



**Doktori (PhD) Értekezés**

**AZ ALMAFÉLÉK TŰZELHALÁSÁT OKOZÓ *ERWINIA AMYLOVORA*  
HAZAI IZOLÁTUMAINAK BIOLÓGIAI VÁLTOZATOSSÁGA**

**Végh Anita**

**Budapesti Corvinus Egyetem**

**Növénykórtani Tanszék**

**Budapest**

**2012**

## **A doktori iskola**

<b>megnevezése:</b>	Kertészettudományi Doktori Iskola
<b>tudományága:</b>	Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok
<b>vezetője:</b>	Dr. Tóth Magdolna egyetemi tanár, DSc Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcstermő Növények Tanszék
<b>Témavezető:</b>	Dr. Palkovics László egyetemi tanár, tanszékvezető, DSc Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Növénykórtani Tanszék
<b>Társkonzulens:</b>	Hevesi Lászlóné dr. ny. tudományos főmunkatárs, CSc Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcstermő Növények Tanszék

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

.....  
Dr. Tóth Magdolna

Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
Dr. Palkovics László

A témavezető jóváhagyása

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2012. évi október 2.-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:**

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

**Elnöke**

Pedryc Andrzej, DSc

**Tagjai**

Pénzes Béla, CSc

Horváthné Petróczy Marietta, PhD

Barna Balázs, DSc

Soltész Miklós, DSc

**Opponensek**

Kocsisné Molnár Gitta, PhD

Gáborjányi Richárd, DSc

**Titkár**

Horváthné Petróczy Marietta, PhD

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>7</b>
1.1    CÉLKITŰZÉSEK .....	9
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>10</b>
2.1    A KÓROKOZÓ TUDOMÁNYOS BESOROLÁSA .....	10
2.2    A TÜZELHALÁS-TÖRTÉNET KEZDETE .....	10
2.3    A TÜZELHALÁS BETEGSÉG FÖLDRAJZI ELTERJEDÉSE.....	11
2.4    A BETEGSÉG GAZDASÁGI JELENTŐSÉGE.....	14
2.5    A BETEGSÉG KIALAKULÁSA ÉS TŰNETEI .....	15
2.6    A KÓROKOZÓ GAZDANÖVÉNYEI.....	20
2.7    A KÓROKOZÓ TERJEDÉSE .....	21
2.8    A TÜZELHALÁS ELLENI VÉDEKEZÉS LEHETŐSÉGEI .....	22
2.9    A KÓROKOZÓ AZONOSÍTÁSÁNAK MÓDSZEREI .....	32
2.9.1    A kórokozó izolálása növényből .....	32
2.9.2    A kórokozó tenyésztésének feltételei .....	33
2.9.3    A kórokozó morfológiai és tenyészbélyegei.....	33
2.9.4    A kórokozó biokémiai, fiziológiai tulajdonságai.....	34
2.9.5    A kórokozó molekuláris azonosítása .....	35
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>	<b>38</b>
3.1    A VIZSGÁLAT HELYE ÉS IDEJE .....	38
3.2    A VIZSGÁLAT ANYAGA.....	38
3.2.1    Izolátumok .....	38
3.2.2    Bakteriofágok .....	40
3.2.3    Táptalajok .....	41
3.2.4    Körtefajták .....	42
3.2.5    Növények, termékek .....	43
3.2.6    Plazmid és baktériumtörzs klónozáshoz .....	43
3.2.7    Primerek.....	44
3.2.8    Enzimek .....	44
3.2.9    Kitek .....	44
3.2.10    Eszközök.....	45
3.3    A VIZSGÁLAT MÓDSZERE .....	45
3.3.1    A betegség tüneteinek megállapítása .....	45
3.3.2    A kórokozó izolálása táptalajon.....	45
3.3.3    Baktérium szuszpenzió előállítás.....	46
3.3.4    A kórokozó azonosítása klasszikus módszerekkel .....	46
3.3.4.1    Gram-féle tulajdonság vizsgálata .....	46
3.3.4.2    Hiperszenzitív reakció.....	47
3.3.4.3    Patogenitási teszt.....	47
3.3.5    A tenyészbélyegek megállapítása és értékelése.....	48
3.3.6    Biokémiai tulajdonságok vizsgálata és értékelése .....	48
3.3.7    Bakteriofág érzékenység vizsgálat- Felcseppentéses módszer .....	49
3.3.8    Bakteriofágok titerértékének meghatározása .....	50
3.3.9    Plakkmorfológia .....	51
3.3.10    Éretlen körtegyümölcsök inokulálása .....	52
3.3.11    A kórokozó azonosítása molekuláris módszerekkel .....	53
3.3.11.1    A 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata .....	53

3.3.11.2	A pEA29 plazmid molekuláris vizsgálata.....	57
3.3.12	Az eredmények statisztikai értékelése .....	59
<b>4.</b>	<b>EREDMÉNYEK.....</b>	<b>60</b>
4.1	A KÓROKOZÓ AZONOSÍTÁSA KÜLÖNBÖZŐ GAZDANÖVÉNYEKRŐL KLASSZIKUS MÓDSZEREKKEL .....	60
4.1.1	Az <i>E. amylovora</i> okozta tünetek.....	60
4.1.2	A Gram-féle tulajdonság.....	60
4.1.3	Hiperszenzitív reakció vizsgálata .....	61
4.1.4	Patogenitási teszt .....	61
4.2	AZ IZOLÁTUMOK MORFOLÓGIAI JELLEMZŐI KÜLÖNBÖZŐ TÁPTALAJOKON .....	63
4.3	AZ IZOLÁTUMOK BIOKÉMIAI JELLEMZŐI.....	68
4.3.1	API 20E kit eredményei.....	68
4.3.2	API 50CH kit eredményei .....	69
4.4	AZ IZOLÁTUMOK BAKTERIOFÁG ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA .....	73
4.5	AZ IZOLÁTUMOK VIRULENCIÁJÁNAK ÉRTÉKELÉSE ÉRETLEN KÖRTEFAJTÁK GYÜMÖLCSEIN ...	79
4.6	AZ IZOLÁTUMOK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA.....	84
4.6.1	Az Ea-PlumBo1, szilváról származó izolátum 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata .....	84
4.6.2	Az izolátumok pEA29 plazmidjának molekuláris vizsgálata .....	86
4.7	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....	93
<b>5.</b>	<b>KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>102</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>106</b>
<b>MELLÉKLETEK.....</b>		<b>110</b>
1. melléklet:	Irodalomjegyzék.....	110
2. melléklet:	Az <i>Erwinia amylovora</i> izolátumok csoportosítása a szelektív táptalajokon (CG és EMB agar) kialakult kolóniák színe, felülete alapján.....	127
3. melléklet:	Az <i>Erwinia amylovora</i> izolátumok szelektív táptalajokon adott eredményéből készített cluster analízis .....	128
4. melléklet:	Az <i>Erwinia amylovora</i> izolátumok biokémiai vizsgálatának (API50CH) eredményéből készített cluster analízis .....	129
5. melléklet:	Négy különböző bakteriofág hatása a vizsgált <i>Erwinia amylovora</i> izolátumokra .....	130
6. melléklet:	Az <i>Erwinia amylovora</i> izolátumok bakteriofág érzékenység vizsgálatának eredményéből készített cluster analízis .....	131
7. melléklet:	Különböző körtefajták éretlen gyümölcszeinek fogékonysága <i>Erwinia amylovora</i> izolátumokkal a fertőzést követően az inokulációt követő 4. napon. (A számok az egy-egy körtefajtákon az adott <i>Erwinia amylovora</i> izolátumok által okozott nekrotikus foltok átmérőjének átlagát jelzik, fertőzési index alapján).....	132
8. melléklet:	A körtefajták éretlen gyümölcszeinek fogékonysága <i>Erwinia amylovora</i> izolátumok- kal a fertőzést követő 4. napon grafikonon ábrázolva (fertőzési index alapján). (A körtefajták után a fertőzési index átlaga van feltüntetve fajtánként mm-ben kifejezve) ...	133
9. melléklet:	A körtefajták éretlen gyümölcszeinek <i>Erwinia amylovora</i> izolátumok fogékonyságából (nekrotikus folt mérete alapján) készített cluster analízis .....	134
10. melléklet:	EaPlumBo1 16S rRNS gén szekvenciája és jellemzői a nemzetközi adatbázisban ...	135
11. melléklet:	Az <i>Erwinia amylovora</i> izolátumok <i>PstI</i> fragment ismétlődő régiójának szekvencia összehasonlítása .....	136
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>		<b>137</b>

