

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Rovartani tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

**A városi dísznövényeken előforduló *Pseudaulacaspis pentagona* morfológiai
és molekuláris összehasonlító vizsgálata**

Sojnóczki Annamária
Növényorvos MSc, I. évfolyam

Belső konzulens: Dr. Péntes Béla, tanszékvezető

Külső konzulens: Dr. Kozár Ferenc tudományos tanácsadó

Dr. Tóbiás István tudományos tanácsadó

Fetykó Kinga tudományos segédmunkatárs

Budapest, 2012

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	2
1 BEVEZETÉS	3
1.1 CÉLKITŰZÉS	4
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
2.1 COCCOIDEA (PAJZSTETVEK).....	5
2.1.1 Pajzstetvek általános morfológiai jellemzése.....	6
2.1.2 Diaspididae család (Kagylós pajzstetvek családja)	7
2.1.3 Diaspididae család morfológiai jellemzői	9
2.1.4 Pseudaulacaspis pentagona (Eperfa-pajzstetű)	11
2.1.5 Az eperfa-pajzstetű elterjedése.....	11
2.1.6 A faj morfológiai jellemzői	14
2.2 A ROVAROK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA	15
2.2.1 A molekuláris genetikai markerek.....	16
2.2.2 Rokon fajok közti eltérések kimutatása.....	17
2.2.3 Szekvenáláson (bázissorrend meghatározásán) alapuló módszerek	17
2.2.4 Az ITS régiókban használt primerek.....	19
2.2.5 Pajzstetű és más fajokon végzett molekuláris vizsgálatok	19
3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	22
3.1 FELHASZNÁLT ANYAGOK	22
3.2 FELHASZNÁLT MÓDSZEREK	22
3.2.1 Mintagyűjtés	22
3.2.2 Morfológiai vizsgálat	23
3.2.3 Molekuláris vizsgálat	23
4 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	27
Morfológiai vizsgálatok.....	27
Molekuláris vizsgálatok.....	29
5 ÖSSZEFOGLALÁS.....	33
6 IRODALOMJEGYZÉK.....	34
7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	39

1 Bevezetés

Az elmúlt fél évszázadban a molekuláris vizsgálatok a humán és természettudomány területeken végzett kutatások szerves részét képezik. Széleskörűen használhatóak ezek a technikák a rovartan területén is. Ma már pontosabb, részletesebb eredményeket kaphatunk a filogenetikai és populációgenetikai kutatásokban, számos esetben molekuláris vizsgálatok alapján új rendszertani besorolások készülnek. Egyszerűbb lehet a morfológiailag hasonló fajok megkülönböztetése, amikor a határozóbélyeg alapján nem vagy alig lehet különbséget tenni, de megkönnyíti a fajmeghatározást, és a rokonsági viszonyok feltérképezését. Ezen túlmenően választ adhat rovar-növény, rovar-predátor vagy rovar-parazitoid közti kapcsolatokra, de múzeumi minták, fosszíliák vizsgálatára is alkalmazzák. A morfológiai vizsgálatok továbbra is alapvető és elengedhetetlen részét képezik ennek a tudományágnak.

A technikákat kombinálva nemcsak rokon fajok esetében lehet, hanem fajon belül is feltárhatunk különbségeket. Fajon belül is lehetnek eltérések mind morfológiai és molekuláris szinten, a két vizsgálat alapján következtetni lehet a faj lehetséges terjedési útvonalára/útvonalaira, egyes mikropopulációk származására, egymás közti különbségére, vagy akár a leghatékonyabb természetes ellenségre.

A *Pseudaulacaspis pentagona* vagyis eperfa-pajzstetű eredetileg Ázsiából származik, de ma már a világon mindenhol megtalálható. Terjedésében több tényező szerepet játszik. Magyarországon szinte mindenhol fellelhetőek populációi, a városi parkokban és mezőgazdasági területeken pl. gyümölcsösökben egyaránt. Polifág kártevő, ezért egy területen belül több mikropopuláció élhet a különböző tápnövényeken. A morfológiai vizsgálatok esetében gondot okoz, hogy csak ivarérett nőtények alapján lehet meghatározást elvégezni. Az ivarérett nőtények megtalálása, begyűjtése sok esetben nehézkes. Szex- feromon csapdák (továbbiakban feromon csapdák) használatával, detektálható a faj jelenléte egy adott helyszínen, de ezzel a módszerrel csak hím egyedek gyűjthetők. A csapdákban levő hímeket, kis gyakorlattal, könnyű felismerni, de a kiemelés során a roncsolódó egyedeken nehézkes lenne morfológiai vizsgálatot végezni (pl. szárny, csáp letörik). A genetikai és morfológiai módszer együttes felhasználásával már pontosabb képet kaphatunk a vizsgált fajról.

1.1 Célkitűzés

Munkám során a *Pseudaulacaspis pentagona* (eperfa-pajzstetű) nőtény és hím egyedeinek a morfológiai és molekuláris összehasonlító vizsgálatát végeztem. Ennek során az alábbi célokat tűztem ki:

- A vizsgálathoz használt *P. pentagona* nőtények felkutatása, azonosítása és begyűjtése különböző területekről és különböző tápnövényekről.
- Mikroszkópi preparátumok készítése, jellemző morfológiai jegyek azonosítása.
- Az ITS-2 szekvencia alkalmazhatósága és ez esetleges különbségek vizsgálta az egyes mikropopulációkon.
- Céлом volt továbbá a morfológiai és molekuláris vizsgálatok eredményének az összevetése.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Coccoidea (Pajzstetvek)

A pajzstetvek, olyan növényi nedveket szívogató rovarok, amelyek valamennyi tagja a Homoptera - Egyenlőszárnyú rovarok rendjébe, azon belül a Sternorrhyncha - Növénytetvek alrendjébe tartoznak. A "Sternorrhyncha" elnevezés (a görög "sternon" jelentése mellkasi a "Rhynchos" pedig orr vagy ormány) a szájszerv helyére utal, szipókájuk töve egész hátul, legtöbbször a mellső lábak között helyezkedik el, bár sok esetben a kifejtett egyedeknél lábak is hiányoznak. Coccoidea mellett ide tartozik még három osztag: a levéltetvek (Aphidoidea), liszteskék (Aleyrodoidea) és a földibolhák (Psylloidea) (GULLAN és MARTIN, 2003). Az összes rovar közül a pajzstetvek fajgazdagság szempontjából viszonylag kis csoportot alkotnak, körülbelül 7.700 leírt fajjal. Jelenleg 46 pajzstetű család ismert, amelyek közül 32 maradt fenn, és 14 fosszilis ismert (KONDO és mtsai., 2008).

A pajzstetvek egyszerű testfelépítésűek, a nőstényeik legtöbb esetben helyhez kötött életmódot folytatnak. Megjelenési formáikban változatosak, egyes talajlakó *Margarodida* fajok cisztákat készítenek például a *Neomargarodes festucae* Archangelskaia, 1935, más fajok teste teljesen ellaposodott, alkalmazkodva az egyszikűek levélhüvelyében való életmódra például egyes *Eriococcidae* vagy a *Diaspididae* fajok esetében, a lapos nőstények testét kagyló alakú pajzs védi, rátapadnak a gazdanövény kérgére vagy behatolnak az alá (KONDO és mtsai., 2008). A nőstény alakja is formagazdag, esetenként tojásdad, kerekded vagy megnyúlt. A testet fedő viaszréteg eltérő a különböző családoknál: lehet lemezszerű (*Ortheziidae*), porszerű (*Pseudococcidae*), kagylószerű (*Diaspididae*) vagy akár csupasz (*Coccidae*, *Kermesidae*) ez esetben a nőstény háta erősen szklerotizált (KOSZTARAB és KOZÁR, 1978). Sejtszintű vizsgálatok kimutatták, hogy a kromoszóma számban is változó, a vizsgált fajoknál a $2n=8-68$ között mozog (NUR és mtsai., 1987). Továbbá különféle sperma szerkezetet (ROBISON, 1977; 1990), valamint genetikai rendszereket figyeltek meg (NUR, 1980; NORMARK, 2003).

A pajzstetvek kevés kivétellel növényevők, szívogatásukkal gyengítik a tápnövényeiket, és az általuk termelt mézharmaton megtelepülő korompenész csökkentheti az asszimiláló felületet, valamint dísnövényeknél az esztétikai érték csökkenését okozzák. Pajzstetvek századok óta ismert és hasznosított rovarok: némelyikük vörös színezéket termel

(*Porphyrophora polonica* (LINNEAUS, 1758)), váladékukat értékes viaszok és gyanták formájában, a gyógyászatban is hasznosítják (KONDO és mtsai., 2008).

Tanulmányozták továbbá a pajzstetvek hangyákkal való mutualista kapcsolatát és a tápnövény specializációt (KONDO és mtsai., 2008). Leírtak szimbiotikus kapcsolatot egyes pajzstetvek és fullánktalan méhek között is (*Hymenoptera: Apidae: Meliponinae*) (CAMARGO és PEDRO, 2002).

2.1.1 Pajzstetvek általános morfológiai jellemzése

A többi Homoptera csoporttól a pajzstetvek elkülöníthetőek a visszafejlődött lábfej alapján, amely 1 ritkán 2 íz-közből áll és egyetlen karomban végződik. A hímeknek nincsen szájszervük és kétszárnyúak, amelyek ritkán elcsökevényesedhetnek. A pajzstetvek nőstényei mindig szárnyatlanok, lábaik erősen visszafejlődtek, testük egyetlen fejtörrel összenőtt potroh képezi.

A pajzstetvek határozókulcsai és leírásai szinte kivétel nélkül az ivarérett nőstényeket veszik alapul. Bizonyos fajok esetében a különböző lárva-stádiumokban is lehetséges a fajok azonosítása. A pajzstetvek morfológiai tulajdonságait KOSZTARAB és KOZÁR (1978, 1988) részletes leírása alapján mutatom be.

A test nagysága 0,5-35 mm között változhat, de a hazai fajok többségének hossza 1-5 mm között van. A csápízek száma 0-16 között váltakozhat, egyes családokban ezek a csápízek visszafejlődtek (*Cryptococcidae*, *Diaspididae*) és legfeljebb csak egy kis szelvényezetlen bűtyök található. A szemek néha teljesen hiányoznak (*Diaspididae*), de többnyire két kis kerek, pigmentes folt alakjában észlelhetők. A szájszervek a szájtövi pajzsból, a kúp alakú szipókából és négy hosszú szúrósértéből állnak. A szipóka rendszerint az elülső lábpár között foglal helyet és a szúrósérték gyakran hurokszerűen rendeződnek. A száj olykor visszafejlődött vagy teljesen hiányzik. A lábak is a legkülönbözőbbek lehetnek, néha jól fejlettek, öt ízűek (*Ortheziidae*), gyakrabban elcsökevényesedtek 1-3 ízre, vagy hiányoznak (*Diaspididae*). Olykor a lábízek összenőnek vagy egyes földben élő fajok esetében az elülső lábak ásólábakká alakultak.

Rendszerint 2-2 serteszőr, más néven karomserte van a lábfej végén és a karmok tövén, aminek szerepe a kapaszkodás segítése. A karmon gyakran fogacska található. A tompor általában háromszögletű és mindegyik oldalán 2-2 korong alakú gödörke figyelhető meg. Áttetsző gödörkék vannak a combon és ritkábban a lábszáron is (*Pseudococcidae*). A két

tori légrés pár jól fejlett és minden családban jelen van, míg a potrohi légrések kisebbek, és csak a *Margarodidae* és *Ortheziidae* családok fajain fejlődtek ki. A korong alakú mirigyek gyakoriak a tori légrések elülső kamrájában, de korong alakú mirigycsoportok gyakran találhatók a tori légrések nyílása közelében is. Ugyancsak a toron találjuk a *Pseudococcidae* fajokon az elülső háti részpárt. A *Diaspididae* családban a potroh hátulsó szelvényei összenőttek egyetlen farlemezzé úgynevezett pigidiummá. A pigidium szélén itt karéjakat és lemezeket találunk.

A végbélnyílás vagy anális nyílás rendszerint a hát utolsó potrohszelvényen van. A családok többségében ezt egy szklerotizált gyűrű veszi körül, amelyen anális gyűrűserték és viaszmirigyek találhatók. A potroh gyakorta két dudorban vagy az anális nyúlványban végződik. Rendszerint egy-egy hosszú anális nyúlványsertét találunk ezeken (*Pseudococcidae* és *Eriococcidae*).

A viasz kiválasztó mirigyek nagyon változatosak, gyakran korong vagy henger alakúak, illetve csőszerűek is lehetnek. A test szőrei különböző alakúak és méretűek: pl. hajszál-, serte-, tűske- vagy töviszerűek. A tűske és korong alakú mirigyek csoportjai képezik a test szélén a *Pseudococcidae* fajok nagy részében a ceráriumokat.

A nőtények tojásrakás idején a tojások védelmére gyakran viaszváladékot termelnek. Az *Eriococcidae* család tagjaira jellemző a nemezszerű tojászsák, amely magát a nőtényt is betakarja, a *Pseudococcidae* fajok többségénél a nőtény a tojásaival együtt laza vattaszerű viaszzsákban van. A *Kermesidae* fajoknál és ugyancsak a *Coccidae* fajok többségénél a nőtény teste betakarja a tojásokat, míg a *Diaspididae* fajoknál a tojások a nőtény pajzsának védelme alatt vannak. Az *Ortheziidae* család fajai, a csótányokhoz hasonlóan, magukkal hordják a tojásaikat a potroh végén, itt egy csőszerű, fehér viaszlemezekből álló tojászsákban vannak. Vannak fajok ahol a nőtény és a tojások is áttetsző, rugalmas viaszhártya alatt vannak vagy például földalatti, gyöngyszerű cisztákat alkotnak.

2.1.2 *Diaspididae* család (Kagylós pajzstetvek családja)

A pajzstetvek csoportjában a *Diaspididae* a legnagyobb család, közel 2430 jelenleg ismert fajjal (BEN-DOV, 2012) képviselt, és fellelhetőek minden kontinensen, kivéve a sarkvidéket (MILLER és DAVIDSON, 2005). A kagylós pajzstetvek családja egyedi jellemzőkkel rendelkezik, ami megkülönbözteti a többi pajzstetű családtól. A mozgásszegény életmód következtében, speciális védelmet kell biztosítaniuk, ezért a levedlett nimfa bőr és

pigidiumon (farlemez) található mirigyek által előállított viasz együttesen alkotja a testet védő kagylószerű pajzsot (HENDERSON, 2011). A pajzs alakja változó: kerek, ovális vagy megnyúlt.

A család fajai a legkülönbözőbb növényeken előfordulnak, de sok faj él fásszárúakon. A fajok leggyakrabban a növények föld feletti részén, a száron és ritkábban leveleken károsítanak szívogatásukkal, kivételes esetekben gyökéren (*Chortinaspis* fűfélék gyökerein). Kevés az ismert monofág faj, többségük oligofág, vagy polifág. A nemzedékszámukat sok esetben a klimatikus viszonyok határozzák meg. Az áttelelés a legkülönbözőbb formában történhet: tojás alakban, L1 vagy L2 alakban, nőtény alakban, lárvá és nőtény vagy akár tojás és nőtény alakban. A szaporodás módja általában váltivarú, esetenként szűznemzés is előfordul. A nőtények tojástermelésük 12-200 között mozog, leggyakrabban 50-100. A legtöbb faj tojástermelő, ismertek viszont eleveneszlő fajok. Az embrionális fejlődési idő a lerakott tojásban változó, pár órától akár három hétig. A tojás alakban telelő fajok esetében ez az idő mintegy 8 hónap. A lárvák kikelés után még pár óráig mozognak, azonban csak pár métert képesek vándorolni mégis passzívan módon tovább tudnak terjedni, például madarak vagy szél által. Letelepedés után hozzák létre a pajzsot. Néhány faj kivételével a hímek szárnyal rendelkeznek, fejlődési alakjainak száma 5, míg a nőtényeknél ez 3 (KOSZTARAB és KOZÁR, 1988). A kagylós pajzsottervekre nem jellemző a mézharmat termelése mivel olyan vak béllel rendelkeznek, amely nincs közvetlen kapcsolatban a gyomorral és a végbéllyel, és így nem bocsátanak ki édes váladékot (HENDERSON, 2011).

Számos kártevő tartozik ebbe a családba, pl. kaliforniai pajzsotterű (*Diaspidiotus perniciosus* COMSTOCK), a közönséges fehér fenyő-pajzsotterű (*Leucaspis loewi* COLVÉE), kecskerágó-pajzsotterű (*Unaspis euonymi* COMSTOCK), eperfa-pajzsotterű (*Pseudaulacaspis pentagona* TARGIONI TOZZETTI).

Természetes ellenségeik közül fontosabbakat említeném: a bődék (pl.: *Chilocorus bipustulatus*), hártýásszárnyú paraziták (pl.: *Chalcidoidea*-fajok), ragadozó atkák (pl.: *Hemisarcopetes malus*) és gombák (*Fusarium*-fajok) (KOSZTARAB és KOZÁR, 1988).

Hazánkban a kagylós pajzsottervek főképpen a gyümölcsaféléken, fásszárú dísnövényeken, valamint szobanövényeken károsítanak. A fajok többségének egyedsűrűsége ritkán ér el magas értéket, mivel természetes ellenségeik hatékonyan működnek, míg más fajok esetében, mint a kaliforniai pajzsotterű (*Diaspidiotus perniciosus*), a piros körte-pajzsotterű (*Epidiaspis leperii*), a gyümölcsfákon általában nagy egyedszámban fordulnak elő, és a paraziták csak kismértékben gyérítik. Fertőzés mértékét KOZÁR és VIKTORIN (1978) féle

skálázási módszerrel lehet becsülni. Leggyakoribb városi dísznövény károsítók: *Carulaspis juniperi* (boróka- és tuja-féléken); *Unaspis euonymii* (kecskerágón), *Pseudaulacaspis pentagona* (japánakácon, eperfán, szivarfán, orgonán) (KOZÁR, 1984), *Leucaspis* fajok (fenyő-féléken) (KOZÁR és mtsai., 2012).

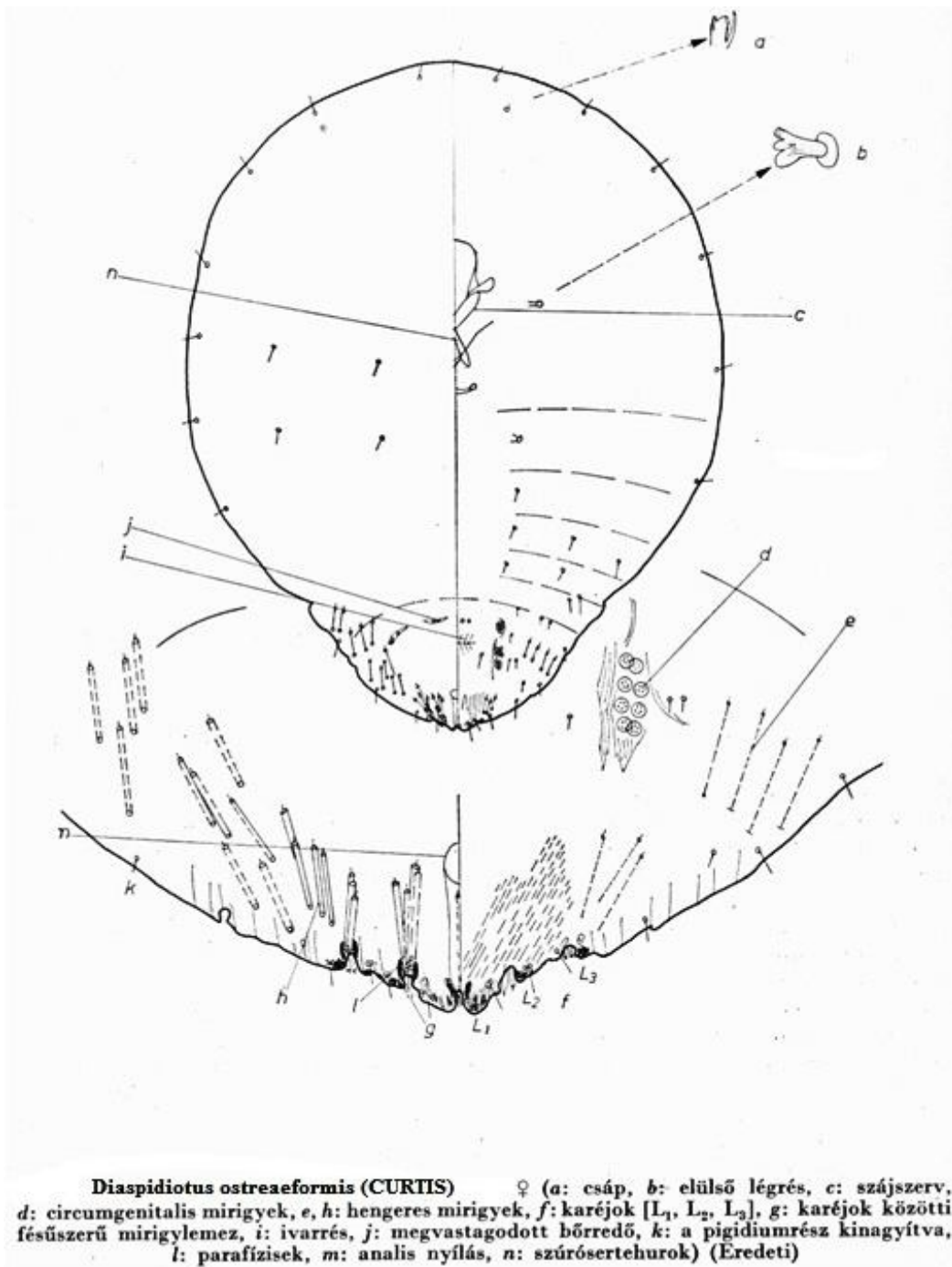
2.1.3 Diaspididae család morfológiai jellemzői

A kagylós pajzstetvek kifejlett nőtényeik teste erőteljesen redukáltság jellemzi: lábak hiánya, szemek hiánya, csápízek visszafejlődése szelvényezetlen bütyökké (BALACHOWSKY, 1948; KOSZTARAB és KOZÁR, 1988; TAKAGI, 1993). A kagylós pajzstetvekre jellemző morfológiai bélyegeket az 1. ábra tartalmazza.

A nőtény lapos testét, kagylószerű pajzs védi, melynek formája lehet kerek, ovális vagy megnyúlt. A fej és a tor szelvényei fejtorrá forrtak össze. A potrohra 8 szelvény a jellemző, a 9.-11. szelvény erősen elcsökevényesedett, az utolsó szelvények (4. vagy 5.-től 8.-ig) pigidiummá vagy farlemez forrtak össze. A csápok szelvényezetlen bütyökké csökevényesedtek és a végükön 1-2 serte található. A szemek apró szklerotizált foltok. A lábak általában hiányoznak, ritkán, mint kis szklerotizált bütykök kivehetők. A hasi oldalon az ivarrés körüli circumgenitális, másnéven ivarrés körüli mirigyek, rendszerint 1 elülső, 2 középső és 2 hátulsó csoportot alkotnak. A circumgenitális mirigyképlet kifejezi, hogy az egyes csoportokban mennyi mirigy található. Az anális nyílás a pigidium háti oldalán található. A pigidium szélén gyakran szklerotizált foltokat találunk. A megnyúlt és többnyire vastag vessző alakú foltokat parafízisnek nevezzük. A pigidium szélén a nyúlványokat kettő csoportba sorolhatjuk. Karéjoknak nevezzük a szklerotizált, lapos és végükön rendszerint lekerekített páros nyúlványokat, jelük az irodalomban L (Lappen). A másik fajta nyúlvány a mirigylemez, amely sokszor fésűszerű. A lemezek a karéjok közötti öblökben helyezkednek el, rendszerint nem szklerotizáltak. Lehetnek szélesek és végükön fogazottak vagy elágazóak, egyes nemeknél serte alakúak, esetenként teljesen hiányozhatnak. A mirigylemezek, illetve serték tövén 1-2 kis csöves mirigy van. A nőtények a pigidium végén lévő karéjok és mirigylemezek segítségével formálják a pajzsukat.

A pajzs készítéséhez szükséges viaszt különböző csöves mirigyek szolgálják. A potroh hátszelvényein a csöves mirigyek szegély alatti és közép alatti csoportokat alkotnak és ezek gyakran szegély menti barázdákban vannak. A hasi oldalon lévő csöves mirigyek kisebbek, és

rendszerint kisebb számban vannak jelen, többnyire a pigidium szegélye alatt (KOSZTARAB és KOZÁR 1978).



1. ábra *Diaspidiotus ostreaeformis* - *Diaspididae* nőstény részletes rajza, Kosztarab és Kozár 1978-as könyvéből átvett ábra.

2.1.4 *Pseudaulacaspis pentagona* (Eperfa-pajzstetű)

A *Pseudaulacaspis pentagona* (TARGIONI TOZZETTI) a dísz és gyümölcsfák pajzstetű károsítói közül az egyik legveszélyesebb, kozmopolita faj. Széleskörű polifág, tápnövény köre 100 körüli, amik több mint 50 családból származnak (BEN-DOV, 2012). Nőstényenként kb. 140 tojást rak. (KOSZTARAB és KOZÁR, 1978). A leginkább veszélyeztetett dísznövények a japánakác, az eperfa, az orgona, és a szivarfa. A gyümölcsfélék közül számottevő fertőzést okoz nálunk az őszibarackon és szilván, ezenkívül a dión, alkalmanként szőlőn is. Továbbá a világ más országaiban a kivi egyik legveszélyesebb kártevője (KOZÁR, 1999). Az eperfa-pajzstetű, mint a család többi károsító tagja főként a szívogatásukkal okoznak problémát, valamint a növények esztétikai értéke csökken (2. ábra).



2. ábra: Eperfa-pajzstetűvel fertőzött szivarfa (saját fotó)

2.1.5 Az eperfa-pajzstetű elterjedése

Az eper-pajzstetű eredeti élőhelye Ázsia, feltehetően Kína az őshazája. Európában először Olaszországban jelezték károsítását TARGIONI-TOZZETTI 1886-ban. Öt évvel később már olyan mértékben elszaporodott az eperfákon, amit selyemhernyó tenyésztéshez használtak, hogy külön törvény szólította fel a tulajdonosokat az faj irtására (COLLINS és WHITCOMB, 1975). Az Egyesült Államok délnyugati részén 1889 óta jegyzik, mint a barackfák általános károsítóját. Az 1900-as évek elején számos őszibarack ültetvényt elpusztított, volt eset rá, hogy 10000 fa pusztult el (GOSSARD, 1902).

Magyarországra az 1920-as évek környékén került be, először Baranya és Somogy megyében terjedt el, elsősorban az eperfákon. Később már a gyümölcsösökben is gondot okozott, főképp az őszibarackosokban. 1929-ben már több déli megyében elterjedt. A kezdeti időszak után terjedése hosszabb időre megállt. A kártevő 1976 táján terjedt tovább (Budapest,

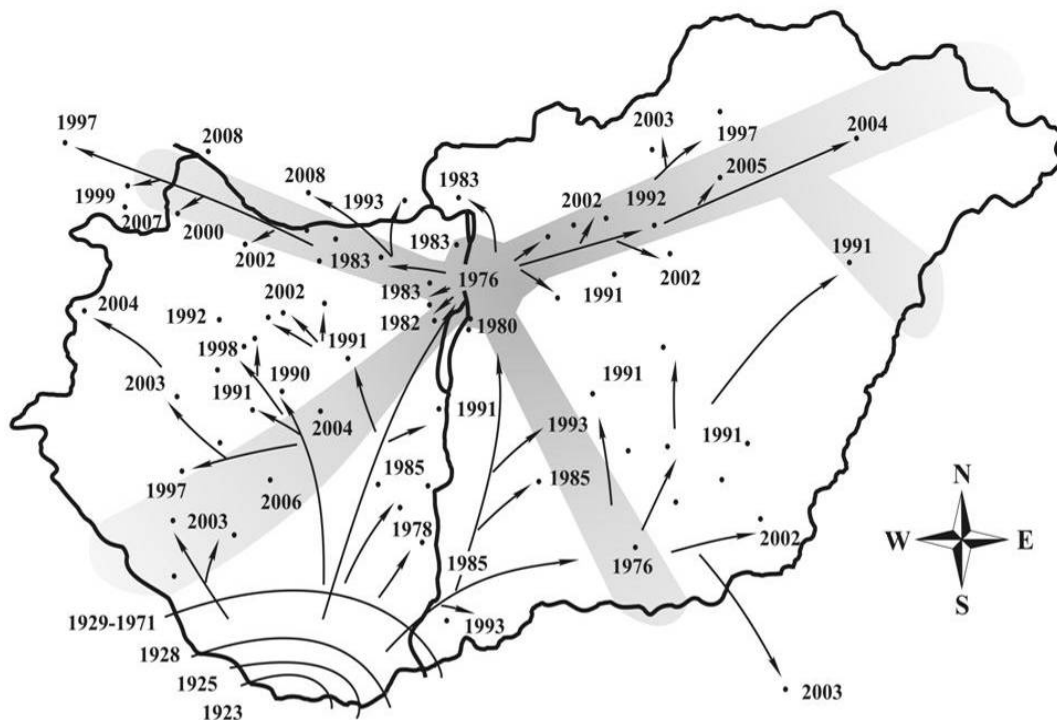
Szeged), főként a városi díszfákon jelentkezett. 1983-ra az ország középső területein, Pest megye több részében is fellelhető volt, majd nem sokkal később az ország további területén is feltűnt (3. ábra). Valószínűleg az enyhe télek is elősegítették a terjedését (KOZÁR és mtsai., 1995; KOZÁR és NAGY, 1986; STOLLÁR és mtsai., 1993). Az utóbbi 15 évben, a vegyszerterhelés csökkentése és a környezetkímélő növényvédelemi irányvonal terjedése, elsősorban a rovarnövekedést szabályozó készítmények elterjedése, az ingerületvezetést gátlók rovására, nagymértékben hozzájárult a pajzstetvek elszaporodásához (MERÉNYI, 2011). Az erős fertőzéseket időről-időre jelentősen csökkenti a rendkívüli téli hideg, azonban egy enyhe tél után ismét jelentősen megnövekedhet a számuk (KOZÁR, 1992). A faj melegkedvelő és az egyre melegedő klimatikus viszonyok miatt, egyre inkább terjeszkedik az északibb területek felé (KOZÁR, 2009). A 90-es években már Franciaországban és Svájcban is megfigyeltek északi terjedést (BAGGIOLINI és mtsai., 1993). Az elmúlt 20 évben több rovarfaj esetében is jelentősen megnövekedett az északi elterjedésük Közép-Európában, melynek átlagsebessége kb. 20-50 km évente (KOZÁR, 1992).

A melegedő tendenciát mutató éghajlat kedvez a fajok terjedésének ám ez csak alapot szolgál a megtelepedéshez. Bizonyos esetekben megfigyelhető a rovarok gyors terjeszkedése, és akár 700 km távolságot is megtehetnek nagyon rövid idő alatt (KOZÁR, 1992). A rovarterjedések egyik fontos vektora lehet a jármű forgalom, helyszíne pedig az úthálózat és az azt kísérő növényi sáv, amely ökológiai folyosóként szolgál az élőlények terjedéséhez (CLARKE, 2002; CROWL és mtsai., 2008; HAWBAKER és mtsai., 2006; KOZÁR, 1984; MARTINEZ és WOOL, 2006; MÉSZÁROS és VOJNITS, 1972; TÖRÖK és mtsai., 2003; KOZÁR, 2009). Az eperfa-pajzstetű terjedéséről viszonylag keveset tudunk, valószínűleg Magyarországra szaporítóanyaggal együtt jutott be, azonban a harmincas évektől kezdve majd a nyolcvanas évekig nincs adat a terjedését illetően és nem is volt jelentős mértékben jelen. Az autópálya-hálózat Magyarországon a legutóbbi évtizedekben alakult ki, igazán a nyolcvanas években indult be, és napjainkig is folyamatosan bővül. Ezzel párhuzamosan az eperfa-pajzstetű terjedésénél is megfigyelhető egyféle tendencia. A klímaváltozás miatt a „sztráda, mint a hőmérő kapillárisa jelenik meg, ahol a higany helyett a rovarfajok terjedését figyeljük” északi irányba (KOZÁR, 2009).

A növényeken szívogató pajzstetvek helyhez kötöttségéből eredő hátrányát a természet bőkezűen ellensúlyozza az óriási tojás-produkcióval és a kikelt parányi, pihekönnyű lárváknak szél útján történő terjedésével. Ezzel magyarázható néhány pajzstetűfaj elszigetelt területfoltokon való váratlan megjelenése is, persze a rajzó, szél repítette lárvák többsége alkalmatlan helyre jutva elpusztul. Viszont egy-egy pajzstetűtelep kialakulásának újabb

forrásai lehetnek a járművekre került, majd az út mentén lesodródó rajzó lárvák (NAGY és KOZÁR, 2010).

Az eperfa-pajzstetű terjedésének lehetséges útvonalára választ adhat a különböző területeken és tápnövényeken előforduló mikropopulációk vizsgálata. A mikropopulációk közötti lehetséges morfológiai és genetikai szintű különbségeket eddig még nem vizsgálták, e faj esetében.



3. ábra A *Pseudaulacaspis pentagona* magyarországi terjedése, NKI grafika (Kozár, 2009).

BAYOUMY és munkatársai (2011) *P. pentagona* elterjedését vizsgálták; a magyarországi autópályák mentén (M0, M1, M3, M5 és M7). 2009-2010 között, feromon csapdázásos módszerrel végezték a felméréseket. Tanulmányuk alapján valószínűsíthető, hogy a *P. pentagona* passzív terjedését nagymértékben elősegítik a járművek, vagyis a transport vektorok. Kiderült, hogy a vizsgált autópályáknál a hímek kisebb számban voltak jelen, mint az egyes városok központja körül vizsgált területeken.



5. ábra: Frissen kihelyezett feromon csapda
(Fotó: Fetykó Kinga)



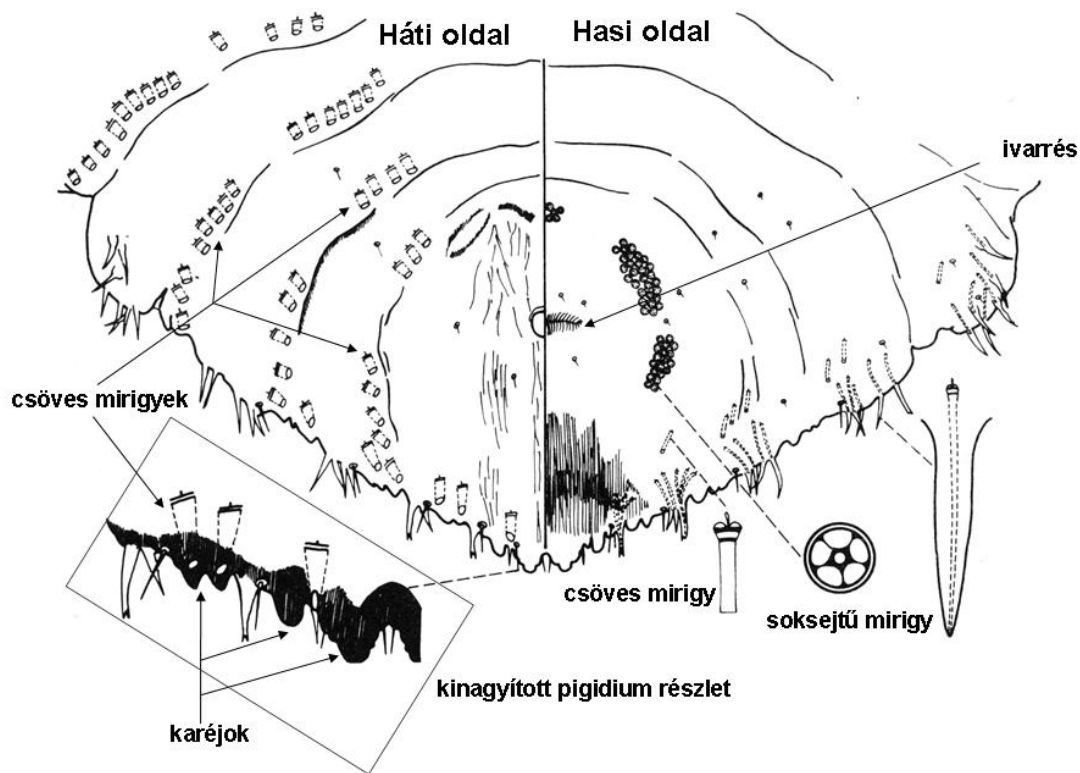
4. ábra: Begyűjtött csapdák (saját fotó)

Azért lehetséges ez, mert a pajzstetű fajok jobban kedvelik a melegebb és párásabb területeket, mint a szárazabb autópálya megállókat (BREADSLEY és GONZALES, 1975). A felszaporodást és az esetleges terjedést feromon csapdás monitoringgal lehet követni (5. ábra, 4. ábra), de ez csak a rajzó hímek számáról ad információt, ebből lehet következtetni a helyi populációk nagyságára. Ha ez a szám nagy, 1000-5000-7000 (12000), akkor erősen fertőzött fákra lehet gyanakodni a közelben (FETYKÓ K., szóbeli közlés).

2.1.6 A faj morfológiai jellemzői

A *P. pentagona* nőtény teste sárga, széles, tojásdad vagy körte alakú, legszélesebb a középtornál. A nőtény pajzsa kerekded, világos színű. A test szélén mély befűződéses vannak. A második (L_2) és a harmadik karéj (L_3) kettéosztott, a végük felé kihegyesedők. Az L_1 háromszögletű, külső és belső szélén rovátkolt (KOSZTARAB és KOZÁR, 1978). Az L_1 általában jól fejlett. A *Pseudaulacaspis* nemén belül két típusa van: a kérgen élő egyedeknél ez a karéjpár kiemelkedő; a levélen élőknél besüllyedt a pigidiumba. Az L_2 jóval kisebb, mint az L_1 , külső illetve belső részre van osztva, általában a külső nagyobb. Az L_3 kisebb az L_2 -nél (WEI és FENG, 2012). A mirigylemezek nagyok, vastagok, a csúcsukon gyakran kettéosztottak. A háti hengeres mirigyek rövidek, kettős kitinperemük van, és nagy számban alkotnak a potrohszelvevényeken harántsorokat. A hasi hengeres mirigyek igen aprók és csak kevés számban találhatók meg a pigidium szegély alatti sávjában. A circumgenitális (ivarnyílás körüli) mirigyek 5 nagy tömör csoportot alkotnak.

A pigidium szegélye erősen szklerotizált. Az elülső légrés mellett 12-18 korong alakú mirigy van, ezek hiányoznak a hátulsó légréseknél. A circumgenitális mirigyképlet a következő: 6-20 (24-38) 18-30. Az eperfa-pajzstetűre jellemző a nagy, vastag és csúcsukon kettéosztott mirigylemezek. Ez alapján könnyen elkülöníthetők minden más hazai *Diaspididae* fajtól. (KOSZTARAB és KOZÁR 1988).



6. ábra A nőtény eperfa-pajzstetű pigidiuma Kosztarab és Kozár, 1978 ábrája alapján.

2.2 A rovarok molekuláris vizsgálata

A klasszikus genetika elvei jelentős előrelépést jelentettek a rovar fajok sokszínűségének és ökológiájának megismerésében. Az egyes látható jegyek, másnéven fenotípusos markerek, mint például a szemszín, a testen lévő sávok, foltok, szőrök, tüskék stb. alapján lehetőség nyílt tanulmányozni a fajok elterjedését, párzási viselkedését, az öröklődő genetikai vonásaikat (BARTLETT és mtsai., 1968; BOND és mtsai., 1970; BARTLETT és BUTLER 1975). Bár ezek a fenotípusos markerek általában megtalálhatók a szervezet élettartamának egész ideje alatt, sok gyakorlati korláttal rendelkeznek. A legnagyobb hátrányuk, hogy nehéz számszerűsíteni, nem függetlenek az adott környezeti hatásoktól és a fejlődési stádiumtól,

esetenként pedig nagy szakértelmet igényel azonosításuk. Ma már a fenotípusos meghatározás mellett segíthet a molekuláris módszerek használata (BEHURA, 2006).

2.2.1 A molekuláris genetikai markerek

A molekuláris genetikai markerek alapvetően két nagy csoportba sorolhatók: (i) *nukleinsav alapú markerek*, melyek a genom vagy genomok nukleinsav-szekvencia szintű polimorfizmusát használják azok jellemzésére; (ii) a *nem nukleinsav alapú markerek* melyek fehérje vagy mikromorfológiai bélyegeket használnak fel jellemzésre. Ez utóbbi markerek a környezettől nem függetlenek. A molekuláris markerezés két szélsőséges esete: a tulajdonság (gén vagy gének) követése molekuláris markerekkel vagy genomok azonosítása illetve genomok közötti különbség megállapítása akár egyetlen bélyeg szintjén is. A nukleinsav alapú molekuláris markerek általában a genom egyes részleteinek (fragmentumainak) fizikai méretkülönbsége alapján (gélen elválasztott fragmensek méretének, meglétének megállapításával), vagy bizonyos szekvenciák meglétének kimutatásával (pl. hibridizációval) valamint e módszerek kombinálásával végeznek azonosításokat. A fragmensek képzésének két alapvető módszere ismert: a restrikciós enzimek használata, vagy/és a genomrészletek amplifikálása PCR technikával (BISZTRAY, 2001).

A DNS felfedezése és működésének beható vizsgálata az elmúlt évtizedekben, nagyban hozzájárult, ahhoz hogy megértsük az egyes szervezetek közötti evolúciós kapcsolatokat. A nukleinsav alapú módszerekkel már teljes biztonsággal lehet fajokat azonosítani, elkülöníteni. Számos esetben már csak molekuláris módszerek alkalmazásával készítenek teljes egészében fejlődéstörténeti törzsfákat, ennek ellenére a molekuláris és morfológia vizsgálatok még mindig nagymértékben kiegészítik egymást, azonban elmondható, hogy nagymértékben javította a vizsgálatok pontosságát (CATERINO és mtsai., 2000; GURNEY és mtsai., 2000).

A nukleinsav alapú vizsgálatok mára már nem csak célzottan az adott témával foglalkozó kutatók mindennapjainak részei, hanem a legkülönbözőbb kutatási területeken napi rendszerességgel használják. A DNS alapú molekuláris markerezés témaköre széles területet ölel fel, megannyi alkalmazási és technikai lehetőséggel.

Ezeknek a vizsgálatoknak nagy előnye, hogy a DNS minden szervezetben egyformán megtalálható, általában független a környezeti és a génkölsönhatásoktól. Minden fejlődési stádiumban, akár lárvákat vagy tojásokat, megbízhatóan vizsgálhatunk. A másik nagy előny, hogy nemtől függetlenül lehet használni. Pajzstetvek esetében a morfológiai leírások csak nőstényre vonatkoznak, fajszintű azonosításuk magas taxonómiai ismereteket feltételeznek. A feromon csapdák alkalmazásakor csak ivarérett hímegeket tudunk begyűjteni, és ezek fajszintű azonosítása gyakran problémás. Ilyen esetekben a genetikai azonosítás módszere sokkal egyszerűbb és célravezetőbb.

További előnyük az objektivitás, a megbízható és pontos ismételhetőség, a könnyű értelmezhetőség, ezzel meggyorsíthatjuk a fajok vizsgálatát, azonosítását.

2.2.2 Rokon fajok közti eltérések kimutatása

A DNS minden szakaszán létrejöhetnek véletlenszerű spontán mutációk, körülbelül azonos arányban, de a bekövetkezett mutáció megmaradása függ attól hol keletkezett. Az alapvető fontosságú gének változása általában letális, tehát a szervezet nem éli túl, kivéve, ha ezekben a régiókban a változás üteme lassú és nem változtatja meg kedvezőtlenül a gén működését. Ezzel szemben, a nem kódoló génekben vagy nem kifejeződött DNS szekvenciákban ezek a mutációk gyakrabban megmaradnak, e régiókban a változás is gyorsabb, mivel nincsenek közvetlen hatással a szervezet alapvető funkcióira. A rendszertanilag távolabb álló fajok vizsgálatakor a lassabban változó régiók megfigyelését részesítik előnyben, míg a gyorsabban változó szekvenciák jól használhatók rokonfajok közti eltérések kimutatására, elemzésére (GURNEY és mtsai., 2000). A rokonsági viszonyok vagy evolúciós fejlődéstörténet vizsgálatakor ezeket a változó régiókat érdemes vizsgálni, mert a kialakult pontmutációk megmaradnak és a szelekciós nyomás hatására nem torzul a szervezet fejlődése, valamint konzervált határolószekvenciával rendelkeznek, amelyekre könnyen tervezhető PCR primer.

2.2.3 Szekvenáláson (bázissorrend meghatározásán) alapuló módszerek

A DNS adott szakaszairól a legrészletesebb információt a bázissorrend meghatározása adhat. 1974-ben SANGER dolgozta ki ennek a módszerét, s az azóta eltelt évtizedekben a

szekvenálási módszerek egyre gyorsabbak megbízhatóbbak lettek, ma már automatizált módon lehet leolvasni a bázissorrendeket. PCR technikával kombinálva, tehát a DNS megfelelő szakaszait felszaporítva és megszekvenálva lehetőség nyílik rá, hogy például egy fajon belül is detektálni tudjunk egyes változásokat, pontmutációkat.

A riboszomális gének és az azokat elválasztó spacer szekvenciákat széleskörűen használják filogenetikai vizsgálatra, sok esetben a morfológiai vizsgálatok kiegészítésére (BUSSABAN és mtsai, 2005, CECHE, 2011), fontos jellemzőjük, hogy univerzális elterjedésűek, konzervatív és variábilis szekvenciájú szakaszokat egyaránt tartalmaznak. Leggyakrabban a riboszomális DNS-t (rDNS) kódoló géneket (18S, 5,8 S és 28S) és azok átírt köztes szekvenciái képezik (ITS 1 és ITS 2, Internal Transcribed Spacer, BALDWIN, 1992) azokat a szekvencia csoportokat, amiket ilyen esetben használnak (YA-JIE és mtsai., 2003). A gének és azok ITS régióit széleskörűen alkalmazzák filogenetikai vizsgálatokhoz, ezeket DNS vonalkódoknak tekinthetjük. Ezeket a szekvencia csoportokat elterjedten használják szorosan kapcsolódó taxonok filogenetikai vizsgálatainál, rejtélyes faj azonosítása (COLLINS és PASKEWITZ, 1996), valamint filogeográfiai és egyéb népesség genetikai vizsgálatokra (pl. MUKABAYIRE és mtsai., 1999; WÖRHEIDE és mtsai, 2002). A módszer a bázissorrend meghatározásán alapul.

Szekvenáláson alapuló technikák másik célcsoportja a mtDNS. A mitokondriális DNS-t (mtDNS) viszonylag gyors mutációs rátával rendelkezik, emiatt jelentős szórás lehetséges az egyes fajok mtDNS szekvenciái között, de általában ez a változás jóval kisebb fajon belül. A mitokondriális DNS esetében, a leggyakrabban szekvenált gén a citokróm-oxidáz I (COI) és a COII. A COII szekvenciáját a legkülönbözőbb taxonok körében használják, ezek a homológ szekvenciák szinte minden rendnél megtalálhatók. COI gén rövid szekvenciáját előszeretettel használják különböző csoportokban, elsősorban fajszerű azonosításra (CATERINO és mtsai., 2000; HEBERT és mtsai., 2005). Azonban a pajzstetvek esetében ezek az univerzális primerek nem minden taxon esetében alkalmazható sikeresen. Ehelyett a pajzstetvek riboszomális DNS 28s génjének a D2-es régiója jelenleg a kutatók által javasolt lehetséges DNS-vonalkód (KONDO és mtsai., 2008).

2.2.4 Az ITS régiókban használt primerek

A rovarok és más gerinctelenek vizsgálatakor olyan primerekkel vizsgálhatók az ITS régiók, amelyek konzerválódtak.

Erre a régióra írt primerek közül a CAS18sF1/CAS5p8sB1d az ITS1 területet fedi le, ami a 18S és 5,8 S gének között található. A CAS5p8sFt/CAS28sB1d és az általunk használt CAS5p8sFc/CAS28sB1d primerpárok az ITS2 szakasznak a felszaporítására alkalmasak, ami 5,8 S és 28S gének között helyezkedik. A CAS18sF1/CAS28sB1d primer kombináció lehetővé teszi az egész terület amplifikációját a 18S és 28S gének között (amely ITS1, 5,8 S gén és ITS2). Ezek a primerek univerzálisak mivel széles körű a használatuk, a legtöbb gerincteleneknél alkalmazhatóak, sőt a CAS18sF1 konzervált határolószekvenciái a gyümölcslegyektől kezdve az emberig minden szervezetben megtalálható (YA-JIE és mtsai., 2003).

2.2.5 Pajzstetű és más fajokon végzett molekuláris vizsgálatok

A pajzstetvek a fásszárú növények és fűfélék gazdaságilag fontos kártevői, emiatt igen sok tanulmány foglalkozik az evolúciós élettanukkal, genetikájukkal (kimérizmus, apai genom megszüntetése, a gyakori szűznemzés) és a gazdanövények, parazitoidok és endoszimbiotikus baktériumok pajzstetűkkel való szoros kapcsolatával. Legtöbb tanulmány a filogenetikai fejlődésük tisztázását célozta meg és a molekuláris módszerek használatával számos új kérdés merült fel.

PARK és munkatársai 2011-ben 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, *Diaspididae* családnál pedig 80%-áról értékes eredményt kaptak. A tanulmányban magas intra-specifikus eltéréseket detektáltak kilenc taxon esetében. Ezek az eredmények arra utalhatnak, hogy felülvizsgálás szükséges a jelenlegi taxonómiai rendszerben. A tanulmány hozzájárul egy hatékony pajzstetvek azonosításához szolgáló rendszer megvalósításához; átfogó DNS vonalkód adatbázisok létrehozásához.

ANDERSEN és munkatársai 2010-ben átfogó filogenetikai vizsgálatot végeztek a *Diaspididae* családban belül. MORSE és NORMARK 2006-os filogenetikai munka elemzésével egészítették ki saját adataikat. A tanulmányhoz 125 faj, 253 mintáját és outgroup-ként nyolc

fajt használtak. Négy különböző gén régió: a nukleáris proteint kódoló gén elongációs faktor 1 α (EF1 α), a nagy riboszomális alegység (28S) rDNS régió, a mitokondriális régióhoz tartozó a citokróm-oxidáz I (COI) és a citokróm-oxidáz II (COII), és a kis riboszomális alegység (16S) rDNS segítségével végezték a vizsgálatokat. Eredményeik nagyjából megerősítik a jelenlegi besorolást, de a monofiletikus vagyis közös rendszertani őstől származó elméletre nem találtak jeleket. Kutatásuk eredménye az előző tanulmányhoz hasonlóan arra utal, hogy a családban még nem rendezettek a taxonómiai viszonyok és teljes körű felülvizsgálatot javasolnak.

A morfológiai és molekuláris vizsgálatok egymás mellett és egymás kiegészítésére való alkalmazására nagyon jó példa GULLAN és munkatársai, 2010-ben végzett tanulmánya *Ferrisia* FULLAWAY (*Pseudococcidae*) nemzetségről. A vizsgálatok során a mitokondriális DNS, citokróm oxidáz I. génjét és a sejtmagi DNS, EF-1 α és a 28s D₂D₃ génjeit használták. A *Ferrisia* nemzetségbe tartozó *F. virgata* (COCKERELL) feltételezhetően, valójában több, rokon fajt tartalmazó taxon habár korábban a morfológiai vizsgálatok alapján egy fajnak vélték. A molekuláris vizsgálatok során kapott adatok alapján a *Ferrisia virgata* fajon belül 6 kládot különítettek el és a kapott molekuláris eredmények alapján új morfológiai bélyegeket írtak le a nemzetség fajainak elkülönítéséhez.

Nemcsak új fajok leírására, hanem fajok azonosítására és megkülönböztetésére is jól alkalmazható együtt a két módszer. RUNG és mtsai. (2008) által készített tanulmányban a *Planococcus* nemzetségről készítettek filogenetikai elemzéseket, a mitokondriális DNS citokróm oxidáz génjének (COI) és a sejtmagi DNS elongációs faktor génjének vizsgálatával. Megbízható eszközöket kifejlesztése volt a céljuk a *Planococcus citri* és a *Planococcus minor* molekuláris fajazonosításához. Az eredmények alapján megállapították, hogy COI gén vizsgálata a morfológiai jellemzők elemzésével kiegészítve jó módszere lehet a két faj elkülönítésének.

A fajtaazonosításon túl fajok eredetére is választ adhat egyes DNS szakaszok vizsgálata. Ebben az esetben is előszeretettel használják a citokróm-oxidáz I (COI) gén teljes szekvenciájának vizsgálatát. GWIAZDOWSKI és mtsai. (2006) az észak-Amerikában invazív bükk gyapjas-pajzstetű fajt (*Cryptococcus fagisuga* LINDINGER) vizsgálta. A kutatásuk célja az eredeti élőhely azonosítása volt. A bükk gyapjas-pajzstetű eredetileg Európából származik, azonban a pontos régiót nem lehetett tudni. Az eredeti élőhely ismerete azért fontos, mert így fellelhetőek a klasszikus biológiai védekezést szolgáló természetes ellenségek. Történelmi feljegyzések vizsgálatán túl a *C. fagisuga* filogenetikai vizsgálatát is elvégezték a meghatározott szekvenciák alapján. Vizsgálták továbbá más *Cryptococcus* és *Eriococcidae*

fajokkal való rokonsági viszonyát a riboszómális DNS (18S gén) segítségével. A 18S gén filogenetikai elemzése alapján *C. fagisuga* egy olyan kozmopolita *Eriococcid* kládba helyezhető, amely egyéb mérsékeltövi fa fajokon is táplálkoznak (kőris, juhar, és a déli bükk). A filogeográfiai tanulmány alapján valószínűsíthető, hogy az eredeti tápnövénye a *C. fagisuga* fajnak a *Fagus sylvatica orientalis*, tehát valószínűleg ezen a keleti bükkön károsító fajok természetes ellensége a leghatékonyabb, ezek Északkelet-Görögországban, a Fekete-tenger vízgyűjtő medencéjében, a Kaukázus-hegységben, vagy Észak-Iránban találhatók meg és innen érdemes behozni.

A fajon belüli különböző populációk vizsgálatát nagyban elősegítik a markerek használata. TODA és MARUI 2007-ben a sok tápnövénnyel rendelkező dohánytripsz (*Thrips tabaci*) különböző populációit vizsgálták, céljuk a faj intra-specifikus genetikai sokféleségének kimutatása. A vizsgálatot Japánban végezték, itt egyre nagyobb számban fordulnak elő a dohánytripszek, és több új tápnövénnyen is észlelték. Ezen kívül csökkent az érzékenységük a rovarölőszerekkel szemben Japánban és ellenálló fajtákat figyeltek meg az Egyesült Államok és Kanada területén is. A kutatás során, egy a mitokondriális citokróm-oxidáz gén alegység I (COI) 810 bp hosszú régióját vizsgálták. Hat ország nyolc populációját és 18 japán populációt vetettek össze majd 17 különböző haplotípusok azonosítottak. Eredményeik alapján a COI gén alapján rajzolt filogenetikai fa két különböző csoportot mutat, amik rendre megfelelnek a két szaporodási formának amit a dohánytripszeknél figyelhető meg. A tanulmányban megemlítik, hogy ez a jelenség szintén megfigyelhető volt egy másik tripsz faj, a *T. nigropilosus* esetében és a kutatók javasolták, hogy ezeket különálló fajként kezeljék (NAKAO és YABU, 1998).

3 Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált anyagok

A vizsgálatok során feldolgozott minták egy része saját gyűjtési anyag, de felhasználtam munkámhoz az MTA ATK Növényvédelmi Kutatóintézet kollégái által begyűjtött mintákat is, valamint külföldről, Japánból, származó feromon csapdás anyagot. A feldolgozott minták adatait az 1. táblázatban összegeztem:

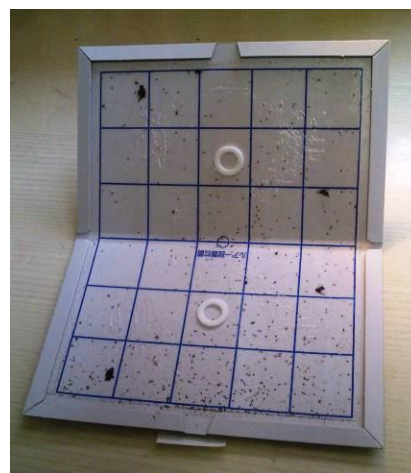
1. táblázat: A dolgozatban vizsgált *Pseudaulacaspis pentagona* egyedek

Begyűjtés helye	Begyűjtés ideje	Nőstény/Hím	Élő/Száraz	Gazdanövény
Aszód	2012.07.10.	Kifejlett Nőstény	Élő	<i>Catalpa bignoides</i> (Szivarfa)
Gödöllő	2012.07.10	Kifejlett Nőstény	Száraz	<i>Sophora japonica</i> (Japánakác)
Japán	2011.11.04-07	Hím (feromon csapda)		Tea ültetvény
Kecskemét	2012.07.17.	Kifejlett Nőstény	Élő	<i>Catalpa bignoides</i> (Szivarfa)
Kecskemét2	2012.03.06	Kifejlett Nőstény nincs prep.		<i>Morus sp.</i> (Eperfa)
Martonvásár	2012.03.29.	Kifejlett Nőstény	Élő	<i>Syringa vulgaris</i> (Orgona)
Vecsés	2012.02.27	Kifejlett Nőstény nincs prep.		<i>Syringa vulgaris</i> (Orgona)

3.2 Felhasznált módszerek

3.2.1 Mintagyűjtés

A vizsgálathoz használt pajzstetű mintákat több helyszínről gyűjtöttük. A nőstények gyűjtéskor a növényről a pajzstetűvel fertőzött ágakat illetve kéreget szedtünk, majd feldolgozásig 4°C-on tároltuk. A minták válogatás után 96%-os alkoholban tároltuk a morfológiai és molekuláris vizsgálatokig. A vizsgált hímek, Japán feromon csapdából (7. ábra) származtak (feromon csapda



7. ábra: Japán feromon csapda

adatai: csapdázási helyszín: Tea field of NIVT Kanaya; Shimada, Shizuoka, Japan, E138°082 N34°483 Alt. 202 m – feromon gyártója Shin-Etsu Chemical Co. Ltd.).

3.2.2 Morfológiai vizsgálat

A morfológiai és molekuláris vizsgálatokat ugyanazon egyedeken végeztük el. A vizsgálatok során egy helyről több (kb 5-5) egyedet is feldolgoztunk, majd azt a mintát vizsgáltuk tovább és annál végeztünk morfológiai vizsgálatot, amelyiknél megfelelő mennyiségben kaptunk PCR-terméket.

Mivel a *P. pentagona* nőtények testnedveit nehézkes eltávolítani a test sérülése nélkül, a morfológiai vizsgálatokhoz a harántirányban kettévágott test alsó részét, a pigidiumot, használtuk fel. A *Diaspididák* esetében az elkülönítő/határozó bélyegek a farlemezen vagy pigidiumon vannak.

A preparálás lépései (KOSZTARAB ÉS KOZÁR 1978):

- Preparálás előtt a frissen gyűjtött anyagot 96%-os alkoholban tártjuk, min.10 percet.
- A mintákat először kálium-hidroxidos (KOH) fürdőbe tesszük, 10-15 percig lassan melegítjük. Ezután a belső részeket kinyomkodjuk.
- A KOH maradékokat 70% -os alkoholos áztatással oldjuk ki a testből, kb. 5-10 perc.
- A festést ESSIG félé festőoldattal végezzük, legalább 10 percig (max. fél óra). A fölösleges festéket 70% alkoholos öblítéssel eltávolítjuk.
- A zsírtalanítást szegfűszegolajjal végezzük, 10-35 perc (szükség esetén egy éjszaka).
- Végül Kanada balzsammal felhelyezzük a tárgylemezre.
- Mikroszkópos vizsgálat előtt a preparátumokat célszerű két hétig szárítani.

3.2.3 Molekuláris vizsgálat

A molekuláris vizsgálatokhoz, nőtények esetében a test felső részét használtuk, aminek esetünkben nincs jelentős szerepe a meghatározásban. A hímeknél az egész egyedet felhasználtuk.

DNS kivonás

A DNS kivonáshoz a REDExtract-N-AmpTM Tissue PCR Kitet (Sigma) használtuk fel a gyártó előírásai szerint:

- A vizsgálatához használt mintákhoz 15-20 µl kivonó puffert pipettáztunk.
- Az elegyet először 55°C-on inkubáltuk 5 percet, majd 95°C-on 3 percet.

- Végül jégen lehűtöttük és a kivonó pufferrel azonos térfogatú semlegesítő, vagyis neutralizációs puffert adtunk, vortex használatával alaposan elegyítettük.

A mintákat ezután -20°C-on tároltuk vagy azonnal felhasználtuk.

PCR vizsgálatok

A felszaporításhoz a riboszómális DNS ITS-2 szakaszát felismerő CAS5p8sFc (5'-GCGAACATCGACAAGTCGAACGCACAT-3') és CAS28sB1d (5'-TTGTTTTCTCCGCTTATTAATATGCTTAA-3') indító szekvenciapárt (KIM és LEE, 2008) alkalmaztuk. A PCR reakciót 25 µl végtérfogatban végeztem. A polimeráz láncreakció (PCR) Taq polimeráz (Fermentas) felhasználásával Eppendorf-PCR készülékben (Eppendorf Mastercycler Gradient) történt.

A PCR reakció lépései (2. táblázat): Az első lépés a 4 perc elődenaturáció 95°C-on, ezután 40 ciklus következett, amelyben 30 másodperc 95°C-on végzett denaturációt, 30 másodpercenyi primerkötés követett 50°C-on, majd 60 másodperc lánchosszabbítás zárt 72°C hőmérsékleten. Az utolsó lépés 10 perc lánczáró szintézis 72°C-on. A 3. táblázat tartalmazza a PCR reakció összetevőit. A PCR reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, 1%-os TBA gélben. A géleket ethidium-bromiddal festettem meg és UV fénnel váltak láthatóvá, dokumentáltam.

2. táblázat: A PCR reakció lépései

Hőmérséklet	Időtartam	Ismétlés
95°C	4 min	40 x
95°C	30 sec	
50°C	30 sec	
72°C	60 sec	
72°C	10 min	
4°C	∞	

3. táblázat: PCR reakció elegy

Összetevő	Bemért mennyiség
PCR puffer (KCl)	2.5µl
MgCl ₂	2.5 µl
dNTP	1 µl
Primer F	0.5 µl
Primer R	0.5 µl
Taq polimeráz	0.25 µl
DNS	0.5 µl
MQ víz	17 µl

PCR-termék tisztítása

A megfelelő mennyiségre felszaporított PCR-termékeket a *PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid)* segítségével tisztítottuk meg, a folyamatot a gyártó előírásai szerint végeztük.

- Az előírtak szerint PCR-termék térfogatához képest ötszörös mennyiséget adunk a DF pufferből és alaposan összekeverjük (vortex).
- Az elegyet szűrős eppendorf csőbe átöntjük, majd a legnagyobb fordulatszámon (Mini Eppendorf) centrifugáljuk 30 másodpercig. A gyűjtőcső tartalmát kiöntjük.
- A szűrőre 600 µl mosó puffert pipetázunk, és újra lecentrifugázzuk 13.000 rpm-en 30 másodpercig, majd szintén kiöntjük a gyűjtőcső tartalmát és további 3 percet centrifugáljuk.
- Végül a szűrő közepére 25 µl steril vizet pipetázunk, 3 percet állni hagyjuk szobahőmérsékleten, utána a tisztított PCR-termék kioldása érdekében még 3 percet centrifugáljuk.

Ligálás

- Előkészítés: 7 µl tisztított PCR-termékhez 1 µl Blunting enzimet és 10 µl ligáló puffert adunk és 70°C-on 5 percig inkubáltuk az elegyet, majd kb. 2 percre jégre tettük.
- Ligálás: Az így kapott terméket 1 µl (Clonejet) klónozó vektorba ligáltuk 1 µl T4 DNS-ligázzal. Gyors centrifugálás után a ligálási reakciót 3-4 órán keresztül végeztük szobahőmérsékleten.

Klónozás

Minden egyes ligátumból 10µl-t transzformáltunk 50 µl *Echerichia coli* DH5α baktérium sejtekbe, majd jégen 20-30 percig inkubáltuk együtt. A jégen történő inkubálás után szigorúan 1 perces 42°C-os hősokkot alkalmaztunk, majd 450 µl antibiotikum-mentes, folyékony táptalaj (LB folyékony táptalaj) hozzáadása után 1 órán keresztül 37°C-on indító inkubálást végeztünk.

A transzformált sejtekből 150, valamint 300 µl-t, ampicillin antibiotikumot tartalmazó LB lemezekre szélesztettünk és 37°C-on legalább egy éjszakán át inkubáltuk (overnight).

A minden klónozásnál 5-5 kolóniából ellenőriztük az insert meglétét PCR segítségével, melyhez Pjet revers 1.2 és Pjet forward 1.2 primereket használtuk a gyártó (Fermentas) utasítása szerint.

A megfelelő telepekből 2ml folyékony táptalajba leoltást végzünk és további egy estére, 37°C-on rázatva inkubáljuk.

Az így kapott plazmidot a *High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid)* segítségével tisztítottuk meg a gyártó előírása alapján:

- Első lépésben 1,5 ml baktérium kultúrát 1 percig centrifugáljuk, a felülúszót leöntjük.
- Az üledék szuszpenzálása 200 µl PD1 pufferrel történik vortex segítségével.
- Majd 200 µl-t adunk a PD2 pufferből és 10-szer óvatosan megforgatjuk az elegyet tartalmazó csöveket, 2 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk.
- A neutralizáláshoz 300 µl-t használunk a PD3 pufferből, óvatosan elegyítés után 3 percig centrifugázzuk.
- Ezután a DNS megkötés lépése következik, szűrővel rendelkező gyűjtőcsőbe átöntjük, és 30 másodpercig centrifugáljuk, az átfolyt puffert leöntjük.
- A mosáshoz 400 µl W1 folyadékot a szűrő közepére pipetázunk, 30 másodperc centrifuga után a gyűjtőcsőből újra leöntjük az átfolyt folyadékot és 600 µl mosó puffert (etanol-tartalmú) helyezünk a szűrő közepére. 30 másodperc centrifuga után a kimosott puffert leöntjük és 3 percre ismét visszarakjuk a centrifugába.
- A kiszáritott szűrőt egy új csőbe átrakjuk és 25 µl elúciós puffert vagy steril vizet adunk a szűrő közepére. 2 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd 2 percig centrifugáljuk, amíg a DNS kimosódik a szűrőből.
- A klónozás sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük.

Szekvenálás

Szekvenálásra mindegyik mintából a megfelelő koncentrációban felszaporított, tisztított plazmidból 10 µl-t küldtünk BAYGEN, Kapilláris Szekvenáló Platform (Szeged) részére. A szekvenciák feldolgozását a CLC Sequence Viewer szoftver segítségével végeztem.

4 Eredmények és megvitatásuk

Morfológiai vizsgálatok

A vizsgálat során a nőstények pigidiumának egyes részleteit hasonlítottuk össze. Az összehasonlító vizsgálathoz, jól felismerhetők és viszonylag könnyen számszerűsíthető bélyegeket kerestünk. A hasi oldalon az ivarnyílás körül 5 tömör, korong alakú mirigyekből álló csoport figyelhető meg, a háti oldalon pedig kettős kitinperemmel rendelkező csöves mirigyeket találunk. Ezek nagy számban vannak jelen és a potrohszelvényeken harántsorokat alkotnak. Továbbá megmértük a középvonal mentét, az elülső mirigycsoport felső vonalától kezdve a pigidium végéig. Az előzetes összehasonlításhoz ezeket az adatokat vettük alapul (4. táblázat). A japán csapdából származó hím, valamint kecskemét² és vecsési nőstényekből nem készült preparátum, ezek esetében csak molekuláris vizsgálatot végeztünk.

Az eperfa-pajzstetű esetében az irodalomból ismert circumgenitalis mirigyképlet a következő: 6-20 (24-38) 18-30 (KOSZTARAB ÉS KOZÁR, 1978). Összevetve az irodalmi adatokkal megállapítható, hogy a kisebb eltérésektől eltekintve, a fajra jellemző értékekkel rendelkeztek a vizsgált egyedek. A morfológia összehasonlítás alapján a legkisebb arányokkal, az átlagtól jóval kisebb szinte az összes értéke a martonvásári egyednek. Külön csoportokat lehet alkotni a mirigyek száma alapján. A martonvásári és a kecskeméti egyedek csöves mirigyek száma szempontjából, az átlag alatt vannak, ellentétben a gödöllői és aszódi egyedekkel. Az aszódi mintáknak az alsó mirigycsoportjai jóval nagyobb számú soksejtű mirigyeket tartalmaz, mint a többi egyed. A középvonal mérési értékeinél szintén a *S. vulgaris*-ról gyűjtött martonvásári minta rendelkezik az átlagtól jóval kisebb (204) méretekkel. A legnagyobb értékkel (240) a *S. japonica*-n talált egyed rendelkezik.

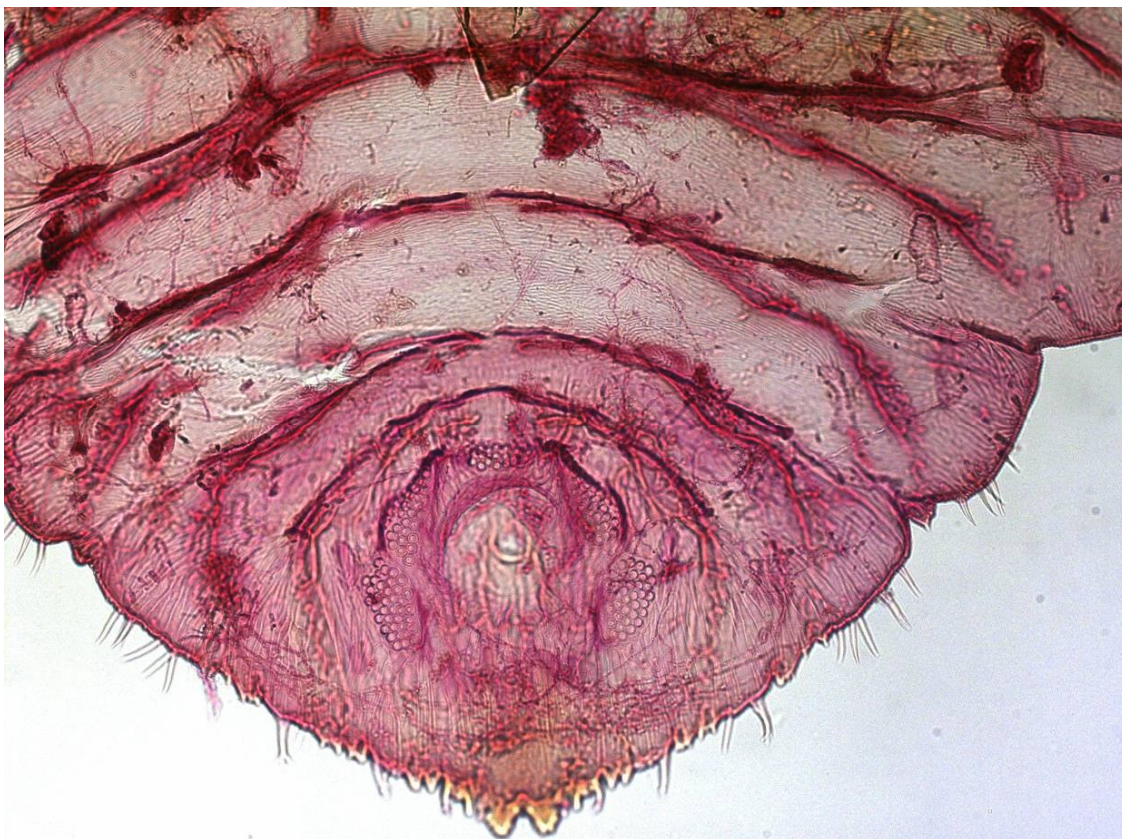
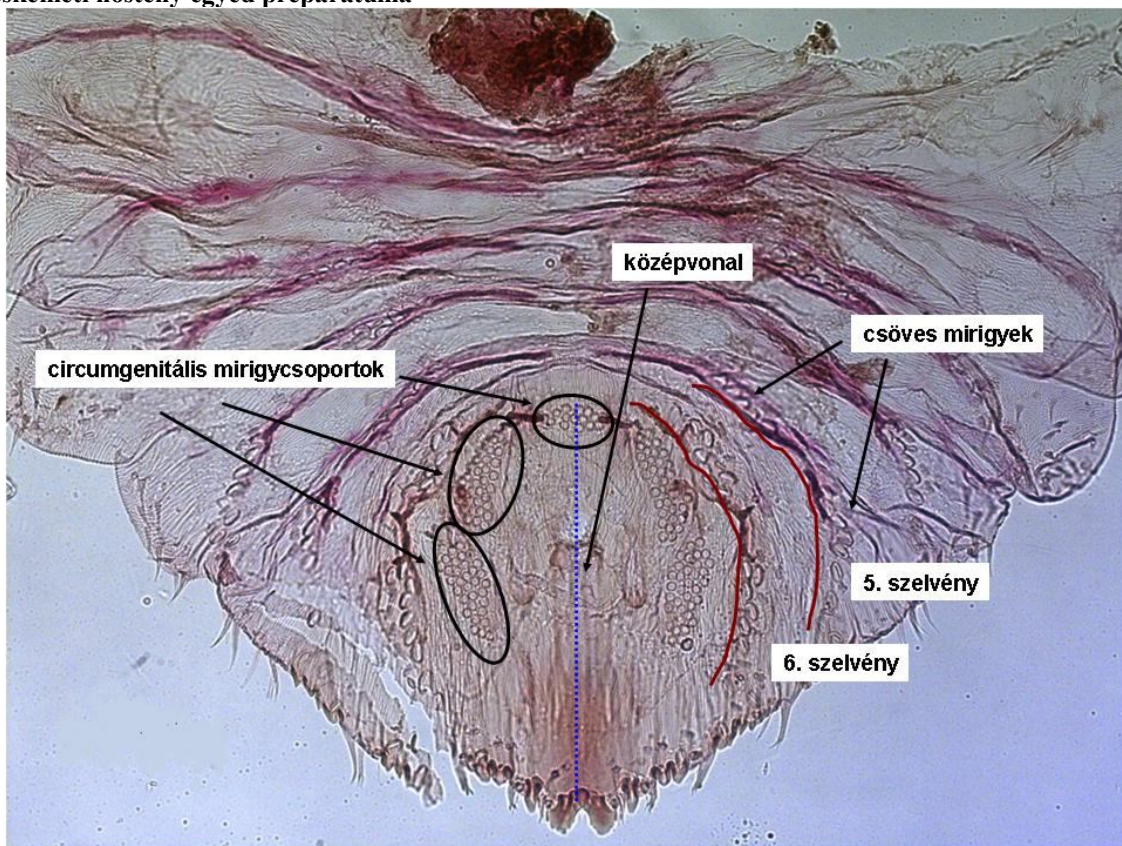
	Circumgenitalis mirigycsoportok					Csöves mirigyek					
	Felső	Bal felső	Jobb felső	Bal alsó	Jobb alsó	Bal* 6	Jobb* 6	Bal* 5	Jobb* 5	Középvonal méret	
Aszód	17	33	32	40	37	10	13	13	11	225,6	<i>Catalpa</i>
Gödöllő	16	33	36	32	35	14	14	12	13	240	<i>Sophora</i>
Kecskemét	17	32	28	34	38	9	9	9	9	230,4	<i>Catalpa</i>
Martonvásár	14	26	23	24	26	8	10	8	7	204	<i>Syringa</i>
Átlag	16	31	29,75	32,5	34	10,25	11,5	10,5	10	225	

4. táblázat: A morfológiai vizsgálat által meghatározott adatok

* Bal/Jobb 5 = 5. potroh szelvény jobb és bal oldalán található csöves mirigyek száma

* Bal/Jobb 6 = 6. potroh szelvény jobb és bal oldalán található csöves mirigyek száma

8. ábra: Felső kép: gödöllői egyed mikroszkópi preparátuma a mért adatokkal bejelölve. Alsó kép: A kecskeméti nőstény egyed preparátuma



A felszaporított ITS2 szekvencia általában 703 bp hosszú kivétel a 706bp vecsés, a 721 bp japán és a 748 bp-ral rendelkező martonvásári minta (7. ábra). A Japán és a martonvásári minták rendelkeznek olyan insert szakaszokkal a szekvencián belül, ami a többi mintából hiányozik. A bázispárok arányában (C-G és T-A) csak minimális különbségeket figyelhettünk meg. A vizsgált egyedek ITS-2 szekvenciáit egymással is összehasonlítottuk (5. táblázat). Mindegyik esetben 90%-on felüli volt a homologitásuk. 96%-os hasonlóság tapasztalható Japán-Aszód, Japán-Kecskemét és Kecskemét2, Martonvásár-Aszód és Kecskemét2 illetve Vecsés között. 97%-os eredményeket kaptunk Aszód-Kecskemét, Japán-Martonvásár és Gödöllő, Kecskemét-Martonvásár. 98%-os lett Vecsés-Aszód, Japán, Kecskemét, Kecskemét2, Kecskemét2-Aszód és Kecskemét. Legnagyobb homologitás (99%) a Gödöllő-Kecskemét, Kecskemét2 és Vecsés között tapasztalható.

5. táblázat: Az ITS-2 szekvenciák páronkénti összehasonlítása

		Aszód	Gödöllő	Japán	Kecskemét	Kecskemét2	Martonvásár	Vecsés
		Catalpa	Sophora	Tea	Catalpa	Morus Sp.	Syringa	Syringa
Aszód	Catalpa		98	96	97	98	96	98
Gödöllő	Sophora			97	99	99	97	99
Japán	Tea				96	96	97	98
Kecskemét	Catalpa					98	97	98
Kecskemét2	Morus						96	98
Martonvásár	Syringa							96
Vecsés	Syringa							

Az ITS-2 szekvenciák összehasonlítása után 1000-szeres bootstrap analízissel törzsfát is készítettünk (9. ábra). Az összehasonlítás alapján két jól elkülöníthető csoportot kapunk. Az aszódi és kecskemét2 nőtény egyed és külön ágon a japán hím egyedek alkotnak egy jól elkülöníthető csoportot valamint a vecsési, gödöllői, kecskeméti nőtény és ezen belül külön ágat képez a martonvásári egyed.



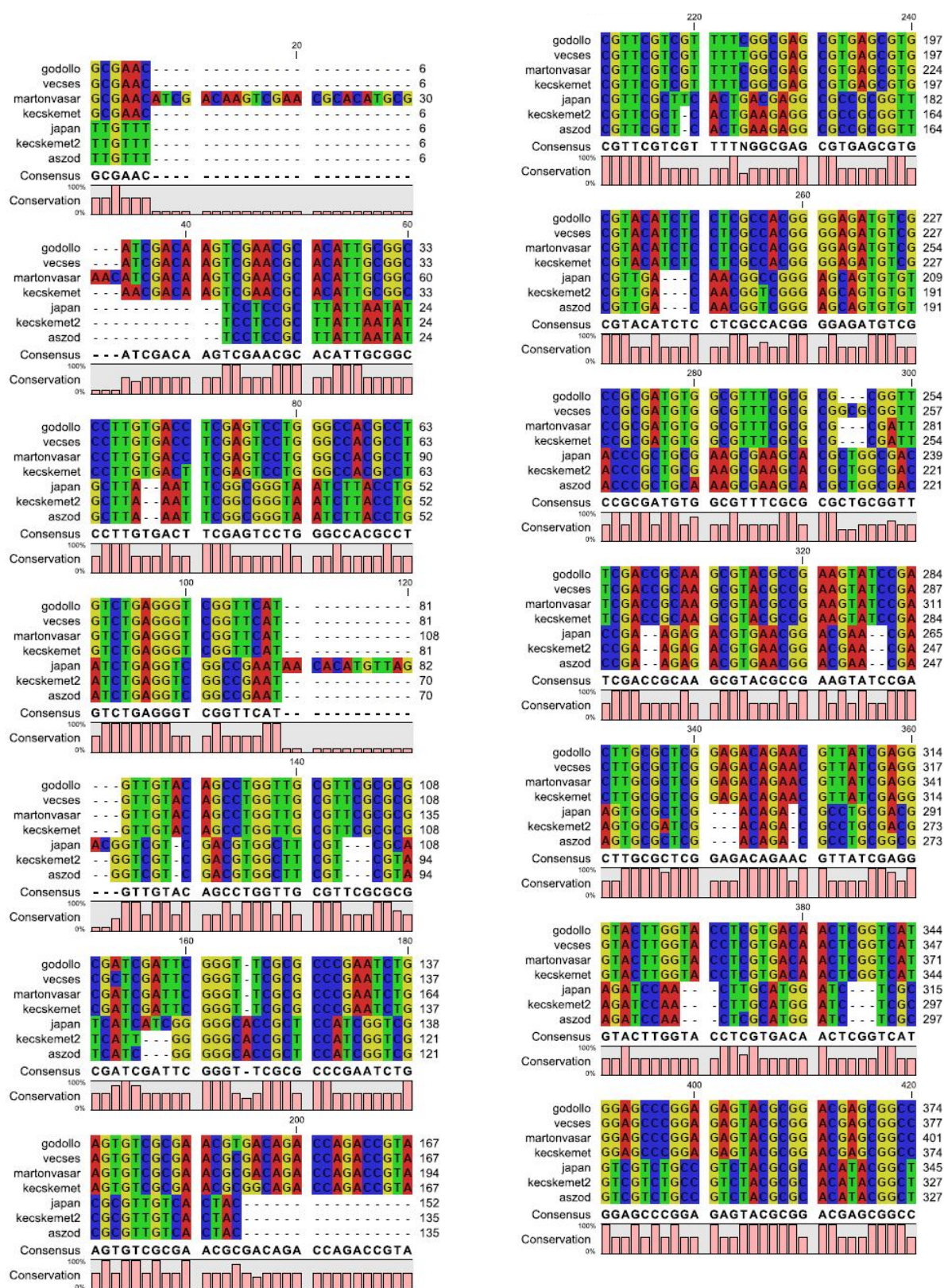
9. ábra: ITS-2 szekvencia alapján készített törzsfa

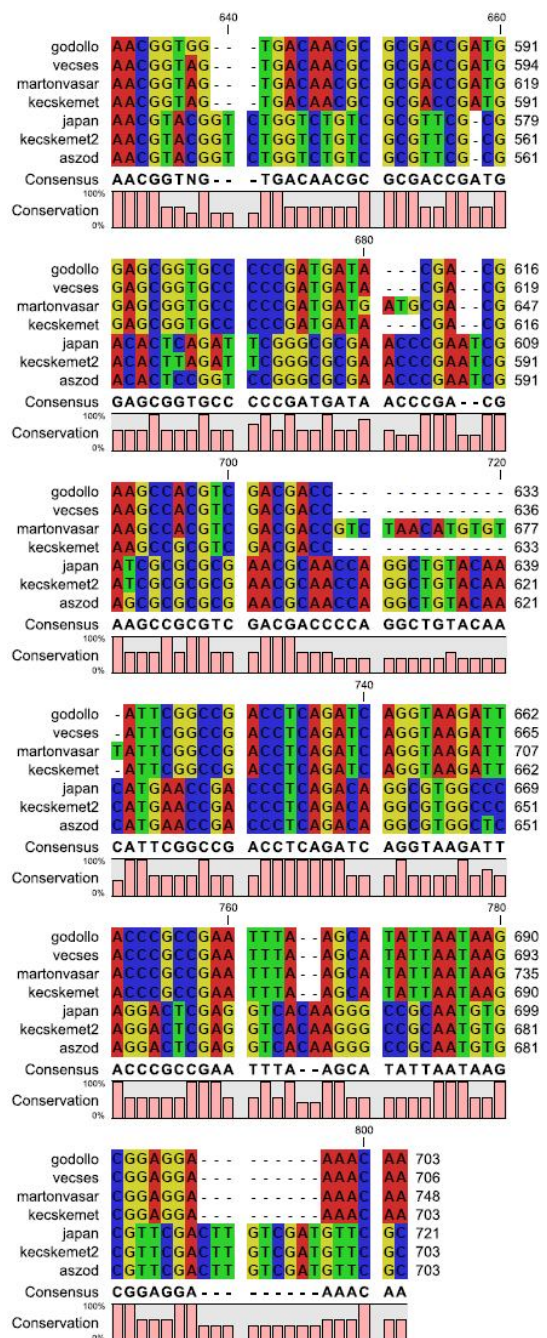
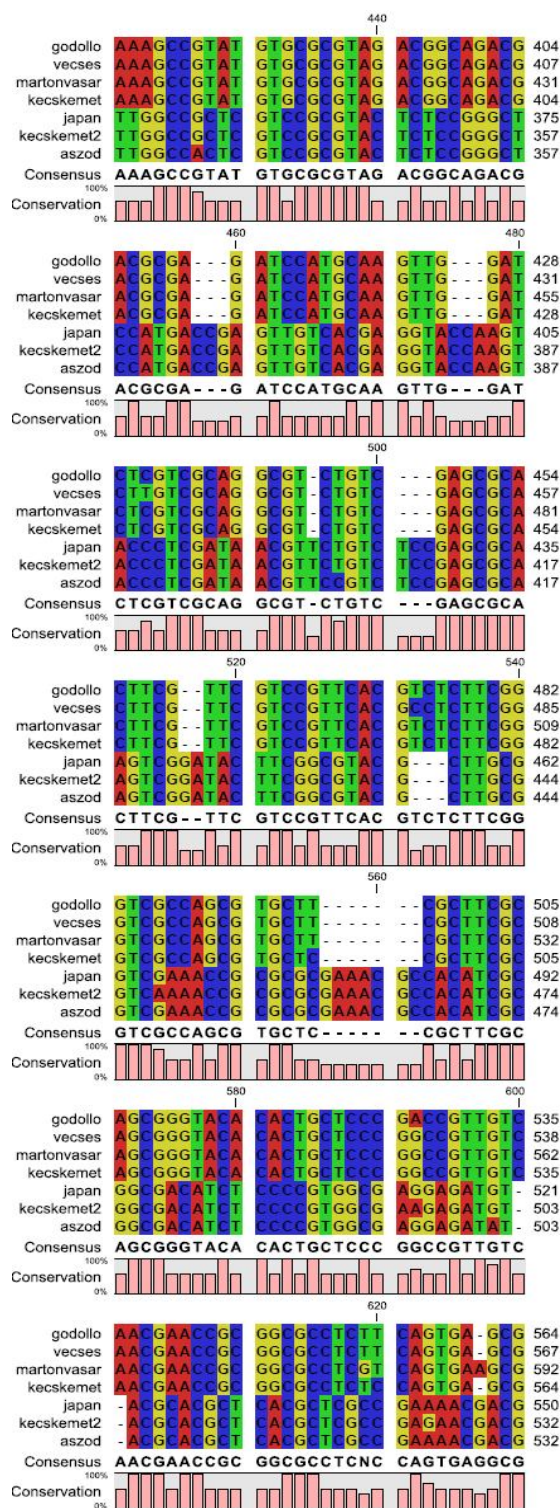
A két vizsgálati módszer alapján, a kis mintaszám miatt nem lehet messzemenő következtetéseket levonni a morfológiai és molekuláris adatok között. Azonban kisebb eltéréseket és párhuzamokat találhatunk, amik előre vetítik egy esetleges nagyobb mintaszámmal végzett tanulmány sikerességét.

A legnagyobb alsó mirigy értékekkel rendelkező aszódi nőstény minta a japán hím és a kecskemét2 nőstény egyed szekvenciáival mutatott nagymértékű homológiát. A *Syringa vulgaris*-on gyűjtött, jóval kisebb morfológiai értékkel rendelkező martonvásári nőstény a második csoporton belül is külön ágat alkot, tehát szekvenciájában is felfedezhető eltérés a többitől. A *Catalpa bignoides* és *Sophora japonica* növényeken talált egyedek között esetünkben nem lehet számottevő különbséget fellelni, sőt a *C. bignoides*-en élő egyedek páronkénti összehasonlítás alapján nagyobb homológiát mutattak a *S. japonica*-n élő egyeddel, mint egymással. Ezek alapján azonban nem lehet elvetni azt a feltevést, hogy a különböző fásszerű növényeken élő mikropopulációk között nincs különbség, hiszen a *S. vulgaris*-on talált egyed mind ITS-2 szekvencia mind a morfológiai vizsgálatok alapján is jól elkülöníthető a többi egyedtől, azonban több minta szükséges a megbízható következtetések levonásához.

Érdekesség, hogy a Japán minta, ami földrajzi elhelyezkedés szempontjából is viszonylag elkülönült területről származik, ITS-2 szekvenciája nagy homológiát mutatott az aszódi nőstény és kecskemét2 hím egyedekkel, feltételezhető a közös származási vonal. Az adatok alapján képet kaptunk arról, hogy a nőstényeket és hímeket is egyaránt lehet használni a vizsgálatokhoz és érdemes több külföldi mintákkal is összevetni, ami egy lehetséges származásra adhat választ. Ezen kívül a vecsési és a gödöllői nőstény és a kecskeméti nőstény egyed szintén nagy homológiát mutatott annak ellenére, hogy mindhárom más tápnövényről lett gyűjtve. Az adatok alapján feltételezhető, hogy a mikropopulációkat nagyobb mértékben befolyásolják a területi elkülönülések, mint a tápnövény.

10. ábra: A vizsgált egyedek ITS-2 szekvencia összehasonlításuk





5 Összefoglalás

Munkám során a különböző területekről illetve különböző tápnövényekről begyűjtött *Pseudaulacaspis pentagona* egyedeket vizsgáltam morfológiai és molekuláris módszerekkel az MTA ATK Növényvédelmi Intézetében. A dolgozat célja, meghatározni, hogy kimutathatóak-e mikropopulációk közötti különbségek mind molekuláris mind morfológiai szinten. Az ivarérett nőstényekből preparátumot készítettünk, mivel ezek a morfológiai vizsgálatok alapját képezik. A morfológiai összehasonlításokat könnyen felismerhető és számszerűsíthető határozóbélyegek összevetése alapján végeztük. A molekuláris vizsgálatokat az egyedek riboszomális RNS nem kódoló ITS-2 szakaszainak összehasonlító elemzésével végeztük el. A morfológiai vizsgálatok alapján, elmondhatjuk, hogy az irodalomban közölt adatoktól, a mért értékek nem tértek el, és a *Pseudaulacaspis pentagona* fajra jellemzőek voltak. Egy esetben a martonvásári minta morfológiailag és molekulárisan is mutatott különbséget. A kisebb morfológiai értékekkel rendelkezett, mint a többi egyed az ITS-2 szekvencia alapján pedig az egyik csoporton belül külön ágon helyezkedik el.

A kapott eredmények alapján feltételezhető, hogy a mikropopulációkat nagyobb mértékben befolyásolják a területi elkülönülések, mint a tápnövény, de messzemenő következtetéseket nem lehet levonni a kis mintaszám miatt.

A Japánból kapott hím minta viszonylag nagy homologitást mutatott a kecskeméti és az aszódi nőstény egyedekkel, feltételezhetően közös származási útvonalat lehet fellelni, továbbá megerősítette a vizsgálat, hogy molekuláris úton mindkét nemet egyaránt felhasználhatjuk és összehasonlíthatjuk, és mindkettőnél alkalmas lehet az ITS-2 szekvencia az esetleges eltérések kimutatására.

A *P. pentagona* esetében ilyen típusú mikropopulációkat érintő morfológia és molekuláris vizsgálatoknak nincsenek hazánkban és külföldön előzményei, viszont eddigi előzetes eredményeink megerősítették, hogy érdemes folytatni a vizsgálatokat, nagyobb minta számmal, több vizsgálati helyszínről (akár a terjedés feltételezett útvonalát követve), a leggyakoribb tápnövények bevonásával, hím és nőstény egyedeket egyaránt vizsgálva.

6 Irodalomjegyzék

1. ANDERSEN J.C., JIN WU, E. MATTHEW ÉS MTSAL. (2010): A phylogenetic analysis of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae), based upon nuclear, mitochondrial, and endosymbiont gene sequences *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(3): 992–1003
2. BAGGIOLINI, M., B. BLOESCH (1993): Foyers de cochenille du murier, *Pseudaulacaspis pentagona*, observes dans la region de la Cote lemanique, *Revue suisse de viticulture,-arboriculture,-horticulture* (Svájc). 25(3): 161-165.
3. BALACHOWSKY, A. S. (1948): Les cochenilles de France, d'Europe, du nord de l'Afrique et du bassin méditerranéen. IV. Monographie des Coccoidea, Diaspidinae (Première partie). *Actualités Scientifiques et Industrielles* 1054: 1–154.
4. BALDWIN, B. (1992): Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1(1): 3–16.
5. BARTLETT, A.C., G.D. BUTLER JR (1975): Genetic control of the cabbage looper by a recessive lethal mutation. *Journal of Economic Entomology*, 68: 331–335.
6. BARTLETT, A.C., N.M. WILSON, E.B. MATTIX (1968): The fate of genetic markers in populations of boll weevils. *Journal of Economic Entomology*, 61: 808–812.
7. BAYOUMY, M.H., K. FETYKÓ, I. TÓBIÁS, Z. KONCZNÉ BENEDICTY, É. SZITA és F. KOZÁR. (2011): A geographical study on *Pseudaulacaspis pentagona* and its parasitoids in Hungarian highway margins using pheromone traps and molecular markers. *Entomologia Hellenica* 20: 17-30.
8. BEARDSLEY, JW. JR. ÉS R.H. GONZALEZ. (1975). The Biology and Ecology of Armored Scales. *Annual Review Entomology* 20: 47-73.
9. BEHURA, S.K (2006) Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology* (2006) 15 , 3087–3113
10. BEN-DOV, Y., (2012): ScaleNet, Family Diaspididae. <http://www.sel.barc.usda.gov/scalecgi/chklist.exe?Family=Diaspididae&genus=> (elérés: 2012. november 5.)
11. BISZTRAY, GY. (2001): A genom összetétele. In: I. VELICH (szerk.): Növénygenetika. Mezőgazda kiadó, Budapest. pp 407-431.
12. BOND, H.A., G.B. CRAIG JR, R.W. FAY (1970): Field mating and movement of *Aedes aegypti*. *Mosquito News*, 30: 394–402.
13. BUSSABAN, B., S. LUMYONG, P. LUMYONG ÉS MTSAL. (2005) – Molecular and morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. *Mycologia* 97: 1002–1011.

14. CAMARGO, J.M.F., S.R.M. PEDRO (2002): Mutualistic Association between a tiny Amazonian stingless bee and a wax-producing scale insect. *Biotropica* 34(3): 446-451.
15. CATERINO, M.S., S.CHO, F.A.H. SPERLING. (2000): The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 45: 1-54.
16. CECH, GÁBOR (2011)Molekuláris biológiai módszerek használata a *Lumbricidae* és az *Enchytraeidae* (Annelida) családok taxonómiai problémáinak megoldásában , Eötvös Loránd Tudományegyetem,Budapest, Doktori értekezés.
17. CLARKE, A. (2002): Macroecology comes of age. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 352–353.
18. COLLINS, F. A., ÉS W. H. WHITCOMB. (1975):Natural Enemies of the White Peach Scale, *Pseudaulacaspis pentagona* (Homoptera: Coccidae), in Florida, *The Florida Entomologist* 58(1): 15-21
19. COLLINS, F. A., S.M. PASKEWITZ (1996): A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, 5: 1–9
20. CROWL, T. A., T. O. CRIST, R. R. PARMENTER, G. BELOVSKY ÉS A. E. LUGO (2008): The spread of invasive species and infectious disease as drivers of ecosystem change. *Frontiers in Ecology and Environment*, 6: 238–246.
21. GOSSARD, H. A. (1902). Two peach scales. *Florida Agricultural Experiment Station Bulletin*, 61: 492-298.
22. GULLAN, P.J. ÉS J.H. MARTIN (2003): Sternorrhyncha (jumping plant-lice, whiteflies, aphids and scale insects).. In V. Resh and R. Cardé (eds), *Encyclopedia of Insects*. Academic Press Amsterdam. p.1079-1089.
23. GULLAN, P.J. KAYDAN, B. M. ÉS HARDY, N.B.(2010): Molecular phylogeny and species recognition in the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae). *Systematic Entomology* 35: 329–339.
24. GURNEY, T, JR., R. ELBEL, D. RATNAPRADIPA, R. BOSSARD (2000): Introduction to the Molecular Phylogeny of Insects pp.63-79 In. S. J. Karcher, (eds) *Tested studies for laboratory teaching. Proceedings of the 21st Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*, pp 509.
25. GWIAZDOWSKI, RA., R. G. VAN DRIESCHE, A. DESNOYERS, S. LYON, S. WU, N. KAMATA, B. B. NORMARK. (2006): Possible Geographic Origin of Beech Scale, *Cryptococcus fagisuga* (Hemiptera: Eriococcidae), an Invasive Pest in North America. *Biological Control* 39(1): 9-18.
26. HAWBAKER, T. J., V. C. RADELOFF, M. K. CLAYTON, R. B. HAMMER (2006): Road development, housing growth, and landscape fragmentation in northern Wisconsin: 1937–1999. *Ecological Application*, 16:1222–1237.

27. HEBERT, P. D. N., GREGORY, T. RYAN (2005): The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54 (5): 852–859.
- HENDERSON, R. C. (2011): Diaspididae (Insecta: Hemiptera: Coccoidea). *Fauna of New Zealand* 66: 275.
28. KIM H., S. LEE, (2008): Molecular systematics of the genus Megoura (Hemiptera: aphididae) using mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecules and Cells*, 25: 510–522.
29. KONDO, T., P.J. GULLAN, D.J. WILLIAMS, (2008): The study of scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnologia Agropecuaria* 9(2): 55–61.
30. KOSZTARAB, M. ÉS KOZÁR F. (1978): Pajzstetvek –Coccoidea. Akadémiai Kiadó, Budapest pp.192.
31. KOSZTARAB, M. ÉS KOZÁR F. (1988): Scale Insects of Central Europe. Akadémiai Kiadó, Budapest pp.456.
32. KOZÁR, F. ÉS VIKTORIN, R.A. (1978): Survey of scale insect (Homoptera: Coccoidea) infestations in European orchards. Changes in the scale infestation levels in Hungarian orchards between 1971 and 1976. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.* 13 (3–4): 391–402.
33. KOZÁR, F. (1984): Új pajzstetűfaj a városi fákon. *Élet és Tudomány* 41: 1293–1294.
34. KOZÁR, F. ÉS NAGY DÁVID A. (1986): The unexpected northward migration of some species of insects in Central Europe and the climatic changes. *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz und Umweltschutz*, 59: 90–94.
35. KOZÁR, F.(1992): Recent changes in the distribution of insects and the global warming. *Proceedings of the 4th ECE/ XIII.SIEEC*, 406–13, Gödöllő (1991)
36. KOZÁR F., D.A.F. SHEBLE, M.A. FOWJHAN (1995): Study On The Further Spread Of *Pseudaulacaspis Pentagon A* (Homoptera: Coccoidea: Diaspididae) In Central Europe, *Israel Journal Of Entomology*. 19:161-164.
37. KOZÁR, F.(1999): Rendkívüli eper-pajzstetű fertőzés várható, *Kertészet és szőlészet*, 7: 8-9.
38. KOZÁR, F.(2009): Pajzstetű (Hemiptera: Coccoidea) fajok és a klímaváltozás: vizsgálatok magyarországi autópályákon, *Növényvédelem* 45 (11): 577-588.
39. KOZÁR, F., FETKÓ, K., SZITA É., ÉS KONCZNÉ BENEDICTY ZSUZSANNA (2012): A fehér fenyő-pajzstetvek újabb jelentős felszaporodása a hazai autópályákon (Hemiptera: Coccoidea, Diaspididae, Leucaspis sp.) *Növényvédelem* (8).
40. MARTINEZ, J. J. ÉS WOOL D. (2006): Sampling bias in roadsides: the case of galling aphids on Pistacia trees. *Biodiversity and Conservation*. Springer, 1–13.
41. MERÉNYI ALEXSZANDRA (2011): Új technológia, más kártevők, *Kertészet és Szőlészet* 47.
42. MÉSZÁROS Z. ÉS A. VOJNITS (1972): Lepkék, pillék, pillangók. *Natura*, Budapest.
43. MILLER, D. R.; J. A. DAVIDSON (2005): Armored scale insect pests of trees and shrubs (Hemiptera: Diaspididae). *Cornell University Press*, Ithaca, New York. pp. 422 .

44. MORSE, G.E., B.B. NORMARK, (2006): A molecular phylogenetic study of armoured scale insects (Hemiptera: Diaspididae). *Systematic Entomology* 31: 338–349.
45. MUKABAYIRE O, D. BOCCOLINI, L. LOCHOUARN, D. FONTENILLE, N.J. BESANSKY (1999): Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS2) diversity of the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Molecular Ecology*, 8: 289–297.
46. NAGY B., KOZÁR F. (2010): Rovarélet az autópályák mentén - Egy kis úőkológia *Élet és Tudomány* 65(19): 582-584.
47. NAKAO, S., S. YABU (1998): Ethological and chemical discrimination between thelytokous and arrhenotokous Thrips nigropilosus Uzel, with discussion of taxonomy. *Japanese Society of Applied Entomology and Zoology* 42: 77–83.
48. NORMARK, B.B. (2003): The evolution of alternative genetic systems in insects. *Annual Review of Entomology* 48: 397-423.
49. NUR, U, S.W. BROWN, J.W. BEARDSLEY (1987): Evolution of chromosome number in mealybugs (Pseudococcidae: Homoptera). *Genetica* 74(1): 53-60.
50. NUR, U. (1980): Evolution of unusual chromosome systems in scale insects (Coccoidea: Homoptera). In: Blackman RL, Hewitt GM, Ashburner M. (eds.), *Insect Cytogenetics*. London, *Royal Entomological Society*, pp. 97-117.
51. PARK D.S., S.J. SUH, P.D.N. HEBERT, H.W. OH, K.J. HONG. (2011): DNA barcodes for two scale insect families, mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and armored scales (Hemiptera: Diaspididae). *Bulletin of Entomological Research* pp 1-6.
52. ROBISON, W.G. (1977): Ultrastructure of Coccoidea sperm. *Bulletin of the Virginia Polytechnic Institute and State University Research Division* 127: 35-50.
53. ROBISON, W.G. (1990): Sperm ultrastructure, behaviour, and evolution. In: Rosen D. (eds), *Armored Scale Insects: Their Biology, Natural Enemies and Control. World Crop Pests*. Amsterdam, Elsevier, pp. 205-220.
54. RUNG, A., S. J. SCHEFFER, G. EVANS, D. MILLER. (2008): Molecular identification of two closely related species of mealybugs of the genus *Planococcus* (Pseudococcidae). *Annals of the Entomological Society of America* 101: 525-532.
55. SANGER F, A.R. COULSON (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94:441–448.
56. STOLLÁR A., Z. DUNKEL, F. KOZAR A.F. DIÁA SHEBLE, (1993): The effects of winter temperature on the migration of insects. *Időjárás* (97)2: 113-120.
57. TAKAGI, S. (1993): Primitive diaspidini (Homoptera: Coccoidea: Diaspididae). *Insecta Matsumurana*, 49: 1–67.

58. TODA, S., T. MURAI (2007): Phylogenetic analysis based on mitochondrial COI gene sequences in *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) in relation to reproductive forms and geographic distribution, *Applied Entomology and Zoology*, 42(2): 309-316.
59. TÖRÖK, K., Z. BOTTA-DUKÁT, I. DANCZA, I. NÉMETH, J. KISS, B. MIHÁLY, D. MAGYAR (2003): Invasion gateway and corridors in the Carpathian Basin.: Biological invasions in Hungary. *Biological Invasions*, 5: 349–356.
60. WEI J.F., J.N. FENG (2012): A new species of *Pseudaulacaspis* MacGillivray, 1921 from China (Hemiptera, Coccoidea, Diaspididae) with a key to Chinese species. *ZooKeys* 210: 9–17.
61. WÖRHEIDE G, J.N.A. HOOPER, B.M. DEGNAN (2002): Phylogeography of western Pacific *Leucetta* ‘chagosensis’ (Porifera: Calcarea) from ribosomal DNA sequences: implications for population history and conservation of the Great Barrier Reef World Heritage Area (Australia). *Molecular Ecology*, 11: 1753–1768.
62. YA-JIE JI, DE-XING ZHANG, LI-JUN HE (2003): Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates, *Molecular Ecology Notes* 3: 581–585.

7 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni konzulenseimnek, Dr. Kozár Ferencnek, Dr. Tóbiás Istvánnak és Fetykó Kingának fáradhatatlan segítségüket és magas szintű szakmai irányításukat mind a vizsgálatok elvégzésében, mind a dolgozatom megírása közben. Külön köszönettel tartozom Dr. Pénzes Béla tanárúrnak, aki lehetőséget biztosított a dolgozat megírására a Rovartani Tanszéken.

Köszönet illeti Konczné Benedicty Zsuzsát, akinek tanácsaira és segítőkészségére mindig számíthattam munkám során.

Köszönöm továbbá az MTA ATK Növényvédelmi Kutatóintézet összes dolgozójának kedvességét és segítőkész hozzáállását, valamint köszönetet mondok a BCE Rovartani tanszékéről Tempfli Baláznak és Varga Máténak, a mikroszkópi felvételek elkészítésében nyújtott segítségüket.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a türelmüket és támogatásukat.