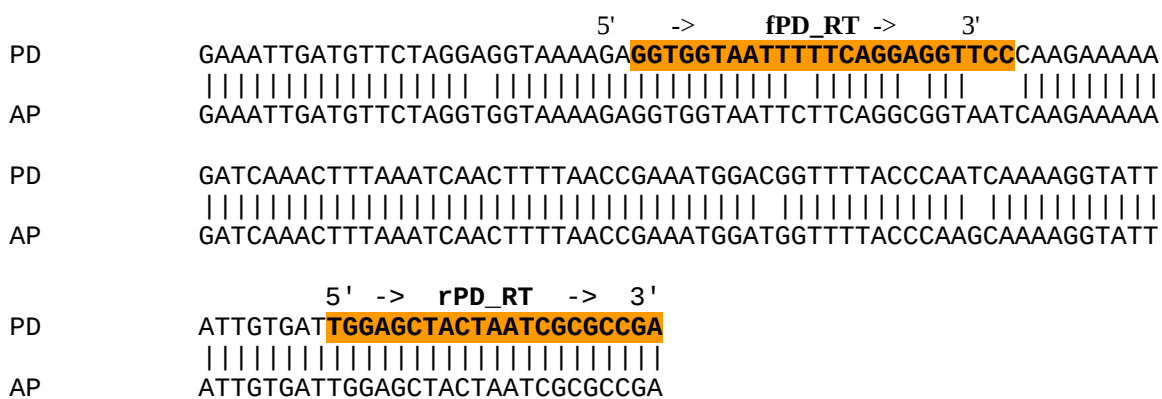
Az 1/93 és az AT törzsek jelenlétének aránya (%)						
Mintavételi hónap	Véletlenszerű helyről		AT törzssel fertőzött hajtásról		AT törzssel fertőzött hajtás alól	
	1/93	AT	1/93	AT	1/93	AT
6	100	0	86	14	93	7
8	100	0	100	0	100	0
10	100	0	100	0	100	0
13	100	0	100	0	100	0

4.4.3. 'Ca. P. mali' 1/93 és egyéb fitoplazma törzsek közötti kölcsönhatások kiértékelése PCR és valós idejű PCR vizsgálatokkal

4.4.3.1. Valós idejű PCR-hez tervezett indítószekvenciák

Az egyes fitoplazma törzsek jelenlétének és egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutatását valós idejű PCR-rel végeztük, amelyhez szükségünk volt fitoplazma fajspecifikus, valós idejű PCR-hez alkalmazható indítószekvenciákra.

A '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens és a '*Ca. P. pyri*' PD1 virulens törzsek valósidejű PCR-rel való elkülönítéséhez olyan indítószekvenciákat terveztünk, amelyek segítségével felszaporított DNS szakaszok nem hosszabbak, mint 200 bp. Az NCBI adatbázisban (www.ncbi.nlm.nih.gov) található PD izolátumok adott *hflB* génjének vagy génrészletének szekvenciáit az AP homológ szekvenciáival vetettük össze, és a legnagyobb eltérést adó szakaszra terveztük az indítószekvenciákat. Az érintett részleges *hflB* gén szakaszon 90%-os homológiát tapasztaltunk. Az NCBI adatbázisban található FM201271 azonosítójú '*Ca. P. pyri*' PD1 részleges *hflB* gén szekvenciát alapul véve (27. ábra) terveztünk PD detektálására alkalmas indítószekvencia-párt (fPD_RT/rPD_RT). A tervezett indítószekvenciák megfeleltek a rájuk vonatkozó követelményeknek, és a tesztelést, illetve a kapcsolódási hőmérséklet gradiens PCR-rel való optimalizálását követően alkalmasnak bizonyultak a PD *hflB* gén 122 bp hosszúságú szakaszának felszaporítására, az AP-t azonban nem amplifikálták. A tervezett indítószekvenciák nukleotid sorrendje a következő: fPD_RT: 5'- GGT GGT AAT TTT TCA GGA GGT TCC -3', rPD_RT: 5'- TCG GCG CGA TTA GTA GCT CCA -3'.



27. ábra. PD ('*Ca. P. pyri*', NCBI azonosító: FM201270) és AP ('*Ca. P. mali*', NCBI azonosító: FR863637) homológ *hflB* gén szakaszok összehasonlítása. A tervezett, valósidejű PCR-hez alkalmas indítószekvencia-pár (fPD_RT/rPD_RT) az ábrán narancssárga színnel van jelölve.

A '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens és a '*Ca. P. prunorum*' GSFY virulens törzseinek elkülönítését és a fitoplazma felszaporodásának nyomon követését szintén valósidejű PCR-rel végeztük. Célunk az volt, hogy az ESFY specifikus, 237 bp hosszúságú terméket adó ECA1/ECA2 (Jarausch *et al.*, 1998) indítószekvencia-pár helyett olyan primereket keressünk, melyek valósidejű PCR-hez alkalmasak, illetve amelyekkel rövidebb szakasz amplifikálható (28. ábra). Az indítószekvenciák tervezéséhez az NCBI adatbázisban található AF195780 jelű, feltételezett nitroreduktáz fehérjéj kódoló gén szekvenciáját vettük alapul. Mivel az AP detektálásához használt indítószekvenciák a *hflB* génen találhatóak, a két célgén szekvenciájának összehasonlításától eltekintettünk. A tervezett fECA_RT/rECA_RT indítószekvenciák nukleotid sorrendje: fECA_RT: 5'- AAT CAA AGA ACT

AAC ACA TTG G -3', rECA_RT: 5'- TGA CTC ATT ATT AAT TGT AAC ATT TTG -3', az általuk felszaporított szakasz hossza 184 bp. Az új indítószekvenciák az AP-t nem szaporították fel.

```

ESFY      TATTGGTGGTTTTAATAAAAAAGAAATTGAATAAATTTTTTAACATTGAAAAAATTATTT
                                     5' -> ECA1 -> 3'

ACCAACTTTAATAATAGCAATAGGAAAAAAGTTAAAAATAATCAAGAACAAGAAGTAAA
                                     5' -> fECA_RT -> 3'
AAATTTTAAAAATGAAAATCAAAGAAC TAACACATTGGTTATAATTTTTTAAAAATTAATTT
TTTATAAAATAAAATAATTAATGATCATAAATCTTTTAAAATAAATAAAGTTTTATG

ATCATTATTATTTTTAATAAATTTTTTAAATTAATAAATTTTTTAAACAACAAAATGT
                                     5' ->
rECA_RT   5' -> ECA2 -> 3'
          -> 3'
TACAATTAATAATGAGTCATTAATTTTTATAAACAAAGGGTTAACTTTTTATGGAACAAA
TAGAAAAATATATTATTATTTTATATTATAAATACACAAAAATTAATAAATCTTCAATATT

```

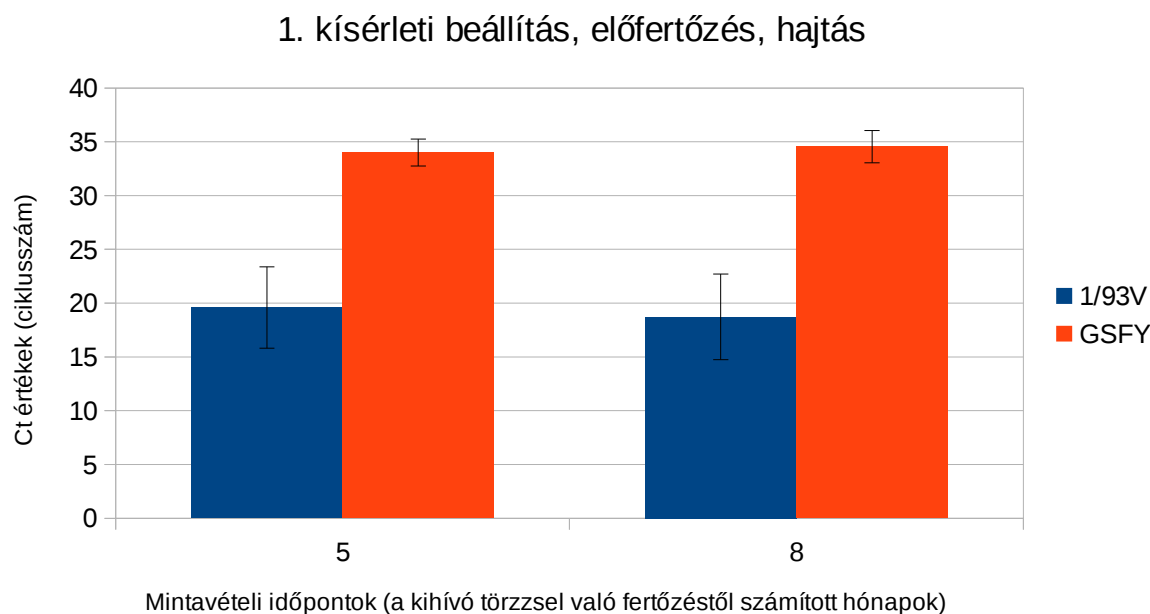
28. ábra. ESFY ('*Ca. P. prunorum*', NCBI azonosító: AF195780) nitroreduktáz-szerű gén fragmentjének szekvenciája, az új, valósidejű PCR-hez alkalmas indítószekvencia-pár (fECA_RT/rECA_RT) az ábrán narancssárga színnel jelölt.

4.4.3.2. '*Ca. P. mali* 1/93 avirulens és '*Ca. P. prunorum*' GSFY virulens törzsekkel való fertőzések hatása rózsameténgen

Polimeráz láncreakció során az 1/93-as törzssel immunizált, GSFY törzssel felülfertőzött rózsameténg növényekből az 1/93-as törzs jelenlétét mutattuk ki. Egyidejű fertőzés esetén az egyes törzsspecifikus indítószekvencia-párok mind az avirulens, mind a virulens törzs DNS szakaszát amplifikálták. Az avirulens törzs által kifejtett gátló hatás tesztelésére valósidejű PCR-t végeztünk az első kísérleti beállításban 2, a második kísérleti beállításban 5 alkalommal. Az általunk tervezett fECA_RT/rECA_RT indítószekvenciák a GSFY törzs specifikus génszakaszát amplifikálták, míg az fhf1B_RT-1/rhf1B_RT-3 primerpár az 1/93-as törzs detektálására volt alkalmas. A valósidejű PCR során a Ct értékeket (kimutathatósági küszöbértékek) hasonlítottuk egymáshoz, ez alapján következtettünk az adott fitoplazma törzs szaporodására. A 35 ciklusszám felett fluoreszcens jelet adó mintákat negatívnak értékeltük, a 30 ciklus után detektálható minták mennyiségét elhanyagolhatónak tekintettük.

Az első kísérleti beállításban a kihívó törzssel való fertőzéstől számított 5. és 8. hónapban vettünk mintát. Az első mintavételi időpontban az 1/93-as törzs átlagosan a 20. ciklusban volt detektálható

viszonylag magas szórási érték mellett, amely feltehetően a véletlenszerű helyekről történt mintavételnek köszönhető. Ebben az időpontban a GSFY törzs egyik esetben sem volt detektálható a 30. ciklus előtt. A második mintavételi időpontban hasonló eredményeket kaptunk, míg az 1/93-as törzs minden minta esetében felszaporodott, a GSFY törzs nem volt kimutatható (29. ábra). Az előfertőzött növények levelei a felülfertőzést követő 8. hónapban enyhe sárgulásos tüneteket mutattak, míg a GSFY törzssel inokulált kontroll növények levelei erőteljesen sárgultak.



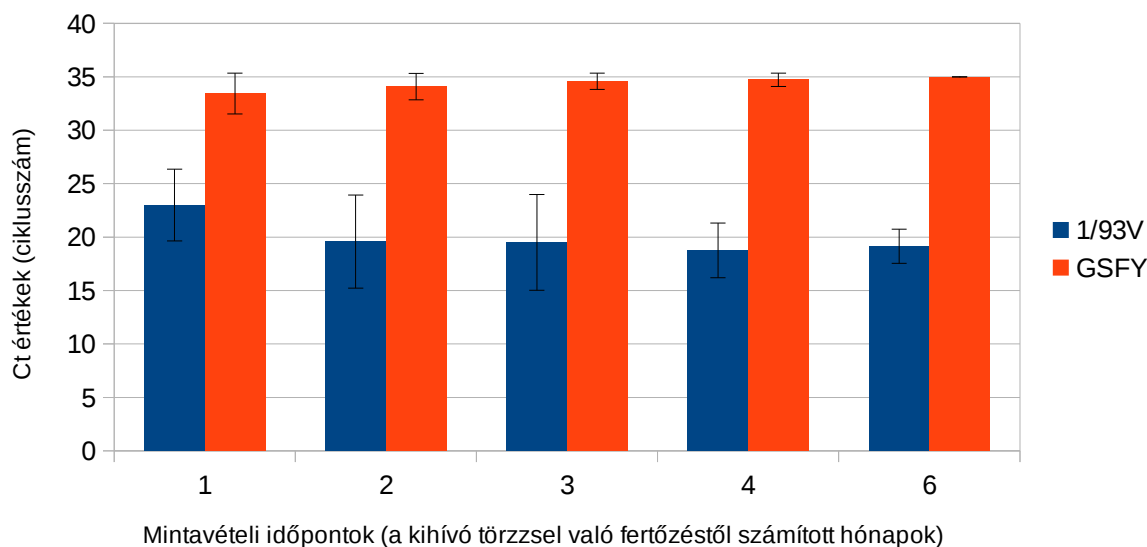
29. ábra. Az első kísérleti beállításban a rózsameténg hajtásában előforduló 1/93 és GSFY törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.

Az első kísérleti beállításban ESFY specifikus primerekkel felszaporított, GSFY-vel fertőzött pozitív kontroll minták a 25-26. ciklusban adtak mérhető fluoreszcens jelet. Az 1/93 törzssel fertőzött kontroll esetében az AP specifikus indítószekvenciákkal felszaporított DNS szakasz a 17-24. ciklusokban érte el a kimutathatósági tartományt alacsony szórás mellett. Önállóan 1/93 avirulens, vagy GSFY virulens törzssel inokulált növényekből a fertőzést követő 5. és 8. időpontban is kimutatható volt az adott törzs, míg negatív kontroll esetében nem kaptunk felszaporított terméket.

A második kísérleti beállításban a kihívó törzssel való fertőzést követő 1., 2., 3., 4. és 6. hónapokban vettünk mintát, így nyomon követtük az adott törzsek mennyiségének változását. A 30. ábrán feltüntetett értékekből kitűnik, hogy 1 hónappal a felülfertőzést követően a GSFY törzs még detektálható mennyiségben jelen volt a növényben, azonban a további időpontokra a mennyisége a

kimutathatósági érték alá, a szórási érték pedig nullára csökkent. Ezzel szemben az 1/93-as törzs mennyisége enyhén növekvő tendenciát mutatott, a felülfertőzést követő 6. hónapban átlagosan a 19. ciklusban volt kimutatható alacsony szórás mellett. A törzsek kimutathatóságát a mintavétel helye nem befolyásolta. A kísérlet során egy növény esetében a virulens törzs a 18. ciklust követően detektálható volt. Ebben az esetben azonban az avirulens törzset csupán a 27-30. ciklusban tudtuk detektálni. Ezt az eredményt kísérleti hibának tekintettük és a továbbiakban nem vettük figyelembe.

2. kísérleti beállítás, előfertőzés, hajtás



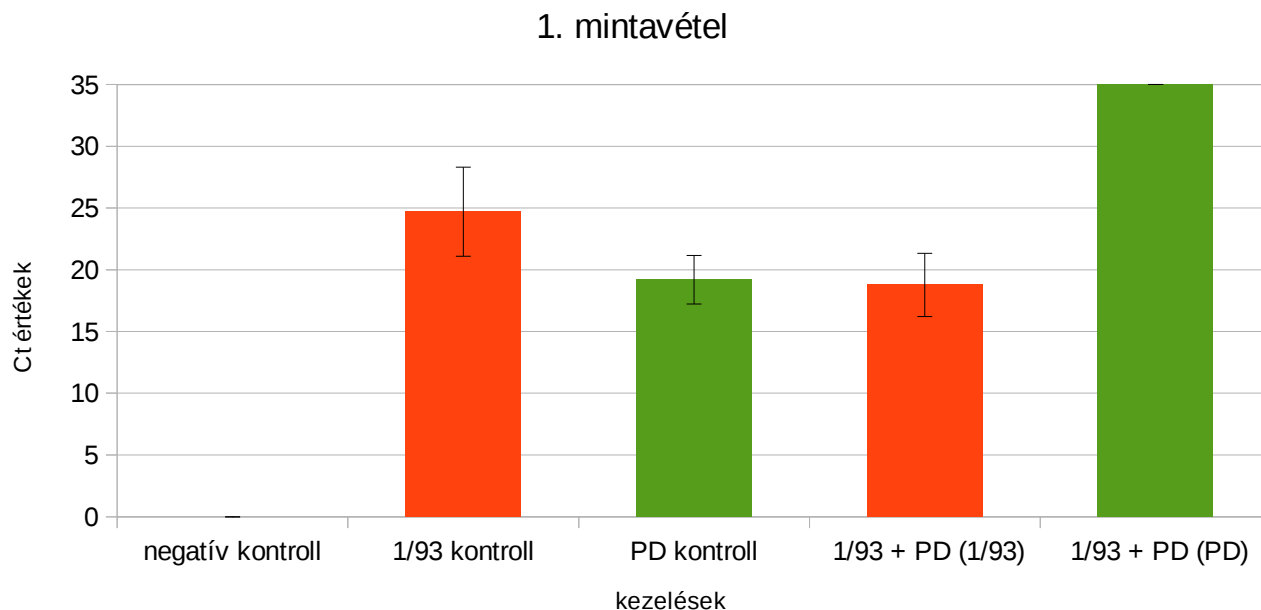
30. ábra. A második kísérleti beállításban a rózsameténg hajtásában előforduló 1/93 és GSFY törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.