## Rövidítések jegyzéke

bp	bázispár
CFU	Colony-forming unit
CG	Crosse-Goodman agar
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
EMB	Eosine-Methylene Blue agar
kb	kilobázis
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	kálim-dihidrogén-foszfát
$\text{MgSO}_4$	magnézium-szulfát
MS	Miller-Schroth agar
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polimeráz-láncreakció
PFU	Plaque-forming unit
RNase	ribonukleáz
rDNS	riboszómális RNS-t kódoló sejtmagi dezoxiribonukleinsav
rRNS	riboszómális ribonukleinsav
SSR	Short-Sequence Repeat (rövid-szekvencia ismétlődés)
TBE	Tris-borát-EDTA puffer
TE	Tris-EDTA puffer
u	unit

# 1. BEVEZETÉS

„A tüzes veszedelem a legegészségesebb és legfejlettebb fák leveleit néhány óra alatt olyan sötét barnává változtatja, mintha forró láng perzselte volna le, és a fák kérgének pórusaiból rozsdabarna váladék tör elő” már a XIX. században ezt írja **William Coxe (1817)** a Gyümölcsfák termesztése című könyvében, amely mind a mai napig megállja a helyét és a betegség jelentős gondokat okoz szerte a világban.

Az almatermésű növényfajok, számos dísznövény és vadonélő növényfaj (**van der Zwet és Keil, 1979**) súlyos betegségét, az ún. „tűzelhalást” az *Erwinia amylovora* (Burrill) **Winslow és mtsai. (1920)** nevű baktérium okozza. Az ENSZ FAO Európai és Földközi-tenger melléki országok Növényvédelmi Szervezete (**OEPP/EPPO, 1983**) ajánlása alapján Európa szerte, így Magyarországon is - mint tagországban- zárlati (karantén) károsító.

A *Rosaceae* családon belül 40 nemzetségbe tartozó 200 növényfaj tekinthető a baktérium gazdanövényének (**Steiner és Zeller, 1996**). A gazdanövények közül a *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Malus*, *Pyrus*, *Photinia*, *Pyracantha* és *Sorbus* nemzetséghez tartozó fajok a legfontosabbak kereskedelmi szempontból. Hazánkban nem annyira jelentős mirtuszgalagonya és a japán naspolya is a kórokozó gazdanövénykörébe tartozik. Az Amerikai Egyesült Államokban a tüskétlen szedren (**Evans, 1996**) és málnán is jelezték a kórokozó megjelenését (**Schnabel és Jones, 2001**), melyek viszont az almán és a körtén nem fertőzőképesek (**Sobiczewski és mtsai., 1997**). Beszámoltak a japán szilva fiatal hajtásainak természetes fertőződéséről is (**Mohan és Thomson, 1996**). Az USA-ban szilva és kajszli hibridjén hajtásszáradásról (**Mohan, 2007**), Németországban az európai szilva (**Vanneste és mtsai., 2002**) és Csehországban a kajszli természetes fertőződéséről is publikáltak (**Korba és Sillerova, 2010**).

Az Amerikai Egyesült Államokban honos, mintegy 200 éve ismert betegséget az 1950-es évek közepén hurcolták be Európába (Anglia) és a Földközi-tenger medencéjébe (Egyiptom) és mára a régió szinte valamennyi országában elterjedt. Magyarországon a fertőzést először 1995 nyarán észlelték egy 43,5 ha-os 5-6 éves almaültetvényben, Nyárlőrinc község határában (**Hevesi, 1996**). Megjelenése óta évről-évre előfordul, s bizonyos években –a baktérium számára kedvező időjárás esetén– az okozott kár igen jelentős. Azóta számos izolátum áll rendelkezésünkre a Budapesti Corvinus Egyetem Génbankjában, illetve folyamatosan gyűjtjük azokat. Az elmúlt években egyre több irodalmi adat jelent meg a kórokozó új gazdanövényeken

való előfordulásáról, valamint *Erwinia amylovora* izolátumok jellemzéséről különböző tulajdonságok alapján, ezért felmerül a kérdés, hogy megváltozott-e a hosszú évek során ez a kórokozó? Az izolátumok tenyészbélyegei, biokémiai tulajdonságuk, virulenciájuk, valamint genetikai tulajdonságaik különböznek-e az eltérő gazdanövényekről, valamint eltérő földrajzi helyekről származó, a hazai és külföldi izolátumok, illetve az ország más-más pontjairól gyűjtött izolátumok esetében?



## 1.1 Célkitűzések

Vizsgálataink során az alábbi célkitűzéseket fogalmazzuk meg:

- *Erwinia amylovora* izolátumok gyűjtése különböző gazdanövényekről és termőhelyekről;
- A gyűjtött izolátumok fajszerű azonosítása és jellemzése klasszikus bakteriológiai módszerekkel;
- A gyűjtött és a Génbankból származó *E. amylovora* izolátumok jellemzése, összehasonlítása tenyészbélyegek alapján különböző táptalajokon;
- A gyűjtött és a Génbankból származó *E. amylovora* izolátumok jellemzése, összehasonlítása biokémiai tulajdonságok alapján;
- A gyűjtött és a Génbankból származó *E. amylovora* izolátumok jellemzése, összehasonlítása bakteriofág érzékenység alapján;
- A gyűjtött és a Génbankból származó *E. amylovora* izolátumok jellemzése, összehasonlítása virulencia alapján különböző körtefajtákon;
- A gyűjtött és a Génbankból származó *E. amylovora* izolátumok azonosítása, jellemzése, összehasonlítása molekuláris módszerekkel, és rokonsági viszonyaik feltárása.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A kórokozó tudományos besorolása

- Törzs: *Proteobacteria*
- Osztály: *Gamma Proteobacteria*
- Rend: *Enterobacteriales*
- Család: *Enterobacteriaceae*
- Nemzetség: *Erwinia*
- Faj: *Erwinia amylovora* (Burrill) **Winslow és mtsai. (1920)**

### 2.2 A tűzelhalás-történet kezdete

Az *Erwinia amylovora* (Burill) **Winslow és mtsai. (1920)** baktérium okozta tűzelhalás az almatermésű gyümölcsfajok legrégebbi és legveszélyesebb betegsége. Az elmúlt 35 évben számos előrelépést tettek, hogy a betegséget megértsék járványtani szempontból, de ezek ellenére a tűzelhalás ma is hatalmas károkat okoz az alma- és körteültetvényekben, és minden évben óriási gazdasági kárt okoz szerte a világban. A tűzelhalás elnevezés egyértelműen utal a kórokozó által okozott perzseléses, égésszerű tünetekre.

A tűzelhalás-történetét **van der Zwet és Keil (1979)** foglalta össze, akik könyvükben akkor ismert tűzelhalásra vonatkozó kb. 2000 publikáció több mint felét dolgozták fel.

