

Kajszi ültetvények fitoplazmás pusztulása ("Ca. Phytoplasma prunorum") Borsod-Abaúj-Zemplén megyében

Tarcali Gábor¹ – Kiss Emese² – Kövics György János¹ – Süle Sándor² – Irinyi László¹ – Kiss László³

¹Debreceni Egyetem AGTC, Növényvédelmi Tanszék, 4032 Debrecen, Böszörményi u. 138.

²MTA Növényvédelmi Kutató Intézet, Biotechnológia Osztály, 1022 Budapest, Herman O. u. 15.

³MNMNK HBM-i Területi Szervezete, 4032 Debrecen, Böszörményi u. 146.

tarcali@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A fitoplazmás eredetű betegségek világszerte egyre komolyabb problémákat okoznak a termesztőknek. Az utóbbi időben különösen a gyümölcsfák fitoplasma által okozott pusztulásai jelentenek komoly veszélyt a gyümölcsstermesztésben a termés minőségének csökkentésével, komoly termésvesztéssel, a fák élettartamának rövidülésével, pusztulásával. A kajszi fitoplazmás betegsége ("Ca. Phytoplasma prunorum" Seemüller and Schneider 2004, korábban: csonthéjasok európai sárgasága fitoplazma, European stone fruit yellows /ESFY/ phytoplasma) 1924 óta ismert Európában. A betegséget 1992-ben Magyarországon is diagnosztizálták. A kórokozó a kajszin kívül más csonthéjas gyümölcs fajokat is veszélyeztet. 2009-ben átfogó vizsgálatokat kezdtünk Borsod-Abaúj-Zemplén megye több csonthéjas ültetvényében a fertőzöttség mértékének megállapítására, és laboratóriumi mintákat gyűjtöttünk a vizuális diagnosztizálás PCR alapú megerősítésére. A terepi vizsgálatok során a vizsgált állományok többségénél súlyos mértékű fitoplazmás fertőzöttséget állapítottunk meg, amelyet a laboratóriumi vizsgálatok eredményei is igazoltak. Laboratóriumban 28 különböző csonthéjas növényről (kajszi, őszibarack, meggy, cseresznye, vadszilva /Prunus cerasifera/) származó mintát vizsgáltunk amelyekből 13-ban PCR vizsgálattal is igazolni lehetett a fitoplazma fertőzöttséget. Megállapítottuk, hogy Borsod-Abaúj-Zemplén megye csonthéjas ültetvényeiben általánosan elterjedt a "Ca. Phytoplasma prunorum", és komolyan veszélyezteti ezen növények termesztését, legnagyobb mértékben a kajsziét.

SUMMARY

Plant diseases caused by phytoplasmas have increasing importance in all over the world for fruit growers. Lately, phytoplasma diseases occur on many fruit varieties and responsible for serious losses both in quality and quantity of fruit production. In the long-run these diseases cause destruction of fruit trees. The apricot phytoplasma disease (Ca. Phytoplasma prunorum) was first reported in Europe in 1924 from France. In 1992 the disease has also been identified in Hungary. On the base of growers' signals serious damages of "Candidatus Phytoplasma prunorum" Seemüller and Schneider, 2004 (formerly: European stone fruit yellows phytoplasma) could be observed in different stone fruit plantations in the famous apricot-growing area nearby Gönc town, Northern-Hungary. Field examinations have been begun in 2009 in several stone fruit plantations in Borsod-Abaúj-Zemplén County mainly in Gönc region which is one of the most important apricot growing regions in Hungary, named "Gönc Apricot Growing Area". Our goals were to diagnose the occurrence of Ca. Phytoplasma prunorum on stone fruits (especially on apricot) in the North-Hungarian growing areas by visual diagnostics and confirm data by laboratory PCR-based examinations. All the 28 collected samples were tested in laboratory trials and at 13 samples from apricot, peach, sour cherry and wild plum were confirmed the presence of phytoplasma (ESFY). On the base of observations it seems evident that the notable losses caused by "Ca. Phytoplasma prunorum" is a new plant health problem to manage for fruit growers, especially apricot producers in Hungary.

Kulcsszavak: "Ca. Phytoplasma prunorum", fitoplazma, ESFY, kajszi, csonthéjasok

Keywords: "Ca. Phytoplasma prunorum", phytoplasma, ESFY, apricot, stone fruits

BEVEZETÉS

A fitoplazma eredetű betegségek világszerte egyre komolyabb mennyiségi és minőségi veszteséget okoznak a szántóföldi növénytermesztésben és a kertészeti gazdálkodásban egyaránt. Az utóbbi időben különösen a gyümölcsfák fitoplaszma pusztulásai jelentenek komoly fejtörést a termesztőknek.

A kórokozó a termés minőségének csökkenését, komoly termésvesztéset, gyümölcsfáknál a termő fák élettartamának rövidülését, a fák pusztulását okozzák. A fitoplazmák egysejtű, apró (60-110 nanométer nagyságú), csak elektromikroszkóppal látható élőlények. Több tulajdonságukban a baktériumokra emlékeztetnek, számos jellemzőjük azonban eltér azoktól. Sejtfal nélküli, táptalajon nem tenyészthető növényi kórokozók. A növényeken általában sárgulást, torzulást vagy burjánzást idéznek elő. Az ilyen sárgulásos, törpüléses, seprősödéses növényi betegségeket korábban vírusos eredetűeknek vélték. Az 1960-as évek végéig a kórokozót mint vírust tartották számon (Samuel és mtsai, 1933, Szirmai, 1956). 1967-ben japán kutatók a beteg növények szöveteiben felfedezték ezeket a mikoplazmaszerű (MLO – mycoplasma-like organism) kórokozókat (Doi és mtsai, 1967). Ekkor vált bizonyítottá, hogy az ilyen jellegű betegségek okozója nem vírus, hanem egy önálló kórokozó csoport, amit 1993-ban új rendszertani besorolás nyomán fitoplazmáknak neveztek el (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes, 1993; Gundersen és mtsai, 1994).

A legrégebben ismert fitoplazma által okozott betegség a burgonya és paradicsom sztolbur betegsége, amely a gazdanövény különböző részeinek torzulását, csökevényesedését, seprősödését, értéktelen, használhatatlan

termés képződését okozza. A gyümölcsfák körében ugyancsak régen ismert fitoplazmás betegség az almafa seprűsödés, amely hazánkban is jelentős károsodást: értéketlen vesszők fejlődését, apró és izetlen gyümölcsök képződését okozza. Több más növényünknek, így a körtének, szőlőnek, kukoricának is van régóta ismert fitoplazma betegsége.

A "*Candidatus Phytoplasma prunorum*" (syn: European stone fruit yellows phytoplasma; ESFY) (Kövcis, 2009) mára Európában egyike lett a csonthéjas gyümölcsűek legfontosabb betegségeinek. Számos európai országban a kajszi termesztés legnagyobb problémájaként említik a kórokozót (Jaraush és mtsai, 2001; Navratil és mtsai, 2001; Torres és mtsai, 2004). A betegség tüneteit először Franciaországban írták le 1924-ben. 1992-ben Magyarországon is megfigyelték, habár vírusos eredetűnek vélt tüneteit már jóval korábban is észlelték hazánk területén is, majd az MTA Növényvédelmi Kutató Intézetének szakemberei be is azonosították a kórokozót (Süle és mtsai, 1997; Viczián és mtsai, 1997). Kártétele Európa-szerte az utóbbi évtizedekben, Magyarország területén pedig az elmúlt években kezdett súlyos méreteket ölteni, elsősorban kajszin, de előfordul más csonthéjas fajokon is. A betegség megjelenéséről adatok vannak Budapest környékéről, Pest, Fejér, Somogy, Borsod-Abaúj-Zemplén és Bács-Kiskun megyékből (Mergenthaler, 2004). A "*Ca. Phytoplasma prunorum*" mára a kajszi egyik legfontosabb betegsége lett Magyarországon (Süle és mtsai, 2003). A Gönci Kajszi termesztő Régióban (Észak-Kelet Magyarország) a kórokozó előfordulásáról 2009-ben számoltak be először (Tarcali - Kövcis, 2009). A betegség megjelenése és terjedése újabb komoly veszélyt jelent a jobb időket megélt hazai kajszi termesztés számára, amely az 1960-as évek nem ritkán 130 000 tonna körüli országos termésmennyiségéhez képest az ezredfordulóra drasztikusan, 20 000 tonna körüli értékekre esett vissza, majd kis mértékben ugyan javult, de napjainkban sem több 35-40 000 tonnánál.

A kajszi fitoplazma által okozott betegsége általánosságban gutaütésszerű szimptomákat mutat. A gutaütés eddigi általánosan ismert betegsége komplexuma (*Pseudomonas syringae* baktérium és *Cytospora cincta* gomba + hideghatás) végső tünetéhez hasonlóan ebben az esetben is a fák gyors pusztulása a végeredmény. A betegség mára a kajszi egyik legsúlyosabb betegségévé vált. Okozója Európában és Magyarországon is zárlati (karantén) kórokozó. A fitoplazma kizárólag a növény háncsszöveteiben képes élni. Ősszel a kórokozó a gyökerekbe vonul vissza és ott tel el. 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-ik évtől figyelhetők meg. A fertőzés a megbetegedett fa körül körkörös terjed tovább, s ezt a fák ilyen irányú pusztulása is jól jelzi.

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 háncs narancssárgás elszíneződése látható, ami később világosbarna lesz. A kórokozó körben elpusztítja a háncsszövetet, s ez vezet a fa hirtelen, gutaütésszerű elhalásához. A pusztulás sajátossága, hogy ellentétben a gutaütés „hagyományos” kórokozóival, a folyamatot nem kíséri mézgaképződés. Idősebb fák esetében a fertőződés általában először csak a fa egyes ágain következik be, és azok pusztulnak el, de később a kór itt is továbbterjed, és bekövetkezik a teljes pusztulás. A betegség a kajszi kívül megtalálható és súlyos károkat okoz őszibarackon, cseresznyén, meggyen is. Az európai szilva jól tolerálja, viszont a japánszilva (*Prunus salicina*) is komoly fogékonyságot mutat a kórokozóra (Carraro és mtsai, 1998; Mona és mtsai, 2008).

A betegség terjedésének két alapvető lehetősége van. A kórokozó fertőzött szaporítóanyagokkal képes nagyobb távolságokra is eljutni. A megfertőzött területen a későbbiekben a vektorok veszik át a terjesztő szerepét, és a kórokozót a beteg egyedekről továbbviszik az egészséges fákra. A kajszi fitoplazmás betegségének vektora a szilvalevel-bolha (*Cacopsylla pruni* Scopoli) (Carraro és mtsai, 2001; Fialová és mtsai, 2007), amely még nem vált széleskörűen elterjedt rovarrá hazánkban, de jelen van már Vas megyében, Budapest környékén és Borsod-Abaúj-Zemplén megyében is.

Borsod-Abaúj-Zemplén megyében található napjaink egyik legjelentősebb hazai kajszi termő régiója a Gönci termőközet. A jó terméseredmények mellett a minőség is kiváló, amit az ízletes gyümölcs mellett jól reprezentál a hungaricum Gönci barack pálinka. Úgy tűnik, mindez most igen komoly veszélybe került, mert a térség csonthéjas ültetvényeiben, és azokon belül is elsősorban a kajsziokban robbanásszerűen felütötte a fejét a fitoplazmás betegség. A Borsod megyei növényvédős kollégáktól hallottunk először a problémáról. Jelzésük hatására a körzet több érintett ültetvényét magában foglaló részletes és alapos vizsgálódásba kezdtünk a betegség diagnosztizálása és a fertőzöttség mértékének feltárása céljából. A 2009 októberében kezdett helyszíni felméréseink során számos kajszi ültetvény tragikus képe tárult elénk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Terepi vizsgálatok

Terepi vizsgálatokat végeztünk 2009 augusztusától kezdődően Borsod-Abaúj-Zemplén megye több csonthéjas, elsősorban kajszi ültetvényében a betegség vizuális diagnosztizálása, a fertőzöttség mértékének felmérése, valamint növényi minták begyűjtése és laboratóriumi PCR ellenőrző vizsgálati céljaira.

A vizsgált ültetvényekben meghatároztuk a fertőzöttség mértékét ($F\%$ = fertőzöttségi %) és fokát (F_i = fertőzöttségi index) a vizuálisan tapasztalható tünetek alapján, amelyek növényi részenként a következők:

- leveleken: sárga elszíneződés, a levelek a színük felé kanalasodnak,
- ágakon: általános sárgulás, száradás,
- kérgen: narancssárgás vagy világosbarna elszíneződés a hánccszövetben,
- fákön: több ág vagy a teljes fa általános sárgulása, száradása, elpusztult vagy már eltávolított fa, a pusztulást nem kíséri mézgaképződés

A fertőzöttség mértékének ($F\%$) meghatározásához ültetvényenként 100 db fából vagy egy gyümölcsfa sorból álló mintaterületet jelöltünk, amelyben a fákat az 1. táblázatban látható értékelési skála (1-5) szerint vizsgáltunk és minősítettünk.

A terepi felvételezés során a vizuális diagnosztizálás eredményeként fertőzöttnek vagy gyanúsnak vélt ültetvények véletlenszerűen kiválasztott fáiból növényi mintákat (ceruza vastagságú hajtás, levelek, gyökérdarabok, kéregminta) vettünk. Mintavételi eszközökként metszőollót, szikét, ásót használtunk. A begyűjtött mintákat azonosítóval ellátott tasakokba helyeztük, hűtőtáskában tároltuk és szállítottuk.

1. táblázat

Értékelési skála a fertőzöttség mértékének (F_i) meghatározásához (Tarcali-Kövics, 2009)	
Fertőzés foka (1)	Vizuális tünetek (2)
I	Fertőzésmentes fa
II	Kezdeti tünetek egy ágon
III	Kezdeti tünetek több ágon
IV	Egy vagy több elhalt ág
V	Elpusztult vagy kivágott fa

Table 1: Scale of infection index (F_i) classification system (Tarcali-Kövics, 2009)
infection degrees (1), visible symptoms (2)

Laboratóriumi vizsgálatok

A jellegzetes tünetek alapján fitoplazma-fertőzöttnek vélt csonthéjas fákról mintákat gyűjtöttünk a laboratóriumi vizsgálatokhoz. A fitoplazma-DNS tisztítás kiinduló növényi anyagként ceruza vastagságú hajtások, ágaknak a kéregtől és farésztől elválasztott hánccszövege, gyökérrészek, levéllyél, levélér használható fel. Pusztuló, vagy már elpusztult növényi részekből a fitoplazma kimutatása már nem lehetséges, mivel a kórokozó élete a növények élő hánccszövetéhez kötött (Mergenthaler, 2004).

A mintákat 2010 augusztusában és szeptemberében gyűjtöttük. A kajszi minták Bekecs és Szerencs határában lévő Majos és Téglaszín ültetvényekből, illetve Bükkaranyosról származnak, az őszibarack mintákat a bekecsi Majos ültetvényből, a meggy mintákat a bekecsi Mélyárok ültetvényből, a vadszilvát Bükkaranyosról gyűjtöttük be. A vizsgálatokhoz a beteg fák tünetes hajtásait, leveleit, gyökerét, illetve egy esetben kérgét használtuk fel. Ellenőrzésként pozitív kontrollnak *Catharanthus roseus* tesztnövényen fenntartott ESFY törzs DNS-ét használtuk fel.

A fitoplazma-fertőzöttség kimutatásához és a kórokozó meghatározásához molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk. A DNS kivonásához a begyűjtött hajtások, ágak farésztől elválasztott hánccszövetét (floém), a levéllyelet, valamint a szennyeződésektől és talajmaradványoktól megtisztított gyökér hánccszövetét vettük alapul. A DNS kivonást Doyle and Doyle (1990) módszere alapján végeztük CTAB kivonópuffer segítségével (2,5% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris (pH 8,0), 1% PVP 500ml desztillált vízben, melyhez felhasználás előtt 0,2 % merkaptó-etanolt adtunk). A feldolgozott növényanyag körülbelül 0,5 g-ját steril dörzsmozsárban CTAB puffer hozzáadásával homogenizáltuk, majd az előírt lépéseket követve kivontuk a DNS-t a mintákból. A DNS pelletet 50-100 μ l steril desztillált vízben vagy módosított TE oldatban (10mM Tris, 0,1mM EDTA) oldottuk fel. A DNS-t -20 °C-on tároltuk.

A fitoplazmával való fertőzöttség megállapításához univerzális, fitoplazmákra tervezett indítószekvenciákkal (fP1/rP7, fU5/rU3, Kirkpatrick és mtsai, 1994) dolgoztunk. A fitoplazmák meghatározásához csoportspecifikus primereket: fO1/rO1, (Kirkpatrick és mtsai, 1994) és fajspecifikus ECA1/ECA2-t (Jarausch és mtsai, 1998) választottunk. A minták DNS-ét ezen indítószekvencia párok segítségével polimeráz láncreakció (PCR) során szaporítottuk fel. A bükkaranyosi minták vizsgálatához nested PCR-t alkalmaztunk, melynek során a specifikus PCR-hez templákként a P1/P7-tel felszaporított szakasz termékéből használtunk fel 1 μ l-t. A reakcióelegy mindkét esetben 1,4mM 10x puffert, 200 μ M dNTPs-t, 0,2-0,2 μ forward és reverse primert, 0,7U Taq-polimeráz enzimet, 1 μ l DNS-t és desztillált vizet tartalmazott. A reakció sikerességét a kapott termék 1%-os agaróz gélben való futtatásával ellenőriztük. A felhasznált indítószekvenciákat és programokat a 2. táblázat tartalmazza.

Mivel a csonthéjasok által termelt gátló anyagok gyakran befolyásolhatják a PCR eredményét, ezért a negatív eredmények ellenére sem zárható ki a fitoplazma jelenléte egyes mintákban. Emiatt több esetben megismételtük a DNS kivonást és annak ellenőrzését.

Három kajsziából és egy őszibarackból kivont fitoplazma DNS 880 bázispár hosszúságú szakaszának nukleotid sorrendjét meghatároztuk, és a nemzetközi adatbázisban (www.ncbi.nlm.nih.gov) található szekvenciákkal összehasonlítva azonosítottuk az általunk keresett fitoplazmát. Ehhez a DNS szakaszt fU5/rU3 univerzális primerpárral szaporítottuk fel, majd a keletkezett terméket QIAquick PCR Purification KIT

A vizsgálat során felhasznált indítószekvenciák és programok

Primer neve (1)	Szekvencia (5'→3') (2)	Pozíció (bp) (3)	Program (4)
P1	AAGAGTTTGCCTGGCTCAG GATT	6-28	94°C-5min; 94°C-1min 55°C-1min 72°C-2min (35 ciklus); 72°C-10min
P7	TTCTCGGCTACTTCCTGC	1818-1836	
fU5	CGGCAATGGAGGAAACT	370-387	95°C-3min; 95°C-1min 55°C-1min 72°C-1min (35 ciklus); 72°C-5min
rU3	TTCAGCTACTCTTTGTAACA	1230-1250	
ECA1	AATAATCAAGAACAAGAAGT		95°C-1min; 95°C-30sec 55°C-30sec 72°C-30sec (35 ciklus); 72°C-3min
ECA2	GTTTATAAAAATTAATGACTC		
fO1	CGGAAACTTTTAGTTTCAGT	61-81	94°C-3min; 94°C-1min 55°C-1min 72°C-1min (35 ciklus); 72°C-7min
rO1	AAGTGCCCAACTAAATGAT	1115-1135	

Table 2: Used sequences and programs on laboratory examinations

name of primer (1), sequences (2), position (3), programme (4)

(QIAGEN) segítségével tisztítottuk meg a nemkívánatos melléktermékektől, a gyártó utasításainak megfelelően. A minták szekvenciájának meghatározása a göttingeni Sequence Laboratories Göttingen GmbH laboratóriumában történt.

EREDMÉNYEK

A terepi diagnosztizálás eredményei

Terepi vizsgálatainkat 2009. októberétől kezdődően folyamatosan végeztük 7 település 17 ültetvényén (11 kajszi, 1 őszibarack, 4 meggy és 1 cseresznye állomány) a diagnosztizálási vizsgálatokat (1. ábra), és mindegyikben találtunk jellegzetes fitoplazmás tüneteket.

1. ábra: Borsod-Abaúj-Zemplén megye térképe a vizsgálati helyszínekkel

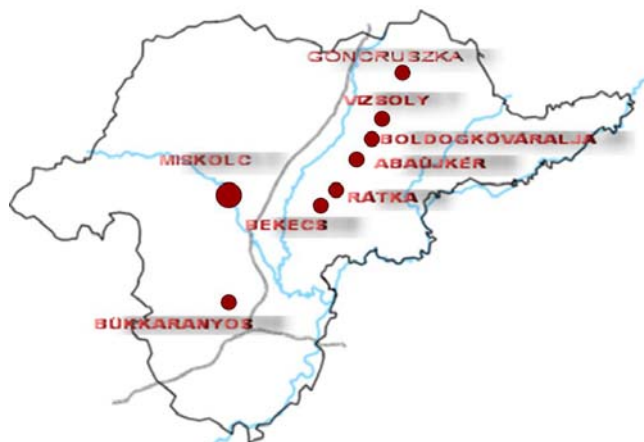


Figure 1: Map of Borsod-Abaúj-Zemplén county with the spots of field examinations

2009. október 2-án Bekecs község térségében vizsgáltunk 4 kajszi, 1 őszibarack, 1 cseresznye és 3 meggy állományt, amelynek eredményeit a 3. táblázatban összesítettük.

Megállapítható, hogy mindegyik vizsgált területen jelen van a kórokozó, és az állományok többségében nagyon súlyos mértékű a fertőzöttség. A kajszisok közül a Majos nevű területen található a 3. sorszámú ültetvény mutatta a letragikusabb képet, ahol szinte totális, 85%-os mértékű volt a fertőzöttség, azaz összesen 15 egészséges fát találtunk az értékelt mintaterületen. A területen a fertőzöttségi index is nagyon magas (3,99) volt, összesen 65 elpusztult, vagy a területről már eltávolított fát regisztráltunk. A Téglaszín elnevezésű gyümölcskertben lévő, a 3. táblázatban 4. számú kajszi ültetvény fertőzöttségi értékei is alig maradtak el az előzőtől (F% - 70; Fi - 3,21; 25 elpusztult vagy kivágott fa).

3. táblázat

Fitoplazmás fertőzés csonthéjas ültetvényekben Borsod-Abaúj-Zemplén megyében 2009-ben

Hely sorsz. (0)	Terepi vizsgálat időpontja (1)	Vizsgált fafaj (2)	Fák kora (év) (3)	Terület (ha) (4)	Vizsgált fák száma (5)	Fertőzés foka (6)					Fi (7)	F% (8)
						I	II	III	IV	V		
1	2009.10.02.	kajszi	4	20	100	98	1	1	-	-	1,03	2
2	2009.10.02.	kajszi	8-9	5	100	45	4	6	5	40	2,91	55
3	2009.10.02.	kajszi	~8	3	100	15	7	7	6	65	3,99	85
4	2009.10.02.	kajszi	12-13	10	100	30	6	4	35	25	3,21	70
5	2009.10.02.	őszibarack	~8	6	100	79	7	2	2	10	1,57	21
6	2009.10.02.	cseresznye	~10	22	100	70	9	4	6	11	1,79	30
7	2009.10.02.	meggy	8-9	5	100	38	14	10	8	30	2,78	62
8	2009.10.02.	meggy	7	~5	100	91	3	1	1	4	1,24	9
9	2009.10.02.	meggy	~30	8	100	64	6	9	13	8	1,95	36

Vizsgálóhelyek: 1-9. Bekecs

Table 3: Results of field examinations in Borsod-Abaúj-Zemplén county in 2009

No. of places (0), date of examination (1), fruit tree species (2), age of trees (3), area of plantation (4), number of examined trees (5), infection degrees (6), infection index (7), infection rate (8)

Spots of field examinations: 1-9 Bekecs

A Majos terület 6 ha-os őszibarack állományában (5. számú) is találtunk fitoplazma fertőzött fákat, de őszibarackon a fertőzöttség mértéke alacsonyabb volt, mint kajszin. A táblázatban 6. sorszámú cseresznye állományban is komoly mértékű fertőzöttséget tapasztaltunk. A Téglaszín kert 5 ha-os meggy ültetvénye a szomszédságában lévő kajszishoz hasonlóan tragikus képet mutatott. Az értékelt 100 fából 30 volt elpusztult vagy már kivágott.

2010. szeptemberében és októberében további 8 borsod-abaúj-zemplén megyei, elsősorban kajszi állományt vizsgáltunk meg (4. táblázat).

4. táblázat

Fitoplazmás fertőzés csonthéjas ültetvényekben Borsod-Abaúj-Zemplén megyében 2010-ben

Hely sorsz. (0)	Terepi vizsgálat időpontja (1)	Vizsgált fafaj (2)	Fák kora (év) (3)	Terület (ha) (4)	Vizsgált fák száma (5)	Fertőzés foka (6)					Fi (7)	F% (8)
						I	II	III	IV	V		
1	2010.09.07.	kajszi	13	22,6	70	11	12	2	10	35	3,66	84
2	2010.09.07.	kajszi	13	22,6	78	17	6	3	11	41	3,68	78
3	2010.09.07.	meggy	7	5	104	43	7	12	12	30	2,78	59
4	2010.10.07.	kajszi	21	50	100	41	10	9	11	28	2,72	59
5	2010.10.07.	kajszi	4	5	54	34	4	4	3	9	2,06	37
6	2010.10.07.	kajszi	~12	6	50	46	1	2	1	-	1,16	8
7	2010.10.07.	kajszi	~25	15	100	23	24	12	21	26	3,21	77
8	2010.10.07.	kajszi	~15	10	50	45	3	1	1	-	1,16	10

Vizsgálóhelyszínek: 1-3-Bükkaranyos, 4-Rátka, 5-Göncruszka, 6-Vizsoly, 7-Boldogkőváralja, 8-Abaújkér

Table 4: Results of field examination in Borsod-Abaúj-Zemplén county in 2010

No. of places (0), date of examination (1), fruit tree species (2), age of trees (3), area of plantation (4), number of examined trees (5), infection degrees (6), infection index (7), infection rate (8)

Spots of field examinations: 1-3-Bükkaranyos, 4-Rátka, 5-Göncruszka, 6-Vizsoly, 7-Boldogkőváralja, 8-Abaújkér

A Bükkaranyos térségi kajszi és meggy ültetvényekben igen magas volt a fertőzött fák száma (kajszi: 77-84%, meggy: 59% –1-3 helyek) magas Fi értékekkel (3,66-3,68, illetve 2,78), továbbá Boldogkőváralján a kajsziiban 77%-os fertőzöttség 3,21 Fi érték mellett (7 helyszínen).

A laboratórium vizsgálatok eredményei

A négy mintánk közül kettő Bekecs térségéből a Majos ültetvényből származó kajszi, egy a Téglaszín ültetvényből származó kajszi, illetve egy a Majos ültetvényből gyűjtött őszibarack volt. A nemzetközi adatbázisban található szekvenciákkal összevetettük a mintáink nukleotid sorrendjét, és 98-100%-os hasonlóságot tapasztaltunk a kiválasztott ESFY (= "Ca. Phytoplasma prunorum") mintákkal.

A bekecsi térségben lévő ültetvényekben összesen három kajszi, egy őszibarack és egy meggyfából sikerült izolálni a fitoplazma kórokozó DNS-ét, a amelyeknél igazoltuk, hogy azok az ESFY csoportba tartozók.

A bükkaranyosi minták közül három kajszi, egy vadszilva és két meggy bizonyult fitoplazmával fertőzöttnek. fO1 és rO1 indítoszekvenciák felhasználásával a direkt, illetve a nested PCR igazolta az ESFY-vel való fertőzöttséget mind a hat minta esetében (5. táblázat). A fitoplazma fertőzött minták ESFY speciális primerekkel

is pozitív eredményt mutattak minden esetben, vagyis egyértelműen a "*Ca. Phytoplasma prunorum*" kórokozó jelenlétét erősítették meg a laboratóriumi vizsgálatok.

A fitoplazma fertőzöttséget univerzális primerekkel 11 esetben tudtuk kimutatni. A P1/P7 primerpárral 1830 bázispár, fU5/rU3 primerekkel pedig a kívánt 880 bázispár hosszúságú szakaszt kaptuk. A kórokozó azonosítása során mind az fO1/rO1, mind az ECA1/ECA2 csoportspecifikus primer párt felhasználva megkaptuk a kívánt hosszúságú szakaszt a pozitív minták esetén (2., 3., 4. ábra).

5. táblázat

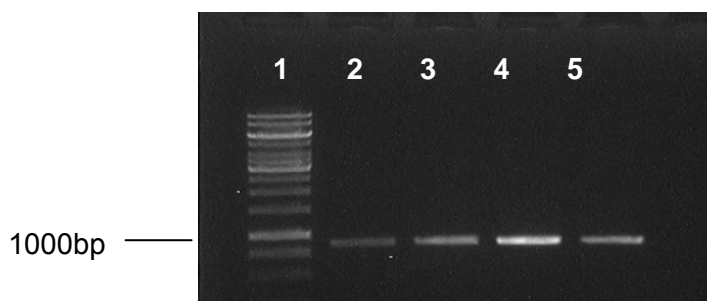
A vizsgált növényfajokról megvizsgált és a sikeres DNS-izolálású "*Ca. Phytoplasma prunorum*" (ESFY) fertőzött növényminták aránya

Gyümölcsfa faj (1)	Vizsgált minták száma (2)	Pozitív minták száma (3)	Fitoplazma (4)
kajszi (<i>Prunus armeniaca</i>)	16	8	ESFY
őszibarack (<i>Prunus persica</i>)	4	1	ESFY
meggy (<i>Prunus cerasus</i>)	7	3	ESFY
vadszilva (<i>Prunus cerasifera</i>)	1	1	ESFY

Table 5: Rates of examined and DNA-isolated "*Ca. Phytoplasma prunorum*" samples of different fruit trees

fruit tree species (1), number of examined samples (2), number of positive samples (3), identified phytoplasma (4)

2. ábra: FU5/rU3 univerzális indítószekvenciákkal felszaporított DNS szakaszok mintázata 1%-os agaróz gélben

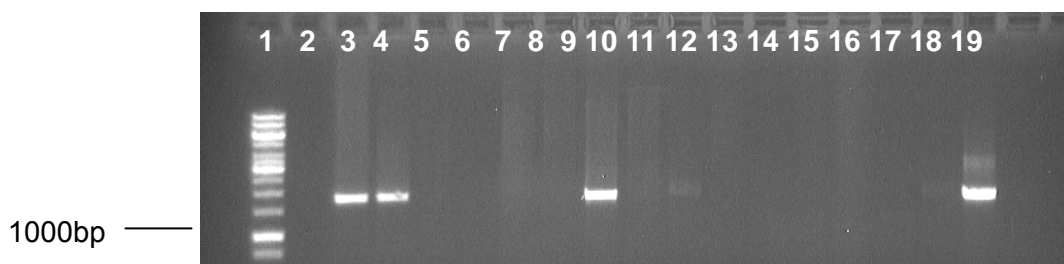


1: DNS méretmarker; 2, 3, 4: fertőzött kajszi minták; 5: fertőzött őszibarack

Figure 2: DNA fragments amplified by FU5/rU3 primers in 1% agarose gel

1: DNA ladder; 2, 3, 4: apricot samples; 5: peach sample

3. ábra: P1/P7 univerzális indítószekvenciákkal felszaporított DNS szakaszok mintázata a PCR termék 1%-os agaróz gélben

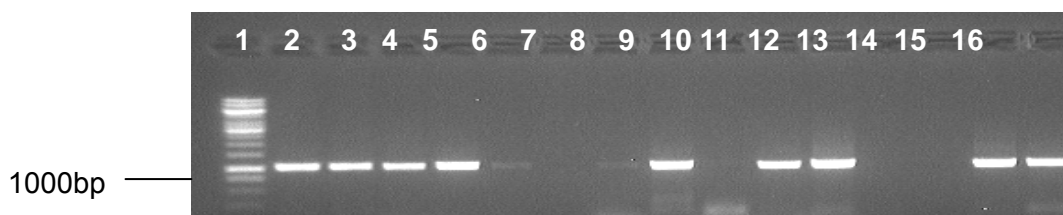


1: DNS méretmarker; 2,5,6,8,10,12,13,14,15,16: negatív minták; 18: pozitív ESFY kontroll; 19: negatív kontroll; 3, 4, 7: fitoplazmával fertőzött kajszi minták; 9: fertőzött vadszilva; 11, 17: fertőzött meggy minták.

Figure 3: DNA fragments amplified by P1/P7 primers in 1% agarose gel

1: DNA ladder; 2,5,6,8,10,12,13,14,15,16: negative samples; 18: positive ESFY control; 19: negative control; 3, 4, 7: apricot samples infected by phytoplasma; 9: infected wild plum sample; 11, 17: infected sour cherry samples

4. ábra: FO1/rO1 csoportspecifikus indítószekvenciákkal felszaporított DNS szakaszok mintázata 1%-os agaróz gélben



1: DNS méretmarker; 2-9: direkt PCR: 2, 3, 4: fertőzött kajszai minták; 5: fertőzött vadszilva; 6, 7, 8: negatív meggy és őszibarack minták; 9: pozitív ESFY kontroll; 10-16: nested PCR: 10: negatív kontroll; 16: pozitív ESFY kontroll; 11: fertőzött kajszai minta (ugyanaz, mint 2.); 12, 15: fertőzött meggy minták (ugyanaz, mint 6., illetve 8.); 13, 14: negatív meggy és őszibarack minták.

Figure 4: DNA fragments amplified by FO1/rO1 group-specific primers in 1% agarose gel

1: DNA ladder; 2,9: direct PCR; 2, 3, 4: infected apricot samples; 5: infected wild plum sample; 6, 7, 8: negative sour cherry and peach samples; 9: positive ESFY control; 10-16: nested PCR: 10: negative control; 16: positive ESFY control; 11: infected apricot sample; 12, 15: infected sour cherry samples; 13,14: negative sour cherry and peach samples

KÖVETKEZTETÉSEK

Kijelenthető, hogy Borsod-Abaúj-Zemplén megye vizsgált területein jelen van a csonthéjasok európai sárgaság (European Stone Fruit Yellows, ESFY) fitoplazma fertőzöttségének kórokozója ("Ca. Phytoplasma prunorum"), súlyos károkat okozva. Négy ültetvényből gyűjtöttünk növényi mintákat laboratóriumi vizsgálatok céljaira. Az eredmények alapján bizonyos, hogy a kórokozó mind a négy, általunk vizsgált ültetvényben jelen van. A jellegzetes, fitoplazma jelenlétére utaló tüneteket mutató növényekből összesen 28 mintát vizsgáltunk meg Bekecs és Bükkaranyos térségéből, a legtöbbet, 16 darabot kajsziból. A mintáink közül 13-ból sikerült igazoltan kimutatni a fitoplazmát. Ugyanakkor a PCR vizsgálat során negatív eredményeket adó minták fitoplazma fertőzöttségét sem zárhatjuk ki teljes bizonyossággal. A csonthéjasok, főként a meggy tartalmazhatnak olyan gátló anyagokat, amelyek befolyásolják a molekuláris kimutathatósági reakció eredményességét. Ebben a térségben korábban még nem történtek átfogó vizsgálatok a fitoplazma fertőzöttség megállapítására. Az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének kutatócsoportja 1995 és 2000 között végzett vizsgálatokat országszerte, de ESFY-vel való fertőzöttségről csak az észak-nyugat magyarországi területekről számolnak be. Észak-Kelet Magyarországon kajszin, vadszilván, őszibarackon és meggyen "Ca. Phytoplasma prunorum" által okozott betegséget korábban még nem írtak le.

IRODALOM

- Carraro, L. - Loi, N. - Ermacora, P. - Osler, R. (1998): High tolerance of European plum varieties to plum leptonecrosis. Eur. J. Plant Pathology 104, 141-145.
- Carraro, L. - Loi, N. - Ermacora, P. (2001): Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. Eur. J. Plant Pathology 107, 695-700.
- Doi, Y. - Teranaka, M. - Yora, K. - Asuyama, H. (1967): Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches broom, aster yellows, or paulownia witches broom. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 33, 259-266.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, 13-15.
- Fialová, R. - Navrátil, M. - Lauterer, P. - Navrkalová, V. (2007): 'Candidatus Phytoplasma prunorum': the phytoplasma infection of *Cacopsylla pruni* from apricot orchards and from overwintering habitats in Moravia (Czech Republic). Bulletin of Insectology 60(2), 183-184.
- Gundersen, D. E. - Lee, I. M. - Rehner, S. A. - Davis, R. E. - Kingsbury, D. T. (1994): Phylogeny of mycoplasma organisms (phytoplasmas): A base for their classification. J. Bacteriol. 176, 5244-5254.
- International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes (1993): Minutes of the interim meetings, 1 and 2 August 1992, Ames, Iowa. Int. J. Syst. Bacteriol. 43, 394-397.
- Jarausch, W. - Lansac, M. - Saillard, C. - Broquaire, J. M. - Dosba, F. (1998): PCR assay for specific detection of European stone fruit yellows phytoplasmas and its use for epidemiological studies in France. European Journal of Plant Pathology 104, 17-27.
- Jarausch, W. - Jarausch-Wehrheim, B. - Danet, J. L. - Broquaire, J. M. - Dosba, F. - Saillard, C. - Garnier, M. (2001): Detection and identification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. European J. Plant Pathology 107, 209-217.
- Kirkpatrick, B.C. - Smart, C.D. - Gardner S. and 9 other authors (1994): Phylogenetic relationship of plant pathogenic MLO-s established by 16/23S rDNA spacer sequences. IOM Letters 3, 228-229.
- Kövecses Gy. (2009): Növénykörtani vademecum. NOFKA. Debrecen. pp. 470.
- Mona, G. - Kadriye, C. - Cigdem, U. S. - Levent, S. (2008): Evaluations of apricot trees infected by *Candidatus Phytoplasma prunorum* for horticultural characteristics. Romanian Biotechnological Letters, Bucharest University, Romanian Society of Biological Sciences 14(1), 4123-4129.

- Mergenthaler E. (2004): Fitoplazmás betegségek Magyarországon: Korszerű diagnosztikai módszerek fejlesztése. Doktori értekezés. Budapesti Közgazdaságtudományi és Államigazgatási Egyetem Kertészettudományi Kar, Budapest. pp. 164.
- Navratil, M. - Valova, P. - Fialova, R. - Patrova, K. (2001): Survey for stone fruit phytoplasmas in the Czech Republic. *Acta Horticulture* 550, 377-382.
- Samuel, G. - Bald, J. G. - Eardly, C. M. (1933): „Big bud”, a virus disease of tomato. *Phytopathol.* 23, 641-652.
- Seemüller, E. - Schneider, B. (2004): "*Candidatus* Phytoplasma mali", "*Candidatus* Phytoplasma pyri" and "*Candidatus* Phytoplasma prunorum", the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1217-1226.
- Süle S. (2003): A kajszi baktériumos és fitoplazmás betegségei. pp. 282-291. *In: Kajszi.* (Eds.) Péntes, B. - Szalay, L. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Süle S. - Viczián O. - Péntes B. (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása. *Kertészet és Szőlészet* 45, 8-11.
- Szirmai J. (1956): Új vírusbetegség hazánkban. *Agrártudomány* 8, 351-354.
- Tarcali, G. - Kövics, G. J. (2009): Occurrence of stone fruit yellows phytoplasma disease in Gönc region, Northern-Hungary. 5th International Plant Protection Symposium at University of Debrecen, 20-22 October 2009, Debrecen, Hungary. *Journal of Agricultural Sciences / Acta Agraria Debreceniensis, University of Debrecen* 38, 69-74.
- Torres, E. - Martin, M. P. - Paltrinieri, S. - Vila, A. - Masalles, R. - Bertaccini, A. (2004): Spreading of EFSY phytoplasmas in stone fruit in Catalonia (Spain). *J. Phytopathology* 152, 432-437.
- Viczián O. - Süle S. - Péntes B. - Seemüller, E. (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása Magyarországon. *Új Kertgazd.* 1, 48-51.