Az 1/93, illetve GSFY törzsekkel fertőzött pozitív kontroll növények esetében az AP, illetve ESFY specifikus indítószekvencia-párok a 16-28, illetve a 18-24. ciklusok között szaporították fel az adott törzset a kimutathatósági küszöbértékig. A negatív kontrollok esetében nem kaptunk fluoreszcens jelet.

4.4.3.3. '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens és '*Ca. P. pyri*' PD1 virulens törzssel való fertőzés hatása rózsameténgen

Az 1/93 avirulens törzssel immunizált növények hajtásáról elsőként a kihívó törzssel való fertőzést követő 4. hónapban, a második alkalommal pedig a felülfertőzést követő 7. hónapban történt. Az első mintavételi időpontban az 1/93 törzssel, illetve a PD törzssel fertőzött kontroll növények mindegyikéből kimutatható volt az adott fitoplazma. A 31. ábra az 1. mintavételi időpontban kapott azon ciklusszámokat ábrázolja, ahol a fluoreszcens jel először volt detektálható. Negatív kontroll

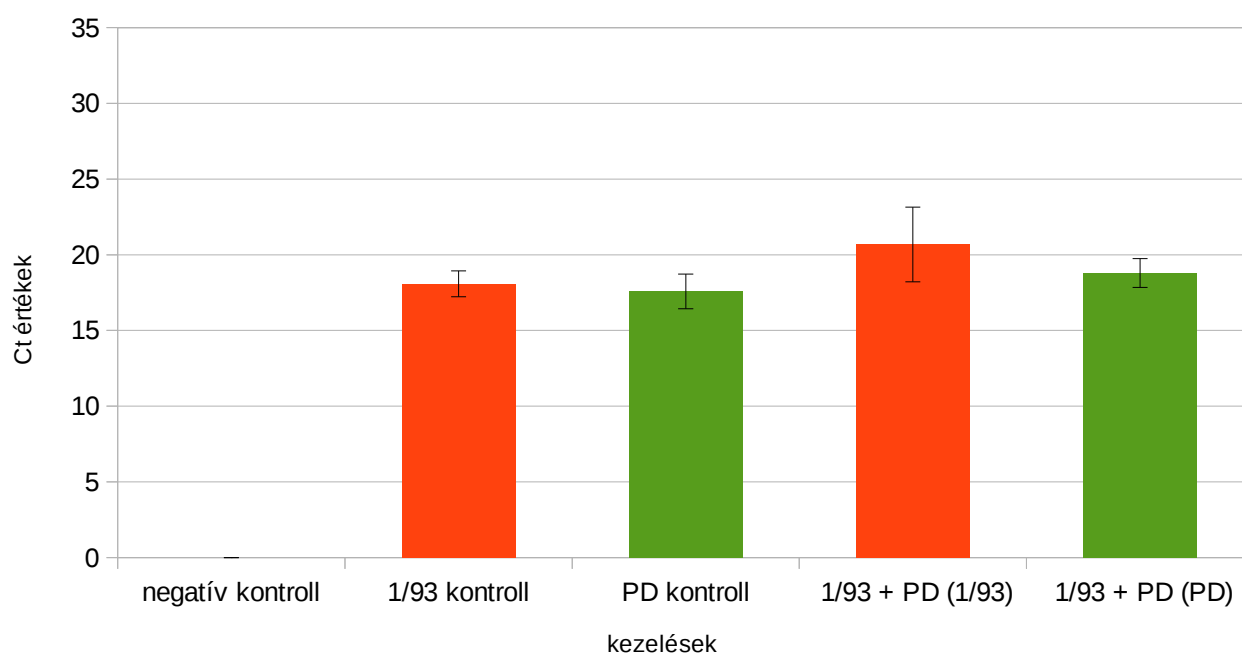
esetében mindig negatív eredményt kaptunk. Míg az 1/93 törzs nagy mennyiségben volt jelen a növényben, addig a PD1 törzs mennyisége a kimutathatósági szint alatt maradt. (A magas Ct értékek a kórokozó alacsony koncentrációban való jelenlétére utalnak.)



31. ábra. Az 1/93 és a PD törzsek egymáshoz viszonyított mennyisége 4 hónappal a kihívó törzsszel való fertőzést követően a ciklusszám (Ct érték) alapján. A pirossal jelölt oszlopok az fhfIB-RT-1/rhfIB-RT-3 indítószekvencia-párral kapott eredményeket, a zöld színű oszlopok az fPD_RT/rPD_RT indítószekvenciákkal kapott eredményeket jelölik.

A második mintavételkor gyűjtött egyszeresen 1/93, vagy PD1 törzsszel fertőzött izolátumokból az indítószekvencia-párok segítségével a specifitásaiknak megfelelő fitoplazma törzset amplifikáltuk. Negatív kontroll esetében nem kaptunk felszaporított terméket. Keresztfertőzés esetén azonban a PD1 törzs átlagosan a 18. és a 21. ciklus között vált kimutathatóvá. Az 1/93-as törzs mennyisége nagymértékben nem változott a 3 hónappal korábban mért adatokhoz képest, akkor a 19., utóbbi esetben a 21. ciklus körül szaporodott fel mérhető mennyiségben (32. ábra).

2. mintavétel



32. ábra. Az 1/93 és a PD törzsek egymáshoz viszonyított mennyisége 7 hónappal a kihívó törzsszel való fertőzést követően a ciklusszám (Ct érték) alapján. A pirossal jelölt oszlopok az fhf1B-RT-1/rhf1B-RT-3 indítószekvencia-párral kapott eredményeket, a zöld színű oszlopok az fPD_RT/rPD_RT indítószekvenciákkal kapott eredményeket jelölik.

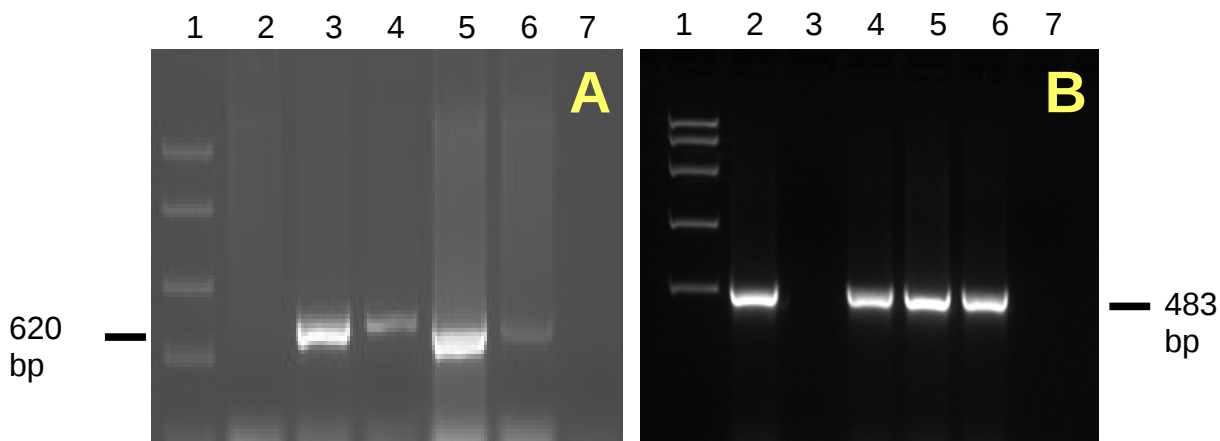
4.4.3.4. '*Ca. P. mali*' 1/93a virulens és '*Ca. P. solani*' STOL virulens törzsekkel való fertőzések hatása rózsameténgen

Az 1/93 törzs STOL törzsre kifejtett hatásának ellenőrzésére a kihívó virulens törzsszel való fertőzést követően 2 havonta vettünk mintát a rózsameténg levelének főeréből 3 alkalommal több biológiai ismétlésben. A minták PCR vizsgálatát minden izolátum esetében elvégeztük STOL specifikus (fSTOL/rSTOL), valamint AP specifikus (fhf1B3_1/rhf1B3) indítószekvencia-párral is. A STOL specifikus indítószekvenciákat alkalmazva sem az 1/93 törzsszel fertőzött növényi minta DNS szakasza, sem a negatív kontroll nem adott amplifikációs terméket. A STOL törzset tartalmazó minta esetében megkaptuk a kívánt 570 bp hosszúságú terméket. Ehhez hasonlóan Az AP specifikus indítószekvencia-pár nem szaporította fel sem a STOL, sem a desztillált vizes kontroll megfelelő DNS szakaszát, míg az 1/93-as kontrollnál a PCR reakció a várt 483 bp hosszúságú amplifikációs terméket eredményezte (33. ábra).

Az 1/93 és STOL törzsekkel egyidejűleg fertőzött rózsameténgből izolált DNS minták PCR-es vizsgálatánál mind az AP specifikus, mind a STOL specifikus indítószekvenciákkal minden esetben és ismétlésben is pozitív eredményt, azaz 483, valamint 620 bp hosszúságú amplifikációs termékeket

kaptunk (33. ábra).

Ezen eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az 1/93 törzs nem gátolja a STOL terjedését a növényen belül, így további molekuláris vizsgálatokat nem végeztünk a STOL törzssel kapcsolatban.



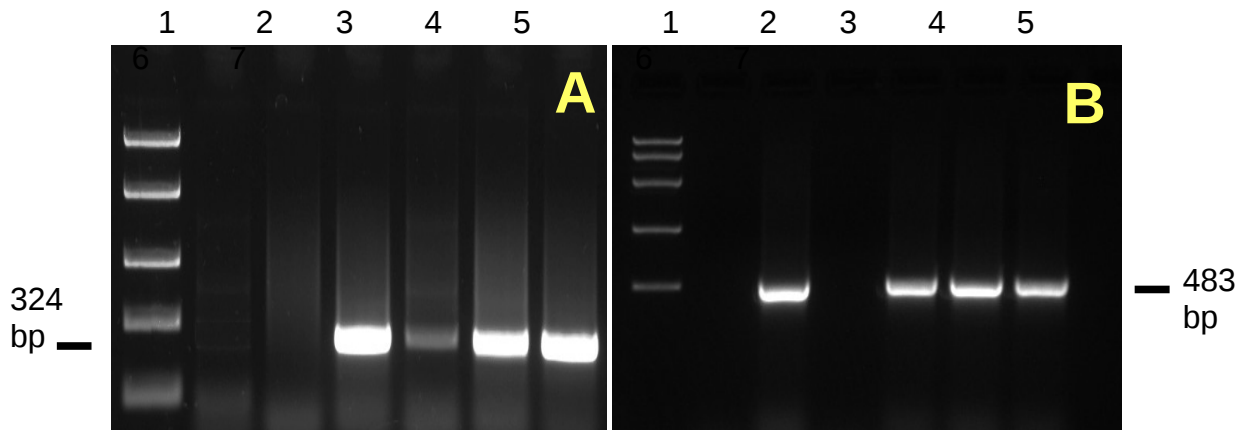
33. ábra. Az 1/93 + STOL keresztfertőzéses kísérletben PCR-rel felszaporított különböző hosszúságú DNS szakaszok agaróz géles ellenőrzése 6 hónappal a kihívó törzsszel való fertőzést követően. A: PCR fSTOL/rSTOL indítószekvencia-pár alkalmazásával: 1. molekuláris méretmarker (Middle Range, Fermentas) 2. 1/93 3. STOL 4. 1/93 + STOL egyidejű fertőzés 5-6. 1/93 + STOL előfertőzés 7. negatív kontroll; B: PCR fhf1B3_1/rhf1B3 indítószekvencia-pár alkalmazásával: 1. molekuláris méretmarker (High Range, Fermentas) 2. 1/93 3. STOL 4. 1/93 + STOL egyidejű fertőzés 5-6. 1/93+STOL előfertőzés 7. negatív kontroll.

4.4.3.5. '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens és '*Ca. P. asteris*' AAY1 virulens törzsekkel való fertőzések hatása rózsameténgen

Az 1/93 és AAY törzsek kölcsönhatásának vizsgálatokor 2, 4, illetve 6 hónappal a felülfertőzést követően végeztünk mintavételt az egyszerűen 1/93, illetve AAY1 törzsekkel fertőzött, előfertőzött és egyidejűleg fertőzött rózsameténg leveleinek főeréből. A minták PCR vizsgálatát minden izolátumnál elvégeztük AY specifikus (fAY/rAY), valamint az AP specifikus (fhf1B3_1/rhf1B3) indítószekvencia-párral is.

Az AY specifikus indítószekvencia-pár felhasználásával az 1/93, illetve a negatív kontrollok nem voltak felszaporíthatók, az AY fertőzött pozitív kontroll esetében azonban megkaptuk a várt 324 bp hosszúságú amplifikációs terméket. Hasonlóképpen működött a reakció az AP specifikus indítószekvenciákat használva is. Ekkor az 1/93-as törzsszel fertőzött minta adott egyértelmű, 528 bp hosszúságú terméket, míg negatív, illetve vizes kontroll esetén nem kaptunk amplifikációs terméket (34. ábra).

Keresztfertőzés esetén mind az előfertőzött, mind az egyidejűleg fertőzött minták megfelelő hosszúságú DNS szakaszait sikeresen szaporította fel külön-külön az AP, illetve az AY specifikus indítószekvencia-pár (34. ábra) a felülfertőzést követő 6 hónapban is. Ezek alapján feltehetően sem a virulens, sem az avirulens törzs növényen belüli koncentrációja nem változott jelentősen.



34. ábra. Az 1/93 + AAY1 keresztfertőzéses kísérletben PCR-rel felszaporított különböző hosszúságú DNS szakaszok agaróz géles ellenőrzése 6 hónappal a kihívó törzssel való fertőzést követően. A: PCR fAY/rAY indítószekvencia-pár alkalmazásával: 1. molekuláris méretmarker (Middle Range, Fermentas) 2. negatív kontroll 3. 1/93 4. AAY1 5-6. 1/93 + AAY1 előfertőzés 7. 1/93 + AAY1 egyidejű fertőzés; B: PCR fhflB3_1/rhflB3 indítószekvencia-pár alkalmazásával: 1. molekuláris méretmarker (High Range, Fermentas) 2. negatív kontroll 3. 1/93 4. AAY1 5-6. 1/93 + AAY1 előfertőzés 7. 1/93 + AAY1 egyidejű fertőzés.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A fitoplazmás betegségek okozta tünetek rózsameténg tesztnövényen jól megfigyelhetők, hamar és jól felismerhető formában jelennek meg. Üvegházi kísérleteink során az AP, PD, ESFY, AY és STOL fitoplazmákkal fertőzött rózsameténg tesztnövényeken kísértük figyelemmel a tünetek kialakulását. Az egyéves megfigyelési periódus alatt azt tapasztaltuk, hogy bizonyos fitoplazmák erőteljesebb tüneteket okoznak a növényen, sőt egy fajon belül a törzsek eltérő virulenciáját is tapasztaltuk, amely egyezik Seemüller (2007) virulenciára vonatkozó megfigyeléseivel. Az egészséges kontroll növényekhez képest a '*Ca. P. mali*' 1/93-as törzs okozta a legkisebb mértékű elváltozást rózsameténgen: csupán a levelek enyhe fokú méretbeli csökkenését tapasztaltuk. Ezzel szemben a '*Ca. P. mali*' AT törzse komoly, szemmel látható deformációkat okozott a tesztnövényben. A tüneteket tekintve a '*Ca. P. pyri*' PD1 törzse által okozott szimptómák kevésbé voltak erőteljesek, ám a '*Ca. P. prunorum*' GSFY, a '*Ca. P. asteris*' AAY1 és a '*Ca. P. solani*' STOL törzsei súlyos, szabad szemmel jól látható elváltozásokat okoztak.

A tünetek szemrevételezésén túl megvizsgáltuk a rózsameténg tesztnövények hajtásának vastagságában bekövetkezett változásokat, amelyek szintén utalnak az adott fitoplazma virulenciájára. A mérés egy éves időtartama alatt minden mintavétel elemzésekor a fertőzetlen kontroll növények hajtásai bizonyultak a legvastagabbnak, legéletképesebbnek. Eredményeink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az 1/93-as törzs 6 és 12 hónappal a fertőzést követően a kontrollhoz hasonló mértékben hatott a növényre, az esetlegesen fellépő különbségek inkább a növény előregedésének voltak betudhatók. A PD1 törzs enyhe mértékben befolyásolta a hajtás vastagságát, azonban a virulens AT, STOL, GSFY és AAY1 törzsekkel való fertőzés hatására a hajtás szignifikáns elvékonyodását figyeltük meg már 8 hónappal a fertőzést követően. Tehát a hajtásvastagság vizsgálatok eredményei egybevágtak a különböző virulenciájú fitoplazma törzsek által okozott szemmel látható tünetekkel. Sajnos a jelenlegi üvegházi körülményeink nem bizonyultak alkalmasnak arra, hogy a fitoplazmák felszaporodásával és az átmérő alakulásával kapcsolatos összefüggéseket az idő előrehaladtával tanulmányozni tudjuk. Ehhez sokkal egyenletesebb és szabályozottabb körülményekre van szükség.

Az egyes fitoplazmák között tapasztalható virulenciabeli eltérés igazolását követően részletesebben foglalkoztunk az egyes fitoplazma törzsek növényen belüli kölcsönhatásaival. A '*Ca. P. mali*' törzsei között fellépő genetikai változékonyságot először az AT törzs Southern blot hibridizációs vizsgálata során fedezték fel (Bonnet *et al.*, 1990), melyet más molekuláris vizsgálatok is követtek. Seemüller és Schneider (2007) a '*Ca. P. mali*' törzseit vizsgálták, és azt feltételezték, hogy a megjelenő tünetek a fertőzést okozó fitoplazma törzs virulenciájától függenek. A tünetek megjelenését az együttesen jelen levő fitoplazma törzsek dominanciája, valamint a fitoplazma populáció összetétele is befolyásolja. A populáción belül bekövetkező változások a jellegzetes tünetek enyhüléséhez

vezethetnek (Carraro *et al.*, 2004; Seemüller *et al.*, 2010). Kísérleteinkben különböző almafákból származó izolátumokban egy, vagy több fitoplazma törzs együttes jelenlétét is igazoltuk a PCR termékek SSCP profilja alapján. Az almafában együttesen előforduló '*Ca. P. mali*' törzsek között általában virulens és avirulens törzsek is megtalálhatók voltak. Tapasztalataink szerint az avirulens és virulens törzsek közötti kölcsönhatások eredményeképp a populációk aránya változhat, amelyek a tünetek kifejeződését is befolyásolja. A törzsek szaporodási feltételei is hatással lehetnek az azok arányában bekövetkező változásokra, amelyek szintén fontos szerepet játszhatnak az AP-ra jellemző tünetek kialakulásában, vagy a tünetmentességben. Megfigyeltük, hogy néhány, a szabadföldi állományban erősen virulens törzs átoltást követően veszített a virulenciájából (Seemüller, szóbeli közlés). Mivel a virulens és avirulens törzsek egyenlő arányban voltak jelen, feltételezhetően az avirulens törzs összetevői gátolhatták a virulenciafaktorokat. Az alacsony virulenciaszint kialakulásában azonban feltételezhetően más mechanizmusok is szerepet játszhattak. Abban az esetben, amikor a boszorkányseprűs tüneteket mutatták a fák, egyszeres (csak az AT törzsre jellemző) SSCP profilt mutattak, míg a nem tünetes ágrészekről izolált mintákból az 1/93-as törzsre jellemző mintázatot kaptuk. A nem összetett izolátumokat vizsgálva Seemüller és munkatársai (2010) arra a következtetésre jutottak, hogy azok a *hflB* gén szekvenciája alapján nagyfokú szekvenciabeli egyezőséget mutatnak. A komplex SSCP profillal rendelkező izolátumok 2-3, vagy 4 különböző mintázattal álltak. Ezzel párhuzamosan a tünetmentes fákról izolált 1/93-as törzs esetében 4 különböző SSCP profilt is kaptunk. Azt tapasztaltuk, hogy azok a '*Ca. P. mali*' izolátumok, amelyek komplex mintázatot mutattak poliakrilamid gélben akár 2-3 különböző '*Ca. P. mali*' törzset is magukba foglalhatnak. Megfigyeléseink alapján a több törzsszel egyszerre fertőzött fák több, mint 10 évesek voltak. Ez a vektorok több éven át tartó fertőzési tevékenységével magyarázható.

Az 1/93-as komplex törzs jellemzésekor azt figyeltük meg, hogy rózsameténg, illetve közönséges dohány tesztnövényekre átoltva a törzsek nagy specifikusságot mutattak. A rózsameténgben, illetve a dohányban szaporodó 1/93-as törzset részleges *hflB*, valamint *imp* génjeik szekvenciái alapján is összehasonlítottuk, és azt tapasztaltuk, hogy azok előbbi esetben 97%, utóbbi esetben csupán 87%-os homológiát mutattak. Feltételezzük, hogy a dohányon szaporodó 1/93-as törzs rózsameténgen is képes életben maradni, majd dohányra visszaoltva újra szaporodik. Ezen tulajdonságok alapján következtettünk arra, hogy a fitoplazma átviteléhez használt aranka vektor egy törzs átvitelét preferálja, amely szoros összefüggést mutat a fitoplazmák gazdanövény-preferenciájával. Feltételezhető, hogy mindkét törzs jelen lehet mindkét tesztnövényben, azonban eltérő fitnessük következtében a predomináns törzs jelenléte meghatározó. Mindazonáltal mind a rózsameténgben, mind a dohányban szaporodó 1/93-as törzsre jellemző SSCP mintázat újra megjelent abban az esetben, amikor az almára visszavitt 1/93-as törzset vizsgáltuk. Ezen eredményeink megerősítik a

kevert fertőzések növénykórtani jelentőségét különös tekintettel a tünetek megjelenésére. Amennyiben az almafából több fitoplazma törzs is izolálható volt, azonban azok avirulensek, vagy enyhén fertőzők voltak, nem tapasztaltuk specifikus tünetek megjelenését. Sok esetben a tünetek kialakulásáért egy különálló törzs volt felelős, amely egyedi SSCP profillal rendelkezett. Azok a törzsek, amelyek az almafán csak enyhe tüneteket okoztak, rózsameténg és dohány tesztnövényeken csupán csekély szimptomák megjelenését indukálták.

Az egyszerű SSCP mintázattal rendelkező izolátumok *hflB* gén szakaszainak klónozott inszertjei nagymértékben uniformnak bizonyultak (Seemüller *et al.*, 2010). Az összetett SSCP profillal rendelkező törzsek (1/93, 17/93) *hflB* gén szakaszait vizsgálva azt feltételeztük, hogy azok együttesen lehetnek jelen egy kevert fertőzésben egyetlen almafán belül. Ezen feltételezésünket a genetikai variabilitás és a filogenetikai törzsfá elemzésével támasztottuk alá. A klónozott *hflB* gén fragmentjeinek szekvencia-analízise során nagyfokú heterogenitást, valamint nukleotid sorrendbeli eltérést tapasztaltunk. Megfigyeltük, hogy egyes 1/93-as és 17/93-as izolátumok a virulens referencia törzsekhez közel helyezkedtek el, míg bizonyos változatok minimális szekvenciabeli eltérést mutattak. A nagyon enyhe tüneteket mutató, vagy tünetmentes fákról izolált törzskomplexeket avirulens, vagy enyhén virulens törzsek alkották. Ezek alapján azt állíthatjuk, hogy a legtöbb fitoplazma törzsekkel keverten fertőzött fa mind enyhe, mind erősen fertőző törzset is tartalmazott. Ezt a különbséget Seemüller és munkatársai (2013) molekuláris markerek elemzésével a nukleinsavak, illetve az aminosavak szintjén is tudták bizonyítani. A vizsgálatainkat az *imp* génnel is elvégeztük, amely csak egyetlen kópiában van jelen, így kizártuk egy esetleges keresztreakció lehetőségét a több kópiában jelen lévő *hflB* géneknél. Habár az *imp* gén SSCP analízise nem bizonyult elég változékonynak az egyes törzsek elkülönítéséhez, a specifikus mintázatok alapján szintén több törzs együttes jelenlétére következtettünk. A különböző SSCP profillal rendelkező inszertek a filogenetikai törzsfán egymástól távol helyezkedtek el. Ezek a szekvenciabeli eltérések az *imp* gén tulajdonságait figyelembe véve szintén arra utalnak, hogy a fertőzésben együttesen több törzs vesz részt. Az 1/93-as törzs *imp* génjén PCR termékének szekvenciáját filogenetikai törzsfán ábrázolva azt tapasztaltuk, hogy a dohányból származó törzs szekvenciája hasonlóságot mutatott az AT törzs *imp* gén szakaszának nukleotid sorrendjével, míg a rózsameténgből izolált törzs azoktól távolabb helyezkedett el.

Vizsgálataink nyomán bizonyossá vált, hogy a 'Ca. P. mali' különböző törzsei által kiváltott tünetek egyetlen formában történő megjelenése legnagyobb bizonyossággal a kevert fertőzéseknek köszönhető. A vizsgált mintáink 50%-nál is magasabb arányban bizonyultak több, akár 2-5 törzsszel fertőzöttnek. Ennek ellenére a valóságban a többszörösen, vegyesen fertőzött fák aránya még magasabb lehet. Megfigyeltük, hogy egy olyan fában, amely az 1/93-as törzs komplex-szel fertőzött, a kórokozó a gyökérből még abban az esetben is kimutatható, amennyiben a tünetek nem jelentkeznek. Ennek

oka egyrészt a fitoplazma populációk összetételében, a köztük lévő predominanciában keresendő, de feltételezhetjük olyan avirulens törzsek jelenlétét is, amelyek gátló hatást képesek kifejteni más, jelen levő virulens törzsekkel szemben.

A rózsameténgben szaporodó avirulens 1/93-as törzzsel kapcsolatos keresztvédettség molekuláris hátterének feltérképezésével jobban megérthetők az egyes fitoplazmák közötti kölcsönhatások mechanizmusai. A különböző fitoplazma törzsek között fennálló antagonista hatásról már a múlt század közepe óta vannak ismereteink. Akkor, molekuláris módszerek hiányában a '*Ca. P. asteris*' eltérő virulenciájú törzsei között kialakuló gátló hatásra a tünetek megjelenése alapján következtettek (Kunkel, 1955). Freitag (1964) megállapította, hogy az antagonista törzs abban az esetben is képes volt gátolni a kihívó, virulens törzs szaporodását a növényben, amennyiben azt 1-2 héttel később oltották a növényre, valamint megfigyelte, hogy a keresztvédettség csak közeli rokonságban álló törzsek között működik hatékonyan.

Keresztvédettségi kísérleteink eredményeképpen igazoltuk azt a feltevést, hogy a törzsek közötti gátlás csak abban az esetben működhet hatékonyan, amennyiben a két törzs azonos rendszertani csoportba tartozik. A Schneider és Seemüller (2007) által avirulens törzsként jellemzett 1/93-as törzs antagonista hatásáról Seemüller és munkatársai számoltak be (2010) egy kevert fertőzéses vizsgálatban. Munkánk során a Seemüller és munkatársai (1998) által kialakított 16SrX rendszertani csoportba tartozó '*Ca. P. mali*' 1/93-as avirulens törzs által kifejtett gátló hatást ellenőriztük az azonos csoportba tartozó '*Ca. P. mali*' AT, '*Ca. P. pyri*' PD1, '*Ca. P. prunorum*' GSFY, valamint a 16SrI csoportba tartozó '*Ca. P. asteris*' AAY1 és a 16SrXII csoportba tartozó '*Ca. P. solani*' STOL virulens törzsekkel szemben. Azt tapasztaltuk, hogy a fajon belüli AT törzzsel szemben rózsameténg tesztnövényben az 1/93-as törzs képes gátló hatást kifejteni, amennyiben a növény immunizálása az avirulens törzzsel legalább a kihívó törzzsel való fertőzést megelőzően 2 hónappal történt. A három kísérleti beállításban a két törzzsel való fertőzés között 2,5, 3, illetve 4 hónap telt el. Abban az esetben, amikor a két oltás között 2,5 hónap telt el, az avirulens törzs már 7 hónap elteltével nagy mennyiségben volt jelen a növényben, azonban az AT nem volt kimutatható egy-két kivételtől eltekintve. A jelen levő törzsek valós idejű PCR során a 20-25. ciklusok között felszaporíthatók voltak a kimutathatósági határ fölé. Megfigyeléseink szerint ahol az AT felszaporítható volt, ott az 1/93-as törzs mennyisége nem volt elegendő az első mintavételi időponttól kezdve. Ebből arra következtettünk, hogy az avirulens törzs alacsony fitnessze, kis mennyisége nem elegendő a növény sikeres immunizálásához. Előfertőzés esetén a sikeres gátlás több mint 2 éven keresztül igazolható volt molekuláris módszerekkel. A virulens törzs mennyisége legfeljebb 15 hónap alatt csökkent a kimutathatósági szint alá, és a további vizsgálatok során sem volt kimutatható. Egyidejű fertőzés esetén az 1/93-as törzs mennyisége nagyjából állandó szinten maradt, ezzel szemben az AT törzs enyhe mértékű csökkenését tapasztaltuk, de 2 év után is detektálható mennyiségben volt jelen.

Tapasztalataink alapján a gyökér érzékenyebbnek bizonyult mind előfertőzés, mind egyidejű fertőzés esetében. A virulens fitoplazma jelenléte hosszabb ideig volt kimutatható, utalva arra, hogy a kolonizáció mértéke a gyökérben a legmagasabb (Seemüller, 2010).

Abban az esetben, amikor a két oltás között 3 hónap telt el, az 1/93-as törzs képes volt immunizálni a növényt, és az előző kísérleti beállításhoz képest a virulens törzs már a 8. hónapra visszaszorult a kimutathatósági szint alá. A gyökeret vizsgálva a virulens törzs a 10. hónapra csökkent a kimutathatósági szint alá.

Amennyiben az avirulens és a virulens törzsekkel való fertőzések között több idő, 4 hónap telt el, jelentős különbségeket tapasztaltunk az előző két kísérleti beállításhoz képest. A kihívó (AT) törzssel való fertőzést követően 3 hónappal már nem volt detektálható a virulens (AT) törzs mennyisége a rózsameténg hajtásában. Ez a tendencia a gyökérben is megfigyelhető volt: ott a 4. hónapot követően csökkent az AT mennyisége a kimutathatósági szint alá. Az AT törzs magasabb túlélési aránya a gyökérben arra utal, hogy a fitoplazma kolonizációja a gyökér felől indul (Seemüller, 2010).

Fenti megfigyeléseink arra utalnak, hogy minél több idő telik el az immunizálást követően a virulens törzs fertőzéséig, annál nagyobb mértékű a keresztvédetség. Ez köszönhető egyrészt annak, hogy az avirulens törzsnek több idő áll rendelkezésére ahhoz, hogy a növényben felszaporodjon, másrészt az elszaporodása során több olyan reakciót is kiválthat a növényből, amelyek védik azt a virulens törzs fertőzésével szemben. Az kérdéses, hogy a növény az immunitását az avirulens, vagy a virulens törzssel való fertőzés során szerzi meg. Feltételezhető az is, hogy a fitoplazmák az egyes enzimek és szénhidrátok metabolizmusainak termékeit használják fel az energiaszükségletük fedezéséhez (Hren *et al.*, 2009), ezáltal az elsőként jelen levő fitoplazma esetleg elfogyasztja a következő elől az annak szaporodásához és fennmaradásához szükséges tápanyagot (Kunkel, 1955).

A keresztvédetség vizsgálatakor figyelemmel kísértük a tünetek megjelenését is rózsameténgben. Előfertőzés esetén azt tapasztaltuk, hogy az immunizálás és a felülfertőzés között eltelt idő jelentősen befolyásolja a gátlás sikerességét. Egyes esetekben a jellegzetes tünetek még megfigyelhetők voltak a virulens törzssel oltott hajtásokban, azonban a 8-10. hónaptól már nem detektáltuk a virulens törzset, később pedig már a tünetek is megszűntek. A virulens törzs visszaszorulását követően ezekben a növényi részekben is megjelent és felszaporodott az avirulens törzs.

Egyidejű fertőzés esetén nagyobb jelentősége volt a mintavétel helyének. Az immunizálás idejétől függetlenül megfigyeltük, hogy az AT törzssel oltott hajtások, az ahhoz közeli hajtások, és az AT tüneteket mutató hajtások AT- fertőzöttsége kimutatható volt. Az AT oltástól távol eső helyekről vagy AT, vagy 1/93-as törzseket detektáltuk. A tünetmentes hajtásokban az 1/93-as törzs jelenlétét

mutattuk ki.

Az 1/93-as és az AT törzsek poliakrilamid-géles profiljuk alapján történő elkülönítésére az SSCP módszert alkalmaztuk. Azokban az esetekben, amikor mindkét törzs jelenléte detektálható volt valósídejű PCR-rel, az SSCP vizsgálat is megerősítette azok jelenlétét. Ez a módszer Schneider (2009) és Schneider és munkatársai (2014) eredményei alapján is alkalmas a törzsek elkülönítésére. Azt tapasztaltuk, hogy hatékony gátlás esetén a keresztvédettség a teljes vizsgálati periódus során fennállt, nem mutatott változást, az AT törzs már nem volt kimutatható, ezzel szemben az 1/93 jelenléte stabil volt. A tünetek megszűnését Schneider és munkatársai (2014) a virulens törzs elpusztulásával, vagy pedig virulenciájának elvesztésével magyarázzák.

Dohány tesztnövényben végzett keresztvédettségi kísérleteink során is igazolódni látszott az 1/93-as törzs gátló hatása a virulens AT törzssel szemben. A fertőzések során kialakuló tünetek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a dohány érzékenyebben reagál a fitoplazma fertőzésre, és a tünetek hamarabb, valamint intenzívebben jelennek meg. Az 1/93 és AT törzsekkel is fertőzött, immunizált növények az 1/93-as törzssel egyszeresen fertőzött növényekhez hasonló tüneteket produkáltak, míg az AT törzssel kezelt növényekben megjelenő tünetek ennél sokkal erősebbek voltak. Ezek alapján a keresztvédettség, illetve a gátló hatás akár a tünetek szemrevételezése alapján is megállapítható dohányon. Kunkel (1955) AY törzsekkel kapcsolatos kísérleteiben -molekuláris technológia híján- szintén a tünetek alapján következtetett a keresztvédettség meglétére. A dohányban fennálló keresztvédettséget valósídejű PCR-rel is igazoltuk, melynek során azt tapasztaltuk, hogy a gyökerekben hamar kolonizálódó avirulens törzs képes megakadályozni a virulens törzs elszaporodását. Megfigyeltük, hogy amennyiben az immunizálást követően a kihívó törzssel való fertőzést nem 3, hanem 6 héttel később végezzük, a gátló hatás erősebben érvényesül; már 8 hónappal a felülfertőzést követően a kimutathatósági szint alá csökken a fertőző törzs mennyisége. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy ennyi idő alatt az avirulens törzs teljesen kolonizálja a növényt (Schneider *et al.*, 2014).

A szintén a 16SrX rendszertani csoportba tartozó GSFY törzssel való felülfertőzés hatását is vizsgáltuk két külön kísérleti elrendezésben. A '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens törzssel immunizált növényekben a GSFY tüneteinek hiányát figyeltük meg. Ezen növényekből kivont DNS minták valósídejű PCR-rel történő vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a tünetmentes növényekben a virulens törzs nem volt kimutatható fél évvel a felülfertőzést követően. Megfigyeltük, hogy amikor a gátlás működött, az 1/93 nagy mennyiségben volt kimutatható, míg amikor a GSFY dominált, az 1/93 csak alacsony számban volt jelen. Egyidejű fertőzés esetén mindkét törzs jelen volt, de a GSFY dominált. Ez a tény egyezik Kunkel (1955) és Castelain és munkatársai (1997) azon véleményével, hogy a keresztvédettség a közeli rokon törzsek között hatékony. A '*Ca. P. prunorum*' izolátumok virulenciabeli eltérései már évekkorábban megemlítsésként kerültek (Cornaggia *et al.*,

1995, Kison és Seemüller, 2001). ESFY esetében a virulencia alapján történő jellemzéshez új módszereket dolgoztak ki (Danet, 2008). Ermacora és munkatársai (2010) '*Ca. P. prunorum*' hipovirulens törzsek azonosítását végezték el szabadföldi kajszai ültetvényekben, ahol hipovirulens törzsek immunizáló hatását tesztelték. Igazolták, hogy a tünetmentesség jelensége gazdanövényhez kötött. Összefüggést találtak az enyhe virulenciájú törzsek (hipovirulens törzsek) alacsony koncentrációjú jelenléte és a tünetmentesség között kigyógyult fákban, valamint megfigyelték a súlyos tüneteket indukáló törzsek (hipervirulens törzsek) nagy koncentrációban való jelenlétét tünetmentes, de fertőzött fákban. Ezzel szemben mi azt igazoltuk, hogy nem csak egy fajon belüli fitoplazma képes gátolni egy virulens törzs szaporodását, hanem azonos rendszertani csoportba tartozó, de más faj is.

Az 1/93 és PD előfertőzéses kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy az 1/93 törzs a fertőzést követő 5. hónapban kolonizálta a rózsameténg tesztnövényt, és egy év elteltével is a kimutathatósági tartományban maradt. Ezzel szemben a PD1 törzs 4 hónappal a felülfertőzést követően még nem volt detektálható mértékben jelen a növényben, azonban a felülfertőzést követően 7 hónappal már az avirulens törzshez hasonlóan nagy mennyiségben tudtuk kimutatni. Ekkor mindkét törzs (avirulens és virulens) együttesen volt jelen a növényben. Megfigyeltük, hogy 7 hónappal a felülfertőzést követően, bár nagy mennyiségben volt jelen a PD1 törzs a növényben, a PD-re jellemző tüneteket nem tapasztaltunk, leveleik zöldek maradtak (nem sárgultak és nem voltak kisméretűek). Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy a PD törzs egyes agresszív törzsekhez képest lassabban kolonizálja a növényt, valamint alacsonyabb fokú virulenciával rendelkezik. Ezen megfigyeléseinket a növény hajtásátmérőinek változásával kapcsolatos eredményeink is alátámasztják.

Sajnos a körülmények nem tették lehetővé az újabb mintavételt, így eredményeink alapján nem vonhatunk le messzemenő következtetéseket. Mindenképpen szükséges lenne a kísérletet több mintavételi időponttal elvégezni ahhoz, hogy egy hosszabb periódusban nyomon követhessük a fitoplazmák felszaporodásának mértékét. Mivel a két törzs (1/93 és PD1) azonos filogenetikai csoportba tartozik, előzetes várakozásaink alapján arra számítottunk, hogy az 1/93-as avirulens törzs gátolhatja a PD1 virulens törzs szaporodását, részleges eredményeink azonban ennek ellentmondanak. Amennyiben mégsem teljesül a gátlás, ez az eset kivételét képezi Kunkel (1955) és Castelein és munkatársai (1997) azon elméletének, illetve a mi megfigyeléseinknek, amelyek szerint a gátlás a közeli rokonsági kapcsolatban álló fitoplazma törzsek között lép fel.

Arra a megállapításra jutottunk, hogy az avirulens törzs nem képes gátló hatást kifejteni azokkal a törzsekkel szemben, amelyek más rendszertani csoportba tartoznak (AAY, STOL). Mind egyidejű, mind előfertőzés esetén azt tapasztaltuk, hogy a két törzs egymás mellett egyidejűleg volt jelen a növényben még a felülfertőzést követően fél évvel is. A tünetek kifejlődése alapján arra

következtettünk, hogy a virulens törzsek voltak dominánsak a növényen belül, hiszen a tünetek rájuk jellemzőek voltak. Kunkel (1955) vizuális megfigyelései szerint a megjelenő tünetek az elsőként fertőző törzsre jellemzőek. Ezzel szemben mi azt figyeltük meg, hogy sikertelen gátlás esetén a domináns – ez esetben a virulens – törzsekre jellemző tünetek alakultak ki. A szimultán fertőzés sikertelensége abban keresendő, hogy a két törzs szaporodása egyszerre történik, az egyik gyorsabb, virulensebb, dominánsabb. Az 1/93 alacsony fitnessze, kis mennyisége miatt még előfertőzés esetén sem hatékony abban, hogy gátló hatását kifejtse (Kunkel 1955).

A keresztvédetség okait vizsgálva számos feltevéssel és megfigyeléssel találkozhatunk a szakirodalomban. Franciaországban megfigyelték, hogy a '*Ca. P. prunorum*' által fertőzött, de kigyógyult kajszi fák hajtásait beteg fákra való oltását követően azok meggyógyultak, míg a nem kezelt betegek lettek. Megfigyelték, hogy az RFLP profil egy virulens törzsszel egyező mintázatot ad. Feltételezték egy avirulens, vagy enyhén virulens törzs jelenlétét, amelyek felelősek lehetnek a keresztvédetségért (Morvan *et al.*, 1986; Castelain *et al.*, 2007). Sinclair (2000) '*Ca. P. fraxini*' törzsek eltérő virulenciáját és a köztük fennálló keresztvédetséget igazolta rózsameténg teszt növényben. A különböző törzsek között fellépő antagonizmusnak köszönhetően elképzelhető, hogy az eredetileg virulens törzs kismértékben, vagy teljesen elvesztette a fertőzőképességét (Seemüller *et al.*, 1984; Seemüller *et al.*, 2011).

Kunkel (1955) tapasztalatai alapján egy bizonyos vírus által fertőzött növény általánosan védett a kórokozó közeli rokonával szemben, de a távolabbi rokonával szemben nem. A keresztvédezési reakció helyi, vagy részleges, illetve teljes formában jelentkezhet. A reakció a fertőzéssel szemben a védekezést és a fertőzés utáni elterjedés megakadályozását foglalja magába specifikus és hatékony módon. Bizonyos kísérletek olyan reménykeltő eredményeket adtak, miszerint az immunizált növények a fertőzést követően csak enyhe, vagy semmilyen tünetet sem produkáltak, míg a védetlen, nem immunizált növények elpusztultak (Castelain *et al.*, 1997, Marcone *et al.*, 2010, Schneider *et al.*, 2014).

Kísérleti tapasztalatok során megállapították, hogy az antagonista törzs alacsony mennyiségben való jelenléte nem elegendő ahhoz, hogy a virulens törzset visszaszorítsa. Ennek értelmében az antagonista fitnessze meghatározó lehet a gátlás mértékére. Kísérleteink, valamint Schneider és munkatársai (2014) munkája során beigazolódott, hogy a '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens törzsszel indukált keresztvédetség során nem csupán a tünetek kifejeződése gátlódik, hanem a virulens törzs mennyisége a kimutathatósági szint alá csökken. Seemüller és Schneider (2007) a '*Ca. P. mali*' számos törzsének osztályozását végezte el azok fertőzőképessége alapján, és további vizsgálatok során igazolták, hogy közülük néhány nem csupán avirulens, hanem antagonista hatással is bírhat. Saját megfigyeléseinkkel összhangban Schneider és munkatársai (2014) többéves szabadföldi és laboratóriumi kísérlet során igazolták, hogy a '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens törzse előfertőzés esetén

képes teljesen visszazorítani a rokon '*Ca. P. mali*' AT virulens törzset kísérleti körülmények között. Mindezek ismeretében a keresztvédettség egy reménykeltő gyakorlati alkalmazhatóság irányába vezet el minket, azonban a biztonságos felhasználáshoz mindenképpen szükséges az antagonista törzs molekuláris tulajdonságainak további mélyreható tanulmányozása. Ahhoz, hogy egy megfelelő védekezési módszert kidolgozhassunk, először a fitoplazmák közötti keresztvédettség mechanizmusát kell alaposan megismernünk.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

GYÜMÖLCSFA-FITOPLAZMÁK KÖLCSÖNHATÁSAINAK MOLEKULÁRIS JELLEMZÉSE

Napjainkban a növénytermesztési ágazat legfontosabb kérdései a növényvédelem témakörében merülnek fel. Egyes betegségek jól kontrollálhatók az integrált növényvédelem ésszerű alkalmazásával, azonban akadnak olyan kórokozó csoportok, amelyek ellen nem állnak rendelkezésünkre hatékony védekezési és megelőzési módszerek. Az utóbbiak közé tartoznak a fitoplazmák is, amelyek olyan kórokozók, amelyek felépítésükben a baktériumokhoz hasonlítanak, viselkedésükben azonban inkább a vírusokra emlékeztetnek. Egészen az 1960-as évek végéig vírus eredetűnek vélték a fitoplazmák által okozott sárgulásos tünetekkel járó betegségeket. Bár a fitoplazmák által okozott betegségekkel, a kórokozó életmódjával kapcsolatban már régóta folynak kutatások, megfelelő védekezési módszert ezidáig nem sikerült kidolgozni. Ezek a mikroorganizmusok több mint 100 növényfaj megbetegítéséért tehető felelőssé, ami komoly gazdasági károkhoz vezethet azáltal, hogy a termés minősége leromlik, a növény elpusztul. A fitoplazma kutatás legfőbb nehézsége abban rejlik, hogy a kórokozó táptalajon nem tenyészthető, szaporodásához igényli a növény háncsszövetének közegét, tápanyagait. A molekuláris módszerek térnyerésével egyre több tulajdonságát ismertük meg ezen kórokozóknak, azonban még napjainkban is akadnak kevésbé kutatott területek.

Magyarországon napjainkban egyik legnagyobb jelentőségű a szőlőn jelentkező *Flavescens dorée* (szőlő aranyszínű sárgulása) fitoplazma által okozott betegség, valamint a kajszit károsító ESFY (European Stone Fruit Yellows, csonthéjasok európai sárgulása). A környező országokban azonban az almát károsító AP, (Apple Proliferation, alma seprűsödés) a körtét megbetegítő PD (Pear Decline, körte leromlás) is jelentős. Jelenleg a legnagyobb veszélyt a kórokozó terjesztéséért felelős rovarvektorok, illetve a nem megfelelően ellenőrzött szaporítóanyag jelenti, így fennáll a veszélye annak, hogy új betegségek jelenjenek meg hazánkban. Emiatt is szükséges a fitoplazmák minél mélyebb szintű ismerete, valamint lehetséges alternatív védekezési, illetve megelőzési módok kidolgozása. Németországban, ahol az alma seprűsödés komoly problémát jelent, igen nagy múltra tekint vissza a fitoplazmakutatás. Német kutatók izolálták almáról a '*Candidatus Phytoplasma mali*' egy avirulens törzsét, amely felhasználhatóvá vált immunizálási kísérletekben. A kísérletek célja alapvetően az volt, hogy megtudjuk, képes-e gátolni az avirulens törzs egy közeli rokonságban álló másik, virulens fitoplazma törzs szaporodását. Szintén német kutatók ismerték fel annak a növénykórtani jelentőségét, hogy egy almafán belül egy adott fitoplazmának egyszerre több törzse is jelen lehet. A keresztvédettségi, valamint a kevert fertőzéssel kapcsolatos kutatásokba 2009 év

elején kapcsolódtam be, amelynek nagy részét Németországban, a dossenheimi Julius Kühn Institut laboratóriumában végeztem Prof. Dr. Erich Seemüller vezetésével. A keresztvédettséggel kapcsolatos kísérleteket, és egyéb kiegészítő vizsgálatokat Magyarországon az MTA ATK Növényvédelmi Intézetében végeztem Prof. Dr. Süle Sándor vezetésével. Kísérleteink során a korábbi megfigyelések molekuláris hátterét kívántuk feltérképezni. Ennek értelmében azt vizsgáltuk, hogy az almafáknál megfigyelt tünetek megjelenésének, intenzitásának változékonysága hogyan függ össze a növényen belül szaporodó fitoplazma populációk összetételével és arányával. Emellett molekuláris módszerekkel jellemeztük a tünetes és tünetmentes almafákból izolált komplex, illetve egyszerű törzseket is, különös tekintettel a '*Ca. P. mali*' 1/93-as avirulens törzsre. Az 1/93-as törzs feltételezett antagonista hatását teszteltük rózsameténg és dohány növényekben az azonos rendszertani csoportba (16SrX) tartozó '*Ca. P. mali*' AT, '*Ca. P. prunorum*' GSFY, '*Ca. P. pyri*' PD1 és távolabbi rendszertani rokonságban álló (a 16SrXII és 16SrI csoportokba tartozó) '*Ca. P. solani*' STOL, '*Ca. P. asteris*', AAY virulens törzsekkel szemben.

Munkánk során igazoltuk azt, hogy rózsameténg és dohány tesztnövényekben az avirulens 1/93-as fitoplazma törzs képes gátolni az azonos fajba tartozó AT törzs szaporodását. Igazoltuk, a keresztvédettség hosszú távú hatásosságát azáltal, hogy a virulens törzs a fertőzést követően 2 évvel sem volt kimutatható a növényből.

Kimutattuk, hogy az 1/93-as avirulens törzs képes gátolni az azonos taxonómiai csoportba, de más fajba tartozó '*Ca. P. prunorum*' egy virulens törzsének szaporodását is. Elsőként igazoltuk, a keresztvédettség kialakulását közeli rokonságban álló, de nem azonos fajba tartozó fitoplazmák között.

Több ismétlésben elvégzett kísérletek sorával igazoltuk, hogy a keresztvédettség abban az esetben hatékony, amennyiben az immunizáló törzset előzőleg oltjuk a növényre és a kihívó törzsszel való fertőzés később történik. A két fertőzés között eltelt idő nem befolyásolta döntően a gátlás sikerességét, jelentősége abban mutatkozott meg, hogy minél több idő telt el az immunizálás és a felülfertőzés között, annál hamarabb csökkent a virulens törzs mennyisége.

Megállapítottuk, hogy a fitoplazma felhalmozódása a gyökérben éri el a legnagyobb szintet, így ebből a zónából kimutatható a legtovább.

Megfigyeléseink szerint az avirulens és virulens törzsekkel való oltások (fertőzések) elhelyezkedése csupán a gátló hatás kezdeti időpontját befolyásolja.

Megállapítottuk, hogy a gátlás abban az esetben nem alakult ki, amikor a két törzset egyidejűleg oltottuk a növényre. Egyidejű fertőzés esetén, bár az avirulens törzs jelenléte is kimutatható volt a növényből, a virulens törzs játszotta a domináns szerepet.

Eredményeink alapján az 1/93-as törzs feltételezhetően antagonista hatású az azonos rendszertani

csoportba tartozó PD (Pear Decline, körte leromlás) törzssel szemben, azonban a kapott adatokban tapasztalt ellentmondások miatt további vizsgálatokra van szükség.

A más rendszertani csoportokba tartozó AY (Aster Yellow, őszirózsa sárgulás) és STOL (Stolbur, sztolbur) törzsekkel szemben nem tudtuk igazolni az 1/93-as törzs gátló hatását, amellyel megerősítettük azt a korai feltevést, miszerint a keresztvédettség rokon fajok között működik hatékonyan, a távolabbi rokonságban álló fajoknál viszont nem érvényesül.

Igazoltuk több fitoplazma törzs együttes jelenlétének növénykórtani jelentőségét. Kimutattuk, hogy a fitoplazmával fertőzött almafák esetében a tünetek változékonysága összefüggést mutat a benne előforduló törzsek predominanciájával. Eredményeink arra utalnak, hogy egyes esetekben a fertőzést nem egy homogén fitoplazma törzs okozza, hanem azon belüli vonalából álló komplex, amelyek virulenciája is eltérhet. Ezek az eltérések az *imp* és a *hflB* génszakaszok nukleotid sorrendjében is megjelennek.

Bizonyítottuk, hogy az almában található komplex törzset alkotó egyes vonalak erőteljes gazdanövény preferenciával rendelkeznek.

Új, és a korábbi kutatásainkat kiegészítő eredményeink nagymértékben hozzájárulhatnak ahhoz, hogy közelebb kerüljünk a fitoplazmák biológiájának, genetikájának alaposabb megértéséhez, valamint a kórfolyamat megismeréséhez. A keresztvédettséggel kapcsolatos eredményeink a kórokozóval szembeni védekezés biológiai alapjait teremthetik meg. Felvetik továbbá a lehetőségét annak, hogy más fitoplazma fajok között is találhatunk olyan avirulens törzset, amelyek gátolhatják a virulens törzsek szaporodását.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Rózsameténg és dohány tesztnövényekben igazoltuk azt, hogy az avirulens 1/93-as fitoplazma törzs hosszú távon is képes gátolni az azonos rendszertani csoportba és azonos fajba tartozó AT törzs szaporodását.
2. Kimutattuk, hogy az 1/93-as avirulens törzs képes gátolni egy rokon, de más faj, a '*Ca. P. prunorum*' egy virulens törzsének szaporodását is. Elsőként igazoltuk, hogy a keresztvédetség fitoplazmák között működik rokon, de nem azonos fajba tartozó fitoplazmák között.
3. Igazoltuk, hogy a keresztvédetség abban az esetben hatékony, amennyiben az immunizáló törzset előzőleg oltjuk a növényre és a kihívó törzssel való fertőzés később történik.
4. A fitoplazmakutatásban új eredményeink születtek azáltal, hogy igazoltuk több fitoplazma törzs együttes jelenlétének növénykórtani jelentőségét. Kimutattuk, hogy a fitoplazmával fertőzött almafák esetében a tünetek változékonysága összefüggést mutat a benne előforduló törzsek predominanciájával. A különbségek törzsek, vonalak *hflB* gén szekvenciájának szintjén is kimutathatók.
5. Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy egyes esetekben a fertőzést nem egy homogén fitoplazma törzs okozza, hanem azon belüli vonalaktól álló komplex, amelyek virulenciája is eltérhet. Ezek az eltérések az *imp* és a *hflB* génszakaszok nukleotid sorrendjében is megjelennek.
6. Bizonyítottuk, hogy az almában található komplex törzset alkotó egyes vonalak erőteljes gazdanövény preferenciával rendelkeznek.

7. SUMMARY

MOLECULAR CHARACTERISATION OF INTERACTIONS BETWEEN PHYTOPLASMA-STRAINS AFFECTING FRUIT TREES

Nowadays an increasingly important plant protection problem arises in the field of crop production. There are several diseases, which can be controlled successfully by applying integrated plant protection tools, but against some other groups of disorders there are no effective protective and preventive methods given. Phytoplasmas, which are similar to bacteria in their structure, while in their behaviour they are like viruses, belong to the latter group. Before the 1960's disorders with yellowing symptoms – caused by phytoplasmas – were considered virus-associated. During the past decade researchers has yielded new knowledge about phytoplasmas, however a proper protective treatment against them is not developed yet. These microorganisms are associated with the diseases of more than 100 plant species worldwide, which may lead to quantitative losses through declining the fruits and crops and destroying the whole plant. The fact that phytoplasmas are unculturable and that they need nutrient compounds and the medium of the plant phloem for their multiplication makes it harder to study them. The design of novel molecular approaches was performed to achieve effective and detailed analysis of phytoplasmas; nevertheless, some of their properties are still unknown.

Nowadays in Hungary FD (Flavescence dorée) and ESFY (European Stone Fruit Yellows), affecting grapevine and apricot, respectively, are most frequent; they cause the most serious damage. In the neighbouring countries AP (Apple Proliferation), affecting apple trees and PD (Pear Decline) are of great importance. The insect vectors and the inadequate control of propagation material are responsible for the spreading of phytoplasmas. For this reason it is required to get more profound knowledge about these microorganisms, and to prepare alternative preventive and protective methods. In Germany, where AP constitutes a major risk, the phytoplasma research has a long history. German researchers were the first to isolate an avirulent strain of '*Candidatus* Phytoplasma mali' from apple, which was then subjected to immunisation researches. The fundamental goal of the experiments was to test the inhibitory effect of the avirulent strain against the *in planta* multiplication of a closely related, virulent phytoplasma strain. Scientists from Germany recognized the phytopathological relevance of multiple infection of different phytoplasma strains in a single apple tree. I became involved in the experiments in the cross protection and multiple infection projects in the beginning of 2009. Most of the work was carried out in Germany, in the laboratory of the Julius Kühn Institute in Dossenheim under the leadership of Prof. Dr. Erich Seemüller. Experiments in the cross protection project and some other tests were also performed in Hungary in

the Plant Protection Institute of CAR HAS under the leadership of Prof. Dr. Sándor Süle. Our main goal was to study the molecular background of some observations. The variability and intensity of the symptom expression in apple trees was subjected to our examinations. We investigated the correlations between symptom expression and the consistence of phytoplasma populations *in planta*. We presumed that accessions showing more complex profiles represent multiple infections. In the course of this research complex and single phytoplasma strains isolated from naturally infected apple trees showing severe, mild or no symptoms were also characterized by molecular methods in particular the '*Ca. P. mali*' 1/93 antagonistic strain. Its putative antagonistic effect was tested in periwinkle and tobacco test plants against the '*Ca. P. mali*' AT, '*Ca. P. prunorum*' GSFY, '*Ca. P. pyri*' PD1 (group 16SrX) and '*Ca. P. solani*' STOL (group 16SrXII), '*Ca. P. asteris*' AAY (group 16SrI) virulent strains.

A sufficient inhibitory effect of the avirulent strain 1/93 against the virulent strain AT was proved in periwinkle and tobacco plants. The long-lasting efficiency was tested 2 years after the infection and no remnant of the virulent strain could be detected any more.

From our results there is indication that the avirulent strain 1/93 can inhibit the multiplication of a related but virulent strain of '*Ca. P. prunorum*'. We reported that cross protection is effective among related but different phytoplasma species.

We confirmed through many repetitions that cross protection is effective when the plant is immunized by the avirulent strain and the infection by the virulent strain happens later. The efficacy of the inhibition was not influenced decisively by the time period passed between the two infections. The more time passed between immunization and post-infection, the earlier the decrease of the amount of the virulent strain happened.

The root samples from infected plants in the cross-protection modus were subjected to our surveys as well. We experienced that the phytoplasma stayed over the detection level the longest in root samples.

We analyzed the importance of the grafting site, and found that it influences only the beginning of the inhibition.

We also found that the inhibition was effective when the two phytoplasma strains were grafted on the plant in the cross protection modus. In the case of simultaneous infection, the virulent strain dominated, although the presence of the avirulent strain was also detectable. This was also proved by the symptom expression.

The inhibition by the strain 1/93 is supposed to be effective against the virulent PD strain, belonging to the same taxonomical group, but for clarification more experiments are needed.

Against the virulent strains of AAY and STOL, belonging to distantly related taxonomic groups, there were no inhibitory effect by the strain 1/93. Thereby these results support the presumption that

cross protection is effective among closely but not distantly related phytoplasma strains. New results of the simultaneous presence of '*Ca. P. mali*' strains with different pathological and other biological traits and their possible interactions were reported. We revealed that the fluctuation in symptoms in apple trees is related to the predominance of the infecting phytoplasma strains. The differences between the strains can be established at the level of the *hflB* gene sequences. Our results suggest that some phytoplasma accessions are composed of more strains, which vary in virulence. These variations appear at the nucleotide level. We detected that strains of phytoplasma complex in apple possess high host plant preference.

Our new and supplementary results may help to shed light upon the poorly understood aspects of pathogenicity, biology and genetics of the phytoplasmas. Results on the cross protection may contribute to be the basis of a biological protection against phytoplasmas. The results raises opportunities for finding an avirulent strain of other phytoplasma species that can inhibit the multiplication of their related virulent strains.

NEW SCIENTIFIC RESULTS

1. A sufficient long-lasting inhibitory effect of the avirulent strain 1/93 against the virulent strain AT was proved in periwinkle and tobacco plants.
2. From our results there is indication that the avirulent strain 1/93 can inhibit the multiplication of a related but virulent strain of '*Ca. P. prunorum*'. An effective cross protection process among related but different phytoplasma species is reported.
3. We confirmed through that cross protection is effective when the plant is immunized by the avirulent strain and the infection by the virulent strain happens later.
4. New results of the simultaneous presence of '*Ca. P. mali*' strains with different pathological and other biological traits and their possible interactions were reported. We revealed that the fluctuation in symptoms in apple trees is related to the predominance of the infecting phytoplasma strains. The differences between the strains can be established at the level of the *hflB* gene sequences.
5. Our results suggest that some phytoplasma accessions are composed of more strains, which vary in virulence. These variations appear at the nucleotide level.
6. We detected that strains of phytoplasma complex in apple possess high host plant preference.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Ács, Z., Ember, I., Contaldo, N., Nagy, Z., Bertaccini, A. and Kölber M. (2010): Tuf-type characterization of Hungarian stolbur strains from different host species. In: Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management. A. Bertaccini, A. Lavina and A. Batlle (eds). Sitges, Spain, p. 2.

Agrios, G.N. (1997): Plant diseases caused by Mollicutes (phytoplasmas and spiroplasmas). In: Agrios, G.N., ed. Plant Pathology. New York, USA: Academic Press, 457–70.

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.

Ahrens, U., Lorenz, K.-H. and Seemüller, E. (1993): Genetic diversity among mycoplasma-like organisms associated with stone fruit diseases. *Mol. Plant Microbe In.*, 6: 686-691.

Allen, P.J. and Bennett, K. (2010): PASW statistics by SPSS: a practical guide: version 18.0. South Melbourne, Vic. Cengage Learning.

Alma, A., Bosco, D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M. and Arzone, A. (1997): Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Mol. Biol.*, 6: 115–121.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25(17): 3389-3402.

Anonymus (2013): Megjelent Magyarországon a szőlő legpusztítóbb fitoplazmás betegsége, az aranyszínű sárgaság Grapevine flavescence dorée (FD). NÉBIH, www.nebih.gov.hu, 2013.09.11.

Arashida, R., Kakizawa, S., Ishii, Y., Hoshi, A., Jung, H.Y., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Oshima, K. and Namba, S. (2008): Cloning and characterization of the antigenic membrane protein (Amp) gene and in situ detection of Amp from malformed flowers infected with Japanese hydrangea phyllody phytoplasma. *Phytopathology*, 98: 769-775.

Bai, X., Zhang, J.H., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, A.J., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W. and Hogenhout, S.A. (2006): Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J. Bacteriol.*, 188: 3682-3696.

Barbara, D.J., Davis, D.L. and Clark, M.F. (1998): Cloning and sequencing of a major membrane protein from chlorate (AY) phytoplasma. In Proceedings of the 12th International Organisation of Mycoplasmaology, Sydney, Australia, p. 183. Sydney: International Organisation of Mycoplasmaology

Barbara, D.J., Morton, A., Clark, M.F. and Davies, D.L. (2002): Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology*, 148(1): 157-167.

Beanland, L., Hoy, C.W., Miller, S.A. and Nault, L.R. (1999): Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) transmission of aster yellows phytoplasma: Does gender matter? *Environ. Entomol.*, 28: 1101-1106.

Beier D., Spohn G., Rappuoli R. and Scarlato V. (1997): Identification and characterization of an operon of *Helicobacter pylori* that is involved in motility and stress adaptation. *J. Bacteriol.*, 179: 4676-4683.

Berg, M., Davies, D.L., Clark, M.F., Vetten, H.J., Maier, G., Marcone, C. and Seemüller, E. (1999): Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology*, 145: 1937-1943.

Berges, R., Rott, M. and Seemüller, E. (2000): Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90(10): 1145-1152.

Bertaccini, A. (2007): Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Front. Biosci.*, 12: 673-689.

Bertaccini, A. and Duduk, B. (2009): Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol. Mediterr.*, 48: 355-378.

Bianco, P.A., Scattini, G., Casati, P. and Fortusini, A. (2000): Thermotherapy of grapevine cuttings for flavescence doree eradication. In: Proceedings of the 13th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine, pp.: 162–163, Adelaide, Australia

Birschwilks, M., Haupt, S., Hofius, D. and Neumann, S. (2006): Transfer of phloem-mobile substances from the host plants to the holoparasite *Cuscuta* sp. *J. Exp. Bot.*, 57(4): 911-921.

Bisognin, C., Schneider, B., Salm, H., Grando, M. S., Jarausch, W., Moll, E. and Seemüller, E. (2008): Apple proliferation resistance in apomictic rootstocks and its relationship to phytoplasma concentration and simple sequence repeat genotypes. *Phytopathology*, 98(2): 153-158.

Blomquist, C.L. and Kirkpatrick, B.C. (2002): Frequency and seasonal distribution of pear psylla infected with the pear decline phytoplasma in California pear orchards. *Phytopathology*, 92 (11): 1218-1226.

Bonas U. (1994): Hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Curr. Top. Microbiol.*, 192: 79-98.

Bosco, D., Minucci, C., Boccardo, G. and Conti, M. (1997): Differential acquisition of chrysanthemum yellows phytoplasma by three leafhopper species. *Entomol. Exp. Appl.*, 83: 219-224.

Brcák, J. (1979): Leafhopper and planthopper vectors of plant disease agents in central and southern Europe. In: Maramorosch, K., Harris, K. F. eds. *Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents*. Academic Press, USA, pp. 97-154.

Burckhardt, D. (1994): Psylloid pests of temperate and subtropical crop and ornamental plants (Hemiptera, Psylloidea). *Trends Agr. Sci. Entomol.*, 2:173-186.

CABI/EPPO, 2013. *Candidatus Phytoplasma mali*. [Distribution map]. *Distribution Maps of Plant Diseases*, No. October. Wallingford, UK: CABI, Map 761 (Edition 2).

Canik, D. and Ertunc, F. (2007): Distribution and molecular characterization of apple proliferation

phytoplasma in Turkey. *B. Insectol.*, 60 (2): 335.

Carraro, L., Osler, R., Loi, N. and Favali, M.A. (1991): Transmission characteristics of the clover phyllody agent by dodder. *J. Phytopathol.*, 133: 15–22.

Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P. and Refatti, E. (1998): Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *J. Plant Pathol.*, 80 (3): 233-239.

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

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

Castelain C., Chatelliere M-G, Jullian J-P, Morvan G. and Lemaire J-M. (1997): La prémunition contre l'Enroulement Chlorotique de l'abricotier. *Phytoma-La Défense des Végétaux*, 493: 39-44.

Chabrolin, C. (1924): Quelques maladies des arbres fruitiers de la Vallée du Rhône. *Annales des Epiphyties*, 10: 265-333.

Chalak, L., Elbitar, A., Rizk, R., Choueiri, E., Salar, P. and Bové, J.M. (2005): Attempts to eliminate *Candidatus Phytoplasma phoenicium* from infected Lebanese almond varieties by tissue culture techniques combined or not with thermotherapy. *Eur. J. Plant Pathol.*, 112: 85-89.

Chapman, G.B., Buerkle, E.J., Barrows, E.M., Davis, R.E. and Dally, E.L. (2001): A light and transmission electron microscope study of a black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae), affected by witches' broom, and classification of the associated phytoplasma. *J. Phytopathol.*, 149 (10): 589-597.

Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M. and Schulz, A. (2005): Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant. Sci.*, 10 (11): 526-535.

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

- Cordova, I., Jones, P., Harrison, N. A. and Oropeza, C. (2003): In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol. Plant Pathol.*, 4 (2): 99-108.
- Cornaggia, D., Gentit, P., Boyé, R. and Desvignes, J.C. (1995): A new phytoplasma disease of apricot tree: the peach vein clearing. *Acta Hort.*, 386: 448-453.
- Cupidi, A. and Barba, M. (1993): Ottimizzazione del microinesto in vitro per il risanamento della vite. *Vignevini*, 4: 43-46.
- Dai, Q., He, F.T. and Liu, P.Y. (1997): Elimination of phytoplasma by stem culture from mulberry plants (*Morus alba*) with dwarf disease. *Plant pathol.*, 46 (1): 56-61.
- Dale, J.L. and Kim, K.S. (1969): Mycoplasma-like bodies in dodder parasitizing aster yellows-infected plants. *Phytopathology*, 59: 1765-1766.
- Danet, J.L., Bonnet, P., Jarausch, W., Carraro, L., Skoric, D., Labonne, G. and Foissac, X. (2007): Imp and secY, two new markers for MLST (multilocus sequence typing) in the 16SrX phytoplasma taxonomic group. *Bull. Insectol.* 60: 339-340.
- Danet, J.L., Bahriz, H., Cimerman, A. and Foissac, X. (2008): New molecular typing tools to monitor fruit tree phytoplasma variability in the 16SrX taxonomic group. XXth International symposium on virus and virus-like diseases of temperate fruit crops. *Acta Hort.*, 781: 343-349.
- Davies, D.L., Guise, C.M., Clark, M.F. and Adams, A.N. (1992): Parry's disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. *Plant Pathol.*, 41 (2): 195-203.
- Davies, D.L. and Clark, M.F. (1994): Maintenance of mycoplasma-like organisms occurring in *Pyrus* species by micropropagation and their elimination by tetracycline therapy. *Plant Pathology*, 43: 819-823.
- Davis, M.J. and Whitcomb, R.F. (1981): Fastidious bacteria of plant vascular tissue and invertebrates (including so called rickettsia-like bacteria). *The Prokaryotes: A Handbook on Habits, Isolation, and Identification of Bacteria*. Heidelberg, Springer-Verlag, 2172-2188.

Davis, M.J., Tsai, H., Cox, R.L., McDaniel, L.L. and Harrison, N.A. (1988): Cloning of chromosomal and extrachromosomal DNA of the mycoplasma-like organism that causes maize bushy stunt disease. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1: 295-302.

Davis, R.E. and Sinclair, W.A. (1998): Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88 (12): 1372-1376.

Del Serrone, P., La Starza, S., Krystai, L., Kolber, M. and Barba, M. (1998): Occurrence of apple proliferation and pear decline phytoplasmas in diseased pear trees in Hungary. *J. Plant Pathol.*, 53-58.

Dickinson, M., Tuffen, M. and Hodgetts, J. (2013): The phytoplasmas: an introduction. In *Phytoplasma*, Humana Press, 1-14.

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. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*, 33: 259-266.

Douglas, S.M. (1993): Cytology, histology, and histochemistry of MLO infections in tree fruits. In: *Handbook of Cytology, Histology, and Histochemistry*. A.R. Biggs (ed). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp.: 253-279.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus*, 12: 13-15.

Edwards, E.T. (1935): Witches' broom. A new virus disease of lucerne. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, 1: 31-32.

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-Kühn-Archiv*, 427: 197.

Faccioli, G. (2001): Control of potato viruses using mersitem and stem-cutting cultures, thermotherapy and chemotherapy. In: Loebenstein, G, Berger, PH, Brunt, AA, Lawsan, RG eds.:

Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Seed-potatoes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.: 365-390.

Faccioli, G. and Colalongo, C. (2002): Eradication of potato virus Y and potato leafroll virus by chemotherapy of infected potato stem cuttings. *Phytopathol. Mediterr.*, 41: 76-78.

Fialová, R., Navratil, M., Lauterer, P. and Navrkalova, V. (2007): 'Candidatus Phytoplasma prunorum': the phytoplasma infection of *Cacopsylla pruni* from apricot orchards and from overwintering habitats in Moravia (Czech Republic). *B. Insectol.*, 60 (2): 183.

Firrao, G., Smart, C.D. and Kirkpatrick, B.C. (1996): Physical map of the Western X-disease phytoplasma chromosome. *J. Bacteriol.*, 178(13): 3985-3988.

Firrao, G., Andersen, M., Bertaccini, A., Boudon, E., Bove, J. M., Daire, X. and Wang, K. (2004): 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54 (4): 1243-1255.

Firrao, G., Gibb, K. and Stretten, C. (2005): Short taxonomic guide to the genus 'Candidatus Phytoplasma'. *J. Plant Pathol.*, 249-263.

Fletcher, J., Wayadande, A., Melcher, U. and Ye, F. (1998): The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. *Phytopathology*, 88 (12): 1351-1358.

Florance, E.R. and Cameron, H.R. (1978): Three dimensional structure and morphology of mycoplasma-like bodies associated with albino disease of *Prunus avium*. *Phytopathology*, 68: 75-80.

Fodor, M., Viczián, O., Mergenthaler, E. and Süle, S. (1999): Cabbage infected with phytoplasma from aster yellows. *Acta Phytopathol. Hun.*, 34 (1-2): 1-6.

Freitag, J. H. (1964): Interaction and mutual suppression among three strains of aster yellows virus. *Virology* 24: 401-413.

Frasinghelli, C., Delaiti, L., Grando, M. S., Forti, D. and Vindimian, M. E. (2000): *Cacopsylla costalis* (Flor 1861), as a vector of apple proliferation in Trentino. *J. Phytopathol.*, 148 (7-8): 425-431.

Gáborjányi, R. és Lönhárd, M. (1967): Adatok a sztolbur vírus magyarországi elterjedéséhez. *Növényvédelem*, 4: 176-180.

Garcia-Chapa, M., Sabaté, J., Laviña, A. and Batlle, A. (2005): Role of *Cacopsylla pyri* in the epidemiology of pear decline in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.*, 111 (1): 9-17.

Garnier, M., Foissac, X., Gaurivaud, P., Laigret, F., Renaudin, J., Saillard, C. and Bové, J. M. (2001): Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 324 (10): 923-928.

Golino, D.A. (1989): Experimental hosts of the beet-leafhopper-transmitted virescence agent. *Plant Dis.*, 73: 850-854.

Goodwin, P.H., Mahuku, G.S., Liu, H. and Xue, B.G. (1999): Monitoring phytoplasma in population of aster leafhoppers from lettuce fields using the polymerase chain reaction. *Crop Prot.*, 18: 91-99.

Gundersen, D.E., Lee, I-M., Rehner, S.A., Davis, R.E. and Kingsbury, D.T. (1994): Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas), a basis for their classification. *J. Bacteriol.*, 176: 5244-5254.

Gundersen, D.E. and Lee, I.-M. (1996): Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterr.*, 35: 144–151.

Han S. and Cha B. (2002): Genetic differentiation of phytoplasma isolates by DNA heteroduplex mobility assays and single-strand conformation polymorphism analysis. *Plant Pathol. J.*, 18: 308-312.

Hanboonsong, Y., Choosai, C., Panyim, S. and Damak, S. (2002): Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Mol. Biol.*, 11 (1): 97-103.

Heinze, K. and Kunze, L. (1955): Die europäische Asterngelbsucht und ihre Übertragung durch Zwergzikaden. *Nachr. Bl. Dtsch. Pfl. Sch.-D.(Braunschweig)*, 7: 161-164.

Helms, K. (1957): Witches' Broom disease of Lucerne. I. The occurrence of two strains of the disease and their relation to big bud of tomato. *Crop Pasture Sci.*, 8 (2): 135-147.

Hibben, C.R. and Wolansky, B. (1970): Dodder transmission of a mycoplasma from ash trees with yellows type symptoms. *Phytopathology*, 60: 1295.

Hibino, H. and Schneider, H. (1970): Mycoplasma-like bodies in sieve tubes of pear trees affected with pear decline. *Phytopathology*, 60: 499-501.

Hirumi, H. and Maramorosch, K. (1973): Ultrastructure of the aster yellows agent: mycoplasma-like bodies in sieve tube elements of *Nicotiana rustica*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 225: 201.

Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E.D., Kakizawa, S., Kingdom, H.N. and Namba, S. (2008): Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.*, 9 (4): 403-423.

Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M. and Igarashi, Y. (2006): Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. *J. Microbiol. Methods*, 66: 165-169.

Horváth, J. (1972): Növényvírusok, vektorok, vírusátvitel. Akadémiai Kiadó, Budapest, 285-293.

Hosford, R.M. (1968): Transmission of plant viruses by dodder. *Bot. Rev.*, 33: 387-406.

Hoshi, A., Ishii, Y., Kakizawa, S., Oshima, K. and Namba, S. (2007): Host-parasite interaction of phytoplasmas from a molecular biological perspective. *B. Insectol.*, 60 (2): 105.

Hren, M., Nikolić, P., Rotter, A., Blejec, A., Terrier, N., Ravnkar, M., Dermastia, M. and Gruden, K. (2009). 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics*, 10 (1): 460.

<http://www.q-bank.eu/Phytoplasmas/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Igloi, G. (1983): A silver stain for the detection of nanogram amounts of tRNA following two-dimensional electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 134: 184-188.

IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group (2004): Description of the genus 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 1243-1255.

Ito K. and Akiyama Y. (2005): Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH Protease. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59: 211-231.

Jagoueix-Eveillard, S., Tarendeau, F., Guolter, K., Danet, J. L., Bové, J. M. and Garnier, M. (2001): *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by mollicute infections. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14 (2): 225-233.

Jarausch, B., Schwind, N., Jarausch, W., Krczal, G., Dickler, E. and Seemüller, E. (2003): First report of *Cacopsylla picta* as a vector of apple proliferation phytoplasma in Germany. *Plant Dis.*, 87 (1): 101.

Jarausch, B., Schwind, N., Jarausch, W. and Krczal, G. (2004): Overwintering adults and springtime generation of *Cacopsylla picta* (synonym *C. costalis*) can transmit apple proliferation. *Acta Hort.*, 657: 409-413.

Jarausch, W., Saillard, C., Dosba, F. and Bové, J.M. (1994): Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (8): 2916-2923.

Jarausch, W., Lansac, M. and Dosba, F. (1996): Long-term maintenance of nonculturable apple-proliferation phytoplasmas in their micropropagated natural host plant. *Plant Pathol.*, 45 (4): 778-786.

Jarausch, W., Lansac, M., Saillard, C., Broquaire, J.M. and Dosba, F. (1998) PCR assay for specific detection of European stone fruit yellows phytoplasmas and its use for epidemiological studies in France. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104: 17-27.

Jarausch, W., Lansac, M., Bliot, C. and Dosba, F. (1999): Phytoplasma transmission by in vitro graft inoculation as a basis for a preliminary screening method for resistance in fruit trees. *Plant pathol.*, 48 (2): 283-287.

Jarausch, W., Saillard, C., Broquaire, J.M., Garnier, M. and Dosba, F. (2000): PCR-RFLP and sequence analysis of a non-ribosomal fragment for genetic characterization of European stone fruit yellows phytoplasmas infecting various *Prunus* species. *Mol. Cell. Probes.*, 14: 171–179.

Jarausch, W., Jarausch-Wehrheim, B., Danet, J.L., Broquaire, J.M., Dosba, F., Saillard, C. and Garnier, M. (2001): Detection and indentification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107 (2): 209-217.

Jensen, D. D., Schneider, H., Griggs, W. H. and Gonzales, C. Q. (1964): Pear decline virus transmission by pear psylla. *Phytopathology*, 54 (11): 1346.

Jeschke, W. D., Bäümel, P., Räth, N., Czygan, F. C. and Proksch, P. (1994): Modelling of the flows and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. and its host *Lupinus albus* L. II. Flows between host and parasite and within the parasitized host. *J. Exp. Bot.*, 45 (6): 801-812.

Kakizawa, S., Oshima, K., Ishii, Y., Hoshi, A., Maejima, K., Jung, H. Y., Yamaji, Y. and Namba, S. (2009): Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. *FEMS Microbiol. Lett.*, 293: 92-101.

Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsuhashi, W., Watanabe, K. and Sato, M. (2000): Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology*, 90 (8): 909-914.

Khan, A.J., Botti, S., Paltrinieri, S., Al-Subhi, A.M. and Bertaccini, A.F. (2002): Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds. In *14th International Organization of Mycoplasmaology Conference* (Vol. 148).

Kirkpatrick, B.C., Stenger, D.C., Morris, T.J. and Purcell, A.H. (1987): Cloning and detection of

DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science (Washington)*, 238 (4824): 197-200.

Kirkpatrick, B. C. and Fraser, J.D. (1989): Phylogenetic relationships of the Western X-disease mycoplasma-like organism (X-MLO) as established by 16S rRNA sequence. *Phytopathology*, 79: 133-138.

Kirkpatrick, B.C. (1992): Mycoplasma-like organisms, Plant and Invertebrate Pathogens. Prokaryotes, eds. Springer-Verlag, New York, USA, 4050-4067.

Kirkpatrick, B.C., Smart, C., Gardner, S., Gao, J-L., Ahrens, U., Maeurer, R., Schneider, B., Lorenz, K-H, Seemüller E., Harrison N.A., Namba, S. and Daire X. (1994): Phylogenetic relationship of plant pathogenic MLO-s established by 16/23S rDNA spacer sequences. *IOM Let.*, 3: 228-229.

Kison H., Kirkpatrick B.C. and Seemüller E. (1997): Genetic comparison of the peach yellow leaf roll agent with European fruit tree phytoplasmas of the apple proliferation group. *Plant Pathol.*, 46: 538-544.

Kison, H. and Seemüller, E. (2001): Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. *J. Phytopathol.*, 149 (9): 533-541.

Kiss E., Szabó M. és Mergenthaler E. (2014): A bársonyvirág (*Tagetes patula* L.) fitoplazmás betegségének magyarországi előfordulása és a kórokozó molekuláris azonosítása. In: Horváth, J., Haltrich, A. és Molnár, J. (szerk.). 60. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2014. február 18-19., p. 104.

Kiss, E., Mergenthaler, E., Kiss, B. és Viczián, O. (2015): A csonthéjasok európai sárgulása (ESFY) magyarországi terjedésének hátterében álló okok. In: Horváth, J., Haltrich, A., Molnár, J. (szerk.). 61. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2015. február 17-18., p. 60.

Klement Z. (1977): Bacterial canker and dieback disease of apricots (*Pseudomonas syringae* van Hall) *Bull. OEPP*, 7: 57-68.

Kollar A., Seemüller E. and Krczal G. (1989): Impairment of the sieve tube sealing mechanism of

trees infected by mycoplasma-like organisms. *J. Phytopathol.*, 124: 7-12.

Krczal, G., Krczal, H. and Kunze, L. (1988): *Fieberiella florii* (Stål), a vector of apple proliferation agent. *Acta Hort.*, 235: 99-106.

Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A. M., Reinhardt, R. and Seemüller, E. (2008): The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus *Phytoplasma mali*'. *BMC Genomics*, 9:306.

Kunkel, L.O. (1952): Transmission of alfalfa witches' broom to non-leguminous plants by dodder, and cure in periwinkle by heat. *Phytopathology*, 42: 27-31.

Kunkel, L.O. (1955): Cross protection between strains of yellows-type viruses. *Adv. Virus Res.*, 3: 251–273.

Kunze, L. (1989): Apple proliferation. In: *Virus and Viruslike Diseases of Pome Fruits and Simulating Noninfectious Disorders*. P R Fridlund, ed. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics, Washington State University Pullmann, WA, USA., pp.: 99-113.

Kuroli, G. (1970): Adatok a sztolburt terjesztő sárgalábú recéskabóca (*Hyalestes obsoletus* Sign.) biológiájához. *Agrártudományi Egyetem Mosonmagyaróvári Mezőgazdaságtud. Kar Közleményei*, 6: 5-22.

Kuske, C.R. and Kirkpatrick, B.C. (1990): Identification and characterization of plasmids from the western aster yellows mycoplasma-like organism. *J. Bacteriol.*, 172: 1628-1633.

Kuske, C.R. and Kirkpatrick, B.C. (1992): Phylogenetic relationships between the western aster yellows a mycoplasma-like organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 226-233.

Lauer, U. and Seemüller, E. (2000): Physical map of the chromosome of the apple proliferation phytoplasma. *J. Bacteriol.*, 182 (5): 1415-1418.

Lauterer, P. (1999): Results of the investigation on Hemiptera in Moravia, made by the Moravian museum (Psylloidea). *Acta Mus. Moraviae, Sci. Biol.*, 84: 71-151.

- Lee, H., Bang, H.E., Johnson, R., Jordaan, A.M., Victor, T.C., Dar, L., Khan, B.K., Cho, S.N. (2006). Comparison between radioisotopic and non-radioisotopic polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) procedures in the detection of mutations at the *rpoB* gene associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *World J Nucl. Med.*, 5 (4): 241-247.
- Lee, I-M. and Davis, R.E. (1986): Prospects for in vitro culture of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 24 (1): 339-354.
- Lee, I-M. and Davis, R.E. (1988): Detection and investigation of genetic relatedness among aster yellows and other mycoplasma-like organisms by using cloned DNA and RNA probes. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1: 303-310.
- Lee, I-M. and Davis, R.F. (1992): Mycoplasmas which infect plants and insects. Mycoplasmas; Molecular Biology and Pathogenesis, eds. American Society for Microbiology, Washington, USA, 379-390.
- Lee, I-M., Gundersen-Rindal, D.E. and Bertaccini, A. (1998a): Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88 (12): 1359-1366.
- Lee, I-M., Gundersen, D.F., Rindal, D.E., Davis, R.E. and Rartosz, I-M. (1998b): Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 1153-1169.
- Lee, I-M., Davis, R.E. and Gundersen-Rindal, D.E. (2000): Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54: 221-255.
- Lemoine, J. (1991): Deperissement du poirier: role de *Psylla pyri* dans sa dissemination. *Arboriculture fruitière*. 28-32.
- Liefting, L.W., Havukkala, I., Andersen, M.T., Lough, T.J. and Beever, R.E. (2006): The complete genome sequence of 'Candidatus *Phytoplasma australiense*'. In Proc. 16th Congr. Int. Org. Mycoplasma, 9-14. July, 2006, Cambridge, UK. Cambridge, UK.; p.: 43.

- Lim, P.O. and Sears, B.B. (1989): 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J. Bacteriol.*, 171: 5901-5906.
- Lim, P.O. and Sears, B.B. (1991): DNA sequence of the ribosomal protein genes rp12 and rps19 from a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *FEMS Microbiol. Lett.*, 84: 71-74.
- Lim, P.O. and Sears, B.B. (1992): Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *J. Bacteriol.*, 174: 2606-2611.
- Lithgow, J.K., Ingham, E. and Foster, S.J. (2004): Role of the hprT hflB locus in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 150: 373-381.
- Lorenz, K-H., Dosba, F., Poggi-Pollini, C., Llacer, G. and Seemüller, E. (1994): Phytoplasma diseases on *Prunus* species in Europe are caused by genetically similar organisms. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.*, 101: 567-575.
- Maixner, M., Ahrens, U. and Seemüller, E. (1995): Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Eur. J. Plant Pathol.*, 101: 244-250.
- Malembic-Maher, S., Constable, F., Cimerman, A., Arnaud, G., Carle, P., Foissac, X. and Boudon-Padieu, E. (2008): A chromosome map of the Flavescence dorée phytoplasma. *Microbiology*, 154 (5): 1454-1463.
- Maramorosch, K. (1953): Incubation period of aster yellows virus. *Am. J. Bot.* 40: 797-809.
- Maramorosch, K. (1958): Cross protection between two strains of corn stunt virus in an insect vector. *Virology*, 6 (2): 448-459.
- Marcone, C., Ragozzino, A. and Seemüller, E. (1997): Dodder transmission of alder yellows phytoplasma to the experimental host *Catharanthus roseus* (periwinkle). *Eur. J. Forest Pathol.*, 27: 347-350.

Marcone, C., Hergenahm, F., Ragozzino, A. and Seemüller, E. (1999a): Dodder transmission of pear decline, European stone fruit yellows, rubus stunt, Picris echioides yellows and cotton phyllody phytoplasmas to periwinkle. *J. Phytopathol.* 147: 187–192.

Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U. and Seemüller, E. (1999b): Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, 89 (9): 805-810.

Marcone, C. and Seemüller, E. (2001): A chromosome map of the European stone fruit yellows phytoplasma. *Microbiology*, 147 (5): 1213-1221.

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

Marwitz, R. and Petzold, H. (1978): Examination of mycoplasma-like organisms in yellows diseased plants by scanning electron microscope. 3rd Int. Congress of Plant Pathol., München 16-23 Aug., p.: 78.

Mattedi, L., Forno, F., Cainelli, C., Grando, S. and Jarausch, W. (2007): Transmission of 'Candidatus Phytoplasma mali' by psyllid vectors in Trentino. *IOBC WPRS BULL.*, 30 (4): 267.

McCoy, R.E. (1979): Mycoplasmas and Yellows Disease, The Mycoplasmas, Vol. 3. Academic Press, New York, p.: 229.

Mergenthaler E., Kiss E. és Süle S. (2014): A kajszai téli kivirágzása és a fitoplazmafertőzés. *Kertészet és Szőlészet* 2014/ 6., 13-14.

Morton, A., Davies, D.L., Blomquist, C.L. and Barbara, D.J. (2003): Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Mol. Plant Pathol.*, 4: 109-114.

Morvan, G. and Castelain, C. (1965): Recherche d'indicateurs pour les virus liés à l'Enroulement chlorotique de l'Abricotier. *Zastita Bilja*, 85 (88): 419-425.

Morvan, G., Giannotti, J. and Marchoux, G. (1973): Studies on the aethology of apricot chlorotic

leaf roll: detection of mycoplasmas. *Phytopathol. Z.*, 63 (1): 33-38.

Morvan, G. and Castelain, C. (1982): Experiments of cross protection against chlorotic leaf roll diseases (CRLD) of apricot. *Acta Hort.*, 121: 429-434.

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

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

Möllers, C. and Sarkar, S. (1989): Regeneration of healthy plants from *Cathranthus roseus* infected with mycoplasma-like organisms through callus culture. *Plant Sci.*, 60 (1): 83.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum*, 15 (3): 473-497.

Murrall, D.J., Nault, C., Hoy, W., Madden, L.V. and Miller, S.A. (1996): Effect of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *J. Econ. Entomol.*, 89: 1223-1232.

Murray, R.G.E. and Schleifer, K.H. (1994): Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44 (1): 174-176.

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: 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. *Eur. J. Plant Pathol.*, 112 (1): 53-61.

Musetti, R., Marabottini, R., Badiani, M., Martini, M., di Toppi, L. S., Borselli, S., Borgo, M. and Osler, R. (2007): On the role of H₂O₂ in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Prosecco) from Flavescence dorée disease. *Funct. Plant Biol.*, 34 (8): 750-758.

Music, M.S., Krajacic, M. and Skoric, D. (2008): The use of SSCP analysis in the assessment of phytoplasma gene variability. *J. Microbiol. Meth.*, 73 (1): 69-72.

Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaizu, H., Shiozawa, H. and Tsuchizaki, T. (1993a): Detection and differentiation of plant- pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 83 (7): 786-791.

Namba, S., Oyaizu, H., Kato, S., Iwanami, S. and Tsuchizaki, T. (1993b). Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 461-467.

Neimark, H.C. and Kirkpatrick, B.C. (1993): Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-curable plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *Mol. Microbiol.*, 7: 21-28.

Németh, M. (1979): Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, p.: 450.

Németh, M., Ember, I., Krizbai, L., Kölber, M., Hangyál, R. and Bozsics, G. (2001): Detection and identification of phytoplasmas in peach based on woody indexing and molecular methods. *Int. J. Hort. Sci.*, 7: 37-41.

Némethy, Zs., Orosz, A. és Süle, S. (2001): Szabadföldi dísznövények fitoplazmás betegségei. 47. Növényvédelmi Tud. Napok, Budapest, 2001.

Nielson, M.W. (1979): Taxonomic relationships of leafhopper vectors of plant pathogens. In Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents. K. Maramorosch & K. F. Harris (eds). New York: Academic Press. pp.: 3-27.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T. (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86 (8): 2766-2770.

Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M. and Namba, S. (2004): Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat. Genet.*, 36:27-29.

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

Osler R., Carraro L., Loi N., Gregoris A., Pavan F., Firrao G., Musetti R., Ermacora P., Loschi A., Pertot I. and Refatti R. (1996): Le più importanti malattie da fitoplasmi nel Friuli- Venezia Giulia, Atlante. Notiziario ERSA, Anno IX, Sup- pl. 4, Luglio-Agosto 1996, Arti Grafiche Friulane.

Padovan, A.C., Firrao, G., Schneider, B. and Gibb, K.S. (2000): Chromosome mapping of the sweet potato little leaf phytoplasma reveals genome heterogeneity within the phytoplasmas. *Microbiology*, 146 (4): 893-902.

Palacio, A. and Duran-Vila, N. (1999): Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for viroid characterisation. *J. Virol. Methods*, 77 (1): 27-36.

Palmano, S. and Firrao, G. (2000): Diversity of phytoplasmas isolated from insects, determined by a DNA heteroduplex mobility assay and a length polymorphism of the 16S– 23S rDNA spacer region analysis. *J. Appl. Microbiol.*, 89 (5): 744-750.

Papp, T., Niemetz, A., Dosdahl, N., Kumar, K. and Schiffmann, D. (2007): Mutational analysis of Chk1, Chk2, Apaf1 and Rb1 in human malignant melanoma cell lines. *Oncol. Rep.*, 17: 135–140.

Pénzes, B., Szalay, L., Andor, D. és Kis, L. (2003) Kajszi. Mezőgazda Kiadó.

Petróczy, I. (1958): A dohány sztolburos megbetegedése hazánkban, kórképének változékonysága az ökológiai tényezőkkel való összefüggésben. Mezőgazdaságtudományi Kar Közl . Mg. Kiadó, Budapest, pp.: 357-368.

Petróczy, I. (1962): Sztolbur és sztolburhoz hasonló megbetegedések nyugat-magyarországi burgonyatermesztő vidékeinken. *Növénytermelés*, 2: 183-190.

Ploaie, P. G. (1973): Rickettsia-like bodies associated with plant cells. *Rev. Roum. Virol.*, 10: 319-320.

Ploaie, P.G. (1981): Mycoplasma-like organisms and plant diseases in Europe. In: Maramorosch, K. and Harris, K.F. (eds.). *Plant Diseases and Vectors*, 3. Acad. Press, pp.: 61-104.

Příbylová, J. and Špak, J. (2013): Dodder transmission of phytoplasmas. In *Phytoplasma*. Humana Press, pp.: 41-46.

Rao, G.P. (2013): Comments on "The culture of plant pathogenic phytoplasmas in axenic media" (Contaldo et al., 2012). *Phytopathogenic Mollicutes*, 3 (1): 1-2.

Rozen, S. and Skaletsky, H. (1999): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols*. Humana Press. pp.: 365-386.

Rubio, L., Aylloni, M.A., Guerri, J., Pappu, H., Niblett, C. and Moreno, P. (1996): Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Ann. Appl. Biol.*, 129 (3): 479-489.

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

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

Samuel, G., Bald, J.G. and Eardley, C.M. (1933): Big bud, a virus disease of the tomato. *Phytopathology*, 23: 641-653.

Sanchez, G.E., Slack, S.A. and Dodds, J.H. (1991): Response of selected Solanum species to virus eradication therapy. *Am. Potato J.*, 68: 299-315.

Schaper, U. and Seemüller, E. (1982): Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology*, 72:736-742.

Schaper, U. and Seemüller, E. (1984): Recolonization of the stem of apple proliferation and pear decline-diseased trees by the causal organisms in spring. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz*, 91: 608-613.

Schilberszky, K. (1913): A kajszi-barackfák úgynevezett "gutaütéséről". *Természettudományi közlöny*, 45 (575): 340.

Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B.C. and Seemüller, E. (1993): Classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 139: 519-527.

Schneider, B. and Seemüller, E. (1994a): Studies on the taxonomic relationship of mycoplasma-like organisms by Southern blot analysis. *J. Phytopathol.*, 141: 173-185.

Schneider, B. and Seemüller, E. (1994b): Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (9): 3409-3412.

Schneider, B., Cousin, M.T., Klinkong, S. and Seemüller, E. (1995): Taxonomic relatedness and phylogenetic positions of phytoplasmas associated with diseases of faba bean, sunhemp, sesame, soybean, and eggplant. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz*, 102: 225-232.

Schneider, B., Marcone, C., Kampmann, M., Ragozzino, A., Lederer, W., Cousin, M.T. and Seemüller, E. (1997): Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *Eur. J. Plant Pathol.*, 103: 675-686.

Schneider, B. and Seemüller, E. (2009): Strain differentiation of '*Candidatus Phytoplasma mali*' by SSCP- and sequence analysis of the *hflB* gene. *J. Plant Pathol.*, 91 (1): 103-112.

Schneider, B., Süle, S., Jelkmann, W. and Seemüller, E. (2014): Suppression of aggressive strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*' by mild strains in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana occidentalis* and indication of similar action in apple trees. *Phytopathology*, 104 (5): 453-461.

Schneider, H. (1977): Indicator hosts for pear decline: symptomatology, histopathology, and distribution of mycoplasma-like organisms in leaf veins. *Phytopathology*, 67 (5): 592-601.

Scopoli J.A. (1763) *Entomologia Carniolica exhibens insecta Carnioliae indigena et distributa in ordines, genera, species, varietates: methodo Linnaeana*. *Ioannis Thomae Trattner, Vienna, Austria*, 420.

Sears, B.B. and Klomparens, K.L. (1989): Leaf tip cultures of the evening primrose allow stable, aseptic culture of mycoplasma-like organism. *Can. J. Plant Pathol.*, 11: 343-348.

Seemüller, E., Schaper, U. and Zimbelmann, F. (1984): Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz*, 91 (4): 371-382.

Seemüller, E. (1990): Apple proliferation. In: Compendium of Apple and Pear Diseases. A. L. Jones and H. S. Aldwinkle, eds. APS Press, St. Paul, M, USA. pp.: 67-68.

Seemüller, E., Kartte, S. and Kunze, L. (1992): Resistance in established and experimental apple rootstocks to apple proliferation disease. *Acta Hort.*, 309: 245-251.

Seemüller, E., Schneider, B., Maurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K.H., Firrao, G., Avinent, L., Sears, B.B. and Stackebrandt, E. (1994): Phylogenetic classification of phytopathogenic Mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 440-446.

Seemüller, E. and Foster, A. (1995): European stone fruit yellows. In: Ogawa J.M., Zehr E.I., Bird G.W., Ritchie D.F., Uriu K., Uyemoto J.K. (eds.). Compendium of Stone Fruit Diseases, APS Press, St. Paul, MN, USA., pp.: 59-60.

Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A. and Göschl, M. (1998): Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.*, 80: 3-26.

Seemüller, E., Garnier, M. and Schneider, B. (2002): Mycoplasmas of plants and insects. In Molecular Biology and Pathology of Mycoplasmas. Edited by: Razin, S. and Herrmann, R. London, Kluwer Academic / Plenum Publishers; pp.: 91-116.

Seemüller, E. and Schneider, B. (2004): ‘Candidatus Phytoplasma mali’, ‘Candidatus Phytoplasma pyri’ and ‘Candidatus Phytoplasma prunorum’, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 1217-1226.

Seemüller, E. and Schneider, B. (2007): Differences in virulence and genomic features of strains of

'Candidatus Phytoplasma mali', the apple proliferation agent. *Phytopathology*, 97 (8), 964-970.

Seemüller, E., Moll, E. and Schneider, B. (2008): Pear decline resistance in progenies of *Pyrus* taxa used as rootstocks. *Eur. J. Plant Pathol.*, 123: 217-223.

Seemüller, E., Kiss, E., Süle, S. and Schneider, B. (2010): Multiple infection of apple trees by distinct strains of 'Candidatus Phytoplasma mali' and its pathological relevance. *Phytopathology*, 100 (9): 863-870.

Seemüller, E., Kampmann, M., Kiss, E. and Schneider, B. (2011): HflB gene-based phytopathogenic classification of Candidatus Phytoplasma mali strains and evidence that strain composition determines virulence in multiply infected apple trees. *Mol. Plant Microbe Int.*, 24: 1258-1266.

Seemüller, E., Süle, S., Kube, M., Jelkmann, W. and Schneider, B. (2013): The AAA+ ATPases and HflB/FtsH proteases of 'Candidatus Phytoplasma mali': phylogenetic diversity, membrane topology, and relationship to strain virulence. *Mol. Plant Microbe Int.*, 26 (3): 367-376.

Seliskar, C.E. and Wilson, C.L. (1981): Yellows diseases of trees. *Mycoplasma Diseases of Trees and Shrubs. Academic Press, NY*, pp.: 35-96.

Sertkaya, G., Martini, M. and Osler, R. (2008): First report of 'Candidatus Phytoplasma mali' in Turkey. *J. Plant Pathol.*, 90: 143.

Sinclair, W.A. and Griffiths, H.M. (2000). Variation in aggressiveness of ash yellows phytoplasmas. *Plant Dis.*, 84 (3): 282-288.

Steffek, R., Follak, S., Sauvion, N., Labonne, G. and MacLeod, A. (2012): Distribution of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' and its vector *Cacopsylla pruni* in European fruit-growing areas: a review. *EPPO bulletin*, 42 (2): 191-202.

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

Süle, S. (2012a.): A kajszibarack fitoplazmás pusztulása. *Kertészet és Szőlészet*, 26: 12-13.

Süle, S. (2012b): Mitől pusztulnak a kajszifák? *Mezőhír*, 9: 64-66.

Süle, S. (2014): Kajszipusztulás és az ellene való védekezés. *Növényvédelem*, 50 (1): 23-25.

Szirmai, J. (1956): Új vírusbetegség hazánkban. *Agrártudomány*, 8: 351-354.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007): MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599.

Tarcali, G., Kövics, Gy. and Kiss, E. (2014): Occurrence of stone fruit yellows phytoplasma disease ('Candidatus *Phytoplasma prunorum*') in Hungary and Central Europe. In: Kharwar, R.N., Upadhyay, R.S., Dubey, N.K. and Raghuwanshi, R. (eds.): *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Springer India, 205-215.

Tedeschi, R., Bosco, D. and Alma, A. (2002): Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. *J. Econ. Entomol.*, 95 (3): 544-551.

Tedeschi, R., Visentin, C., Alma, A. and Bosco, D. (2003): Epidemiology of apple proliferation (AP) in northwestern Italy: evaluation of the frequency of AP-positive psyllids in naturally infected populations of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *Ann. Appl. Biol.*, 142: 285-290.

Tedeschi, R. and Alma, A. (2004): Transmission of apple proliferation phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *J. Econ. Entomol.*, 97 (1): 8-13.

Tedeschi, R. and Alma, A. (2006): *Fieberiella florii* (Homoptera: Auchenorrhyncha) as a vector of "Candidatus *Phytoplasma mali*". *Plant Dis.*, 90 (3): 284-290.

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

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap

penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22 (22): 4673-4680.

Toth, K.P., Harrison, K. and Sears, B.R. (1994): Phylogenetic relationships among members of the class Mollicutes deduced from rps3 gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 119-124.

Tran-Nguyen, L., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R. and Gibb, K. (2007): An overview of the genome sequence of 'Candidatus Phytoplasma australiense' - Australian strain. *B. Insectol.*, 60: 111-112.

Ulrichova, M. and Petru, E. (1975): Elimination of mycoplasma in tobacco callus tissues (*Nicotiana glauca* Grah) cultured in vitro in the presence of 2.4-D nutrient medium. *Biol. Plantarum*, 17: 103-108.

Valenta, V. (1959a): Interference studies with yellows-type plant viruses. I. Cross protection test with European viruses. *Acta Virol.*, 3: 65–72.

Valenta, V. (1959b): Interference studies with yellows-type plant viruses. II. Cross protection test with European and American viruses. *Acta Virol.*, 3: 145–152.

Valenta, V., Musil, M. and Misiga, S. (1961): Investigations on European yellow-type viruses. *Phytopathology*, 42: 1-38.

Varga, K., Kölber, M., Martini, M., Pondrelli, M., Ember, I., Tőkés, G., Lázár, J., Mikulás, J., Papp, E., Szendrey, G., Schweigert, A. and Bertaccini, A. (2000): Phytoplasma identification in Hungarian grapevines by two nested-PCR systems.- Extended abstracts of XIIIth meeting of the International Council for the Study of viruses and virus-like diseases of the grapevine (ICVG). Adelaide, Australia 12-17 March, pp.: 113-115.

Varga, K., Kölber, M., Erdős, Z., Bíró, E., Paltrinieri, S., Martini, M. and Bertaccini, A. (2001): Identification of phytoplasmas infecting sour cherry in Hungary. *Acta Hort. ISHS*, 2: 383-388.

Vaughn, K.C. (2003): Dodder hyphae invade the host: a structural and immunocytochemical characterization. *Protoplasma*, 220: 189–200.

Viczián, O., Süle, S., Péntes, B. és Seemüller, E. (1997): A kajszai fitoplazmás pusztulása

Magyarországon. *Új Kertgazdaság*, 1: 48-51.

Viczián, O., Süle, S. és Gáborjányi, R. (1998a): A sztolbur fitoplazma természetes gazdanövényei Magyarországon. *Növényvédelem*, 34 (11): 617-620.

Viczián, O., Süle, S. és Gáborjányi, R. (1998b): Titokzatos kórokozók - Fűben-fában fitoplazma. In: *Élet és tudomány*, 53 (16): 491-493.

Viczián, O. (2002): A Magyarországon előforduló fitoplazmák molekuláris biológiai módszerekkel történő meghatározása és tanulmányozása (Doktori értekezés, Szent István Egyetem).

Waters, H. and Hunt, P. (1980): The in vivo three-dimensional form of a plant mycoplasma-like organism by the analysis of serial ultrathin sections. *J. Gen. Microbiol.*, 116: 111.

Wei, W., Davis, R. E., Lee, M. and Zhao, Y. (2007): Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57 (8): 1855-1867.

Weintraub, P.G. and Beanland, L. (2006): Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 91-111.

Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Van Erten, J., Maniloff, J. and Woese, C.R. (1989): A phylogenetic analysis of the mycoplasmas, basis for their classification. *J. Bacteriol.*, 171: 6455-6467.

Woese, C.R. (1987): Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271.

9. MELLÉKLETEK

1. Melléklet: Ábrajegyzék

		oldalszám
1. ábra.	A: egészséges, b: ' <i>Ca. P. mali</i> ' 1/93-as törzssel fertőzött c: ' <i>Ca. P. mali</i> ' AT törzssel fertőzött rózsameténg.	54
2. ábra.	A: ' <i>Ca. P. prunorum</i> ' GSFY törzssel, b: ' <i>Ca. P. solani</i> ' STOL törzssel c: ' <i>Ca. P. asteris</i> ' AAY1 törzssel fertőzött rózsameténg.	55
3. ábra.	' <i>Ca. P. mali</i> ' AT törzs által okozott tünetek dohányon.	56
4. ábra.	' <i>Ca. P. mali</i> ' AT törzs által okozott tünetek almafán és alma termésén; a: tünetes fa és egészséges fa, b: tünetes termés, egészséges termés.	56
5. ábra.	A fertőzést követő 6. (az 1/93id minta esetében a 12.) hónapban mért adatok páronkénti összehasonlítása során kialakult csoportok a szár átmérőjének átlagos mérete, valamint a szórások alapján. Az A, B, C, D jelölések a szignifikáns eltérések alapján való csoportosítást jelentik. Az egészséges minta zöld, az avirulens törzssel fertőzött minta kék, a virulens törzsekkel fertőzött minták bordó színnel jelöltek. A kezelések balról jobbra: „Eg”: fertőzetlen kontroll, „1/93fi”: ' <i>Ca. P. mali</i> ' 1/93 avirulens törzssel fertőzött rózsameténg, a fertőzést követő 6. hónapban, „1/93id”: ' <i>Ca. P. mali</i> ' 1/93 avirulens törzssel fertőzött rózsameténg, a fertőzést követő 12. hónapban, „at”: ' <i>Ca. P. mali</i> ' AT törzssel fertőzött rózsameténg, „pd”: ' <i>Ca. P. pyri</i> ' PD törzssel fertőzött rózsameténg, „stol”: ' <i>Ca. P. solani</i> ' STOL törzssel fertőzött rózsameténg, „esfy”: ' <i>Ca. P. prunorum</i> ' GSFY törzssel fertőzött rózsameténg, „aay”: ' <i>Ca. P. asteris</i> ' AAY1 törzssel fertőzött rózsameténg.	57
6. ábra.	A fertőzést követő 18. (az 1/93id minta esetében a 24.) hónapban mért adatok páronkénti összehasonlítása során kialakult csoportok a szár átmérőjének átlagos mérete, valamint a szórások alapján. Az A, B, C, D jelölések a szignifikáns eltérések alapján való csoportosítást jelentik. Az egészséges minta zöld, az avirulens törzssel fertőzött minta kék, a virulens törzsekkel fertőzött minták bordó színnel jelöltek. A kezelések balról jobbra: „Eg”: fertőzetlen kontroll, „1/93fi”: ' <i>Ca. P. mali</i> ' 1/93 avirulens törzssel fertőzött rózsameténg, a fertőzést követő 18. hónapban, „1/93id”: ' <i>Ca. P. mali</i> ' 1/93 avirulens törzssel fertőzött rózsameténg, a fertőzést követő 24. hónapban, „at”: ' <i>Ca. P. mali</i> ' AT törzssel fertőzött rózsameténg, „pd”: ' <i>Ca. P. pyri</i> ' PD1 törzssel fertőzött rózsameténg, „stol”: ' <i>Ca. P. solani</i> ' STOL törzssel fertőzött rózsameténg, „esfy”: ' <i>Ca. P. prunorum</i> ' GSFY törzssel fertőzött rózsameténg, „aay”: ' <i>Ca. P. asteris</i> ' AAY1 törzssel fertőzött rózsameténg.	58
7. ábra.	A PCR során felszaporított 528 bp hosszúságú <i>hflB</i> gén szakaszok. 1. oszlop: 1 kb méretmarker (Fermentas), 2-19: ' <i>Ca. P. mali</i> ' 1/93-as törzs izolátumai.	60
8. ábra.	A ' <i>Ca. P. mali</i> ' izolátumok <i>hflB</i> fragmentjeinek SSCP profilja. 1-5: 1/93-as izolátum almából, 6-7: 1/93-as izolátum rózsameténgből, 8-9: 1/93-as izolátum dohányból, 10: AT izolátum rózsameténgből, 11: AT izolátum dohányból.	61
9. ábra.	A ' <i>Ca. P. mali</i> ' 17/93-as izolátum <i>hflB</i> gén fragmentjének SSCP profilja.	61
10. ábra.	Klónozott <i>hflB</i> gén fragmentek ' <i>Ca. P. mali</i> ' által fertőzött almafából. 1-13: Az almából izolált 1/93-as törzs <i>hflB</i> fragmentjének klónozását	62

	követően kapott különböző profilok.	
11. ábra.	A 'Ca. P. mali' 17/93-as törzsének klónozott <i>hflB</i> gén fragmentumaira jellemző SSCP mintázatok.	62
12. ábra.	A rózsameténgben, illetve a dohányban előforduló, almafáról átvitt 1/93-as izolátum <i>hflB</i> gén szakaszának szekvenciabeli egyezőségei. A szekvenciák közötti eltérések az ábrán piros színnel vannak jelölve.	63
13. ábra.	A 'Ca. P. mali' izolátumok filogenetikai távolságainak ábrázolása a klónozott 528 bp hosszúságú <i>hflB</i> génszakaszokról. A szekvenciák több törzssel keverten fertőzött fákról származnak. Az AT, AP15, valamint a GDH törzsek szerepelnek referenciaként. A különböző számok az izolátumot és annak klónjait jelölik. Az elágazáson szereplő számok az elágazás valószínűségét jelölik százalékos formában, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis során kaptunk. Az a, illetve b jelölés az 1/93-as és a 17/93-as izolátumok klónozott inzertjeinek fő csoportjait mutatják.	64
14. ábra.	A rózsameténgben, illetve a dohányban előforduló, almafáról átvitt 1/93-as izolátum <i>imp</i> gén szakaszának szekvenciabeli egyezőségei. A szekvenciák közötti eltérések az ábrán piros színnel vannak jelölve.	66
15. ábra.	A 'Ca. P. mali' izolátumok filogenetikai távolságainak ábrázolása a klónozott 528 bp hosszúságú <i>imp</i> génszakaszokról. A szekvenciák több törzssel keverten fertőzött fákról származnak. Az AT, AP15, valamint a GDH törzsek szerepelnek referenciaként. A különböző számok az izolátumot és annak klónjait jelölik. A megszekvenált PCR termékek a fitoplazma törzs, illetve a gazdanövény nevének rövidítésével (Vin-rózsameténg, Tab- dohány) szerepelnek. Az elágazáson szereplő számok az elágazás valószínűségét jelölik százalékos formában, amelyet 1000 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis során kaptunk. Az a, illetve b jelölés az 1/93-as és a 17/93-as izolátumok klónozott inzertjeinek fő csoportjait mutatják.	67
16. ábra.	Az "A" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén a hajtásban előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.	70
17. ábra.	Az "A" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén a gyökérben előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.	71
18. ábra.	Az "A" kísérleti beállításban, egyidejű fertőzés esetén a hajtásban előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.	73
19. ábra.	Az "A" kísérleti beállításban, egyidejű fertőzés esetén a gyökérben előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.	74
20. ábra.	A "B" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén a hajtásban előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.	76
21. ábra.	A "B" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén a gyökérben előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.	77
22. ábra.	A "C" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén a hajtásban előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.	79
23. ábra.	A "C" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén a gyökérben előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének	80

	kimutathatósága a ciklusszám alapján.	
24. ábra.	"C" kísérleti beállításban, egyidejű fertőzés esetén a hajtásban előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.	81
25. ábra.	A "C" kísérleti beállításban, egyidejű fertőzés esetén a gyökérben előforduló 1/93 és AT törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján	82
26. ábra.	SSCP mintázatok a <i>Ca. P. mali</i> <i>hflB</i> 464-es génjének klónozásából. 1-2: AT, 3-4: 1/93, 5-7: 1/93+AT előfertőzéssel, a gátlásra utaló mintázattal, 8-10: 1/93+AT egyidejű fertőzéssel, a sikertelen gátlásra utaló mintázattal (véletlenszerűen választott, valósídejű PCR-rel pozitív eredményt adó minták)	83
27. ábra.	PD (' <i>Ca. P. pyri</i> ', NCBI azonosító: FM201270) és AP (' <i>Ca. P. mali</i> ', NCBI azonosító: FR863637) homológ <i>hflB</i> gén szakaszok összehasonlítása. A tervezett, valósídejű PCR-hez alkalmas indítószekvencia-pár (fPD_RT/rPD_RT) az ábrán narancssárga színnel van jelölve.	85
28. ábra.	ESFY (' <i>Ca. P. prunorum</i> ', NCBI azonosító: AF195780) nitroreduktáz-szerű gén fragmentjének szekvenciája, az új, valósídejű PCR-hez alkalmas indítószekvencia-pár (fECA_RT/rECA_RT) az ábrán narancssárga színnel jelölt.	86
29. ábra.	Az első kísérleti beállításban a rózsameténg hajtásában előforduló 1/93 és GSFY törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.	87
30. ábra.	A második kísérleti beállításban a rózsameténg hajtásában előforduló 1/93 és GSFY törzsek egymáshoz viszonyított mennyiségének kimutathatósága a ciklusszám alapján.	88
31. ábra.	Az 1/93 és a PD törzsek egymáshoz viszonyított mennyisége 4 hónappal a kihívó törzsszel való fertőzést követően a ciklusszám (Ct érték) alapján. A pirossal jelölt oszlopok az <i>fhflB</i> -RT-1/ <i>rhflB</i> -RT-3 indítószekvenciapárral kapott eredményeket, a zöld színű oszlopok az fPD_RT/rPD_RT indítószekvenciákkal kapott eredményeket jelölik.	89
32. ábra.	Az 1/93 és a PD törzsek egymáshoz viszonyított mennyisége 7 hónappal a kihívó törzsszel való fertőzést követően a ciklusszám (Ct érték) alapján. A pirossal jelölt oszlopok az <i>fhflB</i> -RT-1/ <i>rhflB</i> -RT-3 indítószekvenciapárral kapott eredményeket, a zöld színű oszlopok az fPD_RT/rPD_RT indítószekvenciákkal kapott eredményeket jelölik.	90
33. ábra.	Az 1/93 + STOL keresztfertőzéses kísérletben PCR-rel felszaporított különböző hosszúságú DNS szakaszok agaróz géles ellenőrzése 6 hónappal a kihívó törzsszel való fertőzést követően. A: PCR fSTOL/rSTOL indítószekvencia-pár alkalmazásával: 1. molekuláris méretmarker (Middle Range, Fermentas) 2. 1/93 3. STOL 4. 1/93 + STOL egyidejű fertőzés 5-6. 1/93 + STOL előfertőzés 7. negatív kontroll; B: PCR <i>fhflB3</i> _1/ <i>rhflB3</i> indítószekvencia-pár alkalmazásával: 1. molekuláris méretmarker (High Range, Fermentas) 2. 1/93 3. STOL 4. 1/93 + STOL egyidejű fertőzés 5-6. 1/93+STOL előfertőzés 7. negatív kontroll.	91
34. ábra.	Az 1/93 + AAY1 keresztfertőzéses kísérletben PCR-rel felszaporított különböző hosszúságú DNS szakaszok agaróz géles ellenőrzése 6 hónappal a kihívó törzsszel való fertőzést követően. A: PCR fAY/rAY indítószekvencia-pár alkalmazásával: 1. molekuláris méretmarker (Middle Range, Fermentas) 2. negatív kontroll 3. 1/93 4. AAY1 5-6.	92

1/93 + AAY1 előfertőzés 7. 1/93 + AAY1 egyidejű fertőzés; B: PCR fhfB3_1/rhfB3 indítószekvencia-pár alkalmazásával: 1. molekuláris méretmarker (High Range, Fermentas) 2. negatív kontroll 3. 1/93 4. AAY1 5-6. 1/93 + AAY1 előfertőzés 7. 1/93 + AAY1 egyidejű fertőzés.

2. Melléklet: Táblázatok jegyzéke

	oldalszám
1. táblázat. A kísérletek során használt fitoplazma törzsek és rendszertani besorolásuk	37
2. táblázat. A fitoplazma törzsek PCR-es kimutatása során alkalmazott indítószekvenciák	41
3. táblázat. Fitoplazma törzsek valósidejű PCR-rel történő elkülönítésére alkalmazott indítószekvenciák	44
4. táblázat. A keresztvédetségben használt fitoplazma törzsek egyes génszakaszainak felszaporítására használt indítószekvenciák	48
5. táblázat. Az immunizáló és a kihívó fitoplazma törzsek elkülönítésére használt indítószekvenciák valósidejű PCR során	50
6. táblázat. Az "A" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén tapasztalt 1/93 és AT törzsek aránya a hajtásban, illetve a gyökérben. A hónapok a kihívó fertőzéstől számított mintavételi időpontokra utalnak. "n.v.": nem vizsgált.	69
7. táblázat. Az "A" kísérleti beállításban, egyidejű fertőzés esetén tapasztalt 1/93 és AT törzsek aránya a hajtásban, illetve a gyökérben. A hónapok a kihívó fertőzéstől számított mintavételi időpontokra utalnak. "n.v.": nem vizsgált.	72
8. táblázat. A "B" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén tapasztalt 1/93 és AT törzsek aránya a hajtásban, illetve a gyökérben. A hónapok a kihívó fertőzéstől számított mintavételi időpontokra utalnak. "n.v.": nem vizsgált.	76
9. táblázat. A "C" kísérleti beállításban, előfertőzés esetén tapasztalt 1/93 és AT törzsek aránya a hajtásban, illetve a gyökérben. A hónapok a kihívó fertőzéstől számított mintavételi időpontokra utalnak. "n.v.": nem vizsgált.	78
10. táblázat. A "C" kísérleti beállításban, egyidejű fertőzés esetén tapasztalt 1/93 és AT törzsek aránya a hajtásban, illetve a gyökérben. A hónapok a kihívó fertőzéstől számított mintavételi időpontokra utalnak. "n.v.": nem vizsgált.	81
11. táblázat. Az 1/93 és az AT törzsek jelenlétének aránya dohány tesztnövényben az avirulens törzsszel végzett 3 hetes előfertőzésben.	84
12. táblázat. Az 1/93 és az AT törzsek jelenlétének aránya dohány tesztnövényben az avirulens törzsszel végzett 6 hetes előfertőzésben.	84

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton fejezem ki hálámat egykori témavezetőmnek, Dr. Süle Sándornak, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy bekapcsolódjak a hazai fitoplazmakutatásba, valamint számos ötlettel és lehetőséggel támogatta a szakmai fejlődésemet. Köszönetemet fejezem ki Dr. Barna Balázsnak, aki a munkám utolsó szakaszában vállalta a témavezetés folytatását, és számos hasznos tanáccsal hozzájárult a dolgozatom elkészültéhez, továbbá Dr. Palkovics Lászlónak, aki témavezetőm volt a Növénykórtani Tanszéken.

Hálás vagyok a dosenheimi Julius Kühn Institut dolgozóinak: különösképpen Prof. Dr. Erich Seemüllernek és Dr. Bernd Schneidernek, akik hatalmas segítséget nyújtottak a kezdeti lépésektől kezdve, bevezettek a fitoplazmakutatás rejtelseibe, valamint jelentős növényanyagot biztosítottak a további kutatásainkhoz; Maximilian Andrasinak, Maren Kampmann-nak, Katrin Koneckinek, Marina Gernoldnak, Jürgen Grossnak, Heidrun Vogtnak, Felix Hergenahnnak, akikhez személyes és szakmai kérdéseimmel és fordulhattam több hónapos németországi tartózkodásom során.

Köszönöm a támogatást a Növényvédelmi Intézet dolgozóinak, különösképpen Dr. Viczián Orsolyának és Dr. Mergenthaler Emesének, valamint a Biotechnológia osztály további dolgozóinak, és nem utolsósorban a családomnak, férjemnek és kisfiamnak, továbbá mindenkinek, aki közvetlen, vagy közvetett módon támogatott.