#### *Az első elméletek*

Az első írásos feljegyzések 1780-ból származnak, amit New York államban egy körteültetvényben észleltek. Az 1700-as évek végén a tűzelhalással kapcsolatos, először megjelent utalások alapján a fák törzsét fűrő rovarokra gyanakodtak. 1817-ben Coxe írta le először a „tűzelhalás” kifejezést. Majd az 1800-as évek elején Lowell próbálta konkretizálni a „rovar” elméletet, de mások szerint két különböző betegség együttesen jelenti a „tűzelhalást” és csak az egyiket idézik elő rovarok. Az első, eredményes mesterséges visszafertőzést Gookins

végezte el, és előidézte a tüneteket anélkül, hogy ismert lett volna a kórokozó. Az 1800-as évek közepén Salisbury és Salisbury vetették fel először, hogy a betegséget egy gomba okozza. Majd Hull közölte, hogy „a körte és az alma tűzelhalását okozó gomba azonos” (**van der Zwet és Keil, 1979**).

### ***Baktériumos eredet***

**Burrill (1882)** publikálta először, hogy az elhalást okozó patogén szervezet a *Micrococcus amylovorus*, de ő nem izolálta a baktériumot. 1884-ben Joseph C. Arthur végezte el az első izolálást és kísérletében bizonyította, hogy egy baktérium a betegség közvetlen okozója. Az első kutatási projekt (1891-1895) keretén belül, mely a betegséggel foglalkozott Waite fedezte fel, hogy a kórokozó a virágok nektáriumán keresztül is be tud hatolni a növénybe és a méhek terjesztik a baktériumot a beteg virágokról. Waite és Stedman szerint az egyetlen kielégítő védekezés a körte-elhalás ellen a beteg részek metszése és megsemmisítése (**van der Zwet és Keil, 1979**).

### ***A kórokozó elnevezése***

Korábban a kórokozó megnevezése *Micrococcus amylovorus* (**Burrill, 1882**), *Bacillus amylovorus* (Burr.) (**Trevisan, 1889**), majd *Bacterium amylovorum* (Burr.) (**Chester, 1897**).

**Winslow és mtsai. (1920)** nevéhez fűződik az *Erwinia* nemzetség, illetve *Erwinia amylovora* faj megjelölés, ettől kezdődően a kórokozó neve *Erwinia amylovora* (Burr.), amit az Amerikai Bakteriológiai Társaság 1923-tól hivatalosan is elismert (**van der Zwet és Keil, 1979**).

## **2.3 A tűzelhalás betegség földrajzi elterjedése**

### ***A kórokozó világméretű elterjedése***

Az *Erwinia amylovora* egyre nagyobb mértékű elterjedéséről a XVIII. század végétől folyamatosan állnak rendelkezésünkre adatok. A tűzelhalás 1780. évi első megfigyelése (New York államban) után szinte a világ minden táján előfordult. Az Amerikai Egyesült Államokban az összes államban megjelent. 1870-ben Kanadában számoltak be először a kórokozóról, 1921-

ben Mexikóban, majd 1968-ban Guatemalában. 1903-ban Japánban is megjelentek írásos közlemények, jelentések a betegségről, majd ezt követően 1921-ben Új-Zélandon észlelték a kórokozót alma, körte, birs és galagonya növényeken (**Bonn és van der Zwet, 2000**).

Észak-Amerikából több mint fél évszázad alatt jutott el a kórokozó szaporítóanyaggal a többi kontinensre: először Nyugat-Európába (Anglia, 1957) és Észak-Afrikába. Egyiptomban 1964-ben a Nílus völgyében körtén jelentkezett először. Azután közel 20 évig nem volt jelentős kár, a betegség nem jelentkezett, mígnem az ökológiai feltételek ismét kedvezővé váltak a kórokozó számára. A 80-as évek elején robbanásszerű járvány tört ki. Egyiptomból terjedt el a kórokozó Izraelbe (**Shabi és Zutra, 1987**), Jordániába, Törökországba (**Demir, 1993**), Iránba és Görögországba.

Az európai igen gyors elterjedése két irányból, Angliából és Egyiptomból indult. Alig 50 év alatt 39 országban jelent meg a kórokozó. 1966-ban Lengyelországban, Gdansk mellett találták meg almán és körtén (**Sobiczewski, 1996**). Belgiumban, Franciaországban, Németországban 1971-1980 között jelent meg a tüzelhalás. Németországban először Hamburg környékén jelent meg és közel 10 év alatt ért el a fertőzés Bajorországig (**van der Zwet és Beer, 1995**). Észak-Európában, Norvégiában, Svédországban és Észak-Írországban 1986-ban jelentkezett a tüzelhalás dísznövényeken, galagonyán, tűztövisen és madárbirszen. Csehországban először 1987-ben Prága mellett fedezték fel galagonyán (**van der Zwet és Walter, 1996**). Olaszországban, Szicíliában 1990-ben, Bolognában 1994-ben találták meg a kórokozót, **Kokoskova (1996)** szerint fertőzött import szaporítóanyaggal vagy légáram útján jutott be az országba. Svájcban 1989-ben *Cotoneaster* fajokon, 1991-ben körtén és 1994-ben almán jelent meg (**Hasler és mtsai., 1996**). Romániában 1992 augusztusában észlelték először, Braila és Pitesti megyékben. Az előrehaladott tünetek alapján valószínűsíthető, hogy a fertőzés már legalább 1 évvel korábban történt. Az ország összes 41 megyéjéből 1997-ben 35-öt fertőzöttnek minősítettek (**Severin és Constantinescu, 1998**). Ausztriában pedig 1993-ban számoltak be a betegségről. A kórokozót *Cotoneaster* növényekről azonosították (**Keck és mtsai., 1996**). Spanyolországban 1995-ben bukkant fel a kórokozó a francia határ mellett alma ültetvényben (**López és mtsai., 1998**).

A Balkán-félszigeten észak felé terjedt a tüzelhalás betegség. 1989-ben elérte Macedóniát majd ugyanebben az évben, Szerbiában is megjelent az ország nyugati részén, Šabac városhoz közel. A tüzelhalás első tüneteit körtén és birszen figyelték meg (**Arsenijević és mtsai., 1991**). 1990-ben súlyos járványt okozott Szerbia egész területén (**Arsenijević és Panić,**

1992). Dísznövényeken valamivel később jelent meg a kórokozó, *Pyraacantha coccinea*-n 1997-ben, míg *Chaenomeles japonica*-n és *Cotoneaster horisontalis*-on 2000-ben (Gavrilović és Arsenijević, 1998; Balaž és mtsai., 2004). Szerbia egész területén folyamatosan terjed a tűzelhalás kórokozója és gazdanövényeinek száma is folyamatosan növekszik (Balaž és mtsai., 2009).

A déli féltekéről csak Új- Zélandról jelentettek fertőzést. Van der Zwet és Beer (1995) szerint Észak-Amerikától vagy Európától ilyen messzire csak fertőzött faládákkal vagy fertőzött szaporítóanyaggal kerülhetett be a kórokozó. A kórokozót a mai napig összesen 46 országban észlelték. Európában az utolsó *Erwinia* mentes ország Szlovénia volt, míg ott is elszórtan egy-egy fertőzési góc jelent meg 2001-ben, majd egy nagyobb járványról számoltak be 2003-ban (Dreo és mtsai., 2006).

### *A kórokozó hazai megjelenése*

Az 1980-as évek közepétől a betegség balkán-félszigeti előretörését, csehországi, jugoszláviai és romániai fellépését követően komolyan számítani lehetett a magyarországi megjelenésre is. Magyarországon Kecskemét termesztési körzetében (Nyárlőrinc) levő almaültetvényben 1995 késő őszen és 1996 kora tavasszal észlelték először a tűzelhalás tüneteit. A kórokozót, az *Erwinia amylovora* karantén baktériumot Hevesi Mária azonosította (Hevesi, 1996). 1997-ben Zala és Szabolcs-Szatmár-Bereg megye vált áldozattá, illetve további megyékből is jelentettek akkor még nem jelentős károkat (Németh, 1997). Békés, Bács-Kiskun, Csongrád megyékre koncentráltak a fertőzések, de Baranyában is regisztráltak fertőzött góccokat. A magyarországi megjelenés után két évvel a fertőzésmentes megyék száma mindössze Vas és Nógrád megyére koncentráldott (Németh, 1999). 2000-ben, egy járványos évben kb. 3780 ha alma, körte- és birsültetvény volt fertőzött (Pálfi és mtsai., 2000). A következő években Szabolcs-Szatmár-Bereg és Borsod-Abaúj-Zemplén megyében is nőtt a fertőzött területek aránya (Mérő, 2004; Csete és mtsai., 2004). A következő években az időjárási viszonyok nem kedveztek a kórokozó számára, bár 2007-ben több megyében –köztük Fejér megyében– újabb erős fertőzésről számoltak be (Dénes, 2007). Mára már egész Magyarország területe fertőzött a tűzelhalás betegség kórokozójától.

## 2.4 A betegség gazdasági jelentősége

A kórokozó elterjedése, a betegség gazdasági jelentősége egyre nő. Az almafélék termesztésének egyik legmeghatározóbb, legfontosabb korlátozója világszerte. Súlyos gazdasági károkat okozott és okoz mind a mai napig. **Vanneste (2000)** rávilágít, hogy ismereteink egyre bővültek mind a betegségről, mind a kórokozóról felfedezése óta, de tulajdonképpen mind a mai napig problémákat vet fel.

Megdöbbsentő adatok ismeretesek világszerte a tűzelhalás okozta gazdasági kár mértékéről. 1902-ben Kaliforniában Fresno megyében 125 ezer, míg Kings megyében közel 43 ezer körtefát tartottak nyilván, melyek száma két év múlva a tűzelhalás miatt lecsökkent 1500 és 0 darabszámra. 1936-ban az Egyesült Államokban a körtetermesztést a tűzelhalás 14%-kal csökkentette, amely több mint 4 millió dollárt kiesést jelentett. 1951-1960 közötti időszakban az évi átlagos veszteség pedig körtéből 1,5 millió, almából közel 2,5 millió dollár volt (**van der Zwet és Keil, 1979**). 1976-ban Kaliforniában a betegség okozta kár körtéből 4,7 millió dollár, majd 1991-ben Michigan állam délnyugati részén 3,8 millió dollár volt (**van der Zwet és Beer, 1995**).

1966-ban Angliában 12 ezer fertőzött fát találtak faiskolákban, farmokon a minisztérium jelentése szerint (**van der Zwet és Keil, 1979**). Délnyugat-Franciaországban egy Pajam1 alanyú Smoothee ültetvény fájának 18%-a, az M9 alanyú Gala fák 30%-a és az M9 alanyú Royal Gala fák 70%-a pusztult ki (**Lecomte és mtsai., 1996**). 1991-ben Macedóniában több mint 400 ha körte és 60 ha birs ültetvényt kellett megsemmisíteni. Az új telepítések és a területek mentesítésének költsége majdnem 7 millió dollárt tett ki (**Mitrev, 1996; Pejchinovski, 1996**). Szerbiában 1996-ban 30 ha körte és 1,3 ha birs, valamint 1997-ben 64 ha körte és birs ültetvényt semmisítettek meg (**Balaž, 1999**). 1995-ben Olaszország északi részén már volt fertőzés, de robbanásszerűen 1996-ban és 1997-ben nőtt meg a fertőzött ültetvények száma. A fertőzött ültetvényekben végül mintegy 500 ezer fát semmisítettek meg (**Battilani és mtsai., 1998; Calzoralis és mtsai., 1998**). 1986-1991 között Törökországban több mint 2 millió fát vizsgáltak meg. A fertőzött fák aránya gyümölcsfajonként eltérő volt (**Benlioglu és Özakman, 1998**). Van, Gevas, Edremit és Ecris városok környékén a körtefák fertőzöttsége 38, 66, 63 és 75% volt (**Öden, 1998**). Konya tartományban több mint 2 millió alma, 620 ezer körte és 29 ezer birs fa van, ahol az 1997. évben végzett vizsgálat alapján a fertőzött fák aránya riasztóan magas volt (alma 22-51%, körte 58-84%, birs 92%) (**Bastas és Katircioglu, 1998**).

## 2.5 A betegség kialakulása és tünetei

### *A kórokozó életmódja, a fertőzési folyamat*

Van der Zwet és Keil (1979) szerint a fertőzéseket elsődleges és másodlagos fertőzési ciklusokra lehet bontani.

#### Elsődleges fertőzés

Az epifiton formában a fa felületén vagy a rügpikkelyek alatt meghúzódó baktériumok nagy része a tél folyamán elpusztul, de a fekélyes sebeken áttelelt, életben maradt baktériumok tavasszal újra szaporodásnak indulnak. Amikor megindul a nedvkeringés, a felszaporodott baktériumok tömege baktériumnyálka formájában a felszínre tör. A kórokozó a virágok szöveteibe a természetes nyílásokon (nektáriumok nektáriumkiválasztó nyílásai, bibe, portok természetes nyílása, csészelevelek légrései) keresztül jut be. A baktériumsejtek a rovarok, madarak, metszés, szétfröccsenő eső és a szél útján terjednek a gazdanövény környezetében és kerülnek a virágra. A virág felületén megjelennek a baktériumnyálka cseppek, amelyekből a baktériumsejteket az esőcseppek és a viráglátogató beporzó rovarok terjesztik tovább. A kórokozó a sejtközötti járatokban szaporodik. A virágfertőzés azonnal látható. A virágzathól a virágkocsányon át a vesszőkbe, majd az ágakba hatol. Itt az időjárástól és a szövetek fogékonyságától függően halad előre, majd végül kialakulnak a fekélyes sebek.

#### Másodlagos fertőzés

Az elsődleges fertőzés során keletkező inokulum tömeg a fenológiai fázistól, valamint az időjárási körülményektől függően további fertőzéseket idéz elő. A másodlagos fertőzések a vegetációs időben bármikor bekövetkezhetnek. Fertőzési forrás lehet a hajtásokon, leveleken, gyümölcsökön és nagyobb ágakon keletkező baktériumnyálka, illetve a megszilárdult nyálkaanyag által összeragasztott baktériumsejtekből létrejött úgynevezett fonalas struktúra is (exudátum). A baktériumfonalak a szél segítségével nagyobb távolságokra is eljuthatnak. Másodlagos fertőzésre különösen érzékenyek a másodvirágzatok és a növekedésben levő hajtások. A zsenge hajtások fertőződése a természetes nyílásokon és sebzéseken egyaránt végbemehet. Minél idősebb növényi szövet felé halad a fertőzés, annál lassabb a kórokozó

szaporodása. Az éves folyamat végén a fertőzött szövetek elhalnak és kialakulnak a rákos sebek. Ekkor a baktériumsejtek nagy része elpusztul, az életben maradt sejtek azonban áttelelnek, és tavasszal újra fertőznek.

### ***A betegség tünetei***

A tűzelhalás jellegzetes tüneteit **van der Zwet és Keil (1979)** foglalta össze. Attól függően, hogy mely növényi részt támadja meg a kórokozó, megkülönböztetünk virág-, hajtás-, levél-, gyümölcs-, ág- és törzs-, valamint gyökérszár- és gyökérelhalást.

#### Virágelhalás

A vegetáció során először a virágfertőzés tünetei jelennek meg (**Thomson, 1986**). Különálló virág, virágok vagy egy egész virágbog fertőződhet. A virágok először vizenyősek lesznek, hervadnak, fonnyadnak, elszáradnak, barnulnak, majd végül barnás feketén elhalnak (**1. ábra**). A csészelevél és a virágkocsány is vízzel átitatottnak tűnik. A fertőzött megbarnult, megfeketedett virágok lehullhatnak, de rendszerint a fán maradnak. Meleg, párás időjárás során, a virágkocsányon gyakran nyálkacseppek jelennek meg. Exudátum képződés hiányában egyértelműen csak a virágzás után állapítható meg a virágzat megbetegedése. A virágfertőzést követően a kocsányon keresztül szisztemikusan fertőződik a fiatal gyümölcs. A virágzaton kiváló nyálkacseppek a hajtásfertőzés forrásai lehetnek. Egyetlen virág fertőződése gyakran a teljes termőág, termőalap pusztulásához vezet.



**1. ábra:** A tűzelhalás tünetei körtevirágokon  
(Fotó: Végh, 2011)



### Hajtás- és levélhalás

A betegség legjellemzőbb tünete. Vannak évek, amikor csak hajtásfertőzést lehet megfigyelni. Virágzás után, a nedvdús, friss hajtások, a vízhajtások és a tősarjak a legérzékenyebbek a fertőzésre. A hajtásfertőzés tünetei hasonlóak a virágfertőzéshez, de sokkal gyorsabb lefolyásúak. Optimális időjárási feltételek esetén (meleg, párás) a fertőzés 15-30 cm-t is halad, míg extrém esetben akár 50-70 cm-t is elérheti naponta. A hajtások a csúcs vagy alap felől fertőződnek, eléri a vesszőket, gallyakat is. A hajtásvég pásztorbótszerűen visszagömbül, barnul, végül elhal (**2. ábra**). Almafa esetében a fertőzött hajtások világosbarnától sötétbarnába és körte esetében sötétbarnából feketébe hajlók. Ha a fertőződés fekélyes sebből vagy a hajtást nevelő gallyból származik, úgy nem figyelhető meg pásztorbótszerű gömbület. A kórokozó számára kedvező időjárás esetén baktérium nyálkacseppek jelennek meg a hajtásvégeken, amelyek színe először piszkosfehér, majd a levegőn rövidesen borostyánszínű, később rozsdavörös lesz. A levél fertőződése a sztomákon keresztül, rovarok által vagy sebzéseken (jégeső, szélverés) át történik. A levél fő- és mellékerei barnásra színeződnek, majd feketén elhalnak (**3. ábra**). Az elhalt levelek a fertőzött hajtásról nem hullnak le.



**2. ábra:** A tüzelhalás tünetei körtehajtásokon  
(Fotó: Végh, 2011)



**3. ábra:** A tüzelhalás tünetei körteleveleken  
(Fotó: Végh, 2011)

### Gyümölcselhalás

Az éretlen gyümölcsök megbetegedése a leggyakoribb. A kifejlődött gyümölcsökön megjelenő tünetek hasonlóak a fiatal gyümölcsökéhez. Az éretlen gyümölcsök belsőleg szisztemikusan fertőződnek. A gyümölcs először szürkészöld majd vizenyős lesz, később barnulnak, megfeketednek, mumifikálódnak és a fán maradnak vagy lehullanak. Az érett gyümölcsök a bőrszövet lenticelláin, sebzéseken, valamint a fertőzött vesszőkön, gallyakon keresztül a kocsányon át fertőződhetnek. A paraszemölcsökből néha ragadós, sűrű, az opálostól az aranysárgáig változó színű baktériumnyálka tör elő **(4, 5. ábra)**.



**4. ábra:** A tűzelhalás tünetei fiatal körtegyümölcsön  
(Fotó: Végh, 2012)



**5. ábra:** A tűzelhalás tünetei körtegyümölcsön

(<http://www.apsnet.org/publications/imageresources/Pages/Volume87-10-3.aspx>)

### Ág és törzselhalás

A fertőzés, a virágok, a hajtások vagy a gyümölcs felől halad a vesszők, gallyak és idősebb ágakon át a törzs felé **(6. ábra)**. A hánccszövet szivacsos, puha állományú, vizenyős lesz, majd ezüstös barnára színeződik. Az elhalt szövet besüpped, kiszárad, az egészséges és beteg részeket repedés választja el egymástól. A folt alatt a farész rozsdabarna vagy barna színű. A hajtások és ágak teljesen elhalhatnak. Az ágakon és a törzsön jelentkező elhalt foltokon exudátum válhat ki. Ha a rákos seb széléről eltávolítjuk a kérget a fás részeken vörösesbarna jellegzetes csíkozottság

figyelhető meg. Az ágakon lévő fertőzött vízajtások illetve a kisebb elágazások alapi részénél kialakulnak olyan rákos sebek, melyek a kórokozó áttelelését biztosítják (7. ábra).



**6. ábra:** A tűzelhalás tünetei almafa ágain  
(Fotó: Végh, 2010)



**7. ábra:** A tűzelhalás tünetei törzsön

([http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease\\_descriptions/omblight.html](http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease_descriptions/omblight.html))

### Gyökérnyak- és gyökérpusztulás

A tűzelhalásnak ez a két típusa a legveszélyesebb és gyakran okozza az egész fa pusztulását. A gyökérnyaki fertőzés indulhat a téli fagy következtében kialakult sebeken át, vértetű fertőzés nyomán vagy a hajtások felől jut el a törzsön át a gyökérnyakba, majd a gyökerekbe. Még a fakoronából az ág és a törzs felületéről lemosódó baktériumok is fertőznek. A gyökérnyak fertőzés során a fák sokszor nem mutatnak tűzelhalásra utaló tüneteket, ezért összetéveszthetők más egyéb gyökér- és gyökérnyaki betegséggel.

## 2.6 A kórokozó gazdanövényei

A kórokozó a *Rosaceae* család mind a négy alcsaládja (*Maloideae* (*Pomoideae*), *Rosoideae*, *Amygdaloidea* (*Prunoideae*), *Spiraeoideae*) 40 nemzetségének mintegy 200 növényfaján fordul elő (Steiner és Zeller, 1996). A gazdanövények közül a *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Malus*, *Pyrus*, *Photinia*, *Pyracantha* és *Sorbus* nemzetséghez tartozó fajok a legfontosabbak (8., 9. ábra). Feltételezhető, hogy régóta károsít az Amerikában őshonos berkenye, galagonya, vadkörte és vadalma fajokon. Magyarországon jelenleg behozatali tilalom alá eső mirtuszgalagonya (*Stranvaesia davidiana*) és a fagyérzékenysége miatt nem termesztendő japán naspolya (*Eriobotrya japonica*) kevésbé ismert gazdanövényfajok. Az Amerikai Egyesült Államokban a tüskétlen szedren (*Rubus rusticanus* var. *inermis*) (Evans, 1996) és málnán (*Rubus idaeus*) is jelezték a kórokozó megjelenését, melyekről izoláltak is *E. amylovora* baktériumtörzseket is (Schnabel és Jones, 2001), melyek viszont az almát és a körtét nem fertőzték a kísérletekben (Sobiczewski és mtsai., 1997). A kórokozó *Rosa* fajokon történő károsításáról szóló információk nem minden esetben nyertek megerősítést (Németh, 1997). A tűzelhalás betegség nem korlátozódik feltétlenül almatermésű növényfajokra, hiszen már beszámoltak a japán szilva (*Prunus salicina*) fiatal hajtásainak természetes fertőződéséről is (Mohan és Thomson, 1996). A betegség csak a hajtásokat pusztítja el és az idősebb részekre nem terjed át, valamint a virágok fertőzése sem ismert (Mohan és Bijman, 1998). Az USA-ban szilva és kajszli hibridjén (Pluot®) hajtásszáradásáról számoltak be (Mohan, 2007). Csehországban a kajszli (*Prunus armeniaca*) (Korba és Sillerova, 2010), Németország északi részén az európai szilva (*Prunus domestica*) és a japán rózsza (*Rosa rugosa*) természetes fertőződését is publikálták (Vanneste és mtsai., 2002).

A betegség jelentős károkat okozhat erdei- és díszfákon is. A nem gyümölcstermő növényeken azért is lehet jelentős, mert a mechanikai és kémiai védekezés lehetőségei is korlátozottak, fontos szerepet játszhatnak a kórokozó elterjedésében, különösen, ha az ültetvényekkel szomszédos cserjés területekre gondolunk. *Crataegus*, *Cotoneaster*, *Sorbus* és *Pyracantha* fajok vadonélő vagy termesztett példányai is szolgálhatnak gazdanövényként a kórokozó számára, amelynek szerepe az első két fajon jelentősebb. Az egybibés galagonya (*Crataegus monogyna*) Magyarországon is gyakran fertőzött *E. amylovora*-val. A galagonya fertőzött hajtásai barnák, levelei nem hullanak le, hajtásvége meggörbül. A *Cotoneaster* fajok fertőzött hajtásai vörösesbarnák, itt pásztorbotszerű görbültség ritkán figyelhető meg.



*Pyracantha* cserjéken vesszőelhalás jelentkezhet és a levelek barnásra színeződnek. A kórokozó terjedésének megakadályozásánál nem lehet figyelmen kívül hagyni a természetes és telepített növényállományok fertőzöttségét sem (Tomcsányi és mtsai., 1999).



**8. ábra:** A tűzelhalás tünetei tűztövisen  
(Fotó: Végh, 2010)



**9. ábra:** A tűzelhalás tünetei birsen  
(Fotó: Végh, 2011)

## 2.7 A kórokozó terjedése

A tűzelhalás betegség kórokozójának terjedésében nagy szerepe van a meteorológiai tényezőknek. Az eső szerepe a legjelentősebb. Az esőcseppek (harmat, vagy a levelekre lecsapódott erős köd) lemosják a növény felületén lévő epifita formában vagy baktériumnyálkában lévő kórokozót a fa alacsonyabban levő részeire. A baktériumot hordozó vízcseppet nagyobb távolságokra sodorja a szél, melynek szintén nagy szerepe van a kórokozó terjedésében. A járványok kialakulásának előfeltétele a jégverés okozta károk lehetnek. A rovarok elsősorban a szűrő szájszervükkel okozott sérülések és/vagy közvetlen fertőzés esetén, valamint a testükre tapadt baktériumok szállításával terjesztik a kórokozót, ami érvényes a viráglátogató méhekre is. A fertőzés nagy távolságokra történő eljutását pedig a madarak is elősegítik. Végül fontos megemlíteni az emberi gondatlanságot is, mert ez is hozzájárul a kórokozó terjedéséhez. A szaporítóanyag eredetének ellenőrzése, a metszési eszközök fertőtlenítésének elhanyagolása a már fertőzött ültetvények mentesítésekor, valamint bármilyen fertőzött területről származó eszköz bevitele az ültetvénybe szintén fertőzési forrás (van der Zwet és Keil, 1979).

## 2.8 A tűzelhalás elleni védekezés lehetőségei

Az *Erwinia amylovora* okozta tűzelhalás betegség, a legnehezebben leküzdhető betegségek közé tartozik. Mintegy kétszáz éves ismeretség ellenére, az ellene való védekezés a mai napig nem megoldott. Csak a különböző védekezési módszerek, mint a növény egészségügyi rendszabályok, agrotechnikai elemek, növényvédő szerek védekezés, rezisztens és toleráns fajták termesztése és biológiai védekezés integrált alkalmazása hozhat eredményt (Sobiczewski és mtsai., 1997).

### *A betegség előrejelzése*

A vegetációs időszakban nagymértékben függ a növényvédő szerek védekezések hatékonysága a permetezések időzítésétől. Megfelelő hatásuk csak az időben, megelőző jelleggel alkalmazott kezelésnek van. Ha az időjárási körülmények nem kedvezőek a kórokozó elszaporodásához, a fertőzés létrejöttéhez és a betegség kifejlődéséhez, akkor a vegetáció során, elsősorban a virágzás alatt a programszerűen elvégzett kezelések feleslegesek. A jelenleg ismert előrejelzési módszerek közül az USA-ban a Maryblyt rendszert, míg Európában a Billing féle (Firescreens) és azon alapuló rendszereket dolgozták ki. A Maryblyt modell főként az időjárási adatokat veszi figyelembe, míg a Billing-féle integrált rendszer (BIS95) a kórokozó napi szaporodási ütemére alapozott becslésen és a csapadék mérésén alapul (Sobiczewski és mtsai., 1997).

Hazánkban a Maryblyt rendszert alkalmazzák, mely az időjárási adatokat veszi figyelembe, mely alapján időzíthető az *Erwinia amylovora* elleni védekezés a virágzás idején. Azon a feltételezésen alapszik, hogy nagyszámú inokulum van jelen és szigorú feltételeknek kell teljesülniük a virágfertőzés kialakulásához. Fontos szempont, hogy a virágok, bibék egészségesek és kinyíltak legyenek; hőfok órák összege; előző napi harmat, illetve eső lehetővé teszi a kórokozó eljutását a bibétől a virág belseje felé; valamint az átlagos napi középhőmérséklet  $\geq 15,6$  °C legyen, mert befolyásolhatja a kórokozó elszaporodását. Ha a követelmények mindegyike teljesül, akkor kialakul a virágfertőzés és a virágokon a tűzelhalás első, korai tünetei jelentkeznek (Steiner, 1990).

### ***Növényegészségügyi rendszabályok***

Legfontosabb és legalapvetőbb követelmény a fertőzésmentes szaporítóanyag előállítása és forgalmazása. A karantén rendszabályok igyekeznek megakadályozni a kórokozó bármilyen formában történő behurcolását. A betegség bejelentés köteles, azaz fellépése, vagy annak gyanúja esetén a területileg illetékes hatóságot értesíteni kell, valamint annak zárlati intézkedéseit be kell tartani (Németh, 1997).

### ***Agro- és fitotechnikai módszerek***

Legrégebbi védekezési mód a fertőzött növényi részek (elhalt, elfeketedett virágok, pásztorbotszerűen meggörbült hajtások, fertőzött ágrészek) eltávolítása és megsemmisítése. A fertőzött rész alatt 20-50 centiméterrel kell visszavágni a beteg hajtásokat biztonsági okokból, mert a baktérium a számára kedvező időjárás esetén napi 20-40 centimétert is képes haladni a hajtásban és a tünetek csak néhány nap eltelte után jelentkeznek. Emiatt is nagyon fontos az ültetvények rendszeres ellenőrzése. A fertőzött részek eltávolítása során fontos a metszési eszközök folyamatos fertőtlenítése, mely célra különböző készítmények használhatóak.

**Sobiczewski és mtsai. (1997)** tapasztalatai szerint alkalmas a fertőtlenítésre a kálium-mangánoxid (5%), BAC (quaterner ammónium vegyület, 10%), nátrium-hypoklorid (10%) és fenol-alapú fertőtlenítő szerek. **Hasler és mtsai. (1996)** a gyógyászatban is használatos két kézfertőtlenítőt találtak igazán hatékonynak, még a 70%-os alkohol hatásával szemben is. Fontos a metszési és rákos sebek kezelése is. A sebkezelés tél végén, a metszés időpontjában szokásos elvégezni, hiszen az *E. amylovora* terjedésének legkisebb a veszélye január közepe és március közepe közötti időszak (**van der Zwet és Beer, 1995**).

Az egészségesnek látszó kései vagy másodvirágzásból származó virágok eltávolítása is szükséges, mert ezek megjelenési időszakában a virágfertőzés környezeti feltételei sokkal inkább adottak, mint normál virágzás során. A virágzási időben megjelent fertőzött virágokat is el kell távolítani és meg kell semmisíteni (**van der Zwet és Beer, 1995**).

A megfelelő mennyiségű tápanyag-utánpótlásnak is nagy szerepe van a kórokozó elleni védelemben. A túlzott nitrogéntrágyázás elősegíti az intenzív hajtásnövekedést, meghosszabbítva ezáltal azt az időszakot, amikor a növények fokozottan fogékonyak a fertőzésre, ebből adódóan szerencsésebb, ha a műtrágyadózist megosztva juttatják ki. A fejlődő,

könnyen fertőződő vízhajtások miatt, törekedni kell a túl erős metszés kerülésére. Metszés során, illetve a fertőzött ültetvények kezelésekor különösen fontos a technológiai eszközök fertőtlenítése (**Sobiczewski és mtsai., 1997**).

Az egészséges szaporítóanyag biztosításának egyik módja a hőkezelés alkalmazása. **Keck és mtsai. (1990)** vizsgáltak tíz *E. amylovora* izolátumot, ahol a törzseket képviselő baktériumok nagy része 40 °C-on, 23 óra alatt elpusztultak. Egy másik kísérlet során nyolc izolátum vizsgálatát végezték el *in vitro*, ahol 45 °C-on 70 perc, míg 50 °C-on 50 percre van szükség az elpusztításukhoz (**Keck és mtsai., 1993**).

### ***Kémiai védekezés***

Hazánkban a tűzelhalás ellen a rézkészítményeket (hasonlóan más baktériumos betegségekhez), alkalmazzák. Leggyakrabban a rézoxiklorid, rézhidroxid és rézszulfát hatóanyagú szerek kerülnek előtérbe (**Ocskó és mtsai, 2011**). Használatuk során figyelembe kell venni a különböző fajták rézérzékenységét és a fák fenológiai állapotát. Ajánlatos a lombhullás utáni és a rügyfakadás előtti lemosó permetezés. Ezen rézkészítmények jelentik a legegyszerűbb, legolcsóbb, de egyben a legkevésbé hatásos védekezést a tűzelhalás ellen (**László, 2008**). Szisztémikus hatásmódú készítmények közül a fozetil-Al hatóanyagú Aliette 80 WG készítmény alkalmazható a kórokozó elleni védekezés során (**Ocskó és mtsai, 2011**), azonban hatása csak akkor kielégítő, ha az első kezelést már virágzás kezdetén elvégezték és a hatóanyag a növényben már felhalmozódott. **Sobiczewski és mtsai. (1997)** tapasztalatai szerint, a fozetil-Al hatóanyagú Aliette 80 WG a rézkészítményeknél hatásosabb.

### ***Antibiotikumok alkalmazása***

Leghatékonyabb védekezési lehetőségnek a tűzelhalás ellen az antibiotikumok használata volt. Az Amerikai Egyesült Államokban gyakori volt a sztreptomycin virágzáskori alkalmazása, véleményük szerint eredményes védekezés nélküle elképzelhetetlen. Virágfertőzéskor, tapasztalatok szerint, 3-4 kezelés még 30 év után is hatásos, csak 6-nál több kezelés után lép fel rezisztencia (**Sobiczewski és mtsai., 1997**). Ugyanakkor az Egyesült Államokban 1972 óta ismernek sztreptomycin rezisztens *Erwinia amylovora* törzseket. Sztreptomycin rezisztencia spontán kialakulását is igazolták. A sztreptomycin a humán gyógyászatban is használatos, ezért az Egészségügyi Világszervezet (WHO) nem ajánlja



növényvédelmi célú felhasználásra. Az Európai Unió több országában is betiltották, így Magyarországon is. A kasugamycin hatóanyagú Kasumin 2L Magyarországon 2008-tól szintén nem alkalmazható, de eseti engedéllyel még virágzás idején használható volt. A tapasztalatok ezzel a szerrel kapcsolatban azt mutatják, hogy a kórokozóra kifejtett hatásfoka nem kielégítő.

### ***Biológiai védekezés***

#### *Antagonista baktériumfajok*

*E. amylovora*-ra esetében 20 éve zajlanak kutatások biológiai védekezés kidolgozására antagonisták, epifita baktériumok alkalmazásával. Ezek hatása *E. amylovora*-t gátló anyagok termelésén és a tápanyagok kórokozó elöl történő felélésén alapul, ezért kijuttatásuknak már a kórokozó megjelenése előtt meg kell történnie. Legtöbbet vizsgált két epifiton baktériumfaj a *Pseudomonas fluorescens* és az *Erwinia herbicola* preventív alkalmazása hatásosnak bizonyult.

Az *Erwinia herbicola* (Syn. *Enterobacter agglomerans*) (Starr, 1981) törzsek a baktériumoknak egy rendkívül változékony csoportját képezik. Megtalálhatóak növényeken, mint epifiton baktérium, de emellett állati és emberi gyengültségi kórokozó törzsei is léteznek. Az *E. herbicola* és az *Enterobacter agglomerans* törzseket az újabb és részletesebb DNS vizsgálatok és a fehérjék elektroforetikus mintázata alapján a *Pantoea* nemzetséghez sorolják (*Pantoea agglomerans*) (Gavini és mtsai., 1989). A *Pantoea agglomerans* antibiotikumot termelő baktérium specifikusan hat az *E. amylovora* anyagcsere aktivitásának gátlásán keresztül. (Vanneste, 1996; Johnson és Stockwell, 1998; Al-Arabi, 2002; Özaktan és Bora, 2006). Az *E. amylovora* ellen különböző kísérletekben több törzs is hatásosnak bizonyult, melyek közül a P10c kereskedelmi forgalomba is került, Új-Zélandon BlossomBless™, míg Olaszországban PomaVita™ néven (Vanneste, 2006). 2007-ben további két *Pantoea* fajt tartalmazó szert engedélyeztek az USA-ban, BlightBan C9-1 és Bloomtime néven (Vanneste, 2011). A *Pseudomonas fluorescens* 506-os törzse kísérletekben csökkentette a fagykárt és a tűzelhalás tüneteit az USA-ban, szabadföldi kísérletekben (Lindow és mtsai., 1996) és Új-Zélandon is (Vanneste, 2006). Ebből a törzsből előállított terméket, Blightban A506® néven kereskedelmi forgalomba hozták, melyet kinyílt virágoknál érdemes kijuttatni (Elkins és mtsai., 2005).

Hazánkban Hevesi Mária által almalevélről izolált *Pantoea agglomerans* HIP32 törzs *in vitro* kísérletekben erősen gátolta az *E. amylovora* szaporodását (Hevesi és Al-Arabi, 1999; Hevesi és mtsai., 2006<sup>a,b,d</sup>). A Budapesti Corvinus Egyetemen Al-Arabi is foglalkozott PhD

munkája során antagonistá baktériumokkal baktériumos betegségek elleni védekezés céljából. Kísérletében szerepelt a *P. agglomerans* is, melyet kipróbált *E. amylovora* ellen, de vizsgálatai során sikeresnek bizonyult még a *Xanthomonas vesicatoria* okozta betegségtünetek gátlásában is. Vizsgálatai során a *P. agglomerans* HIP32 izolátumot használta. Kísérlete során alma, körte, birs és madárbirs levélkonongját, levelét, körte gyümölcshúsát, valamint madárbirs virágait fertőzte *E. amylovora*-val, ahol elő- és utókezelésként alkalmazta az antagonistá baktériumfajt. Eredményei azt mutatják, hogy a *P. agglomerans* HIP32 izolátumot sikerrel lehet alkalmazni. Vizsgálataiban igazolta azt is, hogy a HIP32 izolátum növényen nem okoz betegségtüneteket (Al-Arabi, 2002). A HIP 32 izolátum 16S rDNS szekvenciája alapján, valamint a klasszikus módszerek eredményei is megerősítették, hogy *P. agglomerans* izolátumok közé sorolható (Szentkirályi, 2007). A génbanki adatok alapján a HIP32 izolátum közeli rokonságot mutat az adatbázisban közölt *P. agglomerans* izolátumokkal, attól függetlenül, hogy milyen szervezetről származnak. Az eredmények alapján azok közül egyikkel sem ad 100% homológiát (Szentkirályi, 2007). A HIP32 izolátum taxonómiájának vizsgálatához nem elegendő a baktérium 16S rDNS szekvenciáinak vizsgálata, mert az a genom konzervált régiója. A rokonsági viszonyok további vizsgálatához a genom más régióinak feltárása szükséges. Hevesi és mtsai. (2008) jellemezték a HIP32 *P. agglomerans* izolátumot. Kísérletükben több *P. agglomerans* izolátum összehasonlítását végezték el biokémiai és molekuláris vizsgálatokkal. A genetikai különbségek kimutatása céljából a 16S rDNS szakaszt és az *rpoB* gént vizsgálták. A 16S rDNS vizsgálat eredménye alapján a legközelebbi rokonságban a *P. dispersa*-val állt, míg a többi *Pantoea* fajokkal 95-96%-os homológiát mutatott, míg a *rpoB* gén vizsgálata során 99%-os azonosságot mutatott a *Klebsiella pneumoniae* fajjal. A *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ubikviter szervezet, számos élőhelyen fordul elő. Szaprofitaként megtalálhatóak vízben, talajban, növényeken, de jelen van az állatokban és az emberi szervezetben is. Tisztázni kell, hogy a baktérium termel-e toxikus anyagokat, amely ártalmas lehet a környezetre, abban az esetben, ha nem, akkor pedig alkalmazható-e az *Erwinia amylovora* elleni biológiai védekezésben (Hevesi és mtsai., 2008).

Az *E. amylovora* elleni védekezésben még a *Bacillus subtilis* több törzse is igen ígéretesnek bizonyult. Különböző törzsekből előállított készítmények kerültek kereskedelmi forgalomba, így az USA-ban 'Serenade' (QST 713), Európában 'Biopro' (BD170) illetve Olaszországban 'Agribiotec' (BSF4) néven (Edgecomb és Manker, 2006; Werner és Aldwinckle, 2006). Böszörményi és mtsai. (2009) *Photorhabdus* és *Xenorhabdus* fajok

antibakteriális hatásáról is beszámoltak. Az antagonista hatáson alapuló készítményeknél fontos, hogy tisztában legyünk azzal, hogy a kórokozót akadályozzuk felszaporodásában, korlátozzuk, de nem pusztítjuk el (**Németh, 1997**). Magyarországon jelenleg nem engedélyezett az antagonista baktériumok kijuttatása tüzelhalás ellen (**Ocskó és mtsai, 2011**).

### Élesztőgomba fajok

A baktérium elleni védekezésben *in vitro* és szabadföldön is a különböző élesztőfajok (*Aureobasidium pullulans*, *Candida sake*, *Metschnikowia pulcherrima*) törzsei is hatásosnak bizonyultak (**Seibold és mtsai., 2006**). Európa több országában ideiglenes felhasználási engedélyt kapott egy osztrák cég (Bio ferm) új biológiai növényvédő szere, a „Blossom Protect”, amely az *Aureobasidium pullulans* élesztőfaj két törzsét tartalmazza. A kinyílt virágokon a faj képes felszaporodni és a kórokozó baktérium bejutását, fertőzését teszi lehetetlenné a nektáriumba (**Hevesi és mtsai., 2009; László, 2008**). Németországban a fajt kipróbálták szabadföldi kísérletekben, ahol a sztreptomycinhez hasonló hatásfokúnak találták (**Ertl és mtsai., 2007**). Magyarországon alma, körte, birs, és naspolya kultúrákban engedélyezett (**Baranyi és Valovics, 2011**).

### Bakteriofágok- Fágterápia

A bakteriofágokat Frederick W. Twort, brit bakteriológus fedezte fel 1915-ben. Tanulmányaiban felvetette a lehetőségét annak, hogy egy vírus okozza a baktériumok pusztulását, az észlelt jelenségre nem ezt a magyarázatot tartotta a legvalószínűbbnek (**Twort, 1915**). Felfedezése után két évvel, 1917-ben, Twort kutatásaitól függetlenül, a párizsi mikrobiológus, Felix H. d’Herelle számolt be egy „láthatatlan, baktérium ellenes mikrobáról” (**Moore, 1926**). Baktériumokat pusztító jelenségre figyeltek fel mind a ketten, de Twort valószínűbbnek tartotta, hogy egy bakteriális enzim okozza a baktériumok pusztulását, míg d’Helle a vírusoknak tulajdonította azt és elnevezte a jelenséget bakteriofágiának (**Summers, 2005**).

A fágterápia hamar az orvosi kutatások figyelmének központjába került, azonban többek között az antibiotikumok felfedezése miatt háttérbe is szorult. **Mallmann és Hemstreet (1924)** és **Moore (1926)** növénykórtani vonatkozásban már az 1920-as években felvetik a bakteriofágok növényvédelmi hasznosításának lehetőségét. Később számos kísérletben a

bakteriofágok bizonyítottan hatásosak voltak egyes növényi kórokozók ellen (**Stanier és mtsai., 1967; Civerolo és Keil, 1969; Boyd és mtsai., 1971; Saccardi és mtsai., 1993; Tanaka és mtsai., 1990**).

Az *E. amylovora* ellen is a bakteriofágoknak nagy jelentősége lehet a tűzelhalás elleni védekezésben. **Erskine (1973)** volt az, aki elsőként ismerte fel, hogy a bakteriofágok jelentős szerepet játszhatnak a tűzelhalás elleni biológiai védekezésben. **Schnabel és mtsai. (1998)** is beszámoltak a bakteriofágok lehetséges felhasználásáról avirulens *E. amylovora* törzsekkel együtt a tűzelhalás ellen. **Schnabel és mtsai. (1999)** az almaültetvényben talajból és levélből bakteriofág törzseket izoláltak. Három bakteriofágból álló törzskeveréket készítettek és ezt használták az almafák virágainak kezelésére. A kísérlet során a fágokkal kezelt virágokban szignifikánsan kisebb *E. amylovora* populáció volt, mint a fágokkal nem kezelt esetében. **Gill és mtsai. (2003)** is végeztek átfogó vizsgálatot az *E. amylovora* bakteriofágjaival. Ötven fágot mutattak ki, amelyből negyvenkettőt sikerült fenntartaniuk. Ezzel a 42 bakteriofággal végezték további vizsgálataikat. Csupán 5 fágot tudtak izolálni fertőzött növényi szövetekből. A bakteriofágok nagy részét a fertőzött, tűzelhalás tüneteit mutató fák talajából nyerték ki. A molekuláris azonosítás során 6 csoportot különítettek el. A morfológiai és molekuláris vizsgálatok során a fágokat a *Caudovirales* rend két családjába sorolták be (*Myoviridae* és *Podoviridae*). A kinyert fágokat különböző *Erwinia* izolátumokkal reagáltatták és lítikus aktivitásukra a plakk-morfológia alapján következtettek. Egyes fágok képesek voltak megfertőzni az avirulens *Pantoea agglomerans* (syn. *Erwinia herbicola*) baktériumot is. (Az izolált fágok közül kettő képes volt reagálni *Pantoea agglomerans* törzsekkel, 6 pedig a *P. agglomerans* 49018 esetében fejtett ki lítikus aktivitást). Megállapították, hogy a bakteriofágok alkalmasak lehetnek a tűzelhalás elleni biológiai védekezésben és felhívják a figyelmet a további, szabadföldi vizsgálatok fontosságára. **Svircev és mtsai. (2005)** szintén *E. amylovora* ellen használható bakteriofágokat vizsgáltak. Szabadföldi kísérlet során körte virágokra juttattak ki fágokat *Pantoea agglomerans* baktériumokon. Az avirulens baktérium a hordozó szerepét is betöltötte, de antagonista szerepe is fontos a védekezés szempontjából. A hordozó-fág kombináció kