



**ÍNVAZÍV GYOMOK ÉS LEVÉLTETVEK KAPCSOLATA, SZEREPÜK MINT
NÖVÉNYI VÍRUSREZERVOÁROK**

DOI: 10.54598/000180

Doktori (PhD) értekezés

Szabó Károly-Attila

Gödöllő

2020

A doktori iskola megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztés és Kertészeti Tudományok

Vezetője: Prof. Dr. Helyes Lajos egyetemi tanár

Professzor, a Növénytudományi Doktori Iskola Vezetője

Szent István Egyetem

Témavezető: Dr. Balog Adalbert egyetemi tanár

Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem

Marosvásárhelyi Kar

Kertészmérnöki Tanszék

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A programvezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
1.1 Biológiai invázió	3
1.2 Invazív gyomok jelentősége.....	4
1.2.1 <i>Erigeron annuus</i> – Egnári seprence	6
1.2.2. <i>Conyza canadensis</i> – Betyárkóró	7
1.3 Gyomnövények, mint vírus rezervoárok.....	7
1.4 Levéltetvek.....	9
1.4.1 <i>Brachycaudus helicyris</i>- Sárga szilva-levéltetű	12
1.4.2 <i>Aulacorthum solani</i> – Zöld foltos burgonya levéltetű	13
1.4.3. <i>Macrosiphum euphorbiae</i> – Burgonya levéltetű	15
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	18
3.ANYAG ÉS MÓDSZERTAN.....	19
3.1 Területek bemutatása - Invazív gyomok felmérése.....	19
3.2. POD-enzim aktivitás mérése és összehasonlítása a gyomnövényekben.....	22
3.3. A levéltetvek kolonizációja a gyomnövényekről a kultúrnövényekre.....	22
3.4. Levéltetvek gyomokról kultúrnövényekre való áttelepülésének vizsgálata genomiális DNS elemzéssel.....	26
3.4.1 . Genomiális DNS izolálás	26
3.4.2 Sejtlízis (Sejt feltárása)	26
3.4.3. Oszlopok feltöltése	26
3.4.4. DNS tartalmú folyadék atmoszára	26
3.4.5. DNS kinyerése	27
3.4.6. Agarózgélelektroforézis	27
3.4.7. Polimeráz láncreakció	28
3.4.8.Poliakrilamid gélelektroforézis	30
3.4.9. Mikroszatellit elemzés	32
3.5.Növényi vírusok kimutatása - Minták gyűjtése.....	33
3.6. Teljes nukleinsav kivonás	34
3.7.Kis RNS könyvtár készítés és szekvenálás	35

3.8. Növényi vírusok kimutatása invazív gyomokban és kultúrnövényekben	36
3.8. Adatok statisztikai kiértékelése	37
3.9. Bioinformatikai adatelemzés	38
Szekvenálható sRNS könyvtár készítés	38
Szekvenálás	38
A HTS eredményének, a szekvenált olvasatok (readek) bioinformatikai elemzése	38
4. EREDMÉNYEK	40
4.1 Invazív gyomok előfordulási gyakorisága a vizsgált területeken	40
4.2 Levéltetvek gyakorisága az invazív gyomokon	40
4.3 A levéltetvek táplálkozásának igazolása stresszfehérjék kimutatásával	42
4.4 Levéltetvek kolonizációja invazív gyomokról a kultúrnövényekre.	43
4.5 Növényi vírusok kimutatása invazív gyomokban és kultúrnövényekben	49
5. KÖVETKEZTETÉSEK	61
6. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	63
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	70
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	72
9. MELLÉKLETEK	73

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 Biológiai invázió

A természeti egységek (óceánok, tengerek, hegységek) természetes választófalaként funkcionáltak a Földön a különböző ökoszisztémák között. Ezen funkciójuk jelentősége lassan csökkent a felfedezések korszakában, mára a globalizált világban majdhogynem teljesen megszűnt. Az ember mozgásával akarva vagy akaratlan számos növényfajt, állatfajt, mikroorganizmust vitt el természetes élőhelyéről, rákényszerítve azt egy számára teljesen új környezetben való életre. Nem minden behurcolt élőlény tudott megmaradni, vagy magától, emberi segítséggel szaporodni (Mooney & Cleland, 2001). Szerencsére csak kevés faj az ami képes lett „kilépni az ember keze alól”, ezek azonban nagy területeket meghódítottak és nagyon komoly ökológiai és gazdasági kárt okoznak évről évre. Ezeket a fajokat invazív fajoknak hívjuk (Botta-Dukát Zoltán, 2004; Keller et al. 2011)

A 2000-es évek elején az Egyesült Államokban az invazív fajok és azok leküzdésére elköltött pénzösszeg meghaladta az 58 milliárd dollárt. Ebből az összegből a legnagyobb hányad az invazív gyomok ellen fordított harcra ment el, ez több, mint 23 milliárd dollárt jelent (Ziska et. al., 2011).

Európát tekintve 10000 invazív faj van számon tartva, mely fajok fele a növényekhez tartozik. Az európai országoknak évente több milliárd euro veszteséget jelent ezen fajok elleni harc (Vilà et al., 2010). Ennek a veszteségnek nagy része az intenzíven művelt mezőgazdasági területeken, fenyőerdőkben, városi környezetben jelentkezik. A kevésbé bolygatott lombhullató erdők, kaszálók, legelők többnyire érintetlenek az invazív gyomoktól (Keller et al. 2011).

Az invazív növényfajok terjedési sebességét, dinamikáját, sikerességüket sokan vizsgálták (Clements et. al., 2007) és sikerességük kulcsát a fenotípusos és genotípusos plaszticitásuknak tulajdonították. Sokkal hatékonyabban illeszkednek be a számukra idegen, sokszor szélsőséges környezetbe (Clements & Dittmann, 2011).

1.2 Invazív gyomok jelentősége

Elsősorban az Amerikai kontinens felfedezése után számos új növényfaj került be Európába és vadult is ki. Ezekre a jelenségekre a kor jelentős botanikusai már akkor felfigyeltek és kezdték vizsgálni ezeket a növényeket. Darwin 1859-ben észlelte, hogy az idegenhonos fajok az új élőhelyen sikeresebbek, abban az esetben, ha nincs rokonfaj a területen, mert a verseny a rokonfajok között sokkal kiélezetebb (Kleunen et. al., 2015). Ezen növényfajok sikerességének kulcsát többen vizsgálták és arra a megfigyelésre jutottak, hogy klasszikus értelemben gyorsabb növekedésük (mint az őshonos vagy akár más idegenhonos növények), magasabb magszámuk, hatékonyabb tápanyagfelhasználásuk alapvetően hozzájárul sikerükhöz. De nem lehet kizárólag csak ezekre az alapelvekre szorítkozni, hanem a növényfajokat az adott környezetükben kell vizsgálni és csak így lehet hiteles következtetést levonni ezek sikeréről (Hejda et. al. 2009; Kleunen et al., 2015). Ezeket ismerve több olyan irányvonal felmerül, melyeket még szükséges vizsgálni ahhoz, hogy ezen növényfajokat jobban megismerjük. Nagyobb rálátás szükséges az invazív növények terjedési útvonalának rekonstruálása, az invázió során bekövetkezett evolúciós változásának molekuláris tulajdonságaira, a terjedésükben szerepet játszó vektoroknak (akár az ember) jelentőségére, az emberrel való kölcsönhatásukra, szociológiai és ökonómiai hatásuk vizsgálatára és magára az a biológiai invázió monitorizálására (Csíszér, 2012).

A biológiai invázió a biodiverzitást negatívan befolyásolja világszerte különböző léptékekben. Az elmúlt évek kutatásai elsősorban ezeknek az invázióknak a negatív hatásukra keresnek választ és esetleges megoldást. Kisebb léptékű a vizsgálat például a paraziták és patogének terjesztésében (Callaway & Maron, 2006), fásszáru invazív növények hatása az erdők tápanyag-gazdálkodásában, az erdők vízkészlet háztartásában, vagy ugyancsak az erdők tűzvédelmi problémáinak vizsgálatára. Azonban ezeknél sokkal súlyosabb a kár, amelyet okoznak, ez a biodiverzitás csökkenése (Hejda et al., 2009).

Talajtípusok és tápanyagmennyiség szintjén vizsgálták az Észak-Kelet Európában leggyakoribb invazív gyomnövényeket, hogy melyek lehetnek azok a jellegzetes talajtípusok, vagy talajkémiai összetevők, amelyek meghatározhatják egyes invazív növények megjelenését. A vizsgálat során arra a megállapításra jutottak, hogy gyakorlatilag a talajtípus nem határozta meg egy gyom megjelenésének a feltételét, hanem különböző talajtípusokon egyaránt megjelenhetnek. Pozitívként levonható, hogy az invazív gyomok a nagyobb növekedésüknek köszönhetően

szignifikánsan több biomasszát és több tápanyagot hagynak maguk után. A soványabb, tápanyagszegényebb területeken, talajkémiai szempontból pozitívnak is mondható volt a hatásuk (Dassonville et al., 2008). A *Solidago canadensis* invazív növényt vizsgáltak Európában és az Egyesült Államokban és fejlődésükben azt tapasztalták, hogy úgy egyedszámban, mind növények habitusában nagyobbak voltak, mint a természetes élőhelyükön. A növények magassága szignifikánsan magasabb volt, ezt a jelenséget többféle képpen magyarázták, de a legvalószínűbb az, hogy a termékenyebb termőtalaj volt a magyarázat rá. A magassága negatív hatása abban nyilvánult meg, hogy sokkal nagyobb és fejlettebb virágzatot volt képes így képezni (Ledger et al., 2015).

Sikeres terjedésük egy másik tulajdonsága lehet, az idegen honos, invazív növények allelopatikus hatása, amelyekkel más szomszédos őshonos növényfajok fejlődését gátolják. Az elmúlt években számos kutató vizsgálta az invazív gyomok allelopatikus hatását különböző természetű növényekre vagy őshonos gyomokra, de mind megosztó eredményekre jutottak (Parepa & Bossdorf 2016; Bao-Ming et al. 2017). Novak et al. 2018-ban a Csehországban leggyakrabban előforduló 8 invazív gyomfajnak az allelopatikus hatását vizsgálta a repce, bab és napraforgó teszt növényeken. Vizsgálatai eredményeképpen azt kapta, hogy ezek a gyomok szignifikánsan a növények méretét csökkentették és nem a magok csírázó képességét, amire a legjobban számítottak volna.

A különböző kontinenseken vizsgálva ugyanazt az invazív gyomnövényt, különböző eredményekre jutottak. Kínában begyűjtött *Solidago canadensis* növényekben az allelopátiáért felelős melléktermékek, melyek elsősorban a növények növekedésére vannak hatással (Ledger et al., 2015) szignifikánsan nagyobb mennyiségben voltak jelen, mint az Amerikai Egyesült Államokból származó növényekben.

Egy másik nagyon fontos aspektusa az invazív növények jelenlétének, az, hogy nem csak a saját jelenlétükkel homogenizálják a faunáját egy-egy megtámadott régióknak, hanem, hogy az adott területen honos herbivor rovarpopulációjára is közvetetten nagy hatással vannak. Egyik lehetőség, hogy az őshonos herbivor populációkra toxikus, mérgező hatással bírnak. Ezzel ellentétben a másik lehetőség, hogy ezek az idegenhonos növényfajok elősegíti egyes fajokat a túlszaporodását vagy új behurcolt rovarfajoknak szolgálnak kedvező táplálékul (Callaway & Ridenour, 2004; Eppinga et al., 2006; Flory & Clay, 2013). Kutatás bizonyította, hogy az Ibériai félszigetre behurcolt invazív gyomokon, az *Acacia dealbata* és az *Carpobrotus edulis* tápnövényei

lettek több őshonos illetve behurcolt rovarfajnak. Az ezeken a fajokon felszaporodó rovarfajok nagy hatással voltak az egész régió faunájára. A még meg nem fertőzött területek nagy nyomás alá helyeződtek. A gyors túlszaporodásuk miatt a területek flórájában és a faunájában nagyfokú homogenizálást lehetett tapasztalni. Az ilyen jelenségek mind azt támasztják alá, hogy ezen növények megismerésére, terjedésük feltérképezésére sokkal nagyobb hangsúlyt kell fektetni, mert másképp nagyban megváltoztathatják az őshonos biodiverzitást (Rodríguez et.al., 2019).

Évente rengeteg tudományos munka születik azzal kapcsolatban, hogy mely invazív növényfajok kerültek be és hódítottak meg újabb és újabb területeket, azonban, hogy ezek a behurcolt fajokon milyen levéltetű fajok képesek megtelepedni és akár ezekre vagy ezekről vírusokat átvinni, már alig lehet olvasni. Munkánk egyik fontos kérdése pont ez, hogy a már behurcolt fontosabb invazív fajokon mely levéltetű fajok találnak gazdanövényre és hogy milyen vírusok találhatóak meg továbbá hogyan terjednek a kultúrnövényekre.

1.2.1 *Erigeron annuus* – Egynári seprence

Jelen dolgozat egyik vizsgált invazív gyomnövénye az *E. annuus*, amely észak-kelet Amerikában őshonos, füves rétek, a préri jellegzetes növénye. Az első feljegyzés róla Nyugat-Európában 1635-ből való, egy botanikus kertben, mint dísnövény. Mára Európa 150 legveszélyesebb invazív növényei között van számon tartva. Ebben az idegen környezetben a ruderalis helyeken, útszéleken, legelőkön találkozhatunk vele (Edwards et. al., 2006; Pacanoski, 2017). Gyors terjedésének egyik sikere abban áll, hogy jellemző rá a $2n$ makrogametofiton így egy növény genetikailag azonos klón magokat hoz, akár 100000-et is (Noyes & Givens, 2013). Az ivaros szaporodás ritka ennél a növénynél. Szaporodásából kifolyólag a különböző populációk között csekély genetikai különbség kellene legyen, amit nem minden vizsgálat erősített meg. Edwards et al. (2006) az európai és észak-amerikai klónok között sokszínű genetikai különbséget vélt felfedezni, Trtikova et al. (2011) a svájci populációkat vizsgálva megállapította 83%-a polimorf, (Tunaitiené et al., 2015) ezek szemben a litvániai populációkban csak 50%-os polimorfizmust talált.

1.2.2. *Conyza canadensis* – Betyárkóró

A vizsgálatom másik fontos invazív gyomfaja, az kanadai betyárkóró, mely szintén Észak-Amerikában őshonos, de már több, mint 350 éve jelen van Európában, de még más kontinenseken is jelezték előfordulását, úgy mint Afrika, Ázsia. Akár 40 kultúrnövényfajnak lehet a gyomnövénye, melyekben meghatározó gazdasági károkat képes okozni. Amerikában a forgatás nélkül termesztett (no-till) szójában a veszteségek akár 83%-osak is lehetnek, Németországban a cukorrépában 64%-os, míg Olaszországban a szőlősökben 28%-os károkat jegyeztek. A növénykultúrák mellett a másik fontos biotóp ahol megtalálható, a kevésbé bolygatott útszélek, töltések, legelők. Számára az optimális területek azok amelyeknek a talaja nincs bolygatva.

Az invazív gyomok közül talán ez a faj illeszkedett be a legsikeresebben az európai flórába. Fontossága nemcsak az általa okozott direkt veszteségekben rejlik, hanem az indirekt veszteségekben is, mivel számos kártevő és kórokozó gazdanövényévé vált (Bajwa et al., 2016; Shah et al., 2014; Weaver, 2001). Gazdanövénye a *Lygus lineolaris*-nak, *Adelphocoris lineolatus*-nak, *Bemisia tabaci*-nak, melyek számos termesztett növény kártevőb. A vírusok közül jelezték a betyárkórón a Paradicsom bokros törpülés vírusát (Tomato bushy stunt virus, TBSV), a Paradicsom bronzfoltosság vírusát (Tomato spotted wilt virus, TSWV) és az Uborkamozzaik vírusát (Cucumber mosaic virus, CMV) (Bajwa et al., 2016).

1.3 Gyomnövények, mint vírus rezervoárok

Egy gyomnövény csak önmagában, mint gyom is képes komoly gazdasági károkat okozni, de ha vesszük azon problematikájukat, hogy ezek a gyomnövények, melyek olykor teljesen fauna idegenek, gazdanövényei lehetnek különböző patogéneknek, vagy akár rezervoárjai is ezeknek, köztesgazdái vagy nyári tápnövényei lehetnek ezek mellett számos vektornak - a gyomnövények jelentősége hatványozódik. Ha ebből a perspektívából szemléljük a gyomok növényvédelmi, gazdasági vagy akár ökológiai jelentőségét akkor sokkal hangsúlyosabbnak kell éreznünk, mint ahogy valójában csak megközelítjük a gyomokat. Több növénypatogén a gyomokat alternatív gazdanövénynek használja, amikor a megfelelő gazdanövény nincs jelen. Ilyen esetekben mintegy természetes rezervoárként közelíthetjük meg a gyomnövényeket (Wisler & Norris, 2005).

A gyomnövények rezervoár jellege leginkább a növényi vírusokban mutatkozik meg. Mivel a gyomnövények is tápnövényei számos rovar vektornak, ezért ezt a jelleget egy komplex gyom-vektor-kultúrnövény rendszerben kell vizsgálni. A levéltetvek életsiklusát figyelembe véve, ezek a fászszerű növényekről a nyár folyamán átvándorolnak különböző lágyszárú növényekre. Ezek a növények, sok levéltetű esetén különböző fajokat, esetleg különböző növény családot jelenthetnek, amelyekbe gyomnövények és kultúrnövények egyaránt tartozhatnak. Ez a tulajdonságuk elősegíti a vírusok könnyű terjedését egyik növényről a másikra, egyik növényfajról egy másik növényfajra (Alexander et. al., 2014).

Már az 1950-es évektől kezdve megfigyelték, hogy a vírussal fertőzött növényeken sokkal nagyobb populációkat alakítottak ki a vektorok, ezek szaporodásdinamikája szignifikánsan gyorsabbnak bizonyult, mint az egészséges növényeken élő társaiké. Ezen növény-vírus-vektor speciális kölcsönhatások, mind a gazdanövények, vektorok és vírusok kiemelt fontosságát mutatják (Colvin et al., 2006).

A különböző levéltetű fajok meghatározott tápnövény preferenciával rendelkeznek, ezek hiányában választhatnak más, kevésbé kedvező tápnövényeket. Malmstrom és társai 2005-ben vizsgálták a *Rhopalosiphum padi* tápnövény preferenciáját Kaliforniában. Kutatási eredményeikből kiderült, hogy ezek a levéltetvek, melyek számos vírusnak vektorai lehetnek, sokkal nagyobb arányban voltak jelen az őshonos pázsitfűféléken, az *Elymus glaucus*, *Elymus multisetus* és a *Nassella pulchra* amikor az invazív vadzab *Avena fatua* is jelen volt velük együtt. Ezt az eredményt csak az tetőzi, hogy az *A. fatua* természetes rezervoárja számos pázsitfűféléket fertőző vírusnak, elsősorban az árpa sárga törpülés vírusának (*Barley and Cereals yellow dwarf virus/ B/CYDV*). Eredményeikből kitűnik, hogy azokban a parcellákban (plot) ahol a vadzab és az őshonos pázsitfűfélék együtt voltak jelen, ott szignifikánsan nagyobb mértékben voltak jelen BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV vírusok, kisebb mértékben detektálták a CYDV-RPV és BYDV-RMV vírusokat is.

Összességében elmondható, a kísérlet eredményeként, hogy az invazív fajok jelenléte negatívan befolyásolta az őshonos pázsitfűfélék előfordulását Kaliforniában, a vírusátvitel csak egyoldalú volt az *Avena fatua*-ról az *Elymus glaucus* felé (Malmstrom et. al., 2005).

Egy szintén a vadzabhoz hasonló gyomfaj került be Észak-Amerikába az 1950-es években és terjed el már az USA több államának prérijén. Ez az invazív gyom a *Ventenata dubia*. Kutatók azt vizsgálták Idiaho és Washington államokban, hogy ebben a növényben megtalálható-e a

pázsítfüvekre veszélyes Barley yellow dwarf virus, (BYDV) vagy a Cereale yellow dwarf virus (CYDV). Két éven keresztül mintavételeztek a kijelölt préríken és eredményül azt kapták, hogy azokon a területeken, ahol ott volt a *V. dubia*, ott nagyobb részt meg a B/CYDV is ott volt. (nyolcból hét helyen). A fertőzésének a mértéke 11% és 87% között változott területtől függően. A vírus több változata közül a BYDV- PAV-ot, a *Rhopalosiphum padi* által terjeszthető és a BYDV-SGV-t, a *Schizaphis graminum* által terjeszthető változatokat mutatták ki. Vektorokat azonban a területi mintavételezéskor nem találtak (Ingwell & Bosque-Pérez, 2015).

Ugyanebben a tanulmányban laboratóriumi körülmények között vizsgálták ezen gyom-vírus kapcsolatát és levéltetű vektorával való kölcsönhatását. A kísérlet eredményeként elmondható, hogy a *R. padi* levéltetű megfertőzi a *V. dubia*-t, de a fertőzés következtében nem fog azokon elszíneződés megjelenni, azonban a növény magassága, levélszáma, kalásza mérete csökken. Ugyanebben a kísérletben kimutatták, hogy a vírus terjesztése az árpa irányában nagyobb százalékban volt jelen akkor, ha a fertőzési forrás a fertőzött *V. dubia* volt és nem a fertőzött árpa. Ezekből az eredményekből kiindulva kijelentették, hogy a *V. dubia* vírus rezervoárja a BYDV több változatának, és mivel fennmarad életképesen ezen a gyomon a vírus vektora, potenciális fertőzési forrása lehet mind a búza mind az árpa kultúráknak (Ingwell & Bosque-Pérez, 2015).

1.4 Levéltetvek

A gyomnövények nem csak magas kompetíciós képességük miatt veszélyesek a kultúrnövényeinkre nézve, hanem azért is, mert számos kórokozó köztes gazdáik. A kórokozó bennük telel át vagy szaporodik. A gyom- és kultúrnövény közti kapcsolatot, és ezáltal a kórokozók terjedését, különböző rovarok (Wang, 2015), azon belül is a levéltetvek is biztosítják, amelyek ideiglenes táplálékforrásként használják a gyomokat. A vándorlás oka a megváltozott növényi tápanyag-összetétel, ugyanis a magas oldható N-tartalmú növényeket szeretik, amelyet csak a fiatal növényi részek biztosítják (Blackman & Eastop, 2007).

A növények, vírusok és vektorok közti kapcsolat 2 millió évre vezethető vissza, és evolúciós alapja van. Hosszú távon csak azok a vírusok maradhatnak fent, amelyek képesek a terjeszkedésre vagy áttelelésre. A növénypatogén vírusok vektorszáma meghaladja a 400-at is. A vektorok 94%-a az ízeltlábúak osztályába, és ennek a 76%-a az egyenlőszárnyúak rendjébe tartozik. Az ismert növénypatogén vírusok 58%-át az ebbe a rendbe tartozó fajok terjesztik. A nem

cirkulatív módon terjedő vírusok 90%-át a levéltetvek terjesztik. Ide tartoznak a potyvírusok, carlavírusok, cucumovírusok, alfamovírusok, fabavírusok, closterovírusok és a sequivírusok (Eigenbrode et. al., 2018).

A levéltetvek (Fam. *Aphididae*) családja a *Hemiptera* rendhez tartozó (Blackman & Eastop, 2007; van Emden & Harrington, 2007) viszonylag kevés (kb. 4000-4700) fajt magába foglaló rovarcsoport. Morfológiájukat és szaporodásukat tekintve eltérnek a rovarvilágban megszokottaktól. A kifejlett, szaporodásra képes egyedek között két formát különíthetünk el, egy szárnyatlan és egy szárnyas változatot. A szárnyatlan egyedek teste vékonyan kitinizált, puha, a testtájuk csak nehezen különíthetők el. Színük a világoszöldtől a pirosas-barnán át a feketéig változhat. Több faj esetében is megfigyelhető, a viaszmirigyekből termelődő viaszpor, ami hamvasságot kölcsönöz a fajoknak.

A szárnyatlan egyedek szárnyas fajtestvérei nemcsak a szárnyak meglétében különböznek, hanem esetükben a testtájuk is jobban tagolódnak és színük is változik. A tor sötétebb jellegzetes rajzolatokkal (Dedryver et. al., 2010; Szalay-Marzsó, 1969). Szaporodásukat tekintve is eltérnek a többi rovartól. A levéltetvek tojásai általában fásszárú növények rügyei, kéregrepedéseiben vannak elhelyezve. A tavasszal ebből kikelő szárnyatlan őszanya parthenogenezissel létrehoz ugyancsak szárnyatlan utódokat. Néhány generáción át ezek az egyedek a fás szárú növényeken fejlődnek, csak a nyár kezdetén jelennek meg a szárnyas alakok, melyek többnyire lágyszárú növényekre vándorolnak és ott folytatják életciklusukat. Az ivaros alakok csak ősszel alakulnak ki, amikor visszarepülnek a fő tápnövényre, párosodnak és lerakják a tojásokat (Blackman & Eastop, 2007; Szalay-Marzsó, 1969). Táplálkozásukra a kettős csatornájú szípóka szolgál, mellyel a sejt közötti járatokból, vagy egyenesen a szállítóyalábokból veszik fel a növényi nedveket. A kevésbé specializálódott fajok csoportját a szállítóedényekből táplálkozó fajok alkotják, az ilyen szívogatások hatására a növényen torzulás vagy nekrotizálódás is észlelhető, míg azok a fajok, amelyek a szípóka ozmótikus hatását használják a tápanyagok felvételéhez, azok már nagyfokú specializálódást mutatnak. Az ilyen táplálkozás hatására torzulások, elszíneződések vagy akár gubacsképződések is megjelenhetnek a leveleken.

Táplálkozásuk jellege miatt a levéltetvek sokkal több növénynedvet felszívnak, mint amennyit meg tudnak emészteni. Mivel ezek a nedvek elsősorban cukrokat tartalmaznak és csak kis mennyiségű fehérjét, ezért a meg nem emésztett táplálékot, elsősorban cukrokat úgynevezett

mézharmat formájában kiengedik, ami számos elölénynek (hangyák, gombák) kiváló tápanyagforrást jelent (Blackman & Eastop, 2007; Szalay-Marzsó, 1969)

Kártételüket tekintve két változatot különíthetünk el, egyik a szívogatásukból adódott fizikai deformáció, klorózis (Dedryver et al., 2010), a másik ami közvetett kártétel, hogy a levéltetvek számos növényi vírus vektorai lehetnek (Eigenbrode et al., 2018).

Körülbelül 2000 olyan vírusfajt tartanak számon, ami a növényeket fertőzi. Nem csak az ember által termesztésbe vont fajok tartoznak ide, hanem a flóra legtöbb fajának létezik vírusos betegsége (Hull, 2002). A vírusok azért, hogy egyik növényről képesek legyen átjutni egy másik növényre, a terjedésüknek egy speciális módját fejlesztették ki. Nagyon szoros és speciális kapcsolatokat hoztak létre gombákkal, fonálférgekkel és rovarokkal, elsősorban olyan rovarokkal, melyeknek a szájszerv típusuk szűrő-szívó. Ezeket az élőlényeket használják terjesztőiknek azaz vektoraiknak. A vírus-vektor kapcsolat régóta vizsgált és igen specifikus, de ennek a specifikusságnak a genetikai és fehérje szintű hátterére csak a mai szekvenálási, bio-informatikai módszerekkel derül fény. Ez a specifikus kapcsolat többféle lehet, vannak olyan vírusfajok, pl CMV (Cucumber mosaic virus) vagy a potyvirusok családjába tartozó egyes fajok, amelyek több levéltetű fajjal is terjedhetnek nem perzisztens módon, de léteznek ennél sokkal szorosabb speciálódások is, mint például a rhabdovírusok melyeknek csak egy bizonyos levéltetű faj lehet a vektora. (Hull, 2002; Whitfield 2015)

A vírusterjesztést abban a kontextusban, hogy mennyi időt kell eltöltsön egy hemiptera (szívogasson) egy fertőzött növényen, hogy át tudja vinni a vírust, és, hogy mennyi időn keresztül tartja meg a fertőzőképességét három csoportba soroljuk ezeket a vírus-vektor kölcsönhatásokat: **a)** nem perzisztens (styletborne), **b)** perzisztens, **c)** szemiperzisztens. (Blanc, Drucker, & Uzest, 2014)

A vírus-vektor kapcsolat specifikus, szoros kölcsönhatást igényel mindkét szervezettől. A legegyszerűbb kapcsolat, illetve terjesztési mód a burok nélküli vírusokhoz köthető, ezekben az esetekben a vírus köpenyfehérjéjének bizonyos szegmenseivel kapcsolódik a vektorok szájszervéhez (Blanc et al., 2014).

Más nem-perzisztens vírusok esetében szükség van segédfehérjékre (helper protein), melyeket a vírus szintetizál és segítségével tudnak kapcsolódni a vektor szájszervéhez. Számos kísérletben (Blanc et al., 2014; Hogenhout et al., 2008; Whitfield et al., 2015) vizsgálták a káposzta mozaik vírusát (Cauliflowe mosaic virus- CaMV), mely terjedésében három fehérje játszik

szerepet. Ezek a P2, P3 és P4 fehérjék. A P2-es fehérje szerepe a leginkább vizsgált mely eszenciális elem a vírus a levéltetvek szájszervéhez való megtapadásában. Azonban szintetizálódásához szükséges a levéltetű szívogatása, vagyis csak akkor termelődik a P2-es fehérje, mikor a potenciális vektor szívogatni kezdi a fertőzött növényt (Whitfield et al., 2015).

A mezőgazdaságban a levéltetű fajoknak csak kevés hányada, 10% az ami kártevőként felléphet, a fajok nagyrésze nem jelenik meg az ember által termesztett növényeken. (van Emden & Harrington, 2007) 14 fajt említ, mint azon fajok, melyek a leggyakrabban jelennek meg és okoznak gazdasági károkat kultúrnövényeken, ezzel szemben (Blackman & Eastop, 2007) 35 polifág fajt sorol fel, melyekkel potenciálisan a legtöbbször találkozunk lágyszárú illetve fásszárú termesztett növényeken.

1.4.1 *Brachycaudus hellicrysi*- Sárga szilva-levéltetű

Polifág levéltetű faj, melynek fő gazdanövényei a *Prunus* fajok, ezekre rakják a tojásokat és ezen kelnek ki az ősanyák. Késő tavasszal, nyáron a szárnyas migráló egyedeinek gazdanövényköre igen széles, 300-350 növényfajt látogathatnak (Blackman & Eastop, 2007; Szalay-Marzsó, 1969). Ezek a fajok elsősorban az *Asteraceae* és a *Boraginaceae* családokba tartozó gazdaságilag fontos kultúrnövények, de a kevésbé jelentős gyomnövényeket is magukba foglalják. Fásszárú növények közül elsősorban a szilva féléken károsít, okoz súlyos torzulásokat, de igen komoly problémákat okoz még napraforgón és különböző krizantém fajokon (JPiffaretti et al., 2013). Gyomnövények közül nagyobb telepeket képes alkotni a cickafarkon (*Achillea*), bogáncson (*Carduus*), aszaton (*Cirsium*), napvirágon (*Helianthus*), veronikán (*Veronica*), aszteren (*Aster*), csodaszemen (*Cineraria*) (Szalay-Marzsó, 1969).

Külsőalakját tekintve, 1,3-1,9 mm testhosszal rendelkeznek (Fericean et. al., 2016), színük sárgás, sárgásbarna enyhén hamvas, viaszporral borítottak (Szalay-Marzsó, 1969), csápjuk a testhossz fele, a farkacská és a potrohcsövek rövidek 0,14-0,28 mm (Blackman & Eastop, 2007). A szárnyas nőstények feje, tora fekete, az olajzöld potroh közepén fekete csillogó folt látható, melynek szélén még 3-3 fekete oldalfolt is megjelenik. A potrohcsövek feketék (Blackman & Eastop, 2007; Szalay-Marzsó, 1969).

2012-es genetikai vizsgálatok bebizonyították, hogy ennek a fajnak az egyedei két úgynevezett testvérfajhoz tartoznak, melyeket *Brachycaudus hellicrysi* H1 és *B. hellicrysi* H2-nek nevezték (Piffaretti et al., 2012). Ez a fajon belüli elkülönítést 4 DNS szakasz alapján végezték. A két vonalnak feltételezhetően változhat a gazdanövényköre, a szaporodásdinamikája, a peszticidekre való érzékenységükben is eltérés lehet sőt a vírusterjesztési tulajdonságuk is eltérhet (Piffaretti et al., 2013).

Táplálkozásuk nyomán kialakult súlyos levéltorzulások mellett a másik nagy kártételük az, hogy számos vírus vektorai lehetnek. Elsődleges vektora a csonthéjasokat fertőző Plum pox vírus (PPV) vírusnak, melyek hatására a fertőzött fák leromlanak, termésük minősége romlik (Piffaretti et al., 2012). A fásszárú növények mellett a lágyszárúak közül elsősorban a burgonyának a vírusait hordozhatja, úgymint a Burgonya Y vírusát (Potato virus X, PVX). Átvivő képessége elmarad ugyan a *Myzus persicae*-től, de a maga 0,21-es indexével a fontos vektora ennek a vírusnak (Steinge et.al. 2015; Vučetić, Jovičić, & Petrović-Obradović, 2013).

1.4.2 *Aulacorthum solani* – Zöld foltos burgonya levéltetű

Szintén egy polifág faj, tápnövényei lehetnek úgy egyszikű, mint kétszikű növényfajok (Blackman and Eastop 2007). Európában őshonos faj, mára azonban minden kontinensen megtalálható, szabadföldi kultúrákban, valamint növényházakban is károsít. Tápnövényei között olyan gazdaságilag fontos fajok jelennek meg, mint a paprika (szabadföldi és növényházi), burgonya, saláta. Ázsiai területeken leírták, mint a szója kártevője (Jandricic et.al. 2010; Matsuhira et al., 2015). Termesztő berendezésben komoly veszteséget képes okozni a paprikán, szamócán és sok dísnövényen (Blackman & Eastop, 2007).

Táplálkozásuk hatására, a nyálukban található anyagok miatt súlyos deformálódásokat és klorózisos tüneteket indukálnak a tápnövényen, egészen addig míg annak a levelei lehullanak. Ilyen formában a növényházi paprika egyik legveszélyesebb kártevőjévé vált. Az *A. solani* esetében még az is problémaként lépett fel, hogy a növényházi termesztésben sikeresen használt biológiai növényvédelmi eljárások nem jártak sikerrel. Sajnos a levéltetvek ellen hatékony készítmények igen károsak az integrált növényvédelemben használt hasznos szervezetekre, míg azok a készítmények melyek kíméletesek ezekkel, azoknak a hatása elenyésző az *A. solani*val szemben (Sanchez et.al. 2007).

A parazitoidokkal végzett növényvédelem sarkalatos pontja a mindenkori hőmérséklet alakulása a termesztő létesítményben, mivel ez meghatározza a hasznos szervezetek fejlődését és a célszervezetek elleni hatásukat. Közel 20%-os hatáscsökkenést jegyeztek *Praonvolucre* esetében, mikor a termesztő berendezés hőmérséklete 18 °C-ról 26 °C-ra emelkedett (Silva, et.al., 2015). Azokban az estekben mikor már a természetes ellenségek nem tudják kellően szabályozni az *A. solani* populációját, így azok felszaporodva elérnek egy kritikus szintet, amikor elkerülhetetlen ellenük kémiai növényvédő szert használni. Így a megfelelő pillanatban kijuttatott növényvédőszer segít növelni a védekezés hatásfokát és kíméletesebben bánik a természetes ellenségek populációjával (Sanchez et al., 2007).

Védekezési eljárásként, a mesterséges kémiai készítményeket le lehetne váltani természetes olajokra. Egyik ilyen lehetőség lehetne a kender olaj, mely sok változatát tartalmazza a terpéneknek, így potenciálisan toxikusan hat a célszervezetekre. Kísérletben bizonyították, hogy 0,1%-os kender olaj már 48 órával a kijuttatása után elpusztította az *A. solani* egyedek 100%-át, de már 24 óra után is 98,2%-os volt a hatása (Górski et. al., 2016).

Szívogatásuk másik súlyos velejárója az, hogy számos vírus természetes vektora. Polifág életmódjának köszönhetően számos növényfajt károsíthat, így legalább 45 vírust terjeszthet (AphID, n.d.). Leggyakrabban a burgonya termesztésben okoz súlyos károkat, mivel a burgonya Y vírusának (PYV) egyik leghatékonyabb vektora, nemcsak Európában hanem a Föld, elsősorban mérsékelt égövű klímáján (Berim & Saulich, 2018; Kakareka et.al. 2016; Kim & Kwon, 2019; Were et. al. 2015). Kim és Kwon (2019) 40 évnyi levéltetű populáció vizsgálat után észlelték, hogy az *A. solani* egyedek száma évtizedről- évtizedre változott, de dacára a nagy hőmérséklet emelkedésnek, ennek a fajnak a populációja drasztikusan nem ugrott meg, mint ahogy akár a *Myzus persicae*-é.

Terjesztésének sikeressége elmarad a *M. persicae*tól. A Tarlórépa mozaik vírus (TuYV) esetében is, de így is komoly károkat képes okozni elsősorban az őszi káposztarepcében, ahol 30-85%-os termésvesztést is okozhatnak (Schliephake et. al., 2000; Steven et. al.2008).

Damsteegt and Hewings (1986) vizsgálták az *A. solani* több törzsét és a Szója törpülés vírusának (SDV) terjesztésének sikerességét. Ezt vírust perzisztens módon terjeszti a különböző nyári tápnövényei között. Megfigyeléseik bizonyították, hogy mind a három vizsgált populáció (Amerikai, Új-Zélandi és a Japán) kiválóan terjeszti a vírust, de a Japán törzs az enyhén sikeresebbnek mondható. Damsteegt et. al. (1990) néhány évvel később 6 populáció egyedeit

hasonlította össze és írta le a különböző morfológiai eltéréseket, de ugyanakkor megfigyelte, hogy ezen populációk mind sikeresebben terjesztették a vírus SDV-D (törpítő) törzsét, mint a SDV-Y (sárgulásos) törzsét.

1.4.3. *Macrosiphum euphorbiae* – Burgonya levéltetű

Külső alakjukat tekintve a viszonylag nagy levéltetű fajokhoz sorolhatók. Egyes szárnyatlan egyedek elérhetik a 4 mm-t is. Színük alapvetően zöld, de vörös egyedek is megjelenhetnek. Csápjuk, lábuk hosszú a végük fele feketék, jellegzetesen a szemük piros, ez a zöld színű változatoknál látványosabb. Kozmopolita faj, a világ minden táján megtalálható. Telelni a *Rosacea* családba tartozó fajokon telel, innen migrál át tavasszal a nyári tápnövényeire. Polifág fajról van szó, számos nyári tápnövénye ismeret. A gazdaságilag fontos tápnövényei a burgonya, saláta és a répa félék, ezek mellett növényházi növényeken és gyomokon mindenhol megtalálható (Blackman & Eastop, 2007; CABI, 2018). Szívogatásuk hatására a megtámadott növények fejlődésében zavar lép fel, fejlődésük lassul és ezen problémák mellett még akár 70 növényi vírusnak is lehetnek vektorai (Samaha, 2017).

Samaha 2017-ben vizsgálta a burgonya *Solanum tuberosum* növény és *M. euphorbiae* kölcsönhatását, a növény védekezési stratégiáját. Eredményei azt igazolták, hogy a burgonya növényen szívogató *M. euphorbiae* levéltevek összetett nyála a növények szállító edényei sejtfalainak a megvastagodását indukálták, mely az első védekezési lépés volt. Polifenolok, azaz lignin és szuberin rakódott le a sejtfalakra 72 órával a fertőzés után. További szívogatás a hiperszenzitív reakció kiváltását eredményezte, amelynek hatására nagy koncentrációban képződtek reaktív oxigéngyökök, amelyek az érintett sejteket elpusztították. Ennek a programozott sejthalálnak következtében a levéltetű populáció néhány nap alatt lecsökkent. Ezek az eredmények csak a *S. tuberosum* és *M. euphorbiae* között voltak leírva. Más tesztnövényeken, paradicsomon vagy lúdfüvön nem észlelték hasonló eredményeket. Ennek a szoros kölcsönhatásnak az ismeretében a burgonyanemesítésben igen komoly szerepe lehet.

Azonban, ha áttörik a burgonya növénynek ezt a védekezési mechanizmusát, akkor egyik legjelentősebb vírusterjesztővé válhatnak. Már 2 órányi vírusos növényen eltöltött idő után 90% a tesztállatoknak felvette a burgonya levélsodró vírust (Potato leagroll virus, PLRV). Terjesztésének

a határfoka ugyan elmarad a zöld őszibarack levéltetűtől, ami kísérleti eredmények szerint 90%-os, de a maga 80%-os terjesztési sikerességével igen komoly burgonya kártevő lehet, elsősorban a vetőgumó termesztés esetén (Wafa et. al., 2018).

Angliai *M. euphorbiae* csapdázások vizsgálata után, mikroszatelit markerezéssel 7 különböző genotípust különítettek el. Ezeket tovább vizsgálva 5-ben a borsó levéltetűben (*Acyrtosiphon pisum*) már kimutatott endoszimbionta baktériumokat *Hamiltonella defensa*-t, *Regiella insectigola*-t is kimutattak. Azok a genotípusok, melyek tartalmazták ezeket endoszimbionta baktérium törzseket ellenállóságot mutattak a szintén polifág, a levéltetűket parazitáló *Aphidius ervi* fürkészdarázs ellen. Bizonyították, hogy azok a genotípusok melyek tartalmazták a *H. defensa* baktériumot, azok gyorsabban fejlődtek, nagyobb volt a túlélési arányuk és nagyobb mennyiségben tudtak szaporodni, mint a szimbiontát nem tartalmazó vonalak. Ezek az eredmények felvetnek egy paradoxon képet azt, hogy a természetes ellenségét használva a *M. euphorbiae* ellen, felszaporítunk, egy olyan törzset, mely végül rezisztens lesz a természetes ellenségeivel szemben (Clarke et. al., 2017). Későbbi vizsgálataik arra is rávilágítottak, hogy a parazita-rezisztens genotípusok alkalmazkodása a rovarölő szerekhez az sikeresebbnek bizonyult, azaz enyhe inszekticid rezisztencia volt észlelhető ezekben az egyedekben (Clarke et. al., 2018). Megfigyelésekből kiderült, hogy a parazitoid rezisztens genotípusok, gyengébben viselték a viszontagságosabb helyzeteket, elsősorban a nem megfelelő klimatikus viszonyokat, (alacsony hőmérséklet) vagy akár a kevesebb zöldtömeget növelő fajokon a életképességük elmaradt az érzékeny genotípusokéhoz képest. Valószínűleg evolúcionálisan a rezisztencia miatt befektetett plusz energia abban csapódik le, hogy ezeket a körülményeket nehezebben viselik (Clarke et al., 2018; Karley et. al., 2017).

A *M. euphorbiae* nyálának a összetételét vizsgálva, néhány speciális vírusokra utaló fehérjét azonosítottak. *Macrosiphum euphorbiae* vírus 1-ként (MeV-1) azonosították be ezt, az erre a fajra jellemző vírust. A lárvákat és imágókat vizsgálva, azt látták, hogy fejlettségtől függetlenül minden stádiumban jelen van ez a vírus, akár egy populációból random kiválasztott egyedeket vizsgálva is. A vírus nincs beépülve a levéltetű genomjába és képes azok testében replikálódni. Észak-amerikai és európai populációkat vizsgálva kijelenthető, hogy csak az európai egyedekben volt jelen. Mivel patológiai hatása a levéltetűre nézve nem ismert azt gyanítják, hogy egy latens növényi vírusról van szó, mely beépült ezen faj hemolimfájába (Teixeira et al., 2016). További hasonló vizsgálatokat végezve, kimutatták a *Macrosiphum euphorbiae* vírus 2-öt, az USA-

ból származó populációkból és a Macrosiphumeuphorbiaevirus 3-at Németországból származó populációból. Annak ellenére, hogy hasonló módon izoláltak levéltevekből vírusokat, DpIDNV a *Dysaphis plantaginae*ből mely azok keletkező szárnyas egyedeinek a számát csökkentette, vagy a MpDNV-t *Myzus persicae*ből, mely azok abnormális fejlődését eredményezte, addig a *M. euphorbiae* vírusos egyedei nem mutattak semmilyen patológiai elváltozást (Teixeira et al., 2018).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk céljai között szerepelt, hogy megvizsgáljuk és összehasonlítsuk az három invazív gyom (*Erigeron annuus*, *Conyza canadensis*, *Solidago canadensis*) populációját eltérő művelésű (intenzív, extenzív) területek között. Vizsgálatokat végeztünk intenzív mezőgazdasági területeken, ahol az intenzív talajművelés mellett műtrágyákat és kémiai növényvédő szereket használtak (HIF-high-input-fields), valamint olyan extenzív mezőgazdasági területeken, ahol ezeknek a hiánya volt a jellemző (LIF-low-input-fields).

Megvizsgáltuk, hogy a domináns invazív gyomfajokon, melyek a leggyakrabban előforduló helyi, őshonos levéltetű fajok, azok milyen arányban vannak jelen a környező, leggyakrabban termesztett mezőgazdasági kultúrákban (kukorica, burgonya és lucerna).

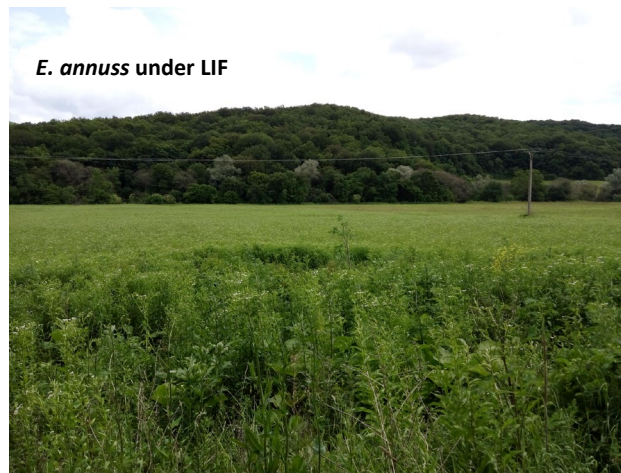
A levéltetvek általi gazdanövény preferencia vizsgálatokra stresszfehérje elemzést végeztünk, továbbá célunk volt azonosítani az invazív gyomokban leggyakrabban előforduló növényi vírusokat.

Összeségében az invazív gyomok szerepét, mint vírusrezervoárok, és potenciális veszélyforrások vizsgáltuk a mezőgazdasági kultúrákra, azt feltételezve, hogy a helyi levéltetű populációk könnyen adaptálódva az invazív gyomokra, komoly vírusvektorokká válnak, a vírusvektor potenciáljuk ugyanakkor nagyban függhet a környezettől és a kezelések típusától.

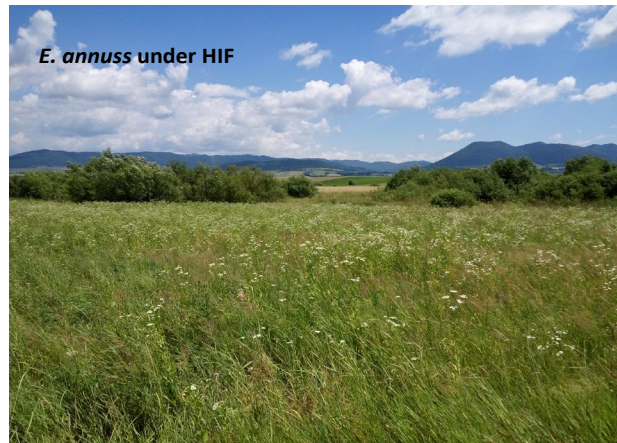
3.ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

3.1 Területek bemutatása - Invazív gyomok felmérése

Terepi gyomfelvételezésünket és a levéltetvek gyűjtését 2015 és 2016 vegetációs időszakában végeztük Romániában, Erdély központi illetve keleti régiójában úgy az intenzíven művelt (HIF), mint a kevésbé intenzív (LIF) területeken (1 ábra).



a. LIF



b. HIF

1.Ábra. A LIF (a) és HIF (b) területek

Az Erdély központi részén elhelyezkedő Szász régió szolgált a kevésbé intenzíven művelt területeknek. Ez a kb. 7440 km² terület fizikai adottságaiból adódóan nem válhat egy intenzív

mezőgazdasági zónává, mivel szűk völgyek és meredek domboldalak alapvetően a kisparcellás (0,3-0,5ha) művelést engedik, sok esetben ezen területek művelését is felhagyják, teret engedve az invazív fajok terjedésének (Zimmermann et. al., 2015). Ennek a területnek a tengerszint feletti magassága 230-800 m között változik és alapvetően az erdős-, legelős részek és szántóföldek nagyjából azonos arányban alkotják ezt a vidéket (28%-24%-37%). Ennek köszönhetően nagy fajgazdagság és nagy biodiverzitás jellemző erre a vidékre (Akeroyd & Page, 2011). A kultúrnövények közül a legmeghatározóbb fajok a kukorica, lucerna, burgonya.

A másik kísérleti területünként az Erdély keleti részén, a Csíki-medencében található, intenzívebben művelt területek szolgáltak. Ezekre a tájakra a nagyobb parcellák és az intenzív termesztés miatt a nagyarányú műtrágya- és peszticid használat volt jellemző (**1. Táblázat**). Ezen a területen a fő gazdasági növénykultúrák a burgonya, lucerna, kukorica, búza és cukorrépa.

1. Táblázat. Az intenzív mezőgazdasági területen (HIF) használt műtrágyák és peszticidok

Kultúrnövény		Kezelés
Burgonya	Műtrágya	N, P, K (15,15,15) 1,2 t/ha
	Gyomirtó	Sencore (metribuzin 70%) Titus 25 DF (rimsulfuron)
	Rovarölő	Calypso (tiacloprid)
	Gombaölő	Banjo (fluazinam) Ridomil Gold (mefenoxam, mankoceb) Infinito (flupikolid, propamokarb klórhidrát) Consento (propamokarbklorhidrat, fenamidon) AcrobatMz (dimetomorf, mankozeb)
Lucerna	Műtrágya	N, P, K (15,15,15) 0,16t/ha
	Gyomirtó	Pallas (pirokszulám)
	Rovarölő	Fastac (alfa-cipermetrin)
	Gombaölő	AmistarXtra (azoxisztrubin)
Kukorica	Műtrágya	N, P, K (15,15,15) -0,4t/ha
	Gyomirtó	Adengo (isoxaflutol 225g/l-tiencabazon-metil 90g/l-ciprosulfamid (safener)150g/l)

A gyomfelvételezéshez és a levéltetvek begyűjtésére mindkét terület típusnál lokalizáltunk két-két mintaterületet, melyek 10-15 km-re voltak egymástól. Ezeken végeztük a vizsgálatokat mindkét évben. Mindegyik területen lokalizáltunk két transzektet (10 m hosszú -1 m széles) melyek körülbelül 1 km-re helyezkedtek el egymástól és amelyek mellett megtalálható volt mind a három fő kultúrnövény (kukorica, burgonya, lucerna). A pontos behatárolásért bemértük a GPS koordinátáját minden transzektnek. Ezek után a transzektet 10 db 1 m²- darabra osztottuk, melyeket utána 10x10 cm kis parcelláskákra, és ezeken a kis területeken megvizsgáltuk a gyomborítást (öshonos fajokat, illetve invazív fajokat egyaránt) (Andújar et. al., 2010). A transzektet minden m²-ről begyűjtöttünk 10 darab invazív gyomot, melyeket műanyag tasakokba csomagolva tároltuk a későbbi laboratóriumi elemzésig. A gyűjtött gyomok aránya tükrözte, az adott m²-en előforduló invazív gyomok arányát. (8 darab gyomot gyűjtöttünk abban az esetben, ha az adott területen egy bizonyos gyom borítása 80%-os volt, és 2 darabot, ha a másik gyom 20%-ban volt jelen az adott területen). Megfigyeltük, hogy mindig volt egy domináns invazív gyomfaj, amely akár 80%-os borításban jelen volt, míg a maradék borítást 1 vagy 2 másik invazív faj tette ki.

Mivel a másik célunk az volt, hogy megvizsgáljuk ezeken a gyomnövényeken előforduló levéltetvek faji összetételét és azok populációját, ezért a levéltetveket vagy a levéltetvekkel borított növényrészeket 96%-os alkoholba eppendorf csőbe tettük és a laboratórium fagyasztójában -20°C-on tároltuk meghatározásig. Ebben a formában 100 növénymintát gyűjtöttünk egy transzekttről egy mintavételi alkalomkor. Évente 4 mintavételi alkalomunk volt, ezen alkalmak között 14 nap telt el és addig folytattuk míg találtunk levéltetveket a növényeken.

A levéltetvek meghatározása, azok kipreparálása után morfológiai vizsgálat útján történt. A preparátum készítését a -20°C-on tárolt levéltetvek számolásával kezdtük, szétválogattuk az imágókat és lárvákat. Az imágókat ezután 98%-os alkoholban 7-8 percen át vízfürdőben főztük. Innen egy óraüvegbe helyeztük és lándzsatűvel a potroh alsó részén egy lyukat szúrtunk, hogy azon keresztül a bél állomány távozni tudjon, majd KOH oldatban újra főztük 10-15 percig. Miután a bélszövet kellően kimosódott a levéltetveket áttettük desztillált vízbe, majd újra főztük 10-15 percen keresztül. Utolsó lépésként a megfelelő egyedeket kanada-balzsamba helyeztük, felcímkéztük (Blackman & Eastop, 2007; Szalay-Marzsó, 1969).

3.2. POD-enzim aktivitás mérése és összehasonlítása a gyomnövényekben

A növénymintákat évente a mintagyűjtésekkor szedtük a transzektékből, mindenik minta levéltetvek által károsított fiatal hajtásrész volt, ezeket műanyag tasakban tároltuk -20°C -on az enzim aktivitás mérésekig ($n=10$ növényminta/ 1 m^2 , így 100/transzekt).

A kivonáshoz 400 mg fagyott növényt 1 ml 50mM-os, 7 pH foszfát puffer hozzáadásával FastPrepInstrument (MP Biomedicals) centrifugával homogenizáltuk. Ezután 20 percen keresztül 4°C -on 6500 r.p.m.-en centrifugáltuk, majd a felülúszót összegyűjtöttük. A fehérjekoncentrációt és az enzim kivonást a Bradford módszerrel végeztük (Bradford, 1976). A POD aktivitását a Németh és társai által kidolgozott módszerrel mértük (Németh et.al., 2009). A reakció mix 955 μl , 50mM-os, 5,5 pH foszfát puffert, 10 μl 0,01 g/l-es 3,3-diaminobenzidin-t és 30 μl enzim kivonatot. A reakció beindításához 5 μl 0,3%-is hidrogén-peroxidot adtunk. Az abszorbancia növekedését 480 nm hullámhosszúságon követtük spektrofotométerrel 5 percig, 5 és 10 $\mu\text{mol min}^{-1}\cdot\text{mg fehérje}^{-1}$ POD-nál.

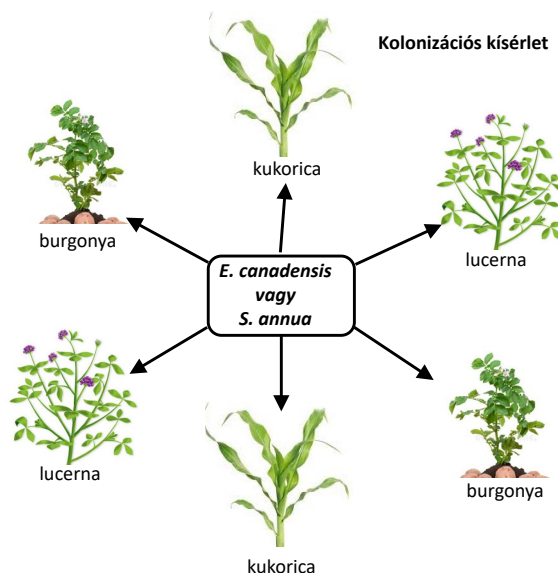
3.3. A levéltetvek kolonizációja a gyomnövényekről a kultúrnövényekre

A vizsgálathoz a levéltetűfajokat a Marosvásárhelyi Sapiientia Erdélyi Tudományegyetem területén e célra kijelölt kísérleti parcellán ültetett és felállított gyomnövényekről, valamint kultúrnövényekről gyűjtöttük 2017-ben.

Vizsgálatokhoz május végén 17,5 cm átmérőjű cserepekbe vetettünk kukoricát, lucernát és burgonyát. Majd gondos ápolás mellett mikor már intenzív növekedésben voltak (BBCH 32-39) ugyanekkora cserepekbe invazív gyomfajokat, seprencét és betyárkórót ültettünk, összesen 20-20 darabot mindenikből (2. ábra).

Ezt követően egy parcellába felállítottunk egy 5 oszlopból és 8 sorból álló kísérletet, úgy, hogy egy oszlopba váltakozva 4 darab seprence és 4 darab betyárkóró került, amelyek köré 25cm távolságra meghatározott sorrendbe egy-egy lucernát, kukoricát, és burgonyát tartalmazó cserepet tettünk. Minden ilyen négyes csoport alkotott egy „kísérleti csoportot”.

A levéltetveket ebből a felállított kísérleti parcellából gyűjtöttük össze.



2.Ábra. Kolonizációs kísérlet

2017 június 12.-én gyűjtöttük az első mintákat, random, nem egymás melletti kísérleti csoportból, úgy, hogy mind a két fajból származó gyomnövény által meghatározott kísérleti csoportokból 3 legyen. Majd az ezt követő minden hét első napján, ha az időjárás is kedvező volt, ugyan úgy, mint azelső gyűjtésnél, 2017 július 17-ig mintákat gyűjtöttünk (2. Táblázat).

2. Táblázat: A gyűjtött növények, pontos helyük és a gyűjtés ideje

Gyűjtés ideje	Gyűjtési csoport pontos helye		Gyomnövény	Kultúrnövények
	Oszlop	Sor		
2017.06.12	1	1	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.12	1	8	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.12	3	5	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.12	4	3	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.12	5	4	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.12	5	8	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.19	1	4	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya

Gyűjtés ideje	Gyűjtési csoport pontos helye		Gyomnövény	Kultúrnövények
	Oszlop	Sor		
2017.06.19	2	2	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.19	3	4	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.19	3	8	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.19	4	6	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.19	5	1	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.26	1	6	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.26	2	4	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.26	2	7	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.26	3	1	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.26	4	8	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.06.26	5	6	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.04	1	4	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.04	2	3	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.04	3	6	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.04	4	4	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.04	5	2	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.04	5	5	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.10	1	2	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.10	1	5	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.10	2	8	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.10	3	3	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.10	4	1	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya

Gyűjtés ideje	Gyűjtési csoport pontos helye		Gyomnövény	Kultúrnövények
	Oszlop	Sor		
2017.07.10	4	7	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.17	1	3	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.17	2	1	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.17	2	5	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.17	3	7	seprence	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.17	4	7	betyárkoró	kukorica, lucerna, burgonya
2017.07.17	5	3	seprence	kukorica, lucerna, burgonya

Mintagyűjtés során műanyagtasakot húztunk a kultúrnövényekre, valamint a gyomnövényekre és egy olló segítségével a száruk also részén elvágtuk a növényeket, így biztosak lehettünk benne, hogy a rajtuk lévő levéltetvek nem hullnak le a gyűjtés során. Minden tasakot külön felcímkéztünk, amelyen szerepelnie kellett a gyűjtés idejének, a növény nevének, valamint pontoshelyzetének a parcellán.

A terepen végzett gyűjtést követően az egyetem kutató laboratóriumában optikai mikroszkópot használva a növényeken talált levéltetveket külön előre elkészített, és abszolút alkohollal feltöltött Eppendorf tubusokba tettük, úgy, hogy a különböző növényfajokon talált tetvek ugyanabba az Eppendorf tubusba kerüljenek a megfelelő címkével ellátva.

Ezeket a mintákat az egyetem kutató laboratóriumában lévő fagyasztóban -20°C -on tároltuk.

Miután, az összes növényfajunkon általunk talált összes levéltetű Eppendorf tubusokba került, ugyancsak az egyetem kutató laboratóriumába Zeiss Stemi 2000-C sztereomikroszkóp használatával azonosítottuk a begyűjtött levéltetű fajokat.

3.4. Levéltetvek gyomokról kultúrnövényekre való áttelepülésének vizsgálata genomiális DNS elemzéssel

3.4.1 . Genomiális DNS izolálás

A -20 °C-on tárolt levéltetveket izolálás céljából steril csipesz segítségével összetörtük és a NucleoSpin Tissue Genomiális DNS kivonó kit alkalmazásával a gyártó által előírt módon kivontuk belőlük a genomiális DNS-t.

3.4.2 Sejtlízis (Sejt feltárása)

A kiválasztott levéltetveket steril 1,5 ml-es Eppendorf tubusokba tettük, ehhez hozzáadtunk 180 µl puffer oldatot (Tissue Lysis Buffer), valamint +25 µl Proteináz K oldatot amit vortex használatával homogenizáltunk. A kapott mintákat 56 °C -on inkubáltuk 1,5 órán keresztül, miközben steril csipesz segítségével rásegítettünk a levéltetvek szétválására.

Ezt követően 200 µl Lysis Buffer B3 -at adagoltunk hozzá, amit rögtön vortexeltünk és az így kapott mintákat ismét inkubáltuk 10 percen keresztül 70°C-on. Az inkubátorból kikerülve vortexeltük a mintákat miután hozzáadtunk 210 µl etanolt.

3.4.3. Oszlopok feltöltése

A kapott mintákat az Eppendorfokból erre a szilikát tartalmú oszlopra (NucleoSpin Tissue Column) pipettáztuk, és 11000 fordulat/perc 1 percen keresztül centrifugáltuk. A centrifugából való kiszedés után a gyűjtőcsőbe átfolyt folyadékot leöntöttük.

3.4.4. DNS tartalmú folyadék átmosása

A membránt először 500 µl 1 mosópufferrel (Was Buffer BW), majd 600 µl 2 mosópufferrel mostuk át a fehérjeszennyeződések eltávolítása érdekében, miközben 11000 rpm fordulatszámon 1 percig centrifugáltuk. Az átfolyt folyadékot mindkét centrifugálást követően elöntöttük. Miután mindkét mosópufferrel elvégeztük a szükséges teendőket a maradék etanol eltávolítása érdekében 1 percen keresztül 11000 rpm-en centrifugáltuk az oszlopot.

3.4.5. DNS kinyerése

Az oszlopokat tiszta Eppendorf tubusokba helyeztük, és a membrane közepére pipettáztunk 50 µl elúciós puffert (Elution Buffer BE), majd 1 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, és 11000 rpm fordulatszámon 1 percig centrifugáltuk.

A kapott átfolyó tartalmazta a genomiális DNS-t, amelyet -20°C-on tároltunk a következő lépésekig.

3.4.6. Agarózgélelektroforézis

A vizsgálatot Csíkszeredában a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Műszaki és Társadalomtudományi karának, Élelmiszeripari Mérnök Tanszékének laboratóriumában végeztük el. Azért volt szükséges ennek a műveletnek az elvégzése, hogy leellenőrizzük, hogy a mintákból sikeresen kivontuk-e a DNS-t.

1%-os agarózgélen ellenőriztük a genomiális DNS izolálás sikerességét.

Ez egy olyan technika, amelyet a molekulák elektromos töltöttségbeni, valamint méretbeni elválasztására használunk. Töltésüktől függően, amikor elektromos térbe kerülnek a töltéssel rendelkező molekulák, akkor vagy a pozitív anód, vagy a negative katód fele mozdulnak el töltésüktől függően. A gélelektroforézis során a negative töltésű nukleinsav molekulák, amelyek a DNS molekula foszfát csoportjai miatt negative össztöltéssel rendelkeznek a feszültség hatására az elektroforézis cella pozitív pólusa felé vándorolnak. A gélközegellenállása miatt a kisebb méretű DNS gyorsabban a nagyobb méretű lassabban fog vándorolni a gélben, így lehetővé válik a méret szerinti elkülönítés, mert az azonos molekulatömegű DNS-darabok sávokba rendeződnek. A nukleinsav vándorlási sebességét a DNS-ek méretén kívül a gélkonzentrációja is befolyásolja: töményebb gélben a vándorlási sebesség alacsonyabb, viszont a felbontás javul. Fontos befolyásoló tényező az alkalmazott áramerősség

Ezt a folyamatot gélben végezzük el, pontosabban agarózgélben, amely egy homogén anyag. A gélelektroforézishez használt 1%-os agarózgélt úgy készítettük el, hogy egy Erlenmeyer-lombikba lemértünk 1g agarózt, ehhez hozzáadagoltunk 1xTAE-oldatot addig, amíg 100 ml nem kaptunk. Forralásig melegítettük mikrohullámú sütőben, miközben kevergettük az agaróz feloldódásáig. Az oldatot kissé visszahűtöttük, és ehhez hozzáadtunk 5µl Read Safe festéket, ezt összekevertük. Közben a gélöntő kádba helyeztük a szükséges fésűt mely a minta felvételére

szolgáló zsebek kialakításához szükséges és ezt követően lehetőleg a legbuborékmentesebben a kapott oldatot a gélöntókádba öntöttük.

A gél megmeredését követően eltávolítottuk a fésűt és a kapott zsebekbe pipettáztuk a DNS- tartalmú mintákat az Effendorf tubusokból. Az első zsebbe 6 µl mintavivőfestéket pipettáztunk. A mintákat úgy vittük fel, hogy: 8 µl izolált DNS mintát kevertünk 2 µl festékkel. Miután ezeket egyenként kimértük és összekevertük, feljegyezve a minták sorrendjét belepipettáztuk a zsebekbe. Majd a géllel belemerítettük az elektroforézistankba. Ez után következett a tényleges elektroforézis 90 V-on körülbelül 30-40 percig tartott a minták futtatása.

Különböző méretű molekulákból áll a zsebekben lévő DNS, ami méret szerint elválasztódik. Ezt DNS kötődő fényjelző festékkel tettük láthatóvá, amely UV fényben fluoreszkál. A kapott mintát ultraibolya fényel átvilágító géppel láthatóvá tettük, és GelDoc rendszerrel lefényképeztük. A fényképen láthatóvá vált mennyire volt sikeres a genomiális DNS kivonásunk (Voyates, 2000).

3.4.7. Polimeráz láncreakció

A gyomnövényekről és kultúrnövényekről befogott levéltetvek mikroszatelita alapú vizsgálatát két primerrel végeztünk, melyeket (Wilson et al., 2004) által írt cikk alapján választottuk ki.

A célja egy specifikus DNS szekvencia sokszorosítása, lehetővé teszi egy specifikus DNS szakasz *in vitro* enzimátikus szintézisét. A módszer lényege, hogy egyetlen DNS template molekulából kiindulva 106 másolat készíthető. A folyamat egy sor ismétlődő enzimátikus reakcióból áll, amelyik a DNS „in vivo” replikációjához hasonlóan megy végbe.

A sejtben a replikáció során a topoizomeráz I és II, a helikázok, girázok és az egyszálú DNS kötőfehérje a kettős DNS száldespiralizációját katalizálják. A primáz szintetizálja a primert egy RNS oligonukleotidot, amelyik komplementer a DNS szállal. A primer és a DNS alkotta komplex a kötőhelye a DNS-polimeráznak III.-nak, amely az új lánccsintézisét végzi, azaz foszfodiészter kötések kialakítását a template DNS-el való komplementaritásnak megfelelően.

3. Táblázat: A kísérlet során felhasznált levéltetvek polimorfizmus vizsgálatához alkalmazott mikroszatellita DNS markerek tulajdonságai

Lókusznév	Ismétlődő szekven- cia	Primer szekvenciák (5'-3')	DNS mérete, bp	T _m , °C	T _a , °C
S23	(GA) ₁₄	F: GGTCCGAGAGCATTCATTAGG R: CGTCGTTGTCATTGTCGTCG	122 – 156	60 58	56
S24	(CA) ₂₀	F: CCCGACCCCGTCCATTCAAA R: CCTCCACCACTACTTTCCTCC	167 – 218	60 60	56

T_a - PCR során alkalmazott primer tapadási hőmérséklet

T_m- primer olvadáspontja

A template DNS-t, a DNS szintézist végző termotabil Tag polimerázt, az enzim puffer oldatát, a primereket, a négyféle nukleotidot, aenzim kofaktorát a MgCl₂-ot és vizet egy PCR tubusba pipettáztuk. Ezeket egy PCR készülékbe helyeztük. Itt ismétlődő denaturáció-renaturáció ciklusok mennek végbe. Első lépésben a cél DNS-t denaturáltuk 90°C-nál magasabb hőmérsékleten. Ezt követően a reakcióelegyet 50°C körüli hőmérsékletre hűtjük, ami lehetővé teszi a primerek hibridálását a cél DNS-hez. Ezeknek a primereknek a szerepe a célszekvencia behatárolása és az amplifikáció iniciálása. Ebben a szakaszban kapcsolódik a termotabil DNS-polimeráz a primer 3'-OH végéhez és elkezdődik a primer elongációja. A harmadik szakaszban a thermocycler a polimeráz aktivitásának optimális hőmérsékletére melegíti az Eppendorf tubusokat. Ezt a három szakaszt a specifitás függvényében akár 20-40 X is megismételjük. Mivel a reakció specifitása változó, befolyásolja a primerek kötődése, szekvenciája, a bázis összetétel és hossza, a hibridálási dőtartalma, a hőmérséklete, a szabad Mg²⁺ionok koncentrációja, valamint más ionok jelenléte.

A DNS vizualizálása után 2 pár primert alkalmaztunk (3. Táblázat) a levéltetvek polimorfizmusának vizsgálatára. A primerek 20-40 bp (bázispár) hosszúságú nukleotid szakaszok, amelyek behatárolják a megsokszorozandó gén elejét és végét.

A PCR termék előállítására érdekében tiszta Eppendorf tubusokba bemértük a reakcióelegy komponenseit: 2,5 µl 10xPCR (NH₄)₂SO₄ tartalmú puffert, 2,5 µl MgCl₂-ot (12,5 mM), 1 µl dNTP-t (5 mM), 1 µl forward primert (5 µM), 1 µl reverse primert (5 µM), 0,25 µl Taq polimerázt (1,25 U/µl), és 1 µl templát DNS-t, majd 50 µl-ig steril desztillált vízzel kiegészítettük. A PCR reakciót automatizált Sure Cycler 8800 Thermal Cycler készülékkel valósítottuk meg a következő program szerint: denaturáció 96°C (3 perc); 32 ciklusban denaturáció 94°C (30 másodperc), hibridizáció 55°C (30 másodperc), polimerizáció 72°C (30 másodperc); végső polimerizáció 72°C (7 perc). Ezt követően a keletkezett mintákat 4°C-on tároltuk.

3.4.8. Poliakrilamid gélelektroforézis

A PCR termékek 10 µl-ét 7%-os native poliakrilamidgélben (poliakrilamidgélelektroforézis-PAGE) szeparáltunk (10 cm), és megfestettük RedSafe DNS kötőfestékkel. Ezt követően a DNS-eket UV fényben vizualizáltuk a GelDoc (Biorad) rendszer alkalmazásával.

A különböző hosszúságú DNS molekulák összetöltése azonos, ezért a lineáris DNS molekulák szeparálódnak méret szerint a poliakrilamidgélben. A PAGE fehérjék és akár 1 nukleotid hosszban különböző oligo – vagy polinukleotidok elválasztására alkalmas.

Gyökös polimerizációra képes az akrilamid vizes oldatban, megfelelő katalizátorok (pl. tetrametil-etilén-diamin, TEMED) és iniciátorok (pl. ammónium-perszulfát, APS) jelenlétében és a reakció során nagy molsúlyú lineáris polimer, ún. poliakrilamid keletkezik. Ennek a rendkívül nagy viszkozitású a vizes oldata. Hosszú poliakrilamid láncok között “hidak” képződnek, és térhálós szerkezetű gél jön létre, ha megfelelő keresztkötő ágens, N, N-metilén-biszakrilamidot is alkalmazunk.

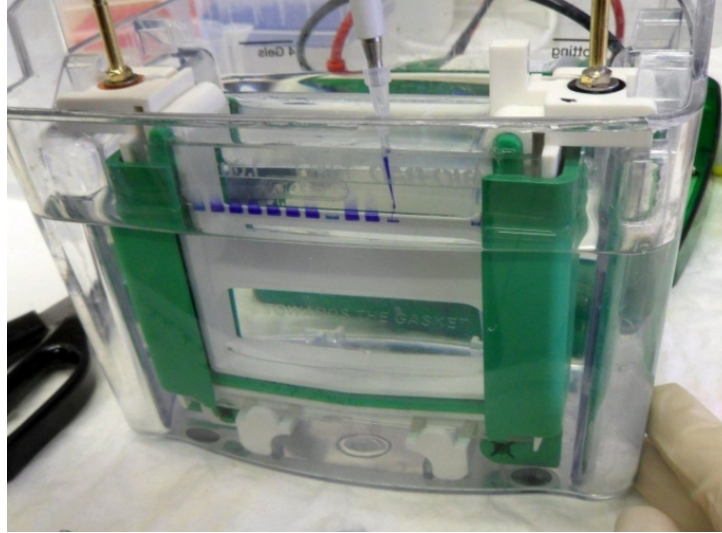
A 7%-os poliakrilamid gél elkészítése érdekében először az üveglapokat zsírtalanítottuk abszolút etanollal, majd a gél öntéséhez szükséges készüléket előkészítettük. Összemértük a megadott akrilamid koncentrációjú szeparáló gél, amelynek összetételét a 4. Táblázat tartalmazza.

4. Táblázat: A 8%-os szeparáló gél összetétele

Összetevő megnevezése	Felhasznált térfogat
Akrilamid-biszakrilamidoldat (40 %)	10 ml
10 X TBE	5 ml
10%-os ammóniumperszulfát	0.35 ml
TEMED	25 µl
Desztillált víz	34,65 ml

A két üveglap közé pipettáztuk a gél oldatát, behelyeztük a fésűt, mellyel a mintafelvivő zsebeket alakítottuk ki. A gél polimerizálódása után (30 perc) a fésűt eltávolítottuk, és a gél behelyeztük az elektroforézis cellába (3. Ábra), majd 1X TBE futtató pufferrel feltöltöttük. 1 liter 10X TBE (Triss-borát-EDTA puffer) futtató puffer elkészítéséhez bemértük a következő összetevőket: 108 g Tris, 55 g bórsavaés 20 ml 0,5 M EDTA pH 8.0 és 1 l-ig kiegészítettük desztillált vízzel.

A mintákat a zsebekbe a következő képpen vittük fel: 10 µl PCR termék + 2 µl 6X mintafelvivő festék. 5 µl-ert pipettáztunk a DNS molekulasúly-markerből az első zsebbe. Az elektroforézist 100 V feszültségen végeztük kb. 2 órán keresztül, amíg a jelzőfesték el nem érte a gél alját. Ezt követően előkészített festékoldatba tettük a gél (100 ml 1XTBE + 5 µl RedSafe), és 30 percig rázattuk, majd UV fényben vizualizáltuk.



3. Ábra: Biorad típusú poliakrilamid gél elektroforézis készülék (szerző fotója)

3.4.9. Mikroszatellit elemzés

A mikroszatellit ellitek nagypolimorfizmust mutató ismétlődő DNS-szakaszok, amelyek nagy számban az eukarióta genomban elszórtan megtalálhatóak és roved bázisszekvenciákból állnak. Általában 2-5 bázispárnyi roved bázisszekvenciát tartalmaznak, amelyek változó számban ismétlődnek. Több ismétlés is megfordulhat a genomban és ugyanaz a szekvencia is előfordulhat eltérő lokuszon. Az ilyen ismétlődések számában az egyedek között variabilitás alakult ki és ezáltal a DNS jellemzésének értékes molekuláris markerportját szolgálja.

Mikroszatellit vizsgálat során a mikroszatellit-allélok közötti legkisebb különbséget is ki lehet mutatni. Polimeráz láncreakció segítségével megszorozva a szakaszt és gélelektroforézissel megállapítva a termék méretét bármilyen DNS szakaszban az ismétlődések számát meg tudjuk állapítani. Különböző PCR terméket fog eredményezni két egyed DNS-e, hogyha ezek lokuszan különböző hosszúságú tandem elrendezések találhatóak. Ezt előhívott gélen különálló sávonként láthatjuk.

A mikroszatellit elemzések során minden levéltetűnél összehasonlítottuk az egyezéseket minden mikroszatellit esetében. Az adatok jobb átláthatósága kedvéért minden mikroszatellit esetében külön mutatjuk be 24 esetet.

3.5.Növényi vírusok kimutatása - Minták gyűjtése

A mintákat az adott területen lévő leggyakoribb és invazívnak számító gyomnövényfajok képezték, a betyárkóró (*Conyza canadensis*), az egynyári seprence (*Erigeron annuus*) és a kanadai aranvessző (*Solidago canadensis*). A minták gyűjtése 2017-ben történt, két területről. Az első terület Tusnádon volt, ahol intenzíven művelt területek domináltak, a másik Segesvár környéke volt, itt felhagyott vagy extenzíven művelt területek voltak. A gyomnövények útszélekről, sáncokról és parcellák széléről voltak gyűjtve. Minden terület úgy volt kiválasztva, hogy a környező mezőgazdasági területeken burgonya, kukorica és takarmánylucerna termesztése történjen.

A hajtás minták gyűjtése háromszor volt megismételve, májustól szeptemberig terjedő időszakban, időpontokként és gyomnövényekként 10-10 mintával.

Tusnádról, ami a high input- intenzív területet jelenti, betyárkóró és egynyári seprence, míg Segesvárról, a low input-extenzív területről kanadai aranyvessző és egynyári seprence volt gyűjtve.

A laboratóriumban azokból a begyűjtött gyom mintákból történt az RNS kivonása új generációs kis RNS követéssel, amelyeken a legnagyobb levéltetű egyedszám volt. A levéltetvek a vírusok legfontosabb vektorai, ők a gyomnövényeket nyári tápnövényként használják amelyekről majd ismét a kultúrnövényre vándorolnak vissza, így ezen növények vizsgálata volt a legcélravezetőbb. Voltak minták, amelyek tünetmentesek voltak, de voltak olyanok is, amelyeken látszott a vírusfertőzés (4.Ábra és 5.Ábra).



4.Ábra: Vírusfertőzés a betyárkóróban (HIF) (*C. canadensis*) (szerző fotója)



5.Ábra: Vírusfertőzés az egynyári seprencében (HIF) (*E. annuus*) (szerző fotója)

3.6. Teljes nukleinsav kivonás

Az új generációs kisRNS követés első lépése a totál nukleinsav kivonása. Az RNS megóvása végett végig jégen dolgoztam.

A folyékony nitrogéneben tartott levélmintákat szárazon, gyorsan dörzscsészében eldörzsöltem, utána 650 μ l kivonó puffert (7 ml steril víz, 10%-os nátrium-dodecil-szulfát SDS –ből 2 ml, 10xEB-ből 1 ml, amelynek 9,5-ös a pH-ja, és 7,5 g 1 M Glicint, 20 ml 100 nM EDTA-t, 20 ml 1 M NaCl-t tartalmaz) pipettáztam, hogy homogenizálni tudjam, és feltárjam a növényi sejteket.

Az így keletkezett masszát az előzőleg előkészített 600 μ l fenolt tartalmazó Eppendorf csövekbe töltöttem. Ezt 5 percre Vortexben centrifugáltam 15000 fordulatszámon.

A centrifugálás után az Eppendorfból keletkezett felső fázist átpipettáztam az új Eppendorf csövekbe, ügyelve arra, hogy a felső és alsó fázis között található interfázist, amiben a fehérjék vannak, ne szívjam fel. Ebben 300 μ l fenolt és 300 μ l kloroformot mértem, ezzel extraháltam a keletkezett vizes fázist. Ezt ismét 5 percig Vortexben centrifugáltam 15000 fordulatszámon.

Új Eppendorf csövekbe 500 µl kloroform: izoamilalkoholt mértem, amire a centrifugálás után keletkezett felső fázist pipettáztam, majd 5 percig Vortexben centrifugáltam. A felső fázishoz ezután 20 µl 4M-os Na-acetátot adagoltam és 1 ml 96%-os EtOH, majd pár percig, amíg a nukleinsavak kicsapódtak, jégen tartottam. Az Eppendorf csöveket megforgattam párszor, majd 30 percig centrifugáltam. Ezután az alkoholt leöntöttem a csövekről és 1 ml 70%-os EtOH-al mostam őket. Ezután 3 percig centrifugáltam, ismét leöntöttem az alkoholt, majd 4 percig beszárítottam a csöveket. A művelet után 30 µl steril vízben visszaoldottam a mintákat, egy percig Vortexeltem, majd a mintákat jégen tartottam. Az ellenőrző futtatáshoz 2 µl totál nukleinsav kivonat mintához 5 µl FDE (10 ml formamid, 10 mg xilén-cianol FF, 10 mg brómfenolkék, 200 µl 0.5M EDTA (pH 8.0)) adtam. Ezt a keveréket denaturáltam 65 C-on 5 percig, majd az össznukleinsav kivonat minőségének ellenőrzésére, a kivonatot 1,2% agaróz gélen választottam el, és 115 V-tal futattam (White & Kaper, 1989).

3.7. Kis RNS könyvtár készítés és szekvenálás

Ezután a kisRNS könyvtár készítése következett, amelynek fő lépései a következők: kisRNS frakció izolálása a totál RNS kivonatból, adapter ligálás, reverz transzkripció, PCR amplifikáció, és cDNS tisztítása gélből.

A kisRNS-eket az összes RNS-t tartalmazó kivonatból kell kitisztítani, amelyet 8%-os urea tartalmú poliakrilamid gélen választanak el. A gélből kivájják a 19-25 nukleotid nagyságú RNS-eknek megfelelő RNS-eket tartalmazó mérettartományt. A géldarabokat 0,3 M NaCl oldatban egy éjszakán át inkubálják, így kinyerik a kisRNS frakciókat, majd alkohollal kicsapják ezeket. Egy mintából 40-50 µg tisztított kisRNS származik. Ezekből könyvtárat készítenek az Illumina Truseq Small RNA Sample Preparation Kit segítségével. Az RNS molekulák 3' és 5' végeihez adapter szekvenciákat ligálnak. Ezt követően reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizálódik, RevertAid H Minus Reverse Transkriptase (Thermo Scientific) enzim segítségével. A cDNS-t indítószekvenciák segítségével amplifikálják. Ezek az indítószekvenciák mintánként eltérő, egyedi index szekvenciákat is tartalmaznak.

A kapott terméket 8 %-os natív poliakrilamid gélen futtatják ellenőrzésképpen, megfelelő méretmarkerekkel együtt. A könyvtár a várt mérettartományban jelenik meg, ezt a gélből majd visszaizolálják, és 1x TE pufferben visszaoldják.

A könyvtár készítésének részletes protokollja a mellékletben elérhető. További adatokat a kis RNS könyvtár létrehozásáról a III. mellékletben tüntetük fel.

3.8. Növényi vírusok kimutatása invazív gyomokban és kultúrnövényekben

Az adott területen megtalálható leggyakoribb és invazívnek számító gyomnövényfajokban előforduló növényi vírusokat vizsgálata új generációs kis RNS követéssel történt az alábbi szempontok és mintaszámok alapján (6. táblázat).

6.táblázat. Kis RNS vizsgálatok és könyvtárak meghatározásának szempontjai.

Kezelések	Könyvtár ID	Növényi minták	Minták gyűjtése 2017		
			Jun.	Jul	Aug.
HIF	1_TC	S. tuberosum	10	10	10
		M. sativa	10	10	10
		Z.mays	10	10	10
	2_TB	E. canadensis	10	10	10
	3_TS	E. anuus	10	10	10
LIF	4_SC	S. tuberosum	10	10	10
		M. sativa	10	10	10
		Z.mays	10	10	10
	5_SA	S. canadensis	10	10	10
	6_SS	E. anuus	10	10	10

Számítógépes elemzéssel megfejthető volt a vírusok szekvenciájuk, és kirakhatóvá váltak a vírusok teljes bázissorrendje. Ezeket kétféleképpen vizsgálták bioinformatikai programokkal: a readekből hosszabb szakaszokat építettek, ezeket contigoknak nevezik. A contigok szekvenciáját hasonlították az adott növényt fertőző, ismert vírusok szekvenciájaihoz. 1-2 vírusspecifikus contig már a vírus jelenlétére utalt. Egy másik vizsgálati módszerrel, a readeket felillesztették a feltételezeten jelen levő vírusokra. Ezáltal megadható volt, hogy egy adott mintában hány olyan kis szekvencia van, amely az adott vírusra illeszkedik. Ezt három érték jellemzi:

- non-redundant read, azaz hogy hány különböző kis RNS illeszkedik a vírusra.
- redundant, ami azt mutatja, hogy összesen hány read illeszkedett. Ez az érték a több, azonos szekvenciájú readek illeszkedését is tartalmazza.

- redundant* egy normalizált redundáns, egy read/millionread értéket jelöl, amely figyelembe veszi, hogy az adott könyvtár hány readet tartalmaz. A tudomány ennek a

számnak az értékét tanulmányozza. Akkor fogadja el az adott vírus jelenlétét, ha ez az érték 200 read/millionread felett van.

3.8. Adatok statisztikai kiértékelése

A nyers adatok bevitele excelbe mind a gyomok, mind a levéltetvek esetében dátumok és gyűjtési helyes szerint történt. Ezt követően az adatok eloszlás vizsgálata zajlott. Mivel a gyomok boritottsági adatai nem mutattak normál eloszlást, ezért nem parametrikus Kruskal-Wallis, majd ezt követően a Mann-Whitney U tesztel hasonlítottuk össze azok boritottságát az eltérő kezelésben részesített területek között.

A levéltetvek esetében a sárga szilvalevéltetű (*Brachycaudus helichrysi*) és a zöld burgonya-levéltetű (*Aulacorthum solani*) előfordulása az egynyári seprencén az eltérő kezelésű területeken normál eloszlást mutatott, ezért az adatokat ANOVA és Tukey tesztel hasonlítottuk össze 95%/os konfidencia intervalumot tekintve szignifikáns eltérésnek. A többi gyomfajon a levéltetvek gyakorisága szintén nem mutatott normál eloszlást, ezért it is Kruskal-Wallis, majd ezt követően a Mann-Whitney U tesztel hasonlítottuk össze az adatainkat. A vizsgált kultúrnövényeken tapasztalt *B. helychrysi* levéltetű faj relatív előfordulását szintén ANOVA és Tukey tesztel végeztük. A peroxidáz stresszfehérje kimutatás adatai esetében páros t tesztet alkalmaztunk, mivel ebben az esetben csak a kezeléseket (intenzív vs. extenzív) hasonlítottuk össze egymással. A kimutatásokat a PAST programcsomag segítségével végeztük el.

A *B. helychrysi* és az *A. solani* levéltetvek átvándorlási intenzitásának statisztikai vizsgálata Chi négyzet tesztel történt, ugyanakkor itt meg kell jegyezni, hogy ez elsősorban a sárga szilvalevéltetű esetében tekinthető megfelelően érzékenynek, a másik levéltetű faj esetében az alacsonyabb egyedszámok miatt az elemzés nem volt kellően pontos. A kimutatást SPSS-ben végeztük el.

Külön elemeztük kis skálán az RNS és DNS alapú vírusok szekvenciák szerinti gyakoriságát gyom és kultúrnövények és kezelések között, ezt ún. Heatmap-en ábráztuk. A szekvencia számokat gyom és kultúrnövények és kezelések között ANOVA és Tukey teszt segítségével hasonlítottuk össze.

A kezelések és a levéltetvek egyedszámának a hatását főkoordináta (PCoA) módszer segítségével vizsgáltuk, melynek során a kezeléseket (intenzív vs. Extenzív) és a levéltetvek gyakoriságát vettük figyelembe mint fő faktorok. Az elemzéseket szintén a PAST programcsomaggal végeztük.

3.9. Bioinformatikai adatelemzés

Szekvenálható sRNS könyvtár készítés

A szekvenáló könyvtár készítéséhez az sRNS kivonatokból poliakrilamid gélen való elválasztás segítségével kitisztítottuk az sRNS frakciót. Ehhez ismert szekvenciájú adaptereket ligálunk, majd cDNS-t írunk át, amit néhány ciklusban PCR reakcióban amplifikálunk. Az így elkészített „sRNS könyvtárát” méret alapján újból gélből tisztítottuk. Kísérleteinkben az Illumina „TruSeq Small RNA Library Prep” kitjét használjuk. A módszer részletes leírását magyarul Czotter Nikoletta doktori dolgozata (<http://konyvtar.uni-pannon.hu/en/node/381>), angolul a Czotter és mtsai (Czotter *et al.*, 2018) könyvfejezet tartalmazza.

Szekvenálás

Az elkészített könyvtárakat Illumina platformon az UD-Genomednél szekvenáltattuk 50bp-os leolvasással. A szekvenálás kiválasztásánál figyelembe vettük, hogy a read-ek száma (szekvenálás mélysége) összefügg a szekvenáló berendezéssel és azzal is, hogy hány mintát szekvenáltattunk együtt.

A HTS eredményének, a szekvenált olvasatok (readek) bioinformatikai elemzése

A bioinformatikai elemzéseket szekvencia elemző programcsomagokkal végezhetjük. Munkánk kezdetén ingyenes programokat és scirpteket használtunk (alább ezeket a lépések találhatóak részletesebben), később pedig a CLC Genomics Workbench és a Geneious programcsomagokat. Az elemzések első lépésében minőségellenőrzés után eltávolítottuk a ligálással az sRNS-ekhez illesztett szekvenciákat. Ezt követően a vírus azonosításhoz két bioinformatikai stratégiát alkalmaztunk egymással párhuzamosan.

A nem redundáns sRNS szekvenciákat direkt módon az NCBI RefSeq adatbázis vírus referencia szekvenciáihoz (növény és gerinctelen gazda) illesztettük fel. Az illesztéshez a BWA aln programot használtuk (Li & Durbin, 2009).

Az sRNS szekvenciákat *de novo* összeszereltük, hosszabb „kontig” szekvenciákba, 13-as, 15-ös és 17-es kmer érték beállítása mellett, a Velvet Software segítségével (Zerbino & Birney, 2008) és a kapott kontig szekvenciákat az NCBI RefSeq adatbázis növény vírus referencia szekvenciáihoz illesztettük MegaBLAST programmal (Morgulis *et al.*, 2008).

A bioinformatikai elemzések eredménye egy víruslista, melynek eredményei molekuláris biológiai módszerekkel (pl. RT-PCR) igazolhatóak.

A bioinformatikai elemzések során nyert tapasztalataink alapján 2017-ben megvásároltuk a Qiagen CLC Genomic workbench software-ét és későbbi munkáink során már ezt a programot használtuk. Az elemzés alapvetően azonban követte korábbi stratégiánkat: az sRNS readekből hosszabb kontigokat építettünk (a program, 'de novo assembly' parancsával), melyeket az NCBI növényi vírus referenciagenomjaihoz illesztettünk. Pozitív találat esetén a readeket (redundáns és nem redundáns readeket is) az adott vírus referenciagenomjára illesztettük ('Map to reference' paranccsal), és az illeszkedő readekből egy normalizált (read/million read) adatot és a vírus lefedettségi %-át számoltuk ki. E három paraméter figyelembevételével állapítottuk meg az adott ültetvény vírusfertőzöttségét.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Invazív gyomok előfordulási gyakorisága a vizsgált területeken

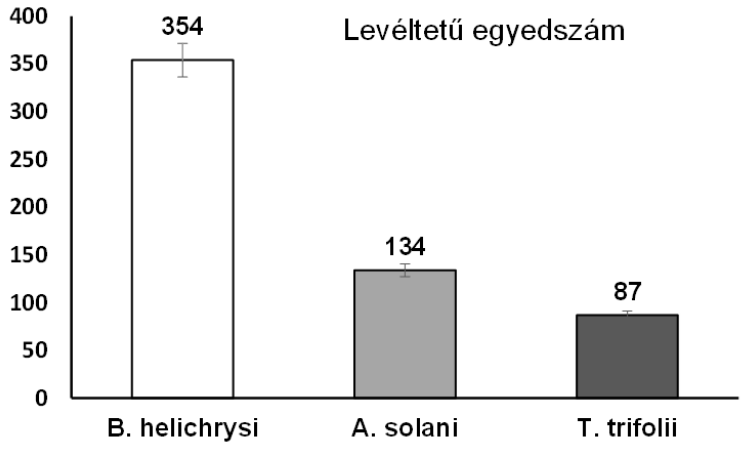
Az eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy három invazív gyomfaj uralta a területeket, ezek az egynyári seprence (*Erigeron annuus*) a kanadai aranyvessző (*Solidago canadensis*) és a betyárkóró (*Erigeron canadensis*) voltak. Az eltérő kezelésben részesített területek között szignifikáns eltérés volt tapasztalható a gyomok borításában. Míg az extenzíven kezelt területen az egynyári seprence borítása meghaladta a 97%-ot, mellette a kanadai aranyvessző volt jelen 2,5%-ban. Az intenzíven kezelt területen az egynyári seprence borítása 84,5% volt, mellette a betyárkóró fordult elő 15%-os borítással, és nem volt jelen a kanadai aranyvessző (5. táblázat).

5. Táblázat. A leggyakrabban előforduló invazív gyomok, azok borítottsága az eltérő művelésben részesített területeken. Az adatokat a Kruskal-Wallis, majd ezt követően a Mann-Whitney U teszttel hasonlítottuk össze.

Kezelések	Gyomok	átlag borítás(%)	medián	25th/75th quart.	U	P
Extenzív-LIF	<i>Erigeron annuus</i>	97.50%	98.5	95/99	2.19	0.02
	<i>Solidago canadensis</i>	2.50%	1.5	1/5		
Intenzív-HIF	<i>Erigeron annuus</i>	84.50%			2.16	0.03
	<i>Erigeron canadensis</i>	15%	84.5	83/86		
			14.5	13/16		

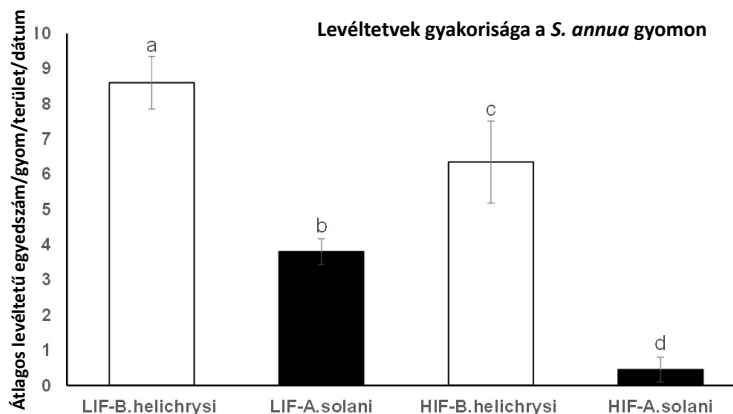
4.2 Levéltetvek gyakorisága az invazív gyomokon

Mindkét kezelésű területen két levéltetű faj volt jelen nagyobb egyedszámban az invazív gyomokon. Ezek a sárga szilvalevéltetű (*Brachycaudus helichrysi*) és a zöld burgonya-levéltetű (*Aulacorthum solani*) voltak. Kis mennyiségben és csak a kanadai aranyvesszőn megjelent még a lucerna levéltetű (*T. trifolii*) is. Ez utóbbi fajjal nem végeztünk további vizsgálatokat. Relatív előfordulásukat tekintve mindhárom gyomnövényen a sárga szilvalevéltetű volt jelen a legnagyobb egyedszámban (6. ábra).



6. **Ábra:** A gyomnövényeken észlelt levéltetvek relatív egyedszáma.

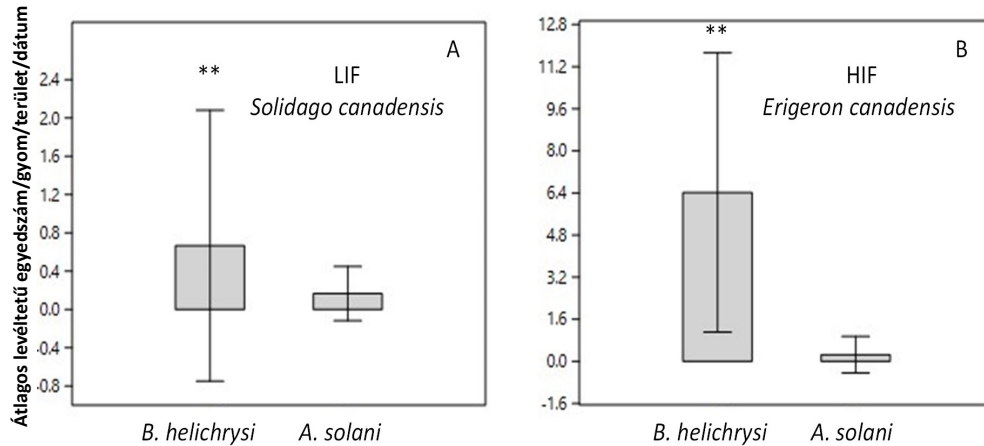
Külön vizsgálva a levéltetvek előfordulását a három invazív gyomon, és kezelések között, elmondhatjuk, hogy a sárga szilvalevéltetű az extenzíven kezelt területeken volt jelen szignifikánsan nagyobb egyedszámban az egynyári seprencén, de ugyanez elmondható a burgonya-levéltetűről is (7. ábra).



7.**Ábra:** A sárga szilvalevéltetű (*Brachycaudus helichrysi*) és a zöld burgonya-levéltetű (*Aulacorthum solani*) előfordulása az egynyári seprencén eltérő kezelésű területeken. (ANOVA és Tukey teszt). Eltérő betűk statisztikailag eltérő értékeket jelölnek.

Összeségében elmondható, hogy a 13%-nyi többlet eltérés az egynyári seprence borítottságában több mint 30% magasabb populációabundanciát eredményez a sárga szilvalevéltetű előfordulásában az extenzíven kezelt terület esetében. Ugyancsak magasabb sárga

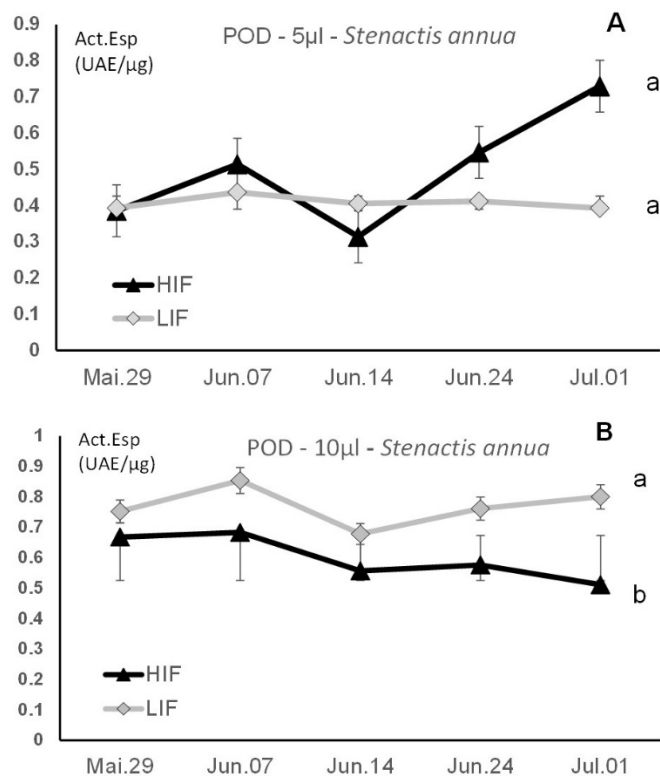
szilvalevél-tű abundancia volt megfigyelhető a kanadai aranyvessző és a betyárkóró esetében is (8. ábra).



8. Ábra: A sárga szilvalevél-tű (*Brachycaudus helichrysi*) és a zöld burgonya-levéltetű (*Aulacorthum solani*) előfordulása a kanadai aranyvesszőn (A) és a betyárkórón (B). (Kruskal-Wallis, és Mann-Whitney U teszt).

4.3 A levéltetvek táplálkozásának igazolása stresszfehérjék kimutatásával

A Peroxidáz stresszfehérje kimutatása minden esetben sikeres volt, ennek magas értéke igazolta, hogy az invazív gyomokon a vizsgált levéltetvek folyamatosan jelen voltak és táplálkoztak. Eltérés volt ugyanakkor megfigyelhető az egyényári seprence esetében az eltérő kezelésben részesített területek között abban az esetben, ha a POD kimutatása 10 μ l mennyiségben történt (9. ábra). Minden más gyomnövényen szintén kimutatható volt a stresszfehérje növekedés, ugyanakkor nem volt eltérés a különböző kezelésben részesített területek között.

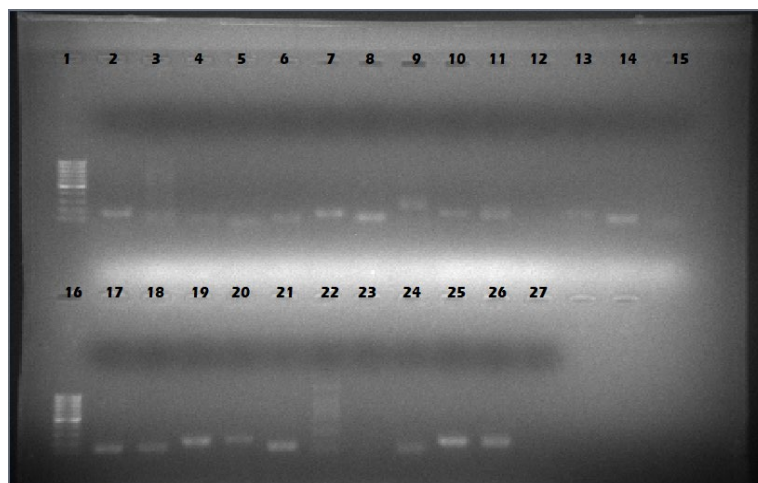


9. Ábra. Peroxidáz stresszfehérje kimutatása az egynyári seprence esetében. Az összehasonlítás páros t teszttel történt.

4.4 Levéltetvek kolonizációja invazív gyomokról a kultúrnövényekre.

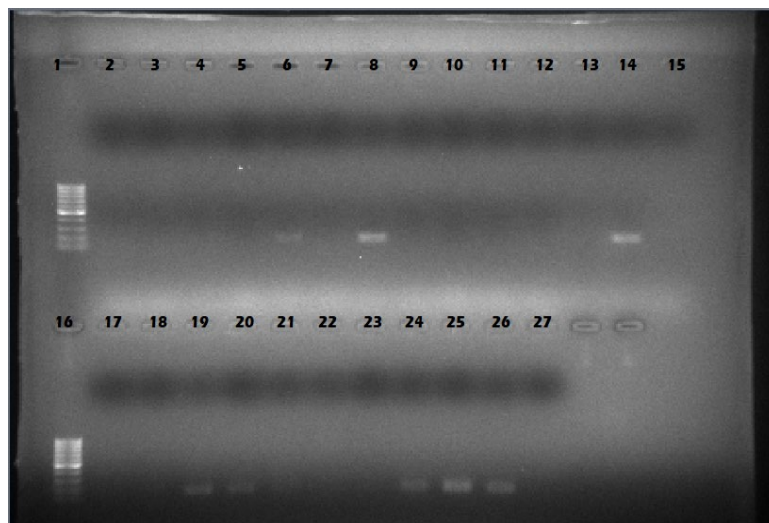
Minden esetben sikerült kimutatni, hogy a sárga szilvalevéltetű és a zöld-burgonya levéltetű is jelentős egyedszámban kolonizálja szárnyas egyedei révén a kultúrnövényeket. Genomiális DNS elemzésekkel kimutatható volt, hogy a gyomokon előforduló kolóniákból származó egyedek azok amelyek a kultúrnövényeket is kolonizálják. A vizsgálat érdekében a kiválasztott a 48 levéltetűből kivont DNS-ből 24-et kiválasztottunk, melyeknél a PCR-el felszaporított DNS szakasz agaróz gélen történő futtatását követően az ellenőrzés során pozitív eredményt kaptunk.

Az 10. ábrán látható az S23 mikroszatellita markerekkel kapott vizsgálat eredménye, melynek alapján megállapíthatjuk, hogy a kulturnövényekre átvándorolt sárga szilvalevéltes egyedei (1-15-ös minták) és a gyomokon maradt (16-27-es minták) egyedei között nagyfokú genetikai azonosság van, a kulturnövényeken befogott egyedek a gyomokon előforduló egyedek leszármazottai (10. ábra).



10. Ábra: A sárga szilvalevéltes izolált genomiális DNS minták S23 mikroszatellita markerekkel végzett vizsgálatának 1%-os agaróz gélelektroforézis képe. 1-15-ös minták kulturnövényeken befogott egyedek, 16-27-es minták gyomokon befogott egyedek.

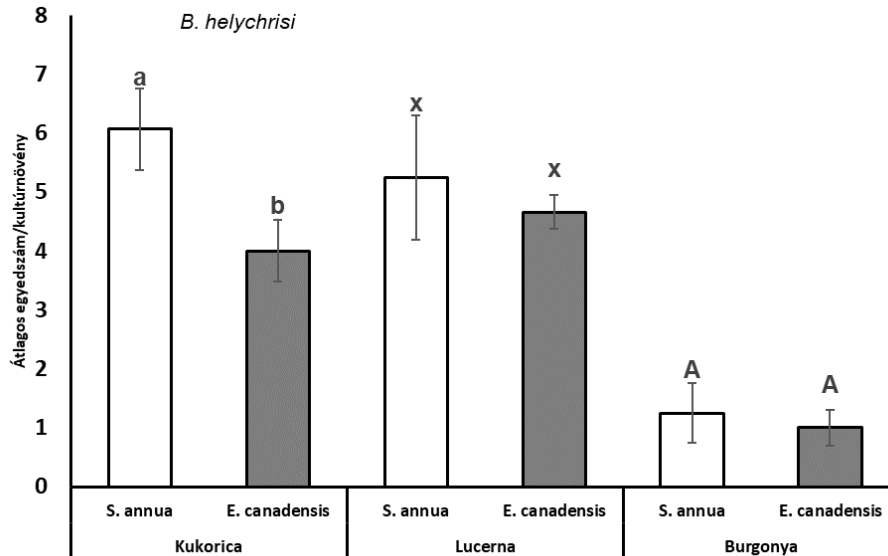
A zöld-burgonyalevéltes esetében viszonylag kis egyedszámú átvándorlás volt megfigyelhető, de ebben az esetben is az egyedek a gyomokról származtak, nem voltak jelen más populációk. A S24-es primer használatakor nem volt minden mintánál PCR termék, tehát a primernek ezeknél a mintáknál nem volt bekötődési helye, de elmondható, hogy szintén hasonlóság áll fenn ezen levéltesek genomiális DNS-ben (11. ábra). Ezen az ábrán is megfigyelhetjük a kulturnövényekre átvándorolt egyedek (1-15-ös minták) és a gyomokon maradt (16-27-es minták) egyedek közötti nagyfokú genetikai azonosságot (11. ábra).



11. Ábra: A zold-burgonya levéltetű izolált genomiális DNS minták S24 mikroszatellita markerekkel végzett vizsgálatának 1%-os agaróz gélelektroforézis képe. 1-15-ös minták kultúrnövényeken befogott egyedek, 16-27-es minták gyomokon befogott egyedek.

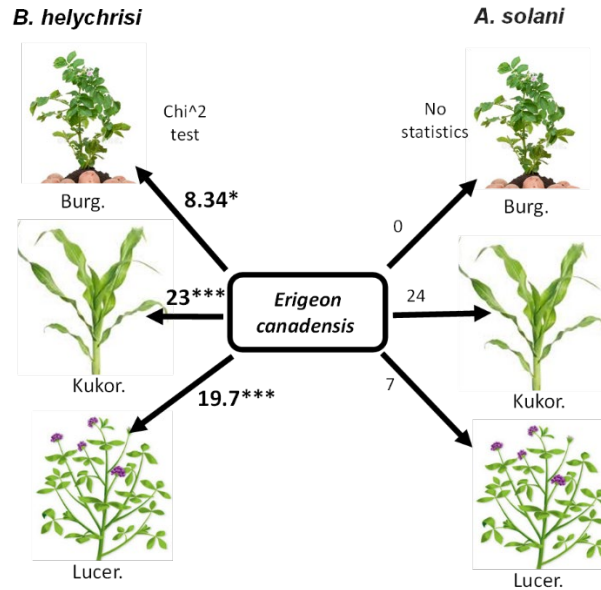
Összeségében kimutatható, hogy a Sárga szilva levéltű viszonylag nagy arányban vándorolt át gyomokról kultúrnövényekre viszont az átvándorlás attól függően változott, hogy mely gyomnövény köré voltak felállítva a kísérlet során a kultúrnövények (12. ábra). Ennek alapján elmondhatjuk hogy:

- A legtöbb *B. helichrysi* levéltetű egyed a kukoricán fordul elő, mégpedig azokon a kukorica egyedeken, amelyek az egynyári seprence gyomnövény faj körül voltak felállítva a kísérlet alatt, míg a betyárkóró esetében a begyűjtött egyedek száma kisebb volt.
- A következő legnagyobb levéltetű egyedszámmal rendelkező kultúrnövény a lucerna volt, ugyanakkor az egynyári seprence gyomnövény faj mellett felállított lucerna egyedeken a levéltetvek abundanciája szintén magasabb volt, szemben a betyárkóró mellett vizsgált lucernával.
- A burgonyán fordult elő a legkevesebb levéltetű egyedszám, ebben az esetben nem volt eltérés a két gyomnövény mellé helyezett burgonya egyedek között (12. ábra).



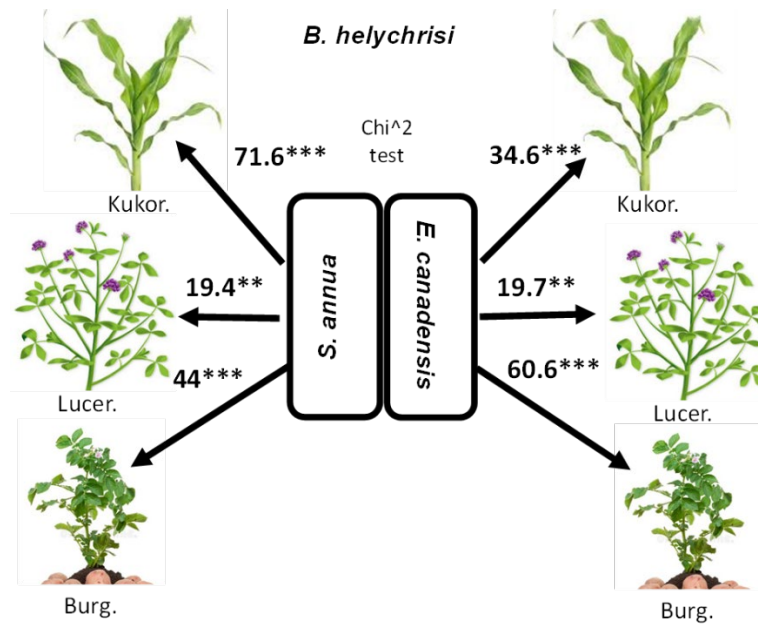
12. Ábra: A vizsgált kultúrnövényeken tapasztalt *B. helychrisi* levéltetű faj relatív előfordulása. (ANOVA és Tukey teszt). Eltérő betűk statisztikailag eltérő értékeket jelölnek.

A Chi négyzet teszt segítségével kimutatható volt a két levéltetű faj gyomokról kultúrnövények felé való átvándorlási intenzitása. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a sárga szilva levéltetveknél szignifikánsan a legerőteljesebb átvándorlást figyelhetjük meg az egynyári seprencéről a kukorica növényre, míg szignifikánsan alacsony átvándorlás történt a burgonyára. Ugyancsak jelentős átvándorlás volt megfigyelhető a lucerna felé is. Nagyon alacsony az átvándorlása az egynyári seprencéről a kultúrnövényekre a zöld-burgonya levéltetvek esetében (13. ábra).



13. ábra. A *B. helychrisi* és az *A. solani* levéltetvek átvándorlási intenzitásának statisztikai vizsgálata (Chi négyzet teszttel) az egynyári seprencéről kultúrnövények felé.

Megvizsgálva annak a lehetőségét, hogy mindkét gyomnövény (egynyári seprence és betyárkóró) egyszerre van jelen, mekkora az átvándorlás intenzitása, megfigyeltük, hogy a sárga szilva levéltetű átvándorlása az egynyári seprencéről szignifikánsan a legmagasabb a kukorica irányába volt, míg a legalacsonyabb átvándorlás a lucerna irányába volt megfigyelhető. A betyárkóróról szignifikánsan a legnagyobb levéltetű átvándorlás a burgonya irányába volt megfigyelhető, míg a legalacsonyabb akárcsak a *E. annuus* gyomnövény esetében a lucernára való átvándorlás volt (14. ábra).



14. Ábra: A *B. helychrisi* levéltetű faj két gyomnövényről kultúrnövények felé való átvándorlási intenzitásának statisztikai vizsgálata (Chi négyzet tesztel).

4.5 Növényi vírusok kimutatása invazív gyomokban és kultúrnövényekben

A kisRNS könyvtárak által 9-20 millió read-et, azaz 9-20 millió 21-24 nt hosszú szekvenciát kaptunk. Az elemzések során 16 vírust sikerült kimutatni (7.Táblázat).

7.Táblázat. Bioinformatikai szempontok a kisRNS azonosítások során.

transmission			aphids	insects	insects	mechanical	seed-borne	insect virus	
virus			RNA viruses				DNA viruses		
reference genome			Potyvirus	Carlavirus		Potexvirus	Solendovirus		
Library code	Sample name	analysis	NC_001616.1	NC_007289.1	NC_001361.2	NC_011620.1	NC_003378.1	NC_004156.2	
			PVY	PVS	PVM	PVX	TVCV	HzNV-2	
HIF	1_TC	crops	CLC contigs	289	13	3	125	19	0
			Non-redundant	58853	1808	1012	9256	939	7435
			Redundant	1998833	3471	1691	37177	1441	17718
			Redundant*	211741	368	179	3938	153	1877
			Coverage	93%	84%	71%	99%	72%	35%
	2_TB	<i>E. canadensis</i>	CLC contigs	0	0	0	0	0	1
			Non-redundant	1003	511	463	340	1110	21943
			Redundant	2732	1042	861	506	1694	43849
			Redundant*	168	64	53	31	104	2670
			Coverage	66%	49%	48%	53%	83%	63%
	3_TS	<i>E. anuus</i>	CLC contigs	0	0	0	0	0	1
			Non-redundant	1029	560	647	401	1281	25857
Redundant			3296	997	1401	750	1889	56662	
Redundant*			164	50	70	37	94	2820	
Coverage			72%	56%	56%	58%	87%	70%	
LIF	4_SC	crops	CLC contigs	146	0	75	0	0	0
			Non-redundant	22548	2560	10027	240	1029	12002
			Redundant	522751	5823	41275	2667	1554	21148
			Redundant*	24787	276	1957	126	74	1003
			Coverage	87%	90%	97%	42%	80%	50%
	5_SA	<i>S. canadensis</i>	CLC contigs	0	0	0	0	0	0
			Non-redundant	726	450	474	292	1188	19434
			Redundant	1921	1313	1229	661	2320	44579
			Redundant*	112	76	72	38	135	2595
			Coverage	57%	44%	45%	49%	83%	62%
	6_SS	<i>E. anuus</i>	CLC contigs	0	0	0	0	0	0
			Non-redundant	682	417	409	304	885	18668
Redundant			1193	612	600	459	1177	32232	
Redundant*			88	45	44	34	87	1646	
Coverage			61%	43%	44%	48%	82%	61%	

* normalized reads
- reads/1 million
sequenced reads

PVY (Potato virus Y), PVS (Potato virus S), PVM (Potato virus M), PVX (Potato virus X), TVCV (Tobacco vein clearing virus), HzNV-2 (Helicoverpa zea nudivirus 2),

A vizsgálatok alatt legkevesebb 9 millió, legtöbb 21 millió vírus szekvencia sorrend azonosítása történe meg (8. táblázat).

8. Táblázat. A minták szekvenciaszámai (HiScan2000 by UD Genomed (Debrecen, Hungary) 50 bp, single end). Az adatokat a következő felületen tároltuk, azok szabadon megtekinthetőek GEO series accession number GSE132755.

Site	Library code	Sequenced reads	Trimmed reads all (containing redundants)	Non-redundant reads %	Number of contigs	
HIF	1_TC	9,444,123	9,212,041	20,19,811	21.93	3553
	2_TB	16,287,256	15,202,422	34,23,785	22.52	4524
	3_TS	20,087,212	19,915,587	6,246,615	31.37	19,038
LIF	4_SC	21,087,654	20,477,950	7,192,941	35.13	11,047
	5_SA	17,177,187	16,751,341	5,537,461	33.06	10,164
	6_SS	13,580,569	13,457,370	5,116,560	38.02	6,142

Az azonosított növényi vírusok az alábbi táblázatokban vannak feltüntetve, bemutatva azok eddig jelzett gazdanövényei, valamint a leggyakrabban jelzett vektorai (9-10. Táblázatok)

9. Táblázat. RNS alapú vírusok bemutatása

	Vírus neve	Génusz	Genom	Gazdanövények	Terjedés
PVY	Potato virus Y	Potyvirus	RNS	<i>Solanaceae</i> család több mint 60 fajtát	Levéltetvek: <i>Myzus persicae</i> , <i>Myzus ornatus</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Aulacorthum circumflexum</i> , <i>Aphis nasturtii</i> , <i>Aphis gossypii</i> , <i>Brachycaudus helichrysi</i> , és szaporító anyaggal
CIYVV	Clover yellow vein virus	Potyvirus	RNS	6 család (<i>Fabaceae</i> , <i>Cucurbitaceae</i> , <i>Solanaceae</i> , <i>Poaceae</i>) 25 fajtát	<i>Myzus persicae</i> , <i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Aulacorthum solani</i> és <i>Macrosiphum euphorbiae</i>
ZTMV	Zucchini tiger mosaic virus	Potyvirus	RNS	<i>Cucurbitaceae</i>	L. Xiao és mtsai. valamint S. E. Webb. és mtsai. 2016-ban Kínában és Floridában, Da Wang és mtsai. 2019-ben Hawaiiion írták le, vektorai ismeretlenek
PVS	Potato virus S	Carlavirus	RNS	Többnyire a <i>Solanaceae</i> család	<i>Myzus persicae</i> (Wetter & Völk, 1960); <i>Aphis frangulae</i> , <i>A. nasturtii</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i>

	Vírus neve	Génusz	Genom	Gazdanövények	Terjedés
PVM	Potato virus M	Carlavirus	RNS	<i>Solanaceae</i> és <i>Chenopodiaceae</i>	<i>Myzus persicae</i>
PVX	Potato virus X	Potexvirus	RNS	<i>Solanaceae</i>	Szöcske: <i>Melanoplus differentialis</i> , <i>Tettigonia viridissima</i> Gomba: <i>Synchytrium endobioticum</i> , mechanikai átvitel
OVX	Opuntia virus X	Potexvirus	RNS	Fügekaktusz, <i>Cactaceae</i> , <i>Chenopodium quinoa</i>	Koenig R. És mtsai. 2004-ben írták le először, vektora ismeretlen
BLRV	Bean leafroll virus	Luteovirus	RNS	65 faj: <i>Vicia</i> , <i>Pisum</i> , <i>Medicago</i> , <i>Trifolium</i> , <i>Lathyrus</i> és <i>Trigonella</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
SCBMV	Squash chlorotic leaf spot virus	Picornavirales	RNS	<i>Cucurbitaceae</i>	Mechanikai átvitel, molytetvek

10.Táblázat. DNS alapú vírusok bemutatása

	Vírus neve	Génusz	Genom	Gazdanövények	Terjedés
TVCV	Tobacco vein clearing virus	Solendovirus	DNS	<i>Nicotiana</i> fajok	Maggal
SPSMV- 1	Sweetpotato symptomless mastrevirus 1	Mastrevirus	DNS	Édesburgonya	Kabóca
DMV	Dahlia mosaic virus	Caulimovirus	DNS	<i>Dahlia</i> fajok, <i>Asteraceae</i> , <i>Solanaceae</i> , <i>Chenopodiaceae</i> , <i>Amaranthaceae</i>	13 levéltetű faj, főleg az <i>Aphis fabae</i> , <i>Myzus persicae</i> és a <i>Macrosiphum euphorbiae</i>

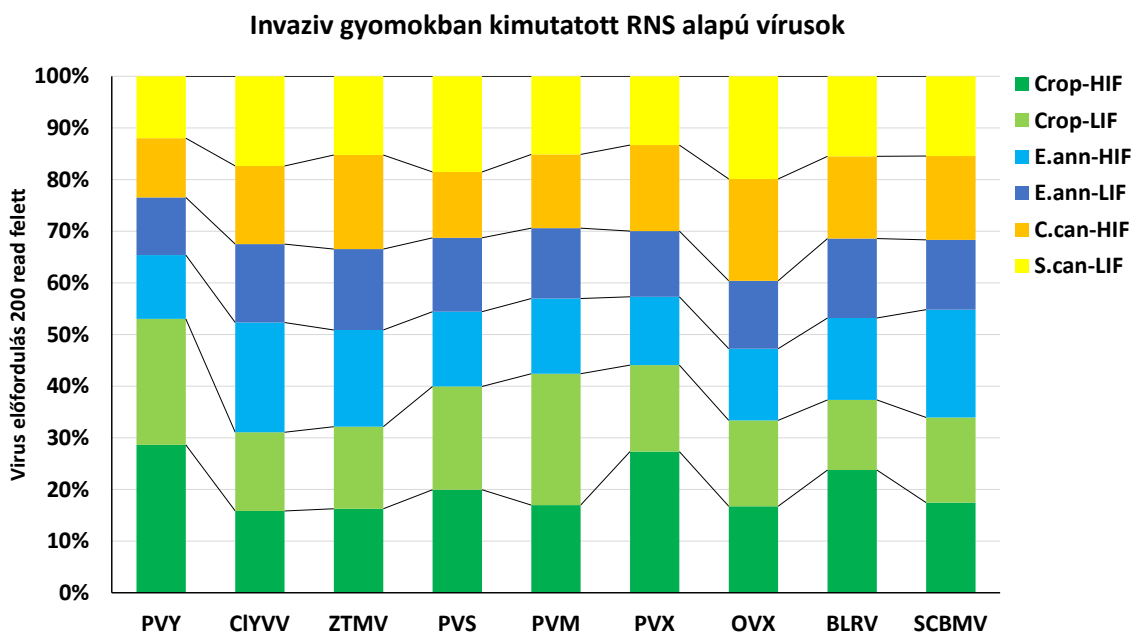
	Vírus neve	Génusz	Genom	Gazdanövények	Terjedés
SPuV	Soybean mild mottle pararetrovirus	Caulimovirus	DNS	Szójabab	Junping Han és mtsai. 2012-ben szekvenálta a teljes genomot, azóta nem jelent meg publikáció
PBCoV	Pineapple bacilliform comosus virus	Caulimovirus	DNS	Ananász	Pajzstetvek
SCBGDV	Sugarcane bacilliform Guadeloupe D virus	Caulimovirus	DNS	Cukornád	Csíraplazma
HzNV-2	Helicoverpa zea nudivirus 2	Baculovirus	DNS	Bagolylepke (<i>Helicoverpa zea</i>)	Szaporodás során

A fenti táblázatokból látható, hogy számos vírus olyan családokat fertőz, amelyek fajai között fontos kultúrnövényeink is szerepelnek (*Fabaceae*, *Cucurbitaceae*, *Solanaceae*, *Poaceae*). Olyan vírusokat is sikerült kimutatni, amelyekről nincs irodalmi adat azzal kapcsolatban, hogy Európában leírták volna (kivételem a CIYVV, ZTMV, BLRV és a burgonya vírusok), és amelyek eddigi ismeretek alapján, természetes módon csak trópusi éghajlatú térségben előforduló növényeket fertőznek (OVX a fügekaktuszt, PBCoV az ananászt).

A gyomnövényekben megtalálható volt még a HzNV-2 vírus, amely eddig az egyetlen ivaros úton fertőző rovar vírus, amely szintén egy olyan fajt, a *Helicoverpa zea*-t fertőzi, amely a kontinensünkön még nincs jelen.

A gyomnövényekből és kultúrnövényekből készült könyvtárak alapján meghatározható volt az egyes vírusok százalékos előfordulása mind kezeléseik között, mind növények (gyom és kultúrnövények) között. Az adatok alapján elmondható, hogy a gazdaságilag nagy jelentőséggel bíró Potato Y vírus HIF és LIF területen majdnem ugyanolyan mértékben jelen van, míg a Potato

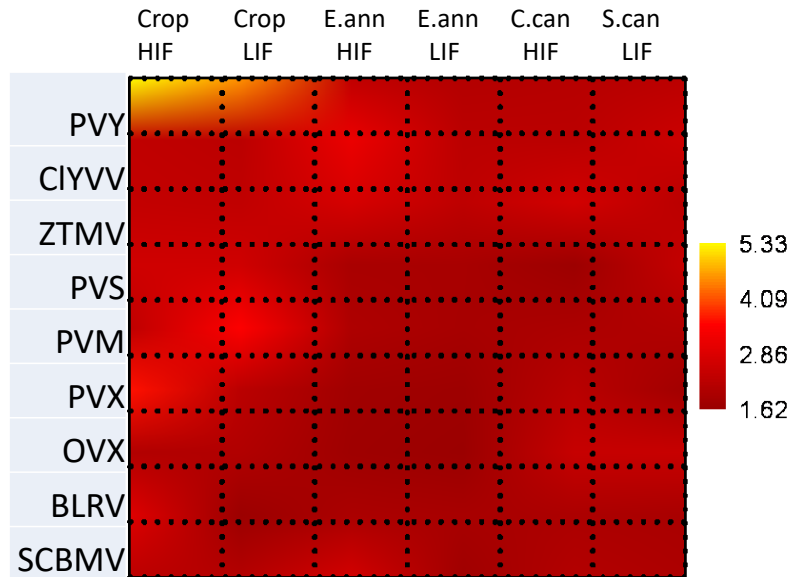
M vírus az extenzíven művelt területen, és a Potato X vírus az intenzíven művelt területen dominál. Egy másik burgonyát fertőző vírus, a Potato S vírus, az extenzív területeken található aranyvesszőre (*S.canadensis*) jellemzőbb. A gyomnövényekben, a gazdaságilag szintén fontos CIYVV HIF területen dominál, akárcsak a ZTMV és az SCBMV vírusok. A LIF területeken a CIYVV csak az aranyvesszőre jellemző, mellette ezen területeken a már említett PVS és az OVX vírusok vannak jelen. A kultúrnövényekhez viszonyítva megfigyelhető, hogy HIF területen a PVY, PVX és BLRV jelenik meg a legnagyobb százalékban, míg a LIF területen a PVY, PVS és PVM, amelyek nem minden esetben mutatnak kiemelkedő értéket a gyomnövényekben. Minél nagyobb a kis RNS-ek százalékos eloszlása, annál valószínűbb, hogy vektorok által az adott vírusok átterülhetnek a kultúrnövényekre.



15.Ábra: Az RNS alapú vírusok előfordulási aránya (százalékos gyakorisága) gyomokban és kultúrnövényekben.

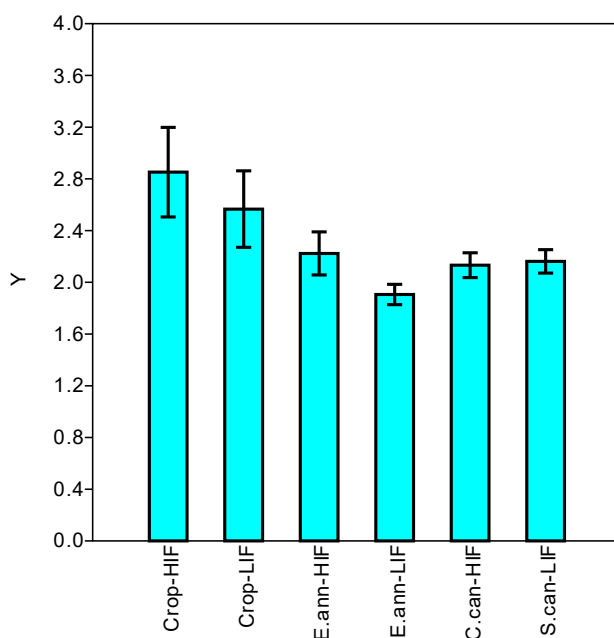
Mivel milliós nagyságrendű kis szekvenciák számáról van szó, ezért 0,1-0,5 %-os eltérés is nagyon számottevő lehet az adatok elemzésénél. Ezért, az adatokat és a szekvenciák eloszlását megvizsgáltam egy jóval kisebb skálán is. A 16. Ábra kis skálán szekvencia azonosságok alapján mutatja meg a vírusok előfordulását a növényekben. Az azonos színű felületek jelzik, hogy mekkora a százalékos azonosság vagy eltérés. Ez alapján almondható, hogy nagyon hasonló, szinte

azonos előfordulási arányai vannak az RNS vírusoknak az általunk vizsgált gyom és kulturnövényekben (16. ábra).



16. Ábra Az RNS alapú vírusok szekvenciák szerinti gyakorisága, Heatmap-en ábrázolva

Összeségében ugyanakkor elmondható, hogy az eltérő kezelésű területek között van enyhe eltérés a szekvenciák gyakoriságát illetően különböző vírusok esetén. Megfigyelhető, hogy az egynyári seprence esetén, amely a HIF és LIF területeken egyaránt jelen volt, a HIF, azaz az intenzíven művelt területeken a szekvenciák gyakorisága kissé magasabb. A HIF területeken jelen levő két faj, az egynyári seprence (*E.annuus*) és a betyárkóró (*C.canadensis*) közül az elsőben a PVY, CIYVV, ZTMV és SCBMV, míg a második gyomnövényben a CIYVV, ZTMV, PVX, OVX és BLRV vírusokra volt több szekvencia találat. A LIF területeken megtalálható egynyári seprence (*E.annuus*) és aranyvessző (*S.canadensis*) közül az utóbbiban volt nagyobb a szekvencia gyakoriság: rá jellemző a CIYVV, ZTMV, OVX és BLRV. A LIF terület egynyári seprencében alacsony volt a szekvenciák gyakorisága úgy a LIF terület másik fajához képest, mint a HIF terület seprencéjéhez képest. Ezt igazolja a statisztikai összehasonlítás is (17. ábra). Az ANOVA és Tukey teszt szerinti összehasonlítás alapján látszik, hogy a P csak egy esetben kisebb, mint 0.05, ez a Crop-HIF és a S.ann-LIF között, vagyis a LIF területen az egynyári seprence esetében van a legkevesebb vírus jelen számszerűen a többivel összehasonlítva (17. ábra, 11.táblázat).



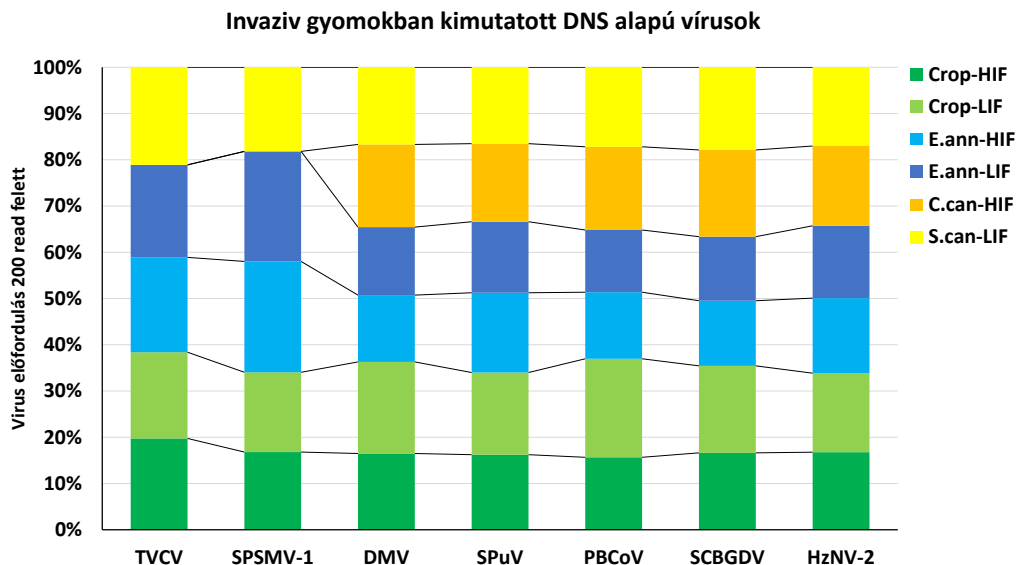
17.Ábra. Az RNS alapú vírusok előfordulása közötti statisztikai összehasonlítás (ANOVA és Tukey teszt).

11.Táblázat: ANOVA szerinti p és F értékek a vizsgált RNS alapú vírusoknál. (ANOVA és Tukey teszt). F értékek a vonal alatt, p értékek a vonal felett láthatóak.

	Crop-HIF	Crop-LIF	E.ann-HIF	E.ann-LIF	C.can-HIF	S.can-LIF
Crop-HIF		0.924	0.2843	0.02631	0.1599	0.1949
Crop-LIF	1.377		0.85	0.236	0.6804	0.7409
E.ann-HIF	3.028	1.651		0.887	0.9996	0.9999
E.ann-LIF	4.556	3.178	1.527		0.9712	0.9516
C.can-HIF	3.466	2.088	0.4375	1.09		1
S.can-LIF	3.323	1.946	0.295	1.232	0.1425	

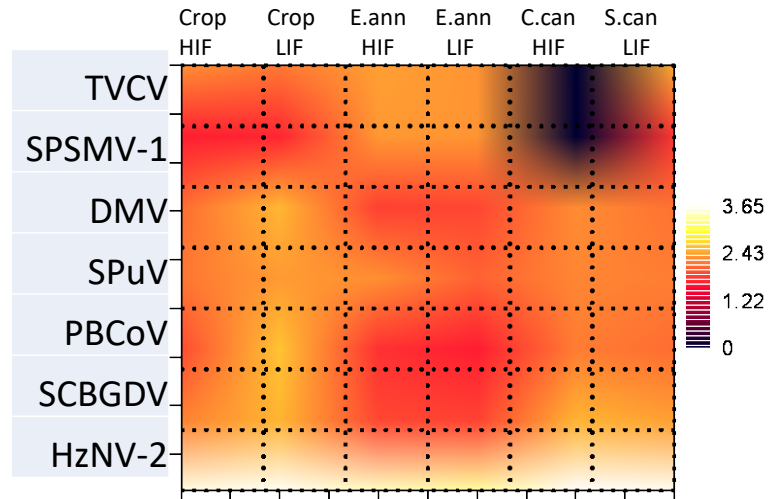
A DNS alapú vírusok esetében szintén megfigyelhető, hogy az intenzíven művelt területeken lévő gyomnövények közül csak az egynyári seprencében volt találat a TVCV és SPSMV-1 vírusokra. A DMV az intenzíven művelt területen lévő betyárkóróra volt jellemzőbb, akárcsak a PBCoV és SCBGDV vírusok. Az extenzíven művelt területek esetén az SPSMV-1 kivételével, amely az egynyári seprencében fordul elő nagyobb százalékban, a többi vírus az

aranyvesszőben dominált. A kultúrnövények esetében a DMV, PBCoV és SCBGDV az extenzíven művelt területeken van gyakoribb (18. ábra).



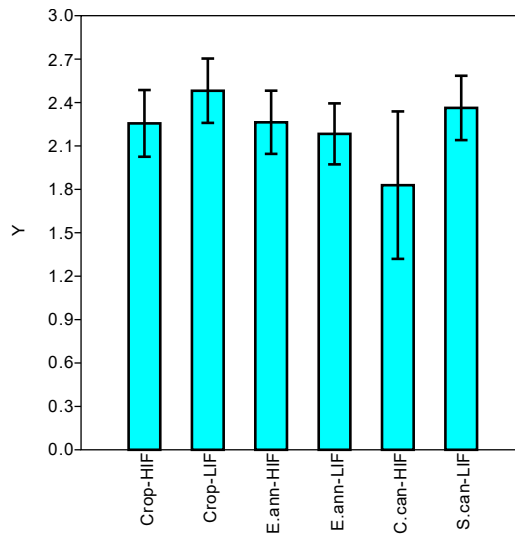
18.Ábra. Az DNS alapú vírusok előfordulási aránya (százalékos gyakorisága) gyomokban és kultúrnövényekben.

A DNS alapú vírusok esetén is megvizsgáltuk kis skálán a vírusok előfordulását a szekvencia azonosságok alapján. Ez alapján elmondható, hogy a TVCV és SPSMV-1 vírusok nincsenek jelen a HIF területen lévő betyárkóróban, csak az egynyári seprencében. Ennek ellenére az egynyári seprencében a többi vírusra magasabb volt a szekvencia-azonosságok száma. A LIF területeken ez az érték az aranyvesszőre mutatott nagyobb értéket, az egynyári seprencéhez viszonyítva. Mindkét területen előforduló egynyári seprencében a vírusokkal megegyező szekvenciák száma majdnem azonos. A kultúrnövényekben kapott szekvenciákat figyelembe véve elmondható, hogy a HIF területeken lévő seprencében a szekvenciák gyakorisága kisebb, a kultúrnövények és a betyárkóró szekvenciáihoz képest, míg a LIF területen a kultúrnövények szekvencia gyakorisága minden esetben meghaladja a gyomnövényekben kapott értékeket (19. ábra).



19.Ábra. A DNS alapú vírusok szekvenciák szerinti gyakorisága, Heatmap-en ábrázolva.

A statisztikai összehasonlítás alapján (12.Táblázat) amely sokkal nagyobb skálán mutatja az eltérést, sem volt kimutatható különbség a kezelések és a növények között. kisebb, mint 0.05, így megállapítható, hogy nincs eltérés a vírusok száma között (20. ábra).

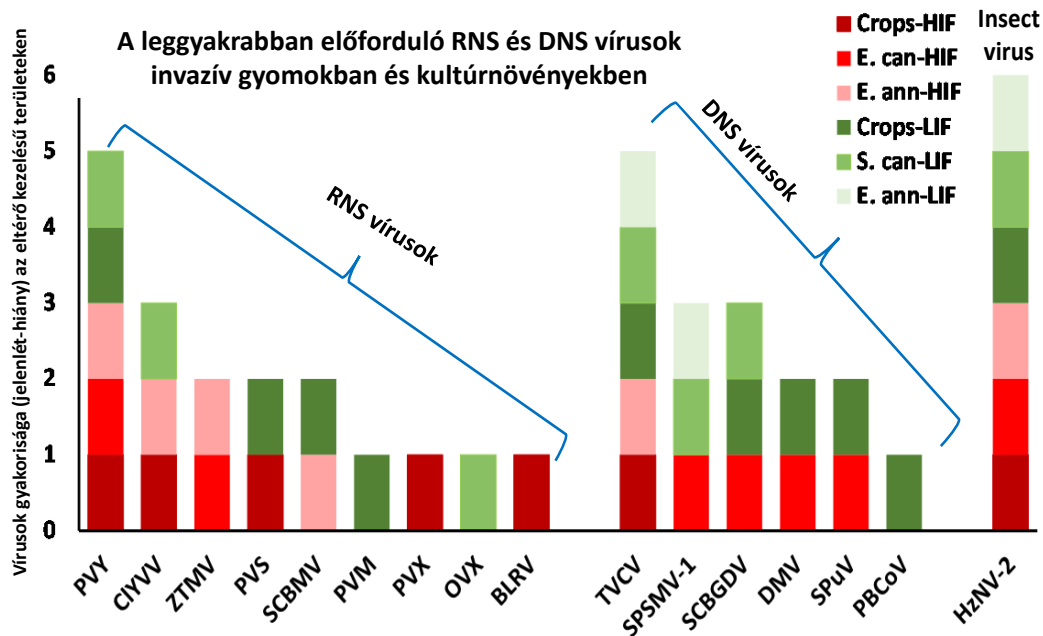


20.Ábra: A DNS alapú vírusok előfordulása közötti statisztikai összehasonlítás (ANOVA és Tukey teszt).

12. Táblázat. ANOVA szerinti p és F értékek a vizsgált DNS alapú vírusoknál. (ANOVA és Tukey teszt). F értékek a vonal alatt, p értékek a vonal felett láthatóak.

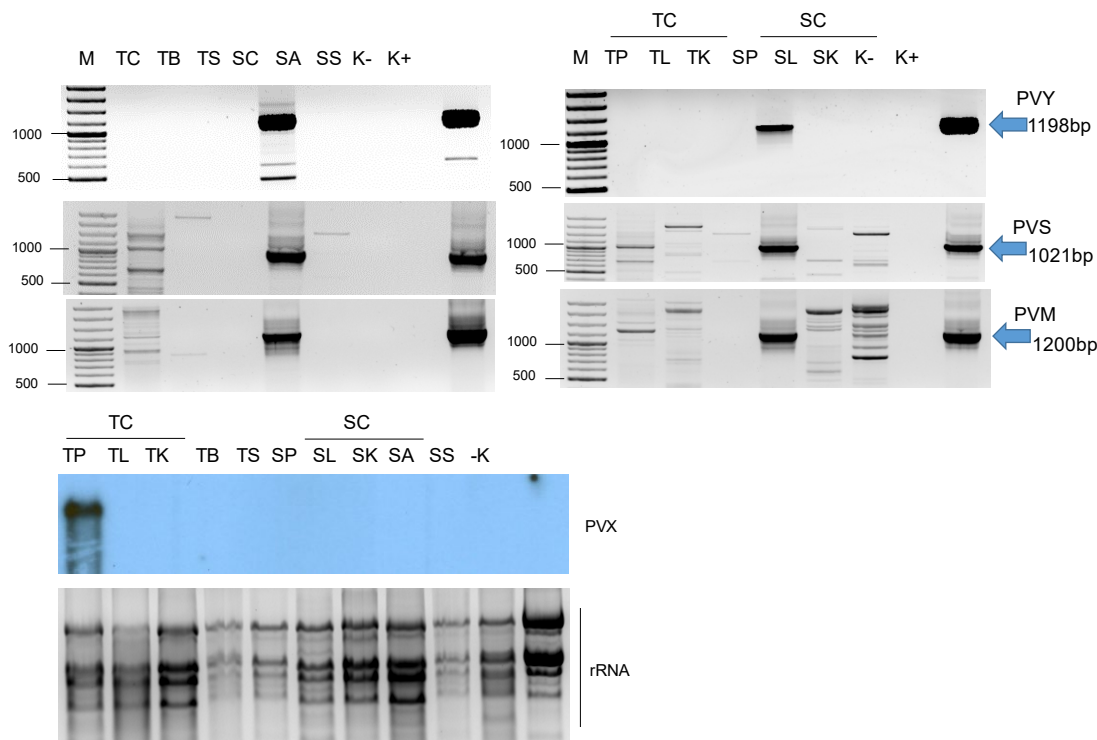
	Crop-HIF	Crop-LIF	E.ann-HIF	E.ann-LIF	C.can-HIF	S.can-LIF
Crop-HIF		0.9936	1	1	0.9004	0.9998
Crop-LIF	0.7788		0.9945	0.9772	0.6085	0.9997
E.ann-HIF	0.02603	0.7528		1	0.8936	0.9999
E.ann-LIF	0.2509	1.03	0.277		0.9525	0.9978
C.can-HIF	1.474	2.253	1.5	1.223		0.7815
S.can-LIF	0.369	0.4098	0.343	0.6199	1.843	

Összeségében pontos képet kaphatunk az invazív gyomokban és a legfontosabb kultúrnövényekben előforduló RNS és DNS vírusok gyakoriságáról, ugyanakkor szembevetendő, hogy egy Európában eddig nem jelzett, de az Egyesült Államokban gyakori bagolylepke kártevő elleni, minden bizonnyal mesterségesen kijutatott vírus van jelen az invazív gyomokban, és az azok mellett lévő kultúrnövényekben (21. Ábra),



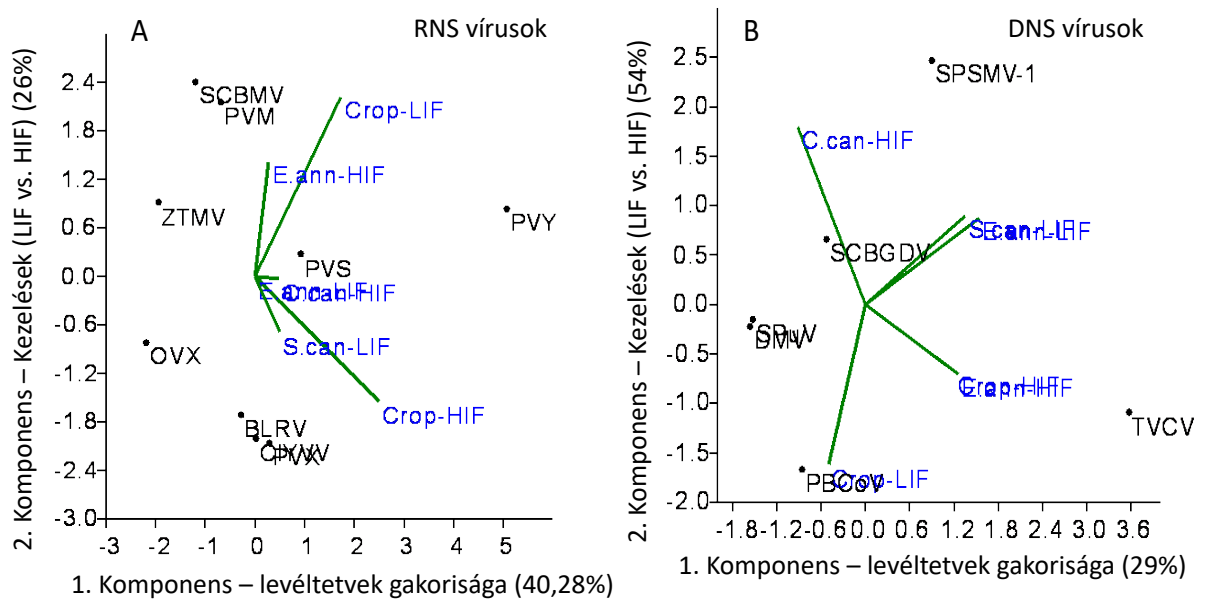
21. Ábra. Az RNS és DNS vírusok előfordulási gyakorisága E. ann - *Erigeron annuus*, C. can - *Conyza canadensis*, S. can - *Solidago canadensis*. PVY - Potato virus Y, CIYVV - Clover yellow vein virus, ZTMV - Zucchini tiger mosaic virus, PVS - Potato virus S, SCBMV - Squash chlorotic leaf spot virus, PVM - Potato virus M, PVX - Potato virus X, OVX - Opuntia virus X, BLRV - Bean leafroll virus, TVCV - Tobacco vein clearing virus, SPSMV-1 - Sweet potato symptomless mastrevirus 1, SCBGDV - Sugarcane bacilliform Guadeloupe D virus, DMV - Dahlia mosaic virus, SPuV - Soybean mild mottle pararetrovirus, PBCoV - Pineapple bacilliform comosus virus, HzNV-2 - Helicoverpa zea nudivirus 2.

A kimutatott vírusok visszaigazolása jelenleg is folyamatban van, eddig a felsorolt és bemutatott 16 vírus közül háromnak (PVY, PVS és PVM) a visszaigazolását sikerült elvégezni, mindhárom a burgonya fontos vírusa (22. ábra)



22. ábra. RT-PCR validálás (A/ RT-PCR or B/ Northern blot). PCR termékek gél elektroforézisen (GenRuler 100bp+; (+K)). PVY – burgonya mozaik Y vírusa, PVS- burgonya S-vírusa, PVM- burgonya M-vírusa.

Főkordináta módszer segítségével, melynek során a kezeléseket (intenzív vs. extenzív) és a levéltetvek gyakoriságát vettük figyelembe, mint fő faktorok, sikerült meghatározni ezek hatását külön az RNS és külön a DNS vírusok terjedésére. Ez eredmények alapján elmondhatjuk, hogy míg az RNS vírusok esetében a levéltetvek határozzák meg leginkább azok terjedését (40,28%), és a kezeléseket hatása csak 26%-ban érvényesül, addig a DNS alapú vírusok esetében a levéltetvek gyakorisága csak 29%-ban befolyásolja azok terjedését, míg a területek kezelése 54%-ban érvényesül (23. ábra).



23. ábra. A kezeléseket (intenzív vs. Extenzív) és a levéltetvek gyakoriságának hatása az RNS (A) és a DNS (B) vírusok terjedésére főkoordináta (PCoA) módszer segítségével.

5.KÖVETKEZTETÉSEK

A vizsgálatok alapján elmondható, hogy a tájidegen invazív gyomok magas helyi, őshonos levéltetű populációt tartanak fenn.

Kimutatható, hogy a sárga szilva – levéltetűt (*Bachycaudus helichrysi*) volt jelen a legtöbb gyom esetében, majd ezt követte a már jóval kevesebb egyedszámú zöldfoltos burgonya – levéltetű (*Aulacorthum solani*), valamint a *Therioaphis trifolii* levéltetű. Nem sikerült kimutatni a Burgonya levéltetű (*Macrosiphum euphorbiae*) jelenlétét, holott sok irodalmi hivatkozás jelzi a fajt invazív gyomokon (Francis et al., 2010; Srinivasan & Alvarez, 2011).

Az áttelepedési kísérletek során kimutatható volt, hogy a legtöbb *B. helichrysi* levéltetű egyed a kukoricára ment át, elsősorban akkor, ha *E. annuus* gyomnövény faj közelében volt.

Hasonlóan, a sárga szilva – levéltetű faj mind a betyárkóróról, mind a seprencéről a kukorica felé vándoroltak át magas egyedszámban, ezt követte a lucerna, majd a burgonya. Mindezen eredmények eddig nem voltak más kutatás során igazolva. A sárga szilvalevéltetű egyil fontos tápnövényeként elsősorban a napraforgó volt eddig feltüntetve, átfogó filogeográfiai vizsgálatok nem igazolták sem mutatták ki, hogy a *B. helichrysi* megjelenik kukoricán (Popkin et al., 2017). Ennek pontosabb igazolása további kísérletek elvégzését igényli.

A vizsgálataink során kimutathatóvá vált, hogy az *E. canadensis* gyomnövényfajról szignifikánsan a legnagyobb levéltetű átvándorlás a burgonya kultúrnövényre történt, míg a legalacsonyabb akárcsak a *E. annuus* gyomnövény esetében a lucernára való átvándorlás volt. Mindezek alapján szintén elmondható, hogy az invazív gyomok magas levéltetű populációt képesek eltartani, azok átvándorlása a kultúrnövények irányába rendkívül intenzív.

A gyomnövényekről és kultúrnövényekről gyűjtött levéltetvek mikroszatelita alapú vizsgálatával bizonyítani tudtuk, hogy az invazív gomokról a kultúrnövényekre való átvándorlás valóban végbemegy.

Összeségében, a területek kezelése meghatározta az invazív gyomok fajösszetételét és egyben azok gyakoriságát is, ami egyben hatással volt a rajtuk előforduló levéltetvekre. A nem kezelt területek esetében a 12%-al magasabb gyomborítás 30%-al magasabb levéltetű abundanciát eredményezett, ami komolyan felveti az extenzíven kezelt, sok esetben védett területek

managementjének a részletes átgondolását. Szintén kijelenthető, hogy az invazív gyomnövények nem csak tájidegen, gyorsan szaporodó, nagy területeket elfoglaló növények, amelyek elnyomják őshonos fajainkat és kompetícióban állnak a kultúrnövényekkel, hanem mint vírus rezervoárok is fontos jelentőséggel bírnak.

A kutatás során sikerült kimutatni 16 vírust, amelyből 9 eddig nem volt hivatalosan jelezve Európában, és amelyek gazdanövényei között nem szerepelt az általam vizsgált három invazív gyomfaj. Pár vírus olyan növényeket illetve rovarokat is fertőz, amelyek hazánkban nincsenek jelen. Bár a visszaigazolása a HzNV-2 vírusnak még folyamatban van, de ez a vírus fontos szerepet kaphat majd a biológiai növényvédelemben a *Helicoverpa zea-t* illetően.

Az eredményekből megfigyelhető, hogy intenzíven és extenzíven kezelt területekről származó növényekben eltérő vírusok vannak jelen, és ezek gyakorisága is eltérő. Intenzív területeken főleg az RNS alapú vírusok domináltak: ZTMV, PVX, OVX, CIYVV, ZTMV, a DNS alapú vírusok közül pedig az SCBGDV jellemzi a területet. Extenzív területeken inkább a DNS alapú vírusok vannak jelen: TVCV, DMV, PBCoV, és az RNS alapúak közül a PVS és PVM. Ezen eltérés talán azzal magyarázható, hogy míg az RNS alapú vírusok egy lépésben tudnak vírusfehérjéket termelni, addig a DNS alapú vírusok ezt csak több lépésben tudják megvalósítani.

Sok esetben, adott vírusok inkább a gyomnövényekre, valamint eltérő vírusok a kultúrnövényekre voltak jellemzőek: a gyomnövényekre a ZTMV, CIYVV, OVX, TVCV, SPSMV-1, a kultúrnövényekre pedig a PVY, PVS, PVX, PVM adtak több találatot.

A vírusok előfordulási intenzitását vizsgálva megállapítható, hogy az intenzíven művelt területeken a vírusok nagyobb valószínűséggel vannak jelen, ami annak köszönhető, hogy az HIF területek genotipikusan és fenotipikusan magasabb diverzitással rendelkeznek, hiszen a terület mozgatva van, így van esélye új fajoknak beférköznie, míg az LIF területek rendszere zártabb.

6. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. AKEROYD, J. R., & PAGE, J. N., 2011. Conservation of High Nature Value (HNV) grassland in a farmed landscape in Transylvania, Romania. *Contributii Botanice*, 46, 57–71.
2. ALEXANDER, H. M., MAUCK, K. E., WHITFIELD, A. E., GARRETT, K. A., & MALMSTROM, C. M., 2014. Plant-virus interactions and the agro-ecological interface. *European Journal of Plant Pathology*, 138(3), 529–547.
3. ANDÚJAR, D., RIBEIRO, A., CARMONA, R., FERNÁNDEZ-QUINTANILLA, C., & DORADO, J., 2010. An assessment of the accuracy and consistency of human perception of weed cover. *Weed Research*, 50(6), 638–647.
4. AphID. (n.d.). http://aphid.aphidnet.org/Aulacorthum_solani.php.
5. BAJWA, A. A., SADIA, S., ALI, H. H., JABRAN, K., PEERZADA, A. M., & CHAUHAN, B. S., 2016. Biology and management of two important <Emphasis Type="Italic">Conyza</Emphasis> weeds: a global review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(24), 24694–24710.
6. BASTOS SILVA, D., BUENO, V. H. P., SAMPAIO, M. V., & VAN LENTEREN, J. C., 2015. Performance of the parasitoid *Praon volucre* in *Aulacorthum solani* at five temperatures. *Bulletin of Insectology*, 68(1), 119–125.
7. BERIM, M. N., & SAULICH, M. I., 2018. AREA AND ZONES OF HARMFULNESS OF POTATO APHID AULACORTHUM SOLANI (HEMIPTERA, APHIDIDAE). *Вестник Защиты Растений*, 96(2), 55–57.
8. BLACKMAN, R. L., & EASTOP, V. F., 2007. *Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs* (John Wiley & Sons Ltd.). Chichester, UK.
9. BLANC, S., DRUCKER, M., & UZEST, M., 2014. Localizing Viruses in Their Insect Vectors. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 403–425.
10. BOTTA-DUKÁT ZOLTÁN, M. B., 2004. *Biológiai inváziók Magyarországon Özönnövények* (Természet bűvár Alapítvány Kiadó). Budapest.
11. BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254.
12. CABI., 2018. *CABI- Invasive species compedium*.
13. CALLAWAY, R. M., & MARON, J. L., 2006. What have exotic plant invasions taught us over the past 20 years? *Trends in Ecology & Evolution*, 21(7), 369–374.

14. CALLAWAY, R. M., & RIDENOUR, W. M., 2004. Novel Weapons: Invasive Success and the Evolution of Increased Competitive Ability. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2(8), 436–443.
15. CHEN BAO-MING, HIU-XUAN, L., MING WEI-BIN, HUI-JIE, W., & SHAO-LIN, P., 2017. Role of allelopathy in plant invasion and control of invasive plants. *Allelopathy Journal*, 41(2), 155–166.
16. CLARKE, HANNAH VICTORIA, CULLEN, D., HUBBARD, S. F., & KARLEY, A. J., 2017. Susceptibility of *Macrosiphum euphorbiae* to the parasitoid *Aphidius ervi*: larval development depends on host aphid genotype. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 162(2), 148–158.
17. CLARKE, HANNAH V., FOSTER, S. P., OLIPHANT, L., WATERS, E. W., & KARLEY, A. J., 2018. Co-occurrence of defensive traits in the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae*. *Ecological Entomology*, 43(4), 538–542.
18. CLEMENTS, D. R., & DITOMMASO, A., 2011. Climate change and weed adaptation: can evolution of invasive plants lead to greater range expansion than forecasted? *Weed Research*, 51(3), 227–240.
19. CLEMENTS, DAVID R., & CATLIN, P. M., 2007. Invasive species issues in Canada – How can ecology help? *Canadian Journal of Plant Science*, 87, 989–992.
20. COLVIN, J., OMONGO, C. A., GOVINDAPPA, M. R., STEVENSON, P. C., MARUTHI, M. N., GIBSON, G. MUNIYAPPA, V., 2006. Host-plant viral infection effects on arthropod-vector population growth, development and behaviour: management and epidemiological implications. *Advances in Virus Research*, 67, 419–452.
21. CSÍSZÁR, Á., 2012. *Invasive plants in Hungary (In Hungarian: Invaziós növényfajok Magyarországon)*. Sopron: Nyugat-Magyarországi Egyetem Kiadó.
22. CZOTTER, N., MOLNÁR, J., SZABÓ, E., DEMIÁN, E., KONTRA, L., BAKSA, I., SZITTYA, GY., KOCSIS, L., DEÁK, T., BISZTRAY, GY., TUSNADY, G. E., BURGYÁN, J., VÁRALLYAY, É., 2018. NGS of virus-derived small RNAs as a diagnostic method used to determine viromes of Hungarian vineyards. *Frontiers of Microbiology*, 9:122
23. DAMSTEEGT, V. D., & HEWINGS, A. D., 1986. Comparative transmission of soybean dwarf virus by three geographically diverse populations of *Aulacorthum* (= *Acyrtosiphon*) *solani*. *Annals of Applied Biology*, 109(3), 453–463.
24. DAMSTEEGT, VERNON D., & VOEGTLIN, D. J., 1990. Morphological and Biological Variation Among Populations of *Aulacorthum solani* (Homoptera: Aphididae), the Vector of Soybean Dwarf Virus. *Annals of the Entomological Society of America*, 83(5), 949–955.
25. DASSONVILLE, N., VANDERHOEVEN, S., VANPARYS, V., HAYEZ, M., GRUBER, W., & MEERTS, P., 2008. Impacts of alien invasive plants on soil nutrients are correlated with initial site conditions in NW Europe. *Oecologia*, 157(1), 131–140.

26. DEDRYVER, C.-A., LE RALEC, A., & FABRE, F., 2010. The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies*, 333(6), 539–553.
27. EDWARDS, P. J., FREY, D., BAILER, H., & BALTISBERGER, M., 2006. Genetic Variation in Native and Invasive Populations of *Erigeron annuus* as Assessed by RAPD Markers. *International Journal of Plant Sciences*, 167(1), 93–101.
28. EIGENBRODE, S. D., BOSQUE-PÉREZ, N. A., & DAVIS, T. S., 2018. Insect-Borne Plant Pathogens and Their Vectors: Ecology, Evolution, and Complex Interactions. *Annual Review of Entomology*, 63(1), 169–191.
29. EPPINGA, M. B., RIETKERK, M., DEKKER, S. C., RUITER, P. C. D., PUTTEN, W. H. V. DER, & PUTTEN, W. H. V. DER., 2006. Accumulation of local pathogens: a new hypothesis to explain exotic plant invasions. *Oikos*, 114(1), 168–176.
30. FERICEAN, L. M., RADA, O., & BADILITA, M. (2016). RESEARCH REGARDING EXTERNAL ANATOMY OF SPECIES BRACHYCAUDUS HELICHRYSI AND BRACHYCAUDUS CARDUI. Retrieved from <https://web.a.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=20661843&AN=119368470&h=hOLj4nLds3v%2bc3iilgM%2fx8SZjTxcB24fUueeyESMJeKuAGjaTBVEshqkhez5Ql%2fo3yctvpC5armQiWMaHGqBQ%3d%3d&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLocal=ErrCrlNotAuth&crlhashurl=login.aspx%3fdirect%3dtrue%26profile%3dehost%26scope%3dsite%26authtype%3dcrawler%26jrnl%3d20661843%26AN%3d119368470>.
31. FLORY, S. L., & CLAY, K., 2013. Pathogen accumulation and long-term dynamics of plant invasions. *Journal of Ecology*, 101(3), 607–613.
32. FRANCIS, F., GUILLONNEAU, F., LEPRINCE, P., DE PAUW, E., HAUBRUGE, E., JIA, L., & GOGGIN, F. L., 2010. Tritrophic interactions among *Macrosiphum euphorbiae* aphids, their host plants and endosymbionts: investigation by a proteomic approach. *Journal of Insect Physiology*, 56(6), 575–585.
33. GÓRSKI, R., SOBIERALSKI, K., & SIWULSKI, M., 2016. The effect of hemp essential oil on mortality *aulacorthum solani* kalt. and *Tetranychus urticae* Koch. *ECOL CHEM ENG S*, 23(3), 505–511.
34. HEJDA, M., PYŠEK, P., & JAROŠÍK, V., 2009. Impact of invasive plants on the species richness, diversity and composition of invaded communities. *Journal of Ecology*, 97(3), 393–403.
35. HOGENHOUT, S. A., AMMAR, E.-D., WHITFIELD, A. E., & REDINBAUGH, M. G., 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 327–359.
36. HULL, R., 2002. *Plant Virology*. Academic Press.

37. INGWELL, L. L., & BOSQUE-PÉREZ, N. A., 2015. The invasive weed *Ventenata dubia* is a host of Barley yellow dwarf virus with implications for an endangered grassland habitat. *Weed Research*, 55(1), 62–70.
38. JANDRICIC, S. E., WRAIGHT, S. P., BENNETT, K. C., & SANDERSON, J. P., 2010. Developmental times and life table statistics of *Aulacorthum solani* (Hemiptera: Aphididae) at six constant temperatures, with recommendations on the application of temperature-dependent development models. *Environmental Entomology*, 39(5), 1631–1642.
39. KAKAREKA, N. N., VOLKOV, YU. G., KOZLOVSKAYA, Z. N., & PLESHAKOVA, T. I., 2016. Potato virus Y in the Russian Far East (epidemiology, strains, and damage). *Russian Agricultural Sciences*, 42(1), 42–45.
40. KARLEY, A. J., EMSLIE-SMITH, M., & BENNETT, A. E., 2017. Potato aphid *Macrosiphum euphorbiae* performance is determined by aphid genotype and not mycorrhizal fungi or water availability. *Insect Science*, 24(6), 1015–1024.
41. KELLER, R. P., GEIST, J., JESCHKE, J. M., & KÜHN, I., 2011. Invasive species in Europe: ecology, status, and policy. *Environmental Sciences Europe*, 23(1), 23.
42. KIM, J., & KWON, M., 2019. Population dynamics of aphid species in Korean seed potato cultivation area over four decades. *Entomological Research*, 49(4), 179–184.
43. KLEUNEN, M. VAN, DAWSON, W., & MAUREL, N., 2015. Characteristics of successful alien plants. *Molecular Ecology*, 24(9), 1954–1968.
44. LEDGER, K. J., PAL, R. W., MURPHY, P., NAGY, D. U., FILEP, R., & CALLAWAY, R. M., 2015. Impact of an invader on species diversity is stronger in the non-native range than in the native range. *Plant Ecology*, 216(9), 1285–1295.
45. LI, H., DURBIN, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transfer. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760.
46. MALMSTROM, C. M., MCCULLOUGH, A. J., JOHNSON, H. A., NEWTON, L. A., & BORER, E. T., 2005. Invasive annual grasses indirectly increase virus incidence in California native perennial bunchgrasses. *Oecologia*, 145(1), 153–164.
47. MATSUHIRA, K., INOUE, H., KAKIMOTO, K., OZONO, M., OBO, K., OHTA, I., & TAKEDA, M., 2015. Damage Caused by the Foxglove Aphid, *Aulacorthum solani* (Hemiptera: Aphididae), to Sweet Pepper Cultivated in Greenhouses with Forcing Culture. *Japanese Journal of Applied Entomology & Zoology*, 59(2), 87–94.
48. MOONEY, H. A., & CLELAND, E. E., 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5446–5451.
49. MORGULIS, A., COULOURIS, G., RAYTSELIS, Y., MADDEN T.L., AGARWALA, R., SCHAFFER, A.A., 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24(16), 1757–1764

50. NÉMETH, Z. I., POZSGAI-HARSÁNYI, M., GÁLOS, B., & ALBERT, L., 2009. Stress Sensitivity of Correlation between POD and PPO Activities in Plants. *Acta Silvatica & Lignaria Hungarica* Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012078051>.
51. NOVAK, N., NOVAK, M., BARIĆ, K., ŠĆEPANOVIĆ, M., & IVIĆ, D., 2018. Allelopathic potential of segetal and ruderal invasive alien plants. *Journal of Central European Agriculture*, 19(2), 408–422.
52. NOYES, R. D., & GIVENS, A. D., 2013. Quantitative Assessment of Megasporogenesis for the Facultative Apomicts *Erigeron annuus* and *Erigeron strigosus* (Asteraceae). *International Journal of Plant Sciences*, 174(9), 1239–1250.
53. PACANOSKI, Z., 2017. Current situation with invasive *Erigeron annuus* (L.) Pers. (daisy fleabane) in the Republic of Macedonia. *Bulletin OEPP/EPPO*, 47(1), 1–7.
54. PAREPA, M., & BOSSDORF, O., 2016. Testing for allelopathy in invasive plants: it all depends on the substrate! *Biological Invasions*, 18(10), 2975–2982.
55. PIFFARETTI, J., ROSSI, J.-P., VANLERBERGHE-MASUTTI, F., GENSON, G., D'ACIER, A. C., & JOUSSELIN, E., 2013. Molecular identification and ecological characteristics of two cryptic lineages within a cosmopolitan aphid pest, *Brachycaudus helichrysi* (Hemiptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology*, 48(2), 155–164.
56. PIFFARETTI, VANLERBERGHE-MASUTTI, F., TAYEH, A., CLAMENS, A.-L., D'ACIER, A. C., & JOUSSELIN, E., 2012. Molecular phylogeny reveals the existence of two sibling species in the aphid pest *Brachycaudus helichrysi* (Hemiptera: Aphididae). *Zoologica Scripta*, 41(3), 266–280.
57. POPKIN, M., PIFFARETTI, J., CLAMENS, A.-L., QIAO, G.-X., CHEN, J., VITALIS, R., ... JOUSSELIN, E., 2017. Large-scale phylogeographic study of the cosmopolitan aphid pest *Brachycaudus helichrysi* reveals host plant associated lineages that evolved in allopatry. *Biological Journal of the Linnean Society*, 120(1), 102–114.
58. RODRÍGUEZ, J., THOMPSON, V., RUBIDO-BARÁ, M., CORDERO-RIVERA, A., & GONZÁLEZ, L., 2019. Herbivore accumulation on invasive alien plants increases the distribution range of generalist herbivorous insects and supports proliferation of non-native insect pests. *Biological Invasions*, 21(5), 1511–1527.
59. SAMAHA, H., 2017. Morphological and histological aspects of *Solanum tuberosum* plants infested by *Macrosiphum euphorbiae* aphids. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124(6), 553–562.
60. SANCHEZ, J. A., CÁNOVAS, F., & LACASA, A., 2007. Thresholds and Management Strategies for *Aulacorthum solani* (Hemiptera: Aphididae) in Greenhouse Pepper. *Journal of Economic Entomology*, 100(1), 123–130.

61. SCHLIEPHAKE, E., GRAICHEN, K., & RABENSTEIN, F., 2000. Investigations on the vector transmission of the Beet mild yellowing virus (BMV) and the Turnip yellows virus (TuYV) / Untersuchungen zur Vektorübertragung des Milden Rübenvergilbungsvirus (Beet mild yellowing virus) und des Wasserrübenvergilbungsvirus (Turnip yellows virus). *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection*, 107(1), 81–87.
62. SHAH, M. A., CALLAWAY, R. M., SHAH, T., HOUSEMAN, G. R., PAL, R. W., XIAO, S., LUO, W., ROSCHE, C., RESHI, Z.A., KHASA, D.P., CHEN, S., 2014. *Conyza canadensis* suppresses plant diversity in its nonnative ranges but not at home: a transcontinental comparison. *The New Phytologist*, 202(4), 1286–1296.
63. SRINIVASAN, R., & ALVAREZ, J. M., 2011. Specialized Host Utilization of *Macrosiphum euphorbiae* on a Nonnative Weed Host, *Solanum sarrachoides*, and Competition With *Myzus persicae*. *Environmental Entomology*, 40(2), 350–356.
64. STEVEN, M., MCGRANN, G., & CLARK, B., 2008. Turnip yellows virus (syn Beet western yellows virus): an emerging threat to European oilseed rape production? *HGCA Research Review*, 69.
65. STEINGER, G. GOY, H. GILLIAND, T. HEBEISEN, & J. DERRON., 2015. Forecasting virus disease in seed potatoes using flight activity data of aphid vectors. *Annals of Applied Biology (UK)*, 166(3), 410–419.
66. SZALAY-MARZSÓ, L., 1969. *Levéltetvek a kertészetben* (Mezőgazdaiadó). Budapest.
67. TEIXEIRA, M. A., SELA, N., ATAMIAN, H. S., BAO, E., CHAUDHARY, R., MACWILLIAMS, J., HE, J., MANTELIN, S., GIRKE, T., KALOSHIAN, I., 2018. Sequence analysis of the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae* transcriptome identified two new viruses. *PLOS ONE*, 13(3), e0193239.
68. TEIXEIRA, M., SELA, N., NG, J., CASTEEL, C. L., PENG, H.-C., BEKAL, S., ... KALOSHIAN, I., 2016. A novel virus from *Macrosiphum euphorbiae* with similarities to members of the family Flaviviridae. *The Journal of General Virology*, 97(5), 1261–1271.
69. TRTIKOVA, M., GÜSEWELL, S., BALTISBERGER, M., & EDWARDS, P. J., 2011. Distribution, growth performance and genetic variation of *Erigeron annuus* in the Swiss Alps. *Biological Invasions*, 13(2), 413–422.
70. TUNAITIENĖ, V., NAUGŽEMYS, D., PATAMSYTĖ, J., & ŽVINGILA, D., 2015. Gradient Of Genetic Diversity Of *Erigeron Annuus* In The Part Of Invasive European Range. *Botanica Lithuanica*, 21(2), 81–88.
71. VAN EMDEN, H. F., & HARRINGTON, R., 2007. *Aphids as Crops Pests*. Oxford: CABI.

72. VILÀ, M., BASNOU, C., PYŠEK, P., JOSEFSSON, M., GENOVESI, P., GOLLASCH, S., NENTWIG, W., OLENIN, S., ROQUES, A., ROY, D., HULME, P. E., HULME, P. E., 2010. How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8(3), 135–144.
73. VOYATES, D., 2000. Agarose Gel Electrophoresis, *Current Protocols in Molecular Biology* 51(1), 2.5A1-2.5A9.
74. VUČETIĆ, A., JOVIČIĆ, I., & PETROVIĆ-OBRAĐOVIĆ, O., 2013. The pressure of aphids (aphididae, hemiptera), vectors of potato viruses. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 65(2), 659–666.
75. WAFI, K., IBTISSEM, & BEN FEKI., 2018. Transmission Efficiency of Potato Leafroll Virus by Four Potato Colonizing Aphid Species in Tunisian Potato Fields. *Potato Research*, 61(1), 89–96.
76. WANG, A., 2015. Dissecting the Molecular Network of Virus-Plant Interactions: The Complex Roles of Host Factors. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 45–66.
77. WEAVER, S. E., 2001. The biology of Canadian weeds. 115. *Conyza canadensis*. *Canadian Journal of Plant Science*, 81(4), 867–875.
78. WERE, H. K., OLUBAYO, F. M., KABIRA, J., AURA, J., & TORRANCE, L., 2015. Aphids Infesting Potato in Kenya. *Potato and Sweetpotato in Africa: Transforming the Value Chains for Food and Nutrition Security*, 396–403.
79. WHITE, J.L. & KAPER, J.M., 1989. A simple method for detection of viral satellite RNAs in small plant tissue samples. *Journal of Virological Methods*, 23, 83-93.
80. WHITFIELD, A. E., FALK, B. W., & ROTENBERG, D., 2015. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*, 479–480, 278–289.
81. WILSON, A. C. C., MASSONNET, B., SIMON, J.-C., PRUNIER-LETERME, N., DOLATTI, L., LLEWELLYN, K. S., FIGUEOA, C.C., RAMIREZ, C.C., BLACKMAN, R.L., ESTOP, A., SUNNUCKS, P., 2004. Cross-species amplification of microsatellite loci in aphids: assessment and application. *Molecular Ecology Notes*, 4(1), 104–109.
82. WISLER, G. C., & NORRIS, R. F., 2005. Interactions between weeds and cultivated plants as related to management of plant pathogens. *Weed Science*, 53(6), 914–917.
83. ZERBINO, D. R., BIRNEY, E., 2008. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genom Research*, 18. 821-829.
84. ZIMMERMANN, H., LOOS, J., WEHRDEN, H. VON, & FISCHER, J., 2015. Aliens in Transylvania: risk maps of invasive alien plant species in Central Romania. *NeoBiota*, 24, 55–65.

85. ZISKA, L. H., BLUMENTHAL, D. M., RUNION, G. B., HUNT, E. R., & DIAZ-SOLTERO, H., 2011. Invasive species and climate change: an agronomic perspective. *Climatic Change*, 105(1–2), 13–42.

7.ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Az eredményeim alapján az alábbi új tudományos eredményeket tartom fontosnak kiemelni.

1. Igazoltam, hogy a vizsgált invazív gyomok (*Erigeron annuus*, *Conyza canadensis*) nagyon magas helyi levéltetűfajt képesek eltartani.
2. Genomiális DNS elemzésekkel igazoltam, hogy az invazív gyomokról a kultúrnövények felé nagyfokú levéltetű átvándorlás van.
3. Igazoltam, hogy a sárga szilvalevéltetű egyik tápnövénye lehet a kukorica.
4. Kimutattam olyan növényi vírusokat, amelyek eddig nem voltak jelezve a vizsgált gyomnövényekben.
5. Kimutattam, hogy a kezeléseknek, vagy azok hiányának nagy szerepe van a vizsált gyomok (*Erigeron annuus*, *Conyza canadensis*) abundanciája révén a levéltetvek egyedsűrűségére, ami meghatározhatja az adott területeken a kultúrnövények vírusfertőzését.
6. Először mutattam ki mesterséges rovarpatogén vírust a vizsgált invazív gyomnövényekben (*Erigeron annuus*, *Conyza canadensis*), ennek a későbbiekben lehet növényvédelmi jelentősége.

7. Kimutattam, hogy a növényi vírusok eltérő gyakorisággal vannak jelen kezelt és nem kezelt területeken, míg az RNS alapú vírusok inkább az intenzíven kezelt területen vannak jelen, addig a DNS alapú vírusok az extenzíven kezelt területekre jellemzőek

8.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A terepi vizsgálatokért és a beállított kísérletekben nyújtott segítségért köszönetet szeretnék mindani Király Timeának, Fákó Viviennek, Kőszeghi Szidóniának, Simpf Rajmundnak és Kovács Zsófiának.

A kis RNS vizsgálatokban Dr. Várallyay Éva, a Gödöllői Biotechnológiai Kutatóintézet Vírusdiagnosztika Csoportjának a vezetője nyújtott értékes segítséget. Köszönöm Jaksa-Czotter Nikolettának és Damián Emesének akik a kis RNS könyvtárakat készítésében és vírusok visszaigazolásában segítették munkám!

Köszönettel tartozom még a kollégámnak dr Bálint Jánosnak, aki segített támogatott, és nem utolsó sorban témavezetőmnek dr Balog Adalbertnek, akik nélkül ez a munka nem születhetett volna meg.

9.MELLÉKLETEK

I. Melléklet. A területeken vizsgált gyomok és levéltetvek.



24. ábra. LIF terület, Keresd (Criş) (szerző felvétele)



25. ábra. HIF, Tusnád (Tuşnad) –*Conyza canadensis*-szel fertőzött terület (szerző felvétele)



2
26.ábra. *Erigeron annuus*-Egynyári seprence (HIF) (szerző felvétele)



27. ábra. Egynyári seprencével fertőzött terület (LIF) (szerdó felvétele)



28. ábra. *Brachycaudus heliocrisi*-Sárga szilva levéltetű aptera (szerző felvétele)



29. ábra. . *Brachycaudus heliocrisi*-Sárga szilva levéltetű alata (szerző felvétele)



30. ábra. *Aulacorthum solani*- Sárgafoltos burgonyalevéltetű, aptera (szerző felvétele)

II. Melléklet. Statisztikai elemzések táblázatai

Chi² elemzések táblázatai

bb/lucerna		
A vs. B		
One constraint		
N1:		23
N2:		21
Deg. freedom:	5	
Chi ² :		19.718
p(same):	0.001411	
Monte Carlo		
p(same):	0.0004	
Fisher exact		
p(same):	5.53E-05	

bb/burgonya		
A vs. B		
One constraint		
N1:		23
N2:		5
Deg. freedom:	5	
Chi ² :		8.3432
p(same):	0.13831	
Monte Carlo		
p(same):	0.1318	
Fisher exact		
p(same):	0.057814	

bb/kukorica		
A vs. B		
One constraint		
N1:		23
N2:		36
Deg. freedom:	8	
Chi ² :		23.07
p(same):	0.003276	
Monte Carlo		
p(same):	0.0007	

Fisher exact
p(same): 0.001069

III. Melléklet. Kis RNS könyvtár készítése

1) Kis RNS frakció izolálása totál RNS kivonatból

a) Gél elektroforézis és minta előkészítés

8%-os TBE-urea PAGE gél öntése (mintánként egy gél).

Gél előfuttatása 100 V feszültségen, 20-30 percig, majd mossuk ki a zsebeket 1x TBE pufferrel.

Minta előkészítés: a 20-30 µg-nak megfelelő mennyiségű RNS kivonatot 1:1 arányban elegyítsük FDE (brómfenolkék) festékkel egy 1.5 ml-es eppendorf csőben. A mintákat 65 °C-ra rakjuk 20 percre denaturálódni.

Minták felvitele a géltre 20µl minta/zseb).

100 V feszültségen futtatjuk a mintákat.

b) Gél festése

Steril petri csészébe 40-50 ml 1X TBE puffert és 3 µletidímu-bromidot rakunk.

Helyezzük bele óvatosan a gélt és 5 percig hagyjuk benne festődni.

c) Kis RNS tisztítása gélből

Egy 0,5 ml-es eppendorf cső alján képezzünk 3-4 lyukat steril tű segítségével.



Helyezzük a 0,5 ml-es csövet egy 2ml-es centrifuga csőbe.



UV lámpa alatt a várt mérettartományba (18-30 bp) steril szike segítségével kivágjuk a gélből a kisRNS frakciót és az előzőekben előkészített csőbe helyezzük.

Centrifugáljuk a mintákat 13.000 fordulatszámon 2 percig szobahőmérsékleten.

Adjunk az elroncsolt gél darabokhoz 350-400 µl 0,3 M NaCl oldatot. Centrifugáljuk 13.000 fordulatszámon 2 percig, szobahőmérsékleten.

Tegyük a mintákat 4 °C-ra és eluáljuk az RNS-t egy éjszakán át enyhe rázatás mellett.

Helyezzük át a mintákat Spin X acetátos filter csövekbe és centrifugáljuk le 6000 rpm-en 2 percig, szobahőmérsékleten.

Adjunk hozzá 600-700 µlizopropanolt és 1 µlglikoblue-t/ glikogént.

Inkubáljuk a mintákat -70 °C-on 2-2,5 órán keresztül legalább.

Centrifugáljuk 20 percen át 13.000 rpm-en, 4°C-on a mintákat.

Öntsük le a felülúszót és mossuk a csapadékot 2x 1ml 70%-os etanol oldatban.

Szárítsuk ki a mintákat 3-5 perc alatt speedvac készülékben.

Oldjuk vissza a csapadékot 12 µl ultra pure vízben.

A mintákat ezután -70 °C-on lehet tárolni.

2) Adaper ligálás

a) 3' adapter ligálás

70 °C-ra melegítsük elő a PCR készüléket.

PCR csőbe tegyünk 2,5 µl-t az izolált kisRNS frakcióból, majd adjunk hozzá 0,5 µl 3' Adaptert.

Denaturáljuk a mintákat 2 percig 70 °C-on, majd tegyük jégre a mintákat.

Melegítsük elő a PCR készüléket 28°C-ra.

Ezalatt mérjük össze a következő reakció mixet:

Reagens	Mennyiség (µl)
Ligationbuffer	1
RNase Inhibitor	0,5
T4 RNA Ligase 2	0,5

Adjuk hozzá a 2 µl mixet a 3 µl denaturált reakcióhoz és inkubáljuk 28 °C-on 1 órát.

Jégen adjunk hozzá 0,5 µl Stop Solution oldatot a reakcióhoz és további 15 percig inkubáljuk 28 °C-on a **3' adapter reakciót**.

b) 5' adapter ligálás

70 °C-ra melegítsük elő a PCR készüléket.

Steril PCR csőbe mérjük ki 0,5 µl 5' Adaptert.

Denaturáljuk a mintákat 2 percig 70 °C-on, majd tegyük jégre a mintákat.

Melegítsük elő a PCR készüléket 28°C-ra.

Adjuk hozzá a denaturált 5' adapterhez a következőket:

Reagens	Mennyiség (µl)
10mM ATP	0,5
T4 RNA Ligase	0,5

Vortexeljük össze és az egészet adjuk hozzá a 3' adapter reakcióhoz.

Inkubáljuk 28 °C-on 1 órát a **3'-5' adapter reakciót**.

3) Reverz transzkripció

70 °C-ra melegítsük elő a PCR készüléket.

Adjunk hozzá a 6 µl 3'-5' adapter reakcióhoz 1 µl RNA RT primert **7µlRT reakció**.

Denaturáljuk a mintákat 2 $\xrightarrow{\text{}}\text{perc}$ ig 70 °C-on, majd tegyük jégre.

Melegítsük elő a PCR készüléket 50°C-ra.

Ezalatt mérjük össze a következő reakció mixet:

Reagens	Mennyiség (µl)
Ultra pure víz	1
5x Reactionbuffer	2

12,5mM dNTP mix		0,5
RNase Inhibitor		1
RevertAid reversetranscritase	H-	1

Az egészet adjuk hozzá az RT reakcióhoz és inkubáljuk 50 °C-on 1 órán keresztül.

A cDNS -20°C-on tárolható.

4) PCR amplifikáció

Mérjük össze a következő reakció mixet:

Reagens	Mennyiség (µl)
Ultra pure víz	4,25
PCR mix (PML)	12,5
RNA PCR primer (RP1)	0,5
RNA PCR primer Index	2

Végül adjuk hozzá a 6,25 µl cDNS templátot.

PCR reakció körülmények beállítása:

16x				
98°C	98°C	60°C	72°C	72°C
30 mp	10 mp	30 mp	15 mp	10 mp

5) cDNS könyvtár tisztítás

a) Gél elektroforézis

8%-os TBE PAGE gél öntése (mintánként egy gél).

Gél előfuttatása 100 V feszültségen, 20-30 percig, majd mossuk ki a zsebeket 1x TBE pufferrel.

Minta előkészítés: 25 μ l PCR terméket elegyítsünk 5 μ l mintafelvívő festékkel (LoadingDye).

Minták felvitele a géltre (15 μ l minta/zseb).

A gél egy-egy szélére két különböző molsúly markert viszünk fel: 4 μ l O'RangeRuler 20 bp, 4 μ l LMW DNA Ladder 25-766 bp.

100 V feszültségen futtatjuk a mintákat.

b) Gél festése

Steril petri csészébe 40-50 ml 1X TBE puffert és 3 μ l etidímu-bromidot öntünk.

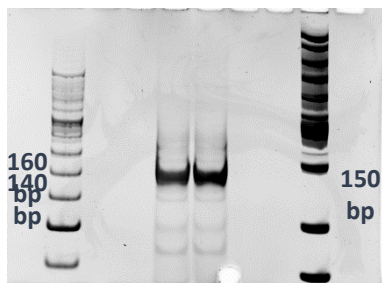
Helyezzük bele óvatosan a gélt és 5 percig hagyjuk benne festődni.

c) cDNS tisztítása gélből

Egy 0,5 ml-es eppendorf cső alján képezzünk 3-4 lyukat steril tű segítségével.

Helyezzük a 0,5 ml-es csövet egy 2ml-es centrifuga csőbe.

UV lámpa alatt a várt mérettartományba (140-150 bp) steril szike segítségével kivágjuk a gélből a kisRNS frakciót és az előzőekben előkészített csőbe helyezzük.



Centrifugáljuk a mintákat 13.000 fordulatszámon 4 percig szobahőmérsékleten.

Adjunk az elroncsolt gél darabokhoz 350-400 μ l 0,3 M NaCl oldatot. Centrifugáljuk 13.000 fordulatszámon 4 percig, szobahőmérsékleten.

Tegyük a mintákat 4 °C-ra és eluáljuk az RNS-t egy éjszakán át egy rázatás mellett.

Másnap helyezzük át a mintákat Spin X acetátos filter csövekbe és centrifugáljuk 6000 rpm-en 2 percig, szobahőmérsékleten.

Adjunk hozzá 1 ml cceatnolt és 1 μ l glikoblue-t/ glikogént.

Inkubáljuk a mintákat -70 °C-on 2-2,5 órán keresztül legalább.

Centrifugáljuk 20 percen át 13.000 rpm-en, 4°C-on a mintákat.

Öntsük le a felülúszót és mossuk a csapadékot 2x 1ml 70%-os etanol oldatban.

Szárítsuk ki a mintákat 3-5 perc alatt speedvac készülékben.

Oldjuk vissza a csapadékot 10-12 µl steril 1xTE pufferben.

A mintákat ezután -20 °C-on lehet tárolni.

SZABÓ KÁROLY ATTILA

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Doktori témához kapcsolódó publikációk

ISI közlemények:

Idegen nyelvű

1. **Szabó KA**, Várallyay E, Demian E, Kiss J, Bálint J, Loxdale HD and Balog A (2019). Local aphid species infestation on invasive weeds affects virus infection of nearest crops under different management systems. *Frontiers in Plant Science* 11(684); <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00684>. (IF. **4,106**). Scimago rank **D1**.
2. **Szabó KA**, Kiss J, Bálint J, Kőszeghi Sz, Loxdale HD, Balog A. (2019). Low and high input agricultural fields have different effects on pest aphid abundance via different invasive alien weed species. *NeoBiota* 43, 27-45. doi: 10.3897/neobiota.43.31553 (IF. **2,488**). Scimago rank **D1**.
3. Balog A, Loxdale HD, Bálint J, Benedek K, **Szabó KA**, Jánosi-Rancz KT, Domokos E. (2017) The arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* affects arthropods colonization on sweet pepper in both the field and greenhouse. *Journal of Pest Science*, 90(3): 935–946. (IF. **4,402**). Scimago rank **D1**.

Doktori témához nem kapcsolódó publikációk:

ISI közlemények:

Idegen nyelvű:

1. Turoczi, B., Bakonyi, J., **Szabó, KA.**, Bálint, J., Máthé, I., Lányi, Sz., **Balog, A***. (2020). In vitro and in vivo effect of poplar bud extracts on *Phytophthora infestans*: a new effective biological method in potato late blight control. *Plants* 9(2), 217; <https://doi.org/10.3390/plants9020217>. (IF. **2,632**). Scimago rank **D1**.
2. Bálint J., Thiesz R., Nyárádi II, **Szabó KA.** (2013): Field Evaluation of Traditional Apple Cultivars to Induced Diseases and Pests, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1): 1-6. (IF. **0,476**). Scimago rank **Q3**.
3. Bálint J., Turóczi B., Máthé I., Benedek K., **Szabó KA.**, Balog A. (2014) In Vitro and In Vivo Effect of Poplar Bud (*Populi gemma*) Extracts on Late Blight (*Phytophthora infestans*). *Acta Universitatis Sapientiae Agriculture and Environment*, 6 (2014) 1-8.
4. Bálint J., **Szabó KA**, Tófalvi B., Puia C., Balog A. (2016) Comparing diseases resistance of local and international plum cultivars (*Prunus domestica*) from Eastern Transylvania, Romania. *Journal of Plant Diseases and Protection* 123: 317. doi:10.1007/s41348-016-0048-6 (IF. **0,485**). Scimago rank **Q3**.
5. János Bálint, Botond Turóczi, István Máthé, Klára Benedek, **Károly-Attila Szabó**, Adalbert Balog (2014). In Vitro and In Vivo Effect of Poplar Bud (*Populi gemma*) Extracts on Late Blight (*Phytophthora infestans*). *Acta Universitatis Sapientiae Agriculture and Environment*, 6 1-8

Kumulatív impakt faktor **14,589**

Idézők száma - 19

h-index - 3

<https://scholar.google.ro/citations?user=SLFbFuIAAAAJ&hl=en>

Konferencia előadások, posztterek:

Idegen nyelvű

Csorba A.B., Putnok Cs.B., **Szabó K.-A.**, Balog A., Bálint J., 2019): Testing insecticides efficacy on pollen beetles (*Meligethes aeneus* F.), 5. Transilvanian Horticulture and Landscape Studies Conference, Tîrgu-Mureş

Tófalvi B., Balog A., **Szabó K.-A.**, Bálint J., 2017): Comparing disease and pest resistance of local and international plum cultivars (*Prunus domestica*) from Eastern Transylvania, Romania, 4. Transilvanian Horticulture and Landscape Studies Conference, Tîrgu-Mureş

Demeter A., Koncz R., Miklos CS., **Szabó K.-A.**, Bálint J. 2015): The effects of different insecticides on ticks, 3. Transilvanian Horticulture and Landscape Studies Conference, Tîrgu-Mureş.

Kószeghi SZ., Bálint J., **Szabó K.-A.**, Benedek K. 2015): Comparing the effects of different Benzyladenine concentrations on lemon balm (*Melissa officinalis* L.) micropropagation, 3. Transilvanian Horticulture and Landscape Studies Conference, Tîrgu-Mureş.

