

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Rovartani Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

**MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ *PLANOCOCCUS* PAJZSTETŰ FAJOK MORFOLÓGIAI
ÉS MOLEKULÁRIS ÖSSZEHAJONLÍTÓ VIZSGÁLATA**

Hoffmann Viktória Zsanett
Növényorvos MSc, I. évfolyam

Tanszéki konzulens:

Dr. Pénzes Béla egyetemi tanár, tanszékvezető

Külső konzulensek:

Dr. Kozár Ferenc az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Dr. Tóbiás István az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Fetykó Kinga, MTA AKT NKI, tudományos segédmunkatárs

Budapest, 2012

1. Tartalomjegyzék

2. Felhasznált rövidítések	- 3 -
3. Bevezetés	- 4 -
4. Célkitűzések	- 6 -
5. Irodalmi áttekintés	- 7 -
5.1. Viaszos pajzstetvek	- 7 -
5. 2. Morfológiai vizsgálatok	- 10 -
5.2.1. Morfológiai vizsgálatok jellemzői	- 10 -
5.2.2. <i>A Planococcus citri</i> morfológiai leírása	- 11 -
5.2.3. <i>A Planococcus vovae</i> pajzstetű faj morfológiai leírása	- 13 -
5.3. Molekuláris vizsgálatok	- 14 -
5.3.1. Molekuláris markerezés	- 14 -
5.3.2. <i>A riboszomális DNS</i>	- 17 -
5.3.3. Pajzstetű fajokon végzett molekuláris vizsgálatok	- 19 -
6. Anyag és módszer	- 22 -
6.1. Vizsgált minták	- 22 -
6.2. Morfológiai vizsgálatok	- 23 -
6.3. Molekuláris vizsgálatok	- 24 -
6.3.1. DNS-kivonás	- 24 -
6.3.2. PCR analízis, PCR termék tisztítása	- 24 -
6.3.3. Klónozás	- 25 -
6.3.4. Szekvenálás, bioinformatikai elemzések	- 26 -
7. Eredmények és megvitatásuk	- 27 -
7.1. Morfológiai vizsgálatok eredményei	- 27 -
7.2. Molekuláris vizsgálatok eredményei	- 28 -
7.2.1. Az ITS2 régióra tervezett primer párok alkalmasságának vizsgálata <i>Planococcus</i> fajok esetében	- 28 -
7.2.2. A minták egymáshoz viszonyított genetikai távolsága	- 30 -
7.3. Morfológiai és genetikai vizsgálatok összevetése	- 31 -
8. Összefoglalás	- 33 -
9. Köszönetnyilvánítás	- 34 -
10. Irodalomjegyzék	- 35 -
11. Nyilatkozat	- 41 -

2. Felhasznált rövidítések

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism – Amplifikált fragmentumhossz-polimorfizmus

BCE: Budapesti Corvinus Egyetem

COI: *Citokróom-oxidáz* gén

DNS: Dezoxiribonukleinsav

ETS: External Transcribed Spacer

IGS: Intergenic Spacer

ITS: Internal Transcribed Spacer -

NTS: Non-Transcribed Spacer

PCR: Polymerase chain reaction – Polimeráz láncreakció

Pl.: *Planococcus*

RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA – véletlenszerűen amplifikált polimorf DNS

rDNS: riboszomális DNS

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism – Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus

RNS: Ribonukleinsav

SSR: Simple Sequence Repeat - Egyszerű szekvencia ismétlődés

3. Bevezetés

A viaszos pajzstetvek világszerte elterjedt kártevők, melyek komoly termés- és profitkiesést okozhatnak a mezőgazdaságban, különösen a gyümölcs-, szőlő- és dísznövénytermesztésben, szabadföldön és üvegházban egyaránt, de megjelenhetnek lakásokban a szobanövényeken is. Kártételükre jellemző, hogy szívogatásukkal a vízháztartás felborításán keresztül gyengítik a gazdanövényt, jelenlétük súlyos esetben a növény pusztulásához vezet. Rejtett életmódjuk és kis méretük megnehezíti az ellenük való védekezést.

Közvetett kártételük még inkább nemkívánatossá teszi jelenlétüket az ültetvényekben; mozgékony állatok, helyváltoztatásra mindkét nem képviselői egész életük során képesek, emiatt fontos szerepet játszhatnak egyes vírusok terjesztésében is (például a *Heliococcus bohemicus* és a *Phenacoccus aceris* a *Grapevine leafroll-associated viruses* hatékony vektorai (SFORZA et al. 2003). Emellett táplálkozásuk jellegéből adódóan károsításuk nyomán erős mézharmat kiválasztás figyelhető meg, mely a növények díszítőértékét csökkenti és lehetőséget ad a korompenész (*Capnodium salicinum* (Mont)) megtelepedésére.

Az integrált növényvédelem és a szelektív rovarölő szerek használatának terjedésével a pajzstetvek által okozott károk valószínűleg súlyosbodni fognak. Terjedésüket és megtelepedésüket a klímaváltozás nagymértékben segítheti. Többek közt a *Planococcus citri* (Risso), *Planococcus ficus* (Signoret), *Pseudococcus viburni* (Signoret) és a *Pseudococcus comstocki* (Kuwana) fajok esetében figyeltek meg lassú északra vándorlást az elmúlt negyven év során (KOZÁR 1997, PELLIZZARI AND GERMAIN, 2010).

A pajzstetvek leírása és a határozókulcsok morfológiai bélyegek alapján készülnek, a pontos fajazonosításnak azonban megvannak a maga korlátai:

- a fajmeghatározáshoz elsősorban kifejlett nőtény használható, a preparátumok elkészítéséhez és vizsgálatához komoly szakértelemre van szükség,
- a pajzstetű hímek, lárvák, tojások fajszerűtű azonosítása igen nehézkes vagy lehetetlen,
- az import áruval együtt bekerülő zárlati kártevők esetében kívánatos a gyors diagnosztikai módszerek alkalmazása, hiszen a karantén előírások betartása kiemelt fontosságú a fajok terjedésének lassításában,

- további problémát jelent, hogy a szexferomonok csak hím imágókat vonzanak, így a monitorozás során használt feromon csapdákból talált egyedek pontos meghatározása morfológiai módszerekkel nem megbízható.

A genetikai markerezés az elmúlt évtizedekben elképesztő mértékű fejlődésen ment keresztül, újabb és újabb technikák segítik a biológusokat munkájukban. A markerek használhatók többek közt fajok, fajták elkülönítésére, genetikai hátterük mélyebb megismerésére, populációk tanulmányozására, de segíthetnek törvényszéki vizsgálatokban, betegségek diagnosztizálásában, akár a növénynemesítők munkáját is lerövidíthetik.

Ennek megfelelően a pajzstetvek kutatásában is egyre inkább terjednek a molekuláris módszerek. Elmondható azonban, hogy a pajzstetvek leírásában a hagyományos, morfológiai bélyegeken alapuló és a molekuláris vizsgálatok egymást szervesen kiegészítik, ráadásul a technikák részletes kidolgozásában még számos feladat áll a rovarászok előtt.

4. Célkitűzések

A rovaratan taxonómiában gyakran előfordul, hogy csak bizonyos nemű és fejlődési stádiumú egyedeket lehet nagy biztonsággal meghatározni. Előfordulhat azonban, hogy csak a morfológiai határozásra alkalmatlan egyedek állnak rendelkezésre.

A pajzstetvek esetében a vizsgálati technika kiválasztásánál a megbízhatóságon túl az időigényesség rendkívül fontos szempont. Gyors DNS kivonási módszerekkel és jól megválasztott, fajspecifikus primer párok használatával fejlődési állapottól függetlenül meghatározható több pajzstetű faj akár pár órán belül (TÓBIÁS ET AL., 2011a).

Ennek megfelelően kutatásaink során a következő célokat tűztük ki:

- A morfológiai vizsgálatokhoz mindig nőtényeket használtunk, ám a fertőzött növényi részeken leggyakrabban tojások vagy lárvák voltak csupán. Ezért legelső célunk a *Planococcus citri* faj laboratóriumi tenyészetének beállítása volt.
- Célul tűztük ki több helyszínről és tápnövényről származó *Planococcus citri* és *Planococcus vovae* nőtények morfológiai azonosítását, mikroszkópi preparátumok alapján.
- Megnéztük az ITS szekvenciák vizsgálatának alkalmazhatóságát *Planococcus* fajok jellemzésére, valamint a szekvenciák hosszának és bázissorrendjének meghatározását ezen fajok esetében.
- A genetikai és morfológiai vizsgálatok eredményeinek összevetése.

Meg kell jegyezni, hogy az eredeti dolgozattervben a *Planococcus vovae* faj vizsgálata nem szerepelt. Ennek ellenére foglalkoztunk vele, mert az egyik *Planococcus citri* szexferomon csapdában *Planococcus vovae* egyedeket találtunk. Erről részletesen az „Eredmények és Megvitatásuk” fejezetben számolok be.

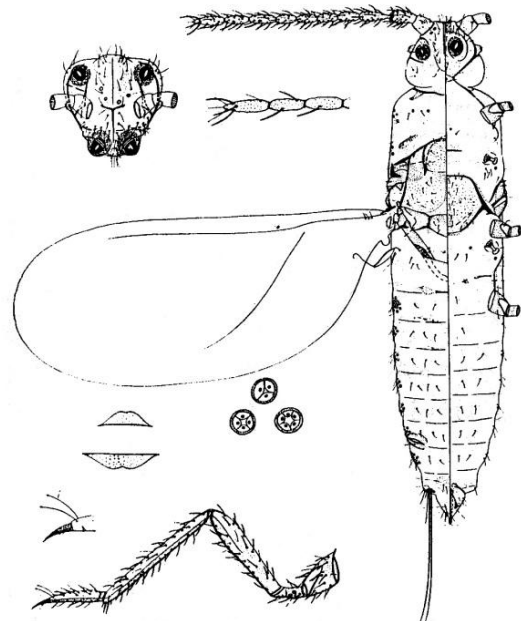
5. Irodalmi áttekintés

5.1. Viaszos pajzstetvek

A viaszos pajzstetvek a pajzstetvek alrendjébe (*Coccinea*) és a viaszos pajzstetvek családjába (*Pseudococcidae*) tartozó fajok. Az alrend fajainak közös jellemzője a visszafejlődött láb, amely egy vagy két ízű, egy karomban végződik (KOSZTARAB AND KOZÁR, 1978). A nőtények az összes faj esetében szárnyatlanok, gyakran lábaik is csökevényesek. A lárvák és a nőtény imágók szűrő-szívó szájszervvel rendelkeznek, táplálkozási módjuk fitofág, szívogatásukkal a vízháztartás felborításán keresztül gyengítik a növényt, mely levélhulláshoz, súlyos esetben pusztuláshoz is vezethet. A legtöbb faj nehezen elérhető helyeken (levélfonákon, kéregrepedésekben, gyökereken) él, mely tulajdonság jelentős mértékben megnehezíti az ellenük való védekezést, illetve növeli az esélyét annak, hogy ezek a kártevők észrevétlenek maradnak a karantén vizsgálatok során.

Növényvédelmi szempontból három család kiemelt jelentőségű: a teknős pajzstetvek családja (*Coccidae*), a kagylós pajzstetvek családja (*Diaspididae*) és a vándor vagy más néven viaszos pajzstetvek családja (*Pseudococcidae*), amelyek egyben a legfajgazdagabb családok is.

A vándor pajzstetvek családjába tartozó fajok nőtényei szárnyatlanok, erősen szelvényezett testüket porszerű viaszváladék borítja, melyet a 3-5 sejttű viaszmirigyek termelnek. Végtagjaik az egyedfejlődés során végig működőképesek maradnak, ebből fakadóan hatékony vírus vektorok. Váltivarúak, jellemző rájuk az ivari dimorfizmus. A kifejlett hímek testtájai jól megkülönböztethetők, az egyedek röpképesek, az első pár szárny vékony, hártyás, átlátszó, a második pár csökevényes. Lábaik hosszúak, nyúlánkak, rajtuk függelékek találhatóak. Alig pár napig élnek, szájszervük fejletlen, nem táplálkoznak,



1. ábra: Hím imágó habitusrajza

feladatuk csupán a nőtények felkutatása és megtermékenyítése (KOSZTARAB AND KOZÁR, 1988), ebben segítséget a szűz nőtények által kibocsájtott szexferomonok nyújtanak. Az első ábrán látható egy hím imágó egyszerűsített habitusrajza (AFIFI, 1968).

Tápnövény körük igen változatos, a legtöbb faj lágyszárúakon, főleg fűféléken táplálkozik, de ugyanúgy előfordulnak fás szárú növények kártevőiként is, nyitva- és zárvatermőkön egyaránt. Vannak köztük polifág (pl. *Planococcus citri*, *Pseudococcus gahani* (Green)), oligofág (pl. *Planococcus vovae* – fejlődése a *Juniperus* nemzetséghez kötött) és monofág fajok is (pl. *Chaetococcus phragmitis* (Marchal), melynek egyedüli tápnövénye a nád (*Phragmites australis* Cav.)) (KOSZTARAB AND KOZÁR, 1988). Nemzedékszámuk változatos, a szabadföldön élő fajoknál alacsonyabb (általában 1-3), üvegházban szaporodó fajok esetén magasabb (6-8 nemzedék évente), valamint ismertek több éven keresztül fejlődő fajok is. A telelés általában tojás vagy lárva alakban történik.

Szaporodhatnak szűznemzéssel (ilyenkor hímek nem, vagy csak kis számban fejlődnek ki) vagy ivarosán, a többség ovipár, de léteznek álelevenszülő fajok is. A tojásprodukció általában 50-200 között van. A fajok többségénél a nőtény a tojásokkal együtt laza vattaszerű viaszszákban könnyen észlelhető a tápnövényen. A nőtényeknél 4, a hímeknél pedig 5 fejlődési stádium ismert.

Kolóniáikat igen gyakran hangyák látogatják, amelyeknek a mézharmat egyszerűen kihasználható, folyamatos táplálékforrás. Azzal, hogy hangyák a mézharmat mennyiségét csökkentik, a korompenész (*Capnodium salicinum* (Mont.)) megtelepedését és továbbterjedését nehezítik, ami előnyös a pajzstetvek számára, hiszen ez a gombafaj megfertőzheti, elpusztíthatja őket (KOSZTARAB AND KOZÁR, 1988).

A pajzstetvek elsősorban passzívan terjednek, szél, illetve madarak és rovarok közreműködésével. Térhódításukban azonban legjelentősebb szerepet a szaporítóanyaggal való széthurcolás játssza. Éppen ezért kiemelten fontos a külföldről érkező áruk folyamatos, alapos ellenőrzése. Északra terjedésüket a felgyorsult kereskedelem, áttelelésüket a klímaváltozás, szabadföldi megtelepedésüket pedig a szűznemzés, illetve a magas termékenység (egy nőtény több száz, sokszor több ezer tojást rakhat) segítheti elő. A fajok monitorozásában támpontot a szexferomon csapdák adnak, melyekkel az állatok rajzása megfigyelhető és tömegszaporodásuk előre jelezhető (SHEBLE AND KOZÁR, 1994).

Az elmúlt és elkövetkező években, az integrált növénytermesztésben a széles hatásspektrumú növényvédőszer - különösen az ingerületvezetés gátlók - használatának fokozatos

csökkenésével, a pajzstetvek feltételezhetően egyre komolyabb károkat fognak okozni. Éppen ezért fontosak a védekezésnél az agrotechnikai módszerek, kiváltképp a fertőzésmentes szaporítóanyag, illetve a kevésbé érzékeny fajták használata, a fertőzés forrásainak gyérítése, szellős korona kialakítása, stb. A súlyos károkat okozó pajzstetű fajok ellen pusztán a biológiai védekezés nem nyújt megfelelő eredményt, mégis nagyon fontos a természetes ellenségek kímélése, esetleges betelepítése az ültetvényekbe. A pajzstetvek elleni vegyszeres védekezés életmódjukból fakadóan nehéz feladat, a technológiai fegyelem betartása és a permetezés idejének helyes megválasztása elengedhetetlen a növényállományok megóvásában (KOZÁR, 1998).

A ScaleNet adatbázisa szerint világszerte 2 247, hazánkban pedig 74 viaszos pajzstetűfajt írtak le; a legismertebb nemzetségek a *Planococcus* (világszerte 44 faj) és a *Pseudococcus* (világszerte 154 faj) (BEN-DOV, 2012). Dolgozatomban a *Planococcus vovae* (Nassonov) és a *Planococcus citri* (Risso) fajokkal foglalkozom.

A *Planococcus* nemzetségre jellemző, hogy 18 pár cerárium (viaszkiválasztó mirigy- és tüskecsoport) található az idetartozó fajok testén, bár előfordulhatnak csökevényes párok a torhoz kapcsolódva.

A *Planococcus citri*-t (viaszos citrom-pajzstetű) 1813-ban írták le, feltehetően Ázsia trópusi területeiről származik (PELLIZZARI, 2010), ám ma már az egész világon elterjedt (BEN-DOV, 2012). Évente akár öt nemzedéke is kifejlődik, Magyarországon szabadföldi körülmények között nem telel át, ám a lakásokban, üvegházakban folyamatosan megtalálható, és kedvező időjárás esetén tömegesen kiszabadulva szabadtéri növényfajokat is fertőzhet. Rendkívül polifág faj, körülbelül 70 növény család fajtát károsítja, hazánkban főleg a dísnövényeket mind szabadföldön, mind üvegházban, különösképp a citrusféléket, babért, pálmaféléket, díszsalánt kedveli, leggyakrabban a leveleken szívogat. Melegebb, szubtrópusi és trópusi vidékeken (pl. Izraelben és Kaliforniában) a déligyümölcs termesztésben okoz komoly károkat (KOZÁR, 1998; MCKENZIE, 1967; MARTIN-MATEO, 1985; WILLIAMS, 1992). Több, esetenként közeli országban is jelentős kártételt okoz szőlőn (MAROTTA, 1978, UYGUN ET AL. 1998, SFORZA ET AL. 2003; PELLIZZARI AND GERMAIN, 2010), ennek veszélye – a faj beltéri felszaporodása, majd kikerülése esetén – hazánkban is fennáll.

A *Planococcus vovae* - magyar nevén boróka-viaszospajzstetű - főleg a Föld palearktikus régiójában elterjedt, ezen kívül észlelték Brazíliában. Hazánkban feltételezhetően egynemzedékes, melegebb országokban több generáció is kifejlődhet egy év alatt. A második stádiumú lárvá telel,

júniusra fejlődnek ki a nőstények, melyek aztán valószínűleg július végén – augusztus elején teszik le tojásaikat, bár ez még tüzetesebb vizsgálatokat kíván.

Főleg a *Cupressaceae* családban károsít, de ritka esetben elfogadja tápnövénynek az *Anthurium*, *Laurus*, *Chamaecyparis* és *Taxus* nemzetségbe tartozó fajokat is (BEN-DOV, 2012), jelenlétük a hajtásokon figyelhető meg. A fertőzött növényeken gyakran együtt van jelen a boróka-pajzstetűvel (*Carulaspis juniperi* (Bouché)). Az utóbbi években a nyitvatermők népszerűsége megnövekedett hazánkban, sok magánkertben, de közparkokban, szállodák, éttermek teraszán is sűrűn találkozhatunk változatos boróka és hamisciprus fajokkal, így a boróka-viaszospajzstetű fertőzések száma is megnövekedett. A kereslet növekedése miatt a faiskolákban, hipermarketek kertészeti részlegeiben, dísnövény árudákban is egyre nagyobb a kínálat a boróka fajokból. Ezeken a helyeken pajzstetvek apró méretük miatt könnyen észrevétlenek maradnak, ez elősegíti terjedésüket. Ráadásul a városi környezet gyakran nem megfelelő ezeknek a növényfajoknak, így legyengülhetnek, védtelenebbé válnak a károsítók támadásával szemben (FETYKÓ, 2010).

5. 2. Morfológiai vizsgálatok

5.2.1. Morfológiai vizsgálatok jellemzői

A fajok elkülönítésére két alapvető eljárás ismert: a határozás lehetséges a morfológiai bélyegek alapján, illetve napjainkban a molekuláris vizsgálatok is egyre nagyobb teret hódítanak. Mindkét technikának megvannak a maga előnyei és hátulütői, elmondható azonban, hogy egymást szervesen kiegészítik.

A fajok meghatározásánál a pajzstetvek esetében több problémával is szembe kell néznünk. Kis méretük és gyakran rejtett életmódjuk nehezíti a felkutatásukat és begyűjtésüket, az elkülönítésük pedig alaposabb vizsgálat nélkül csak a legritkább esetben lehetséges. Ráadásul a besorolást tovább nehezíti, hogy ugyanazok a fajok más-más tápnövényeken eltérő morfológiai tulajdonságokkal rendelkezhetnek (DANZIG, 1961).

A mikroszkópi preparátum készítés a pajzstetvek vizsgálatának hagyományos, jól kidolgozott módja, a gyapjas pajzstetveket a kifejlett nőstények morfológiai bélyegei alapján rendszerezték. Az ilyen vizsgálatokhoz a nőstények kültakaróját helyezzük mikroszkóp tárgylemezre és így vizsgáljuk a tulajdonságait. A preparátumkészítésnek több, alapvetően hasonló módja ismeretes, a jelen kísérletben használtat bővebben az „Anyag és módszer” fejezetben tárgyalom.

A morfológiai vizsgálatok nagy előnye a molekuláris vizsgálatokkal szemben, hogy nem igénylenek speciális vagy drága berendezéseket, a preparátum elkészítéséhez sztereomikroszkóp és egyszerű eszközök (lándzsatű, ecset, szike, stb.) kellenek, a fajmeghatározás pedig fénymikroszkóp segítségével történik. A tárgylemezek korlátlan ideig tárolhatók, erre alkalmas mikroszkóp segítségével róluk képek készíthetők. Fontos szerepet kap azonban a kezűgyesség, gyakorlottság és nem utolsósorban a türelem. Egy szép, jól használható preparátum elkészítése időigényes feladat. A tárgylemezre helyezett mintának a vizsgálat előtt legalább két hétig száradnia kell.

A módszer másik óriási hátránya az időigényességen túl az, hogy kifejlett nőtény állatokhoz kötött, ám előfordulhat, hogy adott időpillanatban nem állnak rendelkezésre ilyen egyedek, lárvákat vagy hím imágókat pedig nem lehet megbízható mikroszkópos fajazonosításra használni. Az anatómiai bélyegeket sokszor nehéz objektíven kiértékelni. További nehézséget jelent, hogy a monitorozásra használt szexferomon csapdák kizárólag kifejlett hím egyedeket vonzanak.

A viaszos pajzstetvek családján belül a rendszerezéshez használt morfológiai bélyegek a következők: állatok mérete; csápízek száma; szipóka alakja, hossza; szűrősertehurok; háti rések megléte; hengeres mirigyek fajtája (csöves, gomba, palack, sugaras); korong alakú mirigyek fajtája (3-, 5-, soksejtű, egyszerűek, rostaszerűek); hasi rés; hátulsó háti rés; ceráriumok (benne serték, mirigyek, kúp alakú tüskék); ivarrés; anális gyűrű; karomsörték; tor légrései (KOSZTARAB AND KOZÁR 1978).

5.2.2. A *Planococcus citri* morfológiai leírása

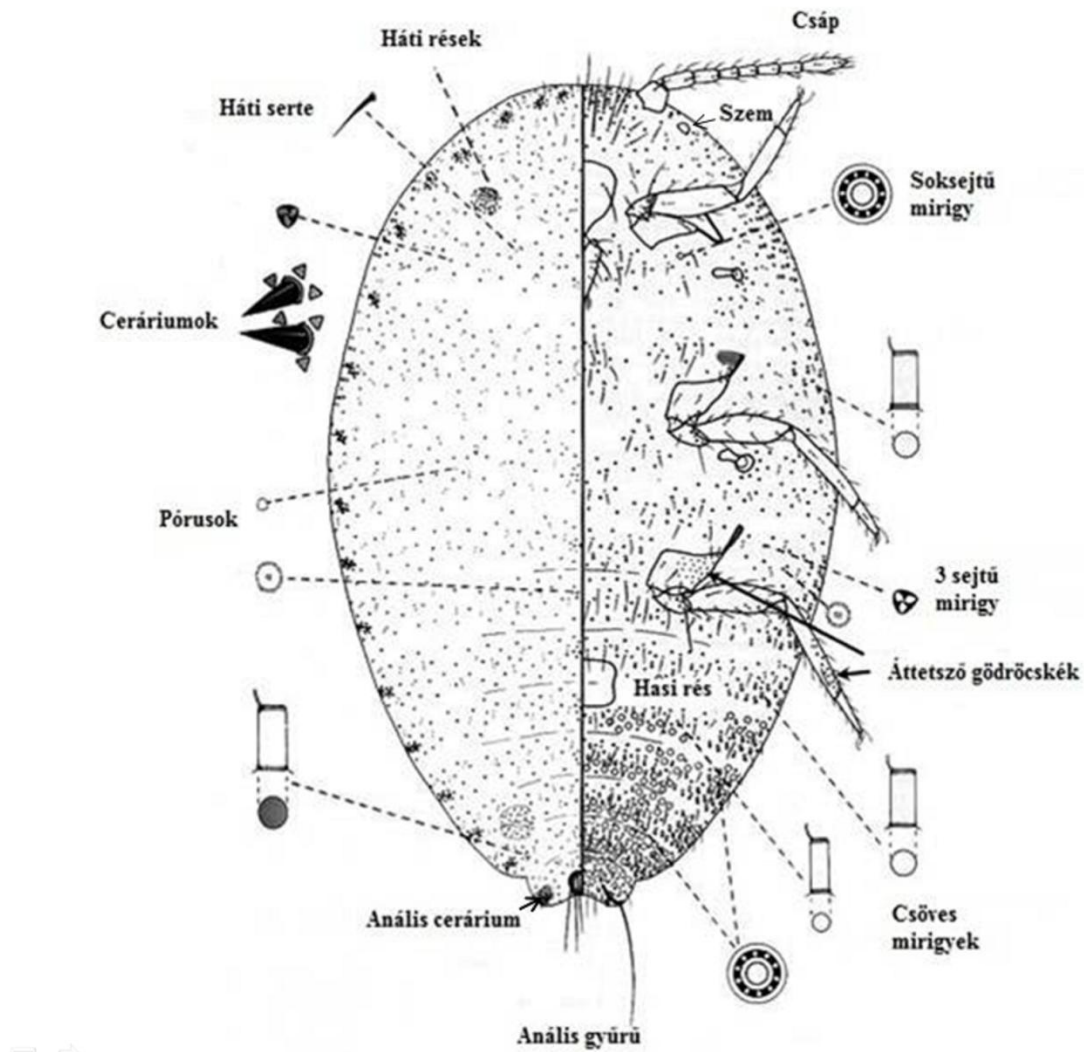
A *Planococcus citri* nőtény imágó ovális, körülbelül 4 milliméter hosszú és 2,8 milliméter széles (KOZÁR, 1998), a viaszréteg alatt átsejlik a rózsaszínes vagy sárgásbarnás test (2. ábra), így a hát csupasz részén láthatóvá válik a középső hosszirányú csík. A test oldalán tizennyolc pár cerárium helyezkedik el, melyek közül a hátulsók rövidebbek. A csápok közt legalább öt darab hengeres mirigy található, a lábon áttetsző gödröcskéket lehet megfigyelni a comb és a lábszár részeken. Egy vagy több hátközépi csöves mirigye van a faj egyedeinek (COX AND BEN-DOV, 1986; WILLIAMS AND DE WILLINK, 1992).



2. ábra: *Planococcus citri* nőtény
(Dr. Szita Éva fotója)

A *Planococcus citri*-t nehezen lehet megkülönböztetni a *Planococcus ficus* (Signoret) és a *Planococcus minor* (Maskell) fajoktól. Emiatt különösen fontos lehet egy megbízható, lehetőség

szerint nem morfológiai alapokon nyugvó faj meghatározási módszer kidolgozása. Ráadásul a viaszos citrom-pajzstetű jelenleg veszélyes kártevőnek minősül, így az azonosítás gyorsabbá, egyszerűbbé tétele igen sürgető. A 3. ábrán láthatjuk a *Planococcus citri* mikroszkópi részletrajzát.



3. ábra: *Planococcus citri* mikroszkópi részletrajza (Forrás: Agricultural Research Service; magyar feliratokkal)

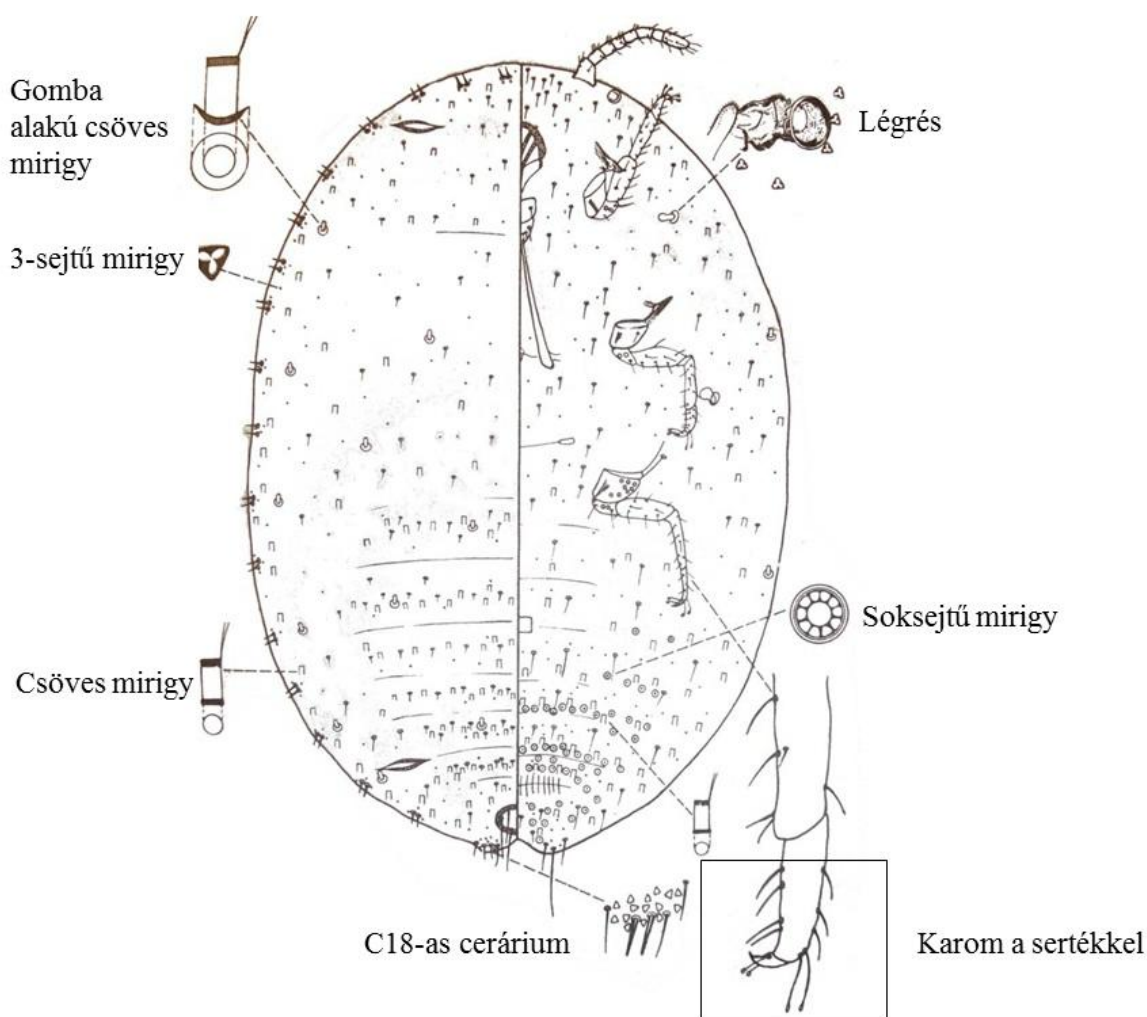
5.2.3. A *Planococcus vovae* pajzstetű faj morfológiai leírása

A *Planococcus vovae* nőténye ovális, barnás színű, körülbelül 3 milliméter hosszú és 1,7 milliméter széles, a test vége mindig látszik a viasz alatt. (4. ábra) (KOSZTARAB AND KOZÁR 1988; MILEK ET AL. 2008).



4. ábra: A *Planococcus vovae* kártétele, nőtény *Planococcus vovae* (Dr. Szita Éva képei)

Ennél a fajnál is megfigyelhető a nemzetségre jellemző tizennyolc pár cerárium, amelyeken két-két tűske található. Ritka esetben csak tizennégy pár cerárium látható. Jól fejlett háti résekkel rendelkezik, hasi résből vagy egy van, vagy hiányzik. Gomba alakú csöves mirigyei elhelyezkedhetnek a háton vagy a hasi oldal szélén, vagy a szegély alatti sávban. A csöves mirigyek a hasi vagy a háti oldal potrohvégi szelvényein vannak. A korong alakú mirigyek közül megfigyelhetünk háromsejtűeket (a test hasi és háti oldalán is) és többsejtűeket (csak a hasi oldalon). A test mindkét oldalán serték találhatók. A csáp legutolsó íze a leghosszabb (KOSZTARAB AND KOZÁR, 1978). Az 5. ábrán láthatjuk a *Planococcus vovae* mikroszkópi részletrajzát.



5. ábra: *Planococcus vovae* átdolgozott mikroszkópi részletrajza KOSZTARAB ÉS KOZÁR 1988-as könyve alapján

5.3. Molekuláris vizsgálatok

5.3.1. Molekuláris markerezés

Ebben az alfejezetben áttekintem a molekuláris markerezés általános jellemzőit, történetét, hiszen a rovartan területén használt eljárások is ezzel párhuzamosan fejlődtek, változtak. Az 5.3.2. *Riboszomális DNS* című fejezetben részletesen foglalkozom az általunk használt, rDNS vizsgálatán alapuló markerezésről.

Molekuláris markernek nevezzük a DNS olyan szakaszait, amelyek a vizsgált egyedek közt különbséget mutatnak, így segítségükkel az egyedek közti változatosság jellemezhető. Ezek az eltérések fenotípusosan nem minden esetben jelentkeznek. Az összes lehetséges szempontból

ideális marker nem létezik, kiemelhetünk azonban előnyös tulajdonságokat és ez alapján, mindig az adott feladathoz igazodva kiválaszthatjuk a megfelelő markerezési technikát. Fontos, hogy a marker kevés mintából könnyen és gyorsan vizsgálható legyen, a vizsgálatokat megbízhatóan tudjuk ismételni, lehetőleg alacsony költségekkel. A marker sokfélesége (polimorfizmus) és a kodomináns öröklődése előnyt jelent. Kiemelten fontos, hogy a markert külső hatások ne befolyásolják, az egész genomban gyakran és konstitutívan jelen legyen (PEDRYC, 2008).

A nukleinsavak vizsgálatán alapuló molekuláris módszerek használatának előnye, hogy a DNS bázissorrendje fejlődési stádiumtól, nemtől, génkölcönhatásoktól és környezeti hatásoktól nagyrészt független. Segítségükkel hímeket, lárvákat, akár tojásokat is megbízhatóan vizsgálhatunk, ami rovarok azonosításakor különösképpen fontos. Kutatási szempontból előnyt jelent objektivitásuk, hiszen az e módon kapott információk általában méret- vagy bázissorrendbeli eltérésként jelentkeznek. Ezen tulajdonságoknak köszönhetően a vizsgálati eredmények könnyen, dokumentálhatók, értelmezhetők, sőt, megbízhatóságuk és ismételhetőségük révén akár felhasználhatók más kutatócsoportok és laboratóriumok számára is.

A DNS-ben környezeti és belső tényezők miatt mutációk alakulnak ki (mutációnak nevezzük a DNS bázissorrendjének végleges megváltozását). A molekuláris markerezés segítségével az így létrejövő változatosság alapján különíthetjük el a vizsgált mintákat. A mutációk létrejöhetnek a genom bármely részében, testi és ivarsejtekben egyaránt, spontán módon vagy mutagének hatására. A mutációk bekövetkezésének valószínűsége a DNS minden szakaszán azonos, ám a helye nagymértékben befolyásolja, hogy a változás megmarad-e (PATTHY, 2008). A háztartási gének (*housekeeping genes*) változása általában letális, kivéve, ha nem befolyásolja kedvezőtlenül a gének működését. Éppen ezért ezekben a régiókban a változás üteme lassú. Ezzel ellentétben, a genom nem kódoló régiójában végbemenő mutációk az életfolyamatokra kisebb hatással vannak, így ezek nagyobb eséllyel maradnak fenn. Nagy általánosságban elmondható, hogy a lassabban változó régiók vizsgálatával olyan fajok közt tehetünk különbséget, amelyek rendszertanilag távolabb állnak egymástól, míg a változékonnyabb szekvenciák jól használhatók rokonfajok, sok esetben fajták közti eltérések kimutatására, elemzésére (HILLIS AND DIXON, 1991).

A legelső, részleteiben kidolgozott DNS alapú molekuláris technika az RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (BOTSTEIN ET AL., 1980)). A folyamat során restrikciós endonukleázokkal emésztik a DNS-t, így különböző hosszúságú DNS szakaszok keletkeznek, amelyeket agaróz gélen elválasztanak, majd nitrocellulóz membránra rögzítenek (ezt a folyamatot nevezzük Southern-blotolásnak (SOUTHERN, 1975)), ezután

izotópokkal jelölt oligonukleotid próbákkal hibridizáltatják. Az eredményt röntgenfilmre helyezve teszik láthatóvá. Az RFLP legnagyobb előnye, hogy semmiféle előzetes ismeretet nem igényel a genomról, a restrikciós endonukleázok (körülbelül száz ilyen enzimet ismerünk) minden faj esetében alkalmazhatók. Hátránya azonban, hogy idő- és munkaigényes és a hibridizációhoz radioaktív izotópot kell alkalmazni.

A molekuláris biológia széleskörű használatát Kary Mullis 1985-ben kidolgozott módszere, a PCR (Polymerase Chain Reaction) technika tette lehetővé. Ez az eredeti, munka- és időigényes eljárás az elmúlt 27 évben, a hőstabil polimeráz (Taq – *Thermus aquaticus*) felfedezésével és az egyre pontosabb és gyorsabb PCR készülékek kifejlesztésével rutin laboratóriumi eljárássá vált. A módszer fontosságát alátámasztja az is, hogy munkásságáért 1993-ban Karl Mullis kémiai Nobel-díjat kapott. A folyamat az *in vivo* körülmények között végbemenő DNS-replikációt „másolja”. Célja, hogy kevés nukleinsavból viszonylag olcsón, megbízhatóan nyerjünk felszaporított DNS szakaszokat. Az RFLP technika után kidolgozott molekuláris markerezési módszerek döntő többsége PCR alapú.

A filogenetikai és populációgenetikai vizsgálatok tárgyául a rovar taxonómusok hagyományosan a mitokondriális DNS-t választják (BEHURA, 2006). Az mtDNS használatának nagy előnye, hogy kizárólag anyai úton öröklődik, nagy számban van jelen (egy átlagos sejt több száz mitokondriumot tartalmazhat), valamint tartalmaz nagymértékben konzervált régiókat, amelyeket univerzális primer párokkal jól vizsgálhatunk (ROEHRDANZ, 1993).

Növekszik a népszerűsége a mikroszatellit markerek használatának is. Az SSR (Simple Sequence Repeat - egyszerű szekvencia ismétlődés, JACOB ET AL., (1991)) régiókban di-, tri-, tetra-, esetleg pentanukleotidok azonos orientációjú elrendeződésben egymást követve ismétlődnek. Az ismétlődések száma fajonként igen változatos, e régiók határszekvenciái azonban nagyfokú konzerváltságot mutatnak, így az ezekre tervezett primerekkel PCR során sikeresen és megbízhatóan szaporíthatók fel a régiók. Ezek főleg közeli rokon fajok vizsgálata esetén bizonyulnak hasznosnak. Nagy előnye a technikának hogy az egyszer már kifejlesztett primerpárok gyakran egy nemzetség vagy család több fajához is használhatók.

Később a rovartan területén is elkezdtek a RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA – véletlenszerűen amplifikált polimorf DNS (WILLIAMS, 1990)) technikát alkalmazni, amelynek nagy előnye, hogy gyors módszer és nem igényel előzetes ismeretet a vizsgált minta bázissorrendjéről. Használata azonban nem széleskörűen elterjedt, mivel nehezen ismételtető, a vizsgálat körülményei befolyásolhatják az eredményeket, ami megnehezíti az objektív kiértékelést.

Az AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – amplifikált fragmentumhossz-polimorfizmus (VOS ET AL., 1995)) technika használatára szintén jellemző, hogy nem kellene hozzá fajspecifikus primerek, így bármely fajra alkalmazható, és – szemben a RAPD módszerrel – jó a reprodukálhatósága.

Egy adott DNS szakasról a legalapvetőbb információt a bázissorrend adja. A nukleinsavak szekvenciák meghatározásának első módszerét Sanger dolgozta ki, 1974-ben. Az azóta eltelt majd négy évtizedben a szekvenálási módszerek elképesztő fejlődésen mentek keresztül. Szerintem érdekes példája a nagymértékű fejlődésnek e területen az exonukleázok segítségével végzett szekvenálás (exonuclease sequencing) (GUO AND WU, 1982). Az elmúlt években az új generációs szekvenáló platformok kifejlesztésével a kutatók előtt olyan lehetőségek nyíltak meg, amelyekkel gyorsan, olcsón, hatalmas mennyiségű adathoz juthatnak.

Ezek a technológiák mind jól adaptálhatóak és széleskörűen használhatóak a rovartan területén, többek közt filogenetikai és populációgenetikai kutatásokban, fajmeghatározásban, rokonsági vizsgálatokban, a rovar-növény illetve rovar-predátor vagy rovar-parazitoid interakciók elemzésében, sőt, akár fosszíliák, múzeumi minták tanulmányozásában is (LOXDALE AND LUSHAI, 1998).

5.3.2. A riboszomális DNS

Mivel a földi élet egyik alapfeltétele a fehérjeszintézis, genomjában minden élőlény rendelkezik azokkal a génekkel, amelyek a riboszómákat felépítő riboszomális RNS-eket kódolják, ezt a régiót nevezzük riboszomális DNS-nek (rDNS). A riboszomális gének megtalálhatók a sejtmagban, a mitokondriumban, plasztiszokban is (HAMBY AND ZIMMER, 1991). A nukleáris riboszomális DNS általában több példányban van jelen, ezek a kópiák elhelyezkedhetnek azonos vagy külön kromoszómán. A szomszédos másolatokat a non-transcribed spacer (NTS, IGS – Intergenic spacer) régió választja el, melynek szerepe a transzkripció erősítése (KOHORN AND RAE, 1982).

A riboszomális RNS gének kódoló és nem kódoló régiókból állnak (6. ábra). A kódoló régió a 18S, az 5,8S és a 28S géneket tartalmazza (GERBI, 1985). A nem kódoló régióban helyezkedik el a két átíródo elválasztó szakasz (Internal Transcribed Spacer, ITS1 és ITS2), az IGS és az external transcribed spacer (ETS).



6. ábra: A riboszómális DNS felépítése

A transzkripció minden génről egyszerre megy végbe, melynek során egyetlen prekurzor-rRNS képződik, ami még tartalmazza a két ITS régiót és az ETS-t is. Később egy utólagos érés során a nem kódoló régiók kivágódnak, és a prekurzor-rRNS-ből három különböző nukleinsav lesz: a 28S (Large Subunit - LSU), amely körülbelül 4000 bázispár hosszúságú, az 5,8S, ami 160 bázispár hosszúságú és a 18S (Small Subunit - SSU), amely nagyjából 1800 bázispár hosszú. Az RNS-ek elnevezése a Svedberg-féle centrifugális ülepedési állandó (S) alapján történik, ezek azt mutatják, hogy a különböző anyagok egy grádiens oszlopon meddig ülepednek, ha nagy fordulatszámon centrifugáljuk őket.

A több kópiában meglévő génekről általában elmondható, hogy gyakran külön-külön fejlődnek, és így az evolúció során egymástól eltérő funkciókra tesznek szert. Az *rRNS* géneknél azonban fellép az együttes evolúció (concerted evolution (ELDER AND TURNER, 1995; ARNHEIM ET AL. 1980)), aminek hatására egy élőlényen belül az rDNS régiók még legváltozékonyabb szakaszaikon sem polimorfak (RUDNÓY, 2007). Ez azért fontos, mert megbízhatóan összehasonlítható eredményeket csak olyan génekről kaphatunk, amelyek egy kópiában vannak jelen, vagy úgy viselkednek.

A riboszómális DNS egyik sajátossága, hogy a nem kódoló és kódoló régiókban bekövetkező mutációk fennmaradásának esélye nagymértékben eltér. Így elmondható, a különböző régiók bázissorrendjének elemzése más-más taxonómiai szintek közti különbségtételre alkalmas. Az érett rRNS-t kódoló DNS szakasz rendkívüli konzerváltságot mutat, hiszen az rRNS-ben végbemenő legkisebb bázissorrend változás is hátrányos lehet az élőlény számára. A riboszómális DNS génjei közül a 18S RNS-t kódoló gén rendelkezik a legalacsonyabb mutációs rátával. A magas konzerváltság miatt a régió vizsgálata alkalmas arra, hogy régen elvált csoportok közötti különbségeket vizsgáljunk, akár törzs vagy osztály szinten (HILLIS AND DIXON, 1991). A

konzerváltság további előnye hogy olyan fajokat is vizsgálhatunk a 18S régióra tervezett primer párokkal, amikről csekély a tudásunk.

Az evolúciós ráta másik véglete az NTS szekvencia változékonysága, ennél egy kicsit lassabb az ITS régió fejlődése. BALDWIN és munkatársai kimondják, hogy az ITS régió főleg pontmutációk során változik, az indelek (inszerció, delécio) aránya kisebb (BALDWIN ET AL., 1995). Nagy variabilitása végett a régió vizsgálata megfelelő lehet alacsonyabb szintű rendszertani kapcsolatok valamint populációk tanulmányozására (BAKKER ET AL. 1992; DUMONT ET AL. 2005). Nagy előnye használatának, hogy az ITS régiók határán nagymértékben konzervált kódoló szekvenciák találhatók, így ezekre univerzális primerek tervezhetők. További pozitívumként említhető a kétszülős öröklődés (ÁLVAREZ AND WENDEL, 2005).

A riboszomális DNS vizsgálatok a filogenetikai kutatások szerves részét képezik, gyökeresen megváltoztatták az élőlények rendszertanát. A különböző régiók – polimorfizmusuk mértékétől függően – éppúgy alkalmasak lehetnek az evolúció során legrégebben (akár a prekambrium alatt) különvált csoportok tanulmányozására, mint egy-egy nemzetség fajai közti különbségtételre, így ezek a markerek rendkívül sokoldalúan felhasználhatók (HILLIS AND DIXON, 1991).

5.3.3. *Pajzstetű fajokon végzett molekuláris vizsgálatok*

DEMONTIS és munkatársai az elsők közt publikálták filogenetikai kutatást a *Planococcus* nemzetségről, 2007-ben. A *Planococcus citri* és *Planococcus ficus* fajhoz tartozó egyedeket feromon csapdák segítségével gyűjtötték, Szardínia szigetén, citrom és szőlő ültetvényekben, majd a mitokondriális DNS *citokróm-oxidáz* génjének (COI) két szakaszát vizsgálták. Az eredményeiket összevetették dél-olaszországi referenciákkal, és korábbi, RAPD markerekkel végzett kísérletek eredményeivel. A különbségeket figyelembe véve két fajspecifikus primer párt fejlesztettek ki, amelyek érzékeny és megbízható markereknek bizonyultak a fajok elkülönítésére (DEMONTIS ET AL., 2007).

RUNG és munkatársai kísérletükben szintén a *citokróm-oxidáz* gént és a sejtmagi DNS *elongációs faktor* génjét vizsgálták. Céljuk az volt, hogy megbízható eszközöket fejlesszenek ki a *Planococcus citri* és a *Planococcus minor* molekuláris fajazonosításához. Mindkét gén bázissorrendje alapján feltételezhető, hogy a Hawaii-szigeteken él egy külön csoport, melynek egyedei különböznek a fent említett két fajtól, annak ellenére, hogy morfológiájuk a *Planococcus citri*-éhez nagyon hasonló. Pusztán a genetikai vizsgálatok alapján azonban nem lehet megmondani,

hogy ezek az egyedek új fajt alkotnak-e. Kimondják, hogy a *COI* gén vizsgálata a morfológiai jellemzők elemzésével kiegészítve jó módszere lehet a két faj elkülönítésének (RUNG ET AL., 2008). Cikkükben hivatkoznak ROSEN ÉS DEBACH korábbi publikációjára, melyben leírják, hogy néhány parazitoid faj a Fémfűrkészek családjából (*Chalcidoidea*) válogat látszólag egy fajba tartozó *Planococcus* egyedek között (ROSEN AND DEBACH, 1977).

CAVALIERI és munkatársai 2008-ban a *Planococcus ficus* és a *Planococcus citri* fajok parazitoid viszonyait vizsgálták, azt remélve, hogy az eredmények a szőlő integrált növényvédelmében hasznosnak bizonyulhatnak. A szerzők felhívják a figyelmet arra is, hogy a két faj nagyfokú morfológiai hasonlósága miatt sürgető probléma az elkülönítéshez megbízható módszereket kidolgozni. Kutatásukban huszonhat *Planococcus* mintát vizsgáltak, RFLP technika alkalmazásával. Minden mintából tíz darab nőtény morfológiai és molekuláris összehasonlítását végezték el. Ezen kívül 128, nőtényekből és lárvákból álló minta DNS-ét elemezték. Az öt felhasznált restrikciós endonukleázból három megfelelőnek bizonyult a két faj egymástól és a kontrolként használt *Pseudococcus longispinus* (Targioni-Tozzetti)-től való elkülönítésére (CAVALIERI ET AL., 2008).

A *Ferrisia* (Fullaway) nemzetséget kívánták jobban megismerni GULLAN és munkatársai, 2010-ben. Ehhez a mitokondriális DNS egy (*citokróm-oxidáz I.*), a sejtmagi DNS két génjét vizsgálták (*EF-1 α* és a *28S D₂D₃*). A kísérletben outgroup fajként a *Planococcus citri* szerepelt, három másik gyapjas pajzstetű fajjal. A *Ferrisia* fajok rendszertana máig vitatott, 1996-ig tíz fajt írtak le, azonban GULLAN és munkatársai egy 2003-ban megjelent cikke alapján feltételezhető, hogy az addig morfológiai vizsgálatok alapján egy fajnak vélt *Ferrisia virgata* (Cockerell) valójában több rokon fajt tartalmazó taxon. 2010-ben GULLAN és munkatársai a molekuláris vizsgálatok során kapott adatok alapján dendrogramot készítettek, melyben a *Ferrisia virgata* minták 6, jól elkülönülő kládot alkottak. Ami igazán érdekessé teszi ezt a publikációt, az az, hogy a kutatócsoport a molekuláris markerezés során kapott eredmények alapján új morfológiai bélyegeket írt le a nemzetség fajainak elkülönítéséhez, így a munkásságuk jó példa arra, hogy a hagyományos morfológiai módszer és a genetikai vizsgálat egymástól nem idegenek, sőt jól kiegészítik egymást.

MALAUZA és munkatársai kutatásuk során a *Planococcus citri* és más, világszerte elterjedt pajzstetű fajok öt DNS régióját (köztük az ITS2 régiót) elemezték PCR technika használatával. Kiértékelték a markerek használhatóságát, Franciaországból és Brazíliából származó - összesen 239 - minta feldolgozásával. A molekuláris eredményeket a korábban elvégzett morfológiai vizsgálatokkal vetették össze. Elmondható, hogy a markerek egyértelműen

különbséget tudtak tenni még a közeli rokonságban álló fajok között is (így például a *Planococcus minor* és *Planococcus citri* esetében) (MALAUSA ET AL, 2010).

PARK és munkatársai 2011-ben nagyszabású kutatási eredményekről számoltak be. A kagylós pajzstetvek (*Diaspididae*) és a viaszos pajzstetvek családjából összesen 75 fajt vizsgáltak 35 családból, a *Pseudococcidae* család esetében a minták több mint 90%-áról értékes eredményt kaptak. Cikkükben kimondják, hogy kutatásaik segíthetnek új DNS vonalkód adatbázisok létrehozásában és nagyban hozzájárulhatnak a pajzstetvek azonosításának megkönnyítéséhez (PARK ET AL., 2011).

Magyarországon a viaszos pajzstetvek molekuláris vizsgálatával a MTA ATK Növényvédelmi Kutató Intézetében foglalkoztak, DR. KOZÁR FERENC, DR. TÓBIÁS ISTVÁN és FETKŐ KINGA. Az első, 2010-es kutatásnak több célja volt; egyrészt vizsgálni három pajzstetű faj (*Planococcus citri*, *Planococcus ficus*, *Pseudococcus comstocki*) európai elterjedését, másrészt tanulmányozni a fajok genomját, valamint a kapott eredmények alapján összehasonlítani a hímek és a nőstények molekuláris jellemzőit. A mintavételeknél több országban kihelyezett feromon csapdákat használtak (2009 és 2010 vizsgálati években: Ausztria, Szlovákia, Szerbia, Görögország, Macedónia, Magyarország). Szabadföldi körülmények között a csapdák egyedül Görögországban fogtak *Planococcus citri* egyedeket, a többi országban valószínűleg üvegházból kikerült állatokat találtak a csapdákból. Feltételezhető ezek alapján, hogy ez a faj hazánkban nem telel át.

A *Planococcus citri* faj esetében az ITS2 szekvenciák 773 bázispár hosszúságúak voltak, és a feldolgozott minták 99-100%-os hasonlóságot mutattak, függetlenül attól, hogy melyik országból származtak. Az ITS2 régió nagy változatossága miatt lehetséges fajspecifikus primer párok kifejlesztése (TÓBIÁS ET AL., 2010). 2011-ben a kutatócsoport ugyanezen fajok vizsgálata során mindegyikre külön-külön fajspecifikus indítószekvenciákat tervezett (TÓBIÁS ET AL. 2011a), amit a következő kísérletben már használtak is (TÓBIÁS ET AL. 2011b).

6. Anyag és módszer

6.1. Vizsgált minták

Kísérleteinkben kétféle mintát használtunk; egyrészt terepről gyűjtött élő egyedek, másrészt, különböző helyeken kihelyezett csapdák által elejtett hím imágók képezték az alapsokaságot. A felhasznált minták adatait az 1. táblázatban tekinthetjük meg.

A vizsgálatokhoz a fertőzött növényi részeket a 2012-es év márciusától májusáig gyűjtöttük. A begyűjtött élő egyedeket vagy még a gyűjtés napján, vagy pár napos hűtőben tárolás után a fertőzött részekkel együtt sűrű hálóval fedett befőttesüvegbe helyeztem. A pajzstetvek táplálékként csíráztatott burgonyagumókat kaptak, így a rovarok kezdeti stádiumától függően két-három hét alatt jelentek meg a nőstény imágók, amelyeket utána a preparálásig 95%-os alkoholban tároltam.



7. ábra: A feromon csapda

A szexferomonos csapdákat Budaörsre és Pozsonyba május 29-én helyeztük ki, a beszedésükkel augusztus harmadikáig vártunk. A felhasznált csapdák leírása: 10x10 cm-es nagykovácsi tetőcsapda, Soveurode (Witasek Pflanzenschutz GmbH, Ausztria) ragasztóval és Biochemtech (Biochemtech Ltd. Kishinev, Moldávia) feromon csalétekkel (7. ábra).

A morfológiai és molekuláris vizsgálatot ugyanazon egyedeken végeztük. Preparálás előtt kinyomtuk a testnedveket, amelyekből kivontuk a DNS-t. Az állat bőrét pedig 95%-os alkoholban tartósítottuk preparálásig. Ezt azért tehettük meg, mert a morfológián alapuló fajazonosításhoz nincs szükség az állat belsejére.

1. táblázat: A feldolgozott minták adatai

	Faj	Nem (N/H)	Gyűjtés helye	Tápnövény	Gyűjtés dátuma	Megjegyzés
1	Planococcus citri	Nőstény	BCE	Platycerium bifurcatum	2012.03.30.	Tenyésztetből, alkoholban tárolt
2	Planococcus citri	Nőstény	BCE	Chamaedorea elegans	2012.03.30.	Tenyésztetből, alkoholban tárolt
3	Planococcus citri	Nőstény	Füvészkert, szaporítóház	Phoenix canariensis	2012.03.30.	Tenyésztetből, alkoholban tárolt
4	Planococcus citri	Nőstény	Pomáz	Anthurium sp.	2012.03.20.	Tenyésztetből, alkoholban tárolt
5	Planococcus citri	Nőstény	Gödöllő	Manilkara zapota	2012. 05.02.	Tenyésztetből, élő példány
6	Planococcus citri	Nőstény	Füvészkert, áruda	Radermachia sp.	2012.05.08	Tenyésztetből, élő példány
7	Planococcus citri	Hím	Budapest, Ferencváros	-	2012.05.29.- 2012.08.03.	Feromoncsapda
8	Planococcus vovae	Nőstény	Budapest, Ferencváros	Chamaecyparis sp.	2012.05.29.- 2012.08.03.	Élő példány
9	Planococcus vovae	Hím	Pozsony	-	2012.05.29.- 2012.08.03.	Feromoncsapda

6.2. Morfológiai vizsgálatok

A preparáláshoz KOSZTARAB MIHÁLY és KOZÁR FERENC 1978-as könyvében leírt módszert alkalmaztuk, kisebb módosításokkal. A preparátum elkészítésének lépései a következők:

- A frissen begyűjtött egyedeket először 95%-os alkoholba helyeztük, körülbelül két órára. Ha a minta alkoholban tárolt volt, akkor rögtön a második lépéssel kezdtük a preparálást.
- Az egyedeket ezután 10%-os kálium-hidroxid fürdőbe tettük és nagyon óvatosan melegítettük. Ez a lépés addig tart, amíg az állat belső részei felpuhulnak, kitisztulnak, ez körülbelül 10-15 perc. Nagyon fontos a folyamatos figyelem, ha túl gyorsan melegítjük őket, illetve ha felforr az oldat, az állatok bőre roncsolódhat. Az edénykéket le kell takarni, hogy megakadályozzuk a párolgást.
- Ha az állat kellőképpen felpuhult, a maradék belső részeket nagyon óvatosan eltávolítottuk, majd a bőrt alkoholba helyeztük, ahol 10-15 percet pihenni hagytuk.
- Ezután 1-2 csepp Essig festőoldatba tettük az állatokat 10-15 percre. A festőoldat 85%-os tejsav, ecetsav, fenol és desztillált víz 20:4:2:1 arányú keveréke.
- A felesleges festéket újabb alkoholos fürdő során mostuk ki, melynek időtartama 5-10 perc.
- Ezután a minták minimum 30 percig szegfűszegolajban álltak.

- A preparálás utolsó lépéseként az állatokat a tárgylemezre cseppentett kanadabalzsamba helyeztük, majd a fedőlemezzel takartuk.

Az így elkészült preparátumokat a fénymikroszkópos vizsgálat előtt két hétig szobahőmérsékleten kell szárítani.

A fajmeghatározást Olympus BX40 mikroszkóp segítségével végeztük, ezután pedig a Budapesti Corvinus Egyetem Rovartani Tanszékén fényképeztük őket.

6.3. Molekuláris vizsgálatok

6.3.1. DNS-kivonás

A DNS-kivonáshoz élő vagy alkoholban tárolt nőstények testnedvét használtuk, a feromon csapdákából szedett hímek esetén pedig az egész imágót. Ezután, a gyártó előírásainak megfelelően használtuk a REDExtract-N-AmplTM Tissue PCR Kitet (Sigma).

6.3.2. PCR analízis, PCR termék tisztítása

Az ITS2 régió amplifikálásához a CAS5p8sFc és CAS28sB1d primerpárt használtuk (KIM AND LEE, 2008). A polimeráz láncreakciót Eppendorf-PCR (Eppendorf Mastercycler Gradient) készülékben végeztük. A PCR reakció összetételét a 2. táblázat mutatja. A 3. táblázatban láthatók a PCR reakció ciklusainak lépései. A denaturáció, kitapadás és lánchosszabbítás szakaszok negyvenszer ismétlődtek. Ha nem vettük ki rögtön a mintákat, a készülék négy fokra hűtötte és így tárolta őket.

2. táblázat: A PCR elegy összetétele

Összetevők	Bemért mennyiség (µl)
PCR puffer (KCl)	2,50
MgCl ₂	2,50
dNTP	1,00
Forward primer	0,50
Reverse primer	0,50
Taq polimeráz	0,25
Templát DNS	0,50
MQ víz	17,00
Össztérfogat (µl)	24,75

A primerek szekvenciái:

CAS5p8sFc: (5'-GCGAACATCGACAAGTCGAACGCACAT-3')

CAS28sB1d: (5'-TTGTTTTCTCCGCTTATTAATATGCTTAA-3')

3. táblázat: A PCR program

Szakasz neve	Hőmérséklet (°C)	Szakasz hossza (perc)
Elődenaturáció	95	4
Templát denaturációja	95	0,5
Primerek kitapadása	50	0,5
Lánchosszabbítás	72	1
Befejező polimeráció	72	10

A PCR sikerességét gélelektroforézissel ellenőriztük. Majd a fragmenteket a PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid) segítségével izoláltuk, a folyamatot a gyártó előírásai szerint végeztük.

6.3.3. Klónozás

- Előkészítés: 7 µl tisztított fragmenthez 1 µl blunting enzimet és a végtérfogatnak megfelelő vízzel és pufferrel kiegészítettük az elegyet. Ezután 70°C-on 5 percig inkubáltuk az elegyet, majd 2 percre jégre tettük.
- Ligálás: Az így már tompa véggel rendelkező terméket a Fermentas utasításai szerint 1 µl Clonejet klónozó vektorba ligáltuk 1 µl T4 DNS-ligázzal. A ligálási reakciót 3-4 órán keresztül szobahőmérsékleten végeztük.
- Klónozás: Minden egyes ligátumból 10µl-t beleraktunk 50 µl-nyi, előzőleg jégen felolvasztott *E. coli* kompetens baktérium törzsbe, majd jégen 20-30 percig inkubáltuk együtt. Az inkubálás után 1 perces 42 °C-os hőshockot alkalmaztunk, majd 450 µl antibiotikum-mentes, folyékony táptalaj (LB folyékony táptalaj) hozzáadása után 1 órán keresztül 37°C-on indító inkubálást végeztünk. Az indítókulturából 150 és 300 µl-t egy-egy ampicillines LB lemezre szélesztettünk és 37°C-on overnight inkubáltuk.
- Fragmentenkét 5 telepből kolónia PCR-t csináltunk, ehhez a Fermentas által tervezett Pjet reverse 1.2 és Pjet forward 1.2 primereket használtuk. Ezt követően 2 ml antibiotikumos folyékony táptalajba leoltottuk a megfelelő telepeket és rázatva, 37°C-

on overnight inkubáltuk. Másnap a folyékony kultúrából a plazmidot a High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) segítségével tisztítottuk ki a gyártó előírása alapján.

6.3.4. Szekvenálás, bioinformatikai elemzések

A mini prepekből tisztított, vizsgálni kívánt fragmentet tartalmazó mintákból 10 µl-t küldtünk el a Baygen cégnek Szegedre, kapilláris szekvenálásra. A filogenetikai fát a MEGA 3.1 szoftver segítségével készítettük, bootstrap analízissel, 1000-es ismétlésben.

7. Eredmények és megvitatásuk

7.1. Morfológiai vizsgálatok eredményei

Morfológiai vizsgálataink során a *Planococcus citri* nőtények általunk megfigyelt és a szakirodalom által leírt határozó bélyegeit használtuk (COX, 1983, COX AND BEN-DOV 1986; WILLIAMS AND DE WILLINK 1992). A faj ismertető bélyegei:

- két csáp közötti csöves mirigyek száma;
- első légrés melletti csöves mirigyek száma;
- áttetsző pórusok jelenléte vagy hiánya a harmadik pár láb csípőjén;
- többsejtű mirigyek száma különböző testszelvényeken, első légrés mellett.

Mivel a vizsgált egyedeinknek mindkét oldala csak jó esetben maradt ép, jól követhető, számszerűsíthető, mérhető bélyegeket, jellegzetességeket igyekeztünk kiválasztani. A csöves mirigyek csoportjai könnyen azonosíthatók az első és második légrés közvetlen környezetében. Ennek mennyiségét darabszámban adtuk meg. A két érték a jobb és baloldalt jelképezi. A harmadik pár láb csípőjén levő átlátszó pórusoknak a jelenléte vagy hiánya is könnyen követhető bélyeg. Mivel bizonyos mintáknál az anális nyúlványserte rövidebbnek tűnt, ezért ennek a hosszát is figyelembe vettük. Vizsgáltuk továbbá az első légrés fölött soksejtű mirigyek számát. A morfológiai megfigyeléseket és méréseket a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat: *Planococcus citri* minták vizsgált morfológiai adatai

Minta	1. légrés csöves m./db. B-J	1. légrés- soksejtű m./db. B-J	2. légrés csöves m./db B-J	3. coxa - áttetsző pórusok +/-	Fejtor- csöves m./db.	Anális nyúlványserte hossza µm	Állapot
FK áruda	10-9	1-3	1-5	+	18	273,6	roncsolt
Gödöllő	6-3	0-0	1-2	+	7	(letört)	roncsolt
Pomáz	8-7	2-0	4-3	+	8	266,4	jó
FK szap. ház	7-7	0-0	4-6	+	6	235,2	jó
BCE1	4-6	0-0	2-3	+	7	232,8	roncsolt

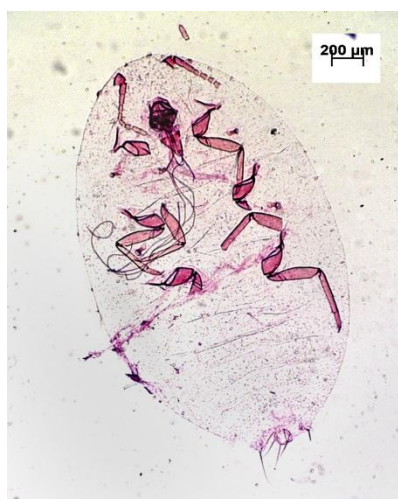
Magyarázat a táblázathoz:

- légrés csöves m./db. – 1. légrés melletti csöves mirigyek száma
- légrés - soksejtű mirigyek – 1. légrés fölötti soksejtű mirigyek száma
- légrés csöves m./db - 2. légrés melletti csöves mirigyek száma
- B/J – bal/jobbs oldal
- 3. coxa - áttetsző pórusok – 3. láb pár csípőjén áttetsző pórusok jelenléte
- Fejtor-csőves m./db. – két csáp között található csöves mirigyek száma
- Anális nyúlványserte hossza – anális nyúlványserte hossza mikrométerben (µm)

Az általunk vizsgált egyedek morfológiai jellemzői a *Planococcus citri* fajleírásának megfelelnek. A preparátumaink, bár mutatnak morfológiai különbségeket, mind *Planococcus citri*-k. A preparátumok minősége a bőrbe ágyazott struktúrák megfelelő azonosíthatósága szempontjából döntő jelentőségű. Bizonyított, hogy a lárva fejlődése során a változó hőmérsékleti viszonyok hatással vannak a különböző mirigyek (csöves, soksejtű) végleges darabszámára (COX, 1983). Ezért fontosnak tartjuk azt, hogy a közeljövőben vizsgálatainkat, lehetőség szerint, szabályozott környezeti feltételek mellett kinevelt egynőstényes tenyészvonalak egyedein is elvégezzük.



8. ábra: *Planococcus citri* mikroszkópi preparátuma



9. ábra: A *Planococcus vovae* mikroszkópi preparátuma

A *Planococcus vovae*-ből csupán egy mikroszkópi preparátum állt rendelkezésre. Ennek morfológiai bélyegeit összevetettük a szakirodalom által közölt adatokkal, ez alapján kijelenthető, hogy ez a nőstény valóban egy boróka-viaszos pajzstetű.

Mindkét faj egy-egy mikroszkópos preparátumáról készítettünk képet. Ezek a 8. és 9. ábrán láthatók.

7.2. Molekuláris vizsgálatok eredményei

7.2.1. Az ITS2 régióra tervezett primer párok alkalmasságának vizsgálata *Planococcus* fajok esetében

A DNS-kivonási módszer alkalmas volt arra, hogy kellő mennyiségű és minőségű DNS-t kinyerjünk a mintákból, függetlenül attól, az egyedek élők vagy alkoholban tároltak voltak. A feromoncsapdáról leszedett hímekből is sikerült elegendő DNS-t kivonni.

A primerpár alkalmasnak bizonyult az ITS2 régiók felszaporítására, így kimondható, hogy megfelelően használható a *Planococcus* nemzetség fajainak vizsgálatához.

A *Planococcus citri* esetében 774 vagy 775 bázispár hosszúságú fragmenteket kaptunk. Ezek az értékek igen közel állnak egy 2011-ben, szintén a Növényvédelmi Intézetben végzett kutatás eredményeihez, amelyben a *Planococcus citri* mintákból felszaporított ITS2 szekvenciák 773 bázispár hosszúságúak voltak (TÓBIÁS ET AL., 2011a).

A *Planococcus citri* szexferomonos csapdák feldolgozásakor váratlan fejleményként tapasztaltuk, hogy a befogott *Planococcus citri* egyedek közül több is a *Planococcus vovae* fajhoz tartozott valójában, amire a molekuláris vizsgálatok során derült fény. A két faj hímjei sztereomikroszkóppal szemlélve morfológiailag feltűnően hasonlóak. A *Planococcus vovae* faj szexferomona nem ismert. Messzemenő következtetéseket ebből a fogásból levonni nem lehet. A rovarok biológiájában nem példátlan hogy egy feromont több rokon faj is vonzónak talál (TÓTH ET AL., 1994). Szükséges megemlíteni azonban, hogy a szóban forgó csapdák egy budaörsi nagyáruház közelében kerültek kihelyezésre, így az is könnyen elképzelhető, hogy a *Planococcus vovae* egyedek véletlenül repültek bele a csapdákba.

A *Planococcus vovae* fajnak egy nőtény és egy feromon csapdával fogott hím egyedét vizsgáltuk. A hím esetében 781, a nőténynél 788 bázispár hosszúságú allélt kaptunk.

A fragmenteket párosával összehasonlítottuk az NCBI (National Center for Biotechnology Information) honlapján található BLASTN 2.2.27 program segítségével (STEPHEN ET AL., 1997). Az azonosság mértékét az 5. táblázatban ábrázoltuk. A *Planococcus vovae* minták kékkel, a *Planococcus citri* minták pirossal szerepelnek a táblázat első sorában és oszlopában.

A két *Planococcus vovae* minta egymástól genetikailag alig különbözik, a bázispárok sorrendje 99,64%-os azonosságot mutatott. A bázissorrendet összevetettem az NCBI honlapjára feltöltött szekvenciákkal is. Az egyezés az adatbázisban szereplő *Planococcus vovae* szekvenciákkal minden esetben 94% feletti volt. Például a BELTRÀ és munkatársai által közölt bázissorrenddel összehasonlítva a Budaörsről származó *Planococcus vovae* hím ITS2 szekvenciái 99%-os egyezést mutattak.

A *Planococcus citri* minták esetében a fajon belüli variabilitás minden esetben fél százalék alatt volt. Az NCBI adatbázisában szereplő adatokkal összevetve is igen nagy volt az egyezés.

A táblázatból kiolvasható, hogy a *Planococcus citri* és *Planococcus vovae* fajok közti azonosság 82-90% közt mozgott.

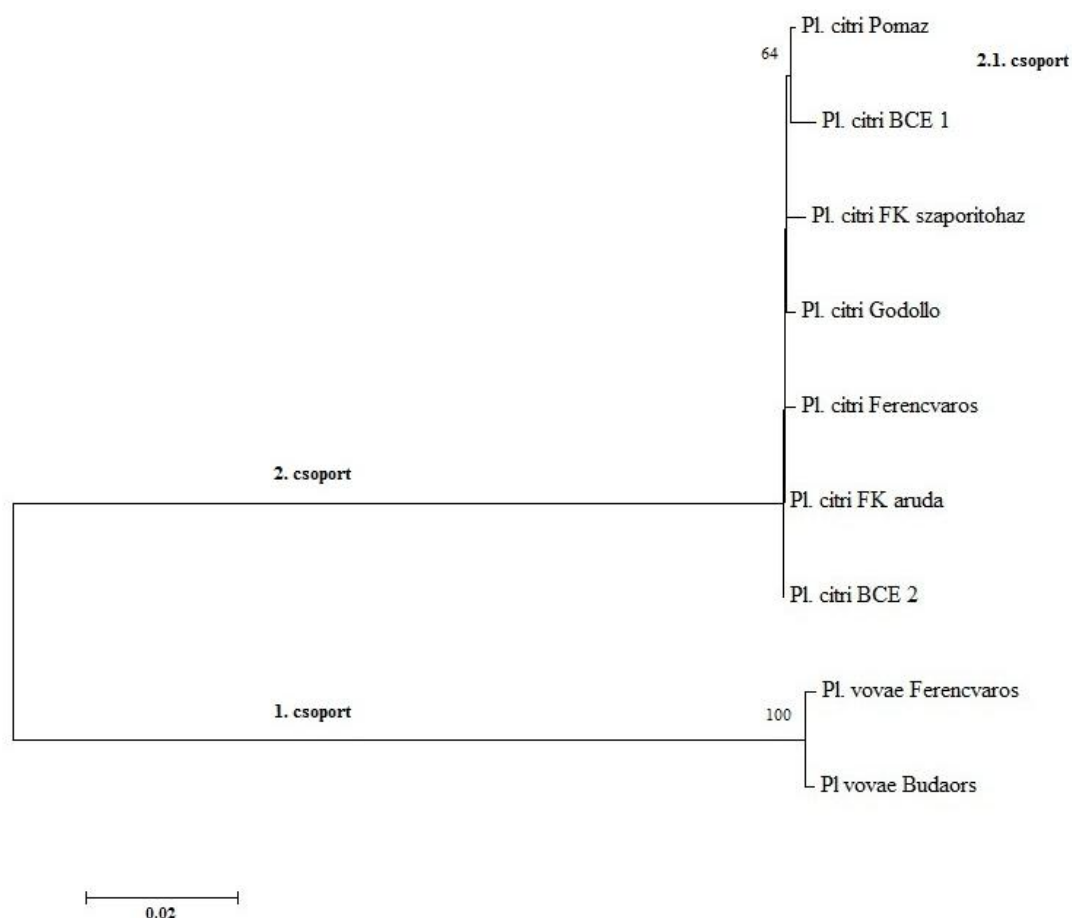
Elmondható tehát, hogy a két fajon belül a variabilitás minimális, függetlenül az állat nemétől és a minta földrajzi eredetétől. A két faj közti bázissorrendbeli különbség azonban elegendő a megbízható fajmeghatározáshoz.

1. táblázat: A *Planococcus citri* és *Planococcus. vovae* faj ITS2 szekvenciáinak összevetése

	BCE 1	BCE 2	FK szapház	Pomáz	Gödöllő	FK áruda	Ferenc tér	10659	Budaörs
BCE 1	-	99,76%	99,64%	99,76%	99,64%	99,52%	99,63%	89%	90%
BCE 2	-	-	99,76%	99,88%	99,88%	99,76%	99,87%	83%	82%
FK szapház	-	-	-	99,64%	98,80%	99,52%	99,64%	83%	82%
Pomáz	-	-	-	-	99,76%	99,64%	99,76%	83%	82%
Gödöllő	-	-	-	-	-	99,64%	99,76%	83%	82%
FK áruda	-	-	-	-	-	-	99,64%	83%	82%
Ferenc tér	-	-	-	-	-	-	-	83%	82%
10659	-	-	-	-	-	-	-	-	99,64%
Budaörs	-	-	-	-	-	-	-	-	-

7.2.2. A minták egymáshoz viszonyított genetikai távolsága

A klaszterezés egy mintahalmaz pontjainak csoportba sorolását jelenti. A folyamat eredményeképpen jön létre az úgynevezett dendrogram, a csoportosítás alapját az elemek különbözősége vagy hasonlósága képezi. A filogenetikában a fajok genotípusbeli hasonlóságát jellemzik vele, ennek mértékét egy nullától egyig terjedő skálán mérik (NEI, 1978). Eredményeinkből a MEGA 5.1 program segítségével két pajzstetű faj kölcsönös genetikai távolságát reprezentáló dendrogramot szerkesztettünk (10. ábra).



10. ábra: A vizsgált minták rendszerezése a Nei genetikai távolságmátrixon alapuló UPGMA klaszteranalízissel (NEI, 1978)

A vizsgált minták két jól elkülönülő csoportot alkottak, melyek közül az egyikbe a *Planococcus vovae* (1), másikba pedig a *Planococcus citri* (2) egyedei kerültek. Kimondható hogy ez a két klád egyértelműen elkülönül, támogatottságuk 100%-os. Viszont a két csoporton belül az egyes minták közeli kapcsolatban állnak egymással. A 2.1-es csoportba tartozó két egyed láthatóan elkülönül a többi *Planococcus citri* mintától, ennek oka ismeretlen. Érdekes, hogy a két állat morfológiai jellemzői nem mutatnak jelentős hasonlóságot egymással, valamint nem különböznek markánsan a többitől.

7.3. Morfológiai és genetikai vizsgálatok összevetése

A kevés mintaszám ellenére gyorsesztek kifejlesztéséhez a morfológiai jellemzők fajon belüli változatossága elegendő lehet. Több helyről származó, több tápnövényről szedett *Planococcus citri* egyedet is bevontunk a kísérletbe. Elmondható, hogy a fenotípusos változatosság

ellenére a molekuláris vizsgálatok igen magas hasonlóságot mutattak. Így ez a szekvencia megbízható eszköz lehet a faj felismeréséhez. A molekuláris és morfológiai vizsgálatok mindkét faj esetében ugyanarra az eredményre vezettek.

8. Összefoglalás

A pajzstetvek leírása és a határozókulcsok hagyományosan morfológiai bélyegek alapján készülnek, a pontos fajazonosításnak azonban megvannak a maga korlátai. A fajmeghatározás nemhez és fejlődési stádiumhoz kötött, és a preparálás embert próbáló feladat.

A *Planococcus citri* faj folyamatosan jelen van a dísznövény piacon, vírusok vektora. A faj azonosítása nehézkes, ha a klasszikus módszereket alkalmazzuk, viszont könnyen és gyorsan megoldható lenne egy fajsinten azonosító molekuláris módszer kidolgozásával. A *Planococcus vovae* egy Magyarországon jegyzett őshonos faj, ami az elmúlt években egyre gyakrabban kerül elő városi nyitvatermőkről. A két fajt jelen esetben az köti össze, hogy a *Planococcus citri* feromon csapdákból *Planococcus vovae* hímeket találtunk.

A primerpár alkalmasnak bizonyult az ITS2 régiók felszaporítására, így kimondható, hogy megfelelően használható a *Planococcus* nemzetség fajainak vizsgálatához. Eredményeink alapján elmondható, a kiválasztott molekuláris vizsgálat alkalmas a fajmeghatározásra, a szekvenciák alapján rajzolt dendrogramon a két faj egyértelműen és markánsan elkülönül egymástól.

Jövőbeli terveink közt szerepel a *Planococcus vovae* faj behatóbb vizsgálata. Ez az állat mind gyakrabban tűnik fel városi környezetben boróka és hamisciprus növényeken, így a részletesebb megismerése kívánatos. A két fajt a véletlenek összjátéka hozta kapcsolatba, mivel egyes *Planococcus citri* szexferomon csapdákból *Planococcus vovae* egyedeket találtunk.

Azért, hogy mind a morfológiai, mind a molekuláris vizsgálatokat megbízhatóbbá tegyünk, a jövőben kipróbáljuk az egynőstényes tenyésztési vizsgálatát, melyeket szabályozott körülmények között, klímakamrában tartanánk.

Ez az alapkutatás gazdasági és növényvédelmi vonatkozásban igen fontos, az előzetes eredményeink jól mutatják, hogy a *Planococcus* nemzetség vizsgálatával a jövőben is érdemes foglalkozni.

9. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőimnek, **Fetykó Kingának, Dr. Kozár Ferencnek és Dr. Tóbiás Istvánnak** folyamatos támogatásukért, hasznos tanácsaikért és a dolgozatom megírásában nyújtott önzetlen segítségükért.

Köszönetet mondok belső témavezetőmnek, **Dr. Pénzes Béla** egyetemi tanárnak, a Budapesti Corvinus Egyetem Rovartani tanszék vezetőjének, aki kutatómunkámhoz biztosította a feltételeket és lehetővé tette a kapcsolatot a közreműködő intézménnyel.

Köszönöm a **kutatóintézet összes dolgozójának** kedvességét, barátságos hozzáállását és laboratóriumi munkám során nyújtott segítségét, külön kiemelve **Fetykó Kingát és Konczné Benedicty Zsuzsannát**, akik bevezetettek a preparátumkészítés és kiértékelés rejtelseibe, és akikhez szakmai kérdésekkel mindig fordulhattam.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Honfi Péternek, Dr. Kozár Ferencnek, Dr. Pénzes Bélának, Dr. Salamon Pálnak és Hoffmann Orsolya Ivettnek**, akik a vizsgálataimhoz nélkülözhetetlen minták egy részét a rendelkezésemre bocsájtották.

A mikroszkópi preparátumok fényképezésében nyújtott segítséget köszönöm **Tempfli Baláznak és Varga Máténak**.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom **családomnak és barátaimnak**, amiért mellettem álltak, türelmükkel és támogatásukkal nyugodt körülményeket biztosítottak egyetemi tanulmányaimhoz és a dolgozatom elkészítéséhez.

10. Irodalomjegyzék

- 1) Afifi S.A. 1968. Morphology and taxonomy of the adult males of the families Pseudococcidae and Eriococcidae: Homoptera: Coccoidea. London. British Museum (Natural History).
- 2) ÁLVAREZ, I. AND WENDEL, J.F. 2005. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29. évf. p. 417–434.
- 3) ARNHEIM, N., KRYSTAL, M., SCHMICKEL, R., WILSON, G., RYDER, O., ZIMMER, E. 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on non-homologous chromosomes in man and apes. *PNAS*. 77. évf. p. 7323–7327.
- 4) BALDWIN, B.G., SANDERSON, M.J., PORTER, J.M., WOJCIECHOWSKI, M.F., CAMPBELL, C.S., DONOGHUE, M.J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard* 82. évf. p. 247-277.
- 5) BAKKER, F. T., OLSEN, J. L., STAM, W. T., VAN DE HOEK, C. 1992. Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) define discrete biogeographic groups in *Cladophora albida* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 28. évf. p. 839–845.
- 6) BEHURA, S.K. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*. 15. évf. p. 3087-3113.
- 7) BEN-DOV, Y., 2012. ScaleNet: a database of the scale insects of the world.
<http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>
- 8) BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32. évf. p. 314-331.
- 9) CAVALIERI, V. MAZZEO, G., GARZIA, G.T., BUONOCORE, E., RUSSO, A. 2008. Identification of *Planococcus ficus* and *Planococcus citri* (Homiptera: Pseudococcidae) by PCR-RFLP of COI gene. *Zootaxa* 7. évf. p. 65–68.
- 10) COX, J. 1983. An experimental study of morphological variation in mealybugs (Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae). *Syst. Entomol.* 6. évf. p. 47-53.

- 11) COX, J., BEN-DOV, Y. 1986. Planococcine mealybugs of economic importance from the Mediterranean Basin and their distinction from a new African genus (Hemiptera: Pseudococcidae). Bull. ent. Res. 71. évf. p. 481-489.
- 12) DANZIG, E.M. 1961. Food forms of Eulecanium franconicum (Lndgr.) (Homoptera, Coccoidea). Entomol. Obozr. 40. évf. p.571-576.
- 13) DEMONTIS, M.A., ORTU, S., COCCO, A. LENTINI, A., MIGHELI, Q. 2007. Diagnostic markers for *Planococcus ficus* (Signoret) and *Planococcus citri*(Risso) by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction and species-specific mitochondrial DNA primers. Journal of Applied Entomology. 131: 59-64.
- 14) DUMONT, H. J., VANFLETEREN, J. R., DE JONCKHERE, J. F., WEEKERS, P. H. H. 2005. Phylogenetic relationships, divergence time estimation, and global biogeographic patterns of calopterygoid damselflies (Odonata, Zygoptera) inferred from ribosomal DNA sequences. Syst. Biol. 54. évf. p. 347–362.
- 15) ELDER, J.F., TURNER, B.J. 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. Quarterly Review of Biology. 70. évf. p. 297-320.
- 16) FETYKÓ K. 2010. Boróka-viaszospajzstetű. Kertészet és Szőlészet 35. évf. p. 6.
- 17) FETYKÓ K., KOZÁR F., SZITA É., KONCZNÉ, B. Zs., TÓBIÁS I. 2012. Újabb adatok invazív Pseudococcidae (Homoptera, Coccoidea) fajok (*Planococcus citri*, *Pl. ficus* és *Pseudococcus comstocki*) európai elterjedéséhez. In: Növényvédelmi Tudományos Napok 2012. Szerk.: KÖMÍVES, T., HALTRICH, A. ÉS MOLNÁR, J., Budapest, 2012, február 21-22. Poszter és összefoglaló, 77.
- 18) GERBI, S. 1985. Evolution of ribosomal RNA. In: Molecular Evolutionary Genetics, MacIntyre, R.J. (ed). New York, N.Y. Plenum. 419–517.
- 19) GUO, L.H. ÉS WU, R. 1982. New rapid methods for DNA sequencing based in exonuclease III digestion followed by repair synthesis. Nucleic Acids Res.10. évf.: 2065-2084.
- 20) GULLAN, P.J., DOWNIE, D.A., STEFFAN, S.A. 2003. A new pest species of the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae) from the United States. Annals of the Entomological Society of America. 96. évf. p. 723-727.

- 21) GULLAN, P.J., KAYDAN, M.B., HARDY, N.B. 2010. Molecular phylogeny and species recognition in the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae). *Systematic entomology*. 35. évf. p. 329-339.
- 22) HAMBY, R.K., ZIMMER, E.A. 1991. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In: *Molecular systematics of plants*. Soltis, P.S., Soltis, D.E., Doyle, J.J. Chapman and Hall. New York. p. 50-91.
- 23) HILLIS, D.M., DIXON, M.T. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*. 66. évf. p. 411-453.
- 24) JACOB, H.J., LINDERPAINTNER, K., LINCOLN, S.E., KUSUMI, K., BUNKER, R.K., YI-PEI, M., GANTEN, D., DZAU, V.J., LANDER, E.S. 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell*. 67. évf. p. 213-224.
- 25) KIM, H., LEE S., 2008. Molecular systematics of the genus *Megoura* (Hemiptera: aphididae) using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecules and Cells*. 25. évf. p. 510-522.
- 26) KOHORN, B.D. AND RAE, P.M.M. 1982. Non-transcribed spacer sequences promote in vitro transcription of *Drosophila* ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res*. 10. évf. p. 6879-6886.
- 27) KOZÁR, F. (1997): Insects in a Changing World. *Acta Phytopath et Entom. Hung*, 32: 129-139.
- 28) KOZÁR F., JENSER G., (szerk.). 1998. *Pajzstetvek – Coccinea*. In: *A szántóföldi és kertészeti növények kártevői*. Budapest. Mezőgazda Kiadó.
- 29) KOSZTARAB M, KOZÁR F, 1978. *Pajzstetvek – Coccoidea*. In: *Magyarország Állatvilága* 17. Budapest. Akadémia Kiadó.
- 30) KOSZTARAB M, KOZÁR F, 1988. *Scale insects of Central Europe*. Budapest. Akadémiai Kiadó.
- 31) MALAUSA, T., FENIS, A., WAROT, S., GERMAIN., J.-F., RIS, N., PRADO, E., BOTTON, M., VANLERBERGHE-MASUTTI, F., SFORZA, R., CRUAUD, C., COULOUX, A., KREITER, P. 2010. DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Applied Entomology*. 135: 142-155.

- 32) MAROTTA, S. 1987. An annotated list of the Italian mealybugs. *Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria 'Filippo Silvestri'*. 43. évf. p. 107-116.
- 33) MARTIN-MATEO, M.P. 1985. Inventario preliminar de los cóccidos de España. III. Pseudococcidae, Ortheziidae y Margarodidae. *Graellsia, Revista de Entomólogos Ibéricos*. 41. évf. p. 89-104.
- 34) MCKENZIE, H.L. 1967. Mealybugs of California with taxonomy, biology, and control of North American species (Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae). Univ. Calif. Press. Berkeley.
- 35) MILEK, T.M., ŠIMALA, M., KRČMAR, S. 2008. Species of the genus *Planococcus* Ferris, 1950 (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) with special regard to *Planococcus vovae* (Nasonov, 1908) as a species newly recorded in Croatia. *Nat.Croat.* 17. évf. p. 157-168.
- 36) NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89 évf. p. 583-590.
- 37) LOXDALE, H.D., LUSHAI, G. 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*. 88. évf. p. 577-600.
- 38) PARK, D-S., SUH, S-J., HEBERT, P.D.N., OH, H-W., HONG, K-J. 2011. DNA barcodes for two scale insect families, mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and armored scales (Hemiptera: Diaspididae). 101. évf. p. 429-434.
- 39) PATTHY L. 2008. Protein evolution. Blackwell Publishing. Malden. MA. USA.
- 40) PEDRYC, A. 2008. Kajszfajták genetikai jellemzése mikroszatellit és S-lókuszt polimorfizmus alapján. (doktori értekezés). Budapest. BCE.
- 41) PELLIZZARI, G., GERMAIN, J-F. 2010. Scales (Hemiptera, Superfamily Coccoidea). 9.3 fejezet. In: Roques A et al. (Eds) Alien terrestrial arthropods of Europe. *BioRisk* 4. évf.: p. 475–510.
- 42) ROSEN, D., DEBACH, P. 1977. Use of scale-insect parasites in Coccoidea systematics. *Research Division Bulletin Virginia Polytechnic Institute and State University* 127: 5-21.
- 43) ROEHRDANZ, R. L. 1993. An improved primer for PCR amplification of mitochondrial DNA in a variety of insect species. *Insect Molecular Biology*. 2. évf. p. 89-91.

- 44) RUDNÓY SZ. 2007. Sejtmagi és kloroplasztisz riboszomális DNS szakaszok vizsgálata a hexaploid búzában és rokonsági körében.(doktori értekezés). Budapest. ELTE.
- 45) RUNG, A., SCHEFFER, S.J., EVANS, G., MILLER, D. 2008. Molecular Identification of Two Closely Related Species of Mealybugs of the Genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* évf. 101. p. 525-532.
- 46) SHEBLE, D.A.F. AND KOZÁR, F. 1994. Use of pheromone traps for monitoring and survey of *Pseudaulacaspis pentagona* (Homoptera, Coccoidea, Diaspididae). In: Kleeberg H. (ed.) Practice oriented results on use and production of neem ingredients and pheromones. 3rd Workshop, Trifolio-MGmbk, p. 135-138.
- 47) SFORZA, R., BOUDON-PADIE, E., ÉS GREIF, C., 2003. New mealybug species vectoring Grapevine leafroll-associated viruses-1 and -3 (GLRaV-1 and -3). *European Journal of Plant Pathology* 109. évf. p. 975–981.
- 48) SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. 98. évf. p. 503-517.
- 49) STEPHEN, F.A., THOMAS L.M., ALEJANDRO, A.S., JINGHUI, Z., ZHENG, Z., MILLER, W., AND DAVID J.L. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* 25. évf. p. 3389-3402.
- 50) TÓBIÁS I., KOZÁR F., KAYDAN, M. B., FETYKÓ K. 2010. Use of molecular tools for identification of males of some scale insects (Hemiptera: Coccoidea), in pheromone traps used for monitoring and comparison with females. *J. Ent. Acar. Res.* 42. p. 171-181.
- 51) TÓBIÁS I., KOZÁR F., KAYDAN, M.B. 2011a. Molekuláris módszerek alkalmazása néhány pajzstetű faj azonosítására. *Növényvédelem*. 47. évf. p. 273-278.
- 52) TÓBIÁS I., KOZÁR F., KAYDAN, M. B. 2011b. Molecular diagnosis of two closely related mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae). *Acta Phytopathologia et Entomologica Hungarica*. 47. p. 51-54.
- 53) TÓTH M., LEAL, W.S., SZARUKÁN I., LESZNYÁK, M., SZŐCS, G. 1994. 2-(E)-nonen-1-ol: Male attractant for chafers *Anomala vitis* Fabr. and *A. dubia* Scop. (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Chemical Ecology*. 20. évf. p. 2481-2487.

- 54) UYGUN, N., SENGONCA, C., ERKILIC, L., SCHADE, M. 1998. The Coccoidea fauna and their host plants in cultivated and non-cultivated areas in the East Mediterranean region of Turkey. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 33. évf. p. 183-191.
- 55) VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23. évf. p. 4407-4414.
- 56) WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18. évf. p. 6531-6535.
- 57) WILLIAMS, D.J. AND DE WILLINK, M.C.G. 1992. Mealybugs of Central and South America. CAB International. London.

11. Nyilatkozat

A tudományos diákköri dolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A szerző neve: Hoffmann Viktória Zsanett

A dolgozat címe: Magyarországon előforduló *Planococcus* pajzstetű fajok morfológiai és molekuláris összehasonlító vizsgálata

A megjelenés éve: 2012

A tanszék neve: Rovartan Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott tudományos diákköri dolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom.

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

Tudomásul veszem, hogy a vízjel nélkül leadott dokumentum szerzői jogai sérülhetnek.

Budapest, 2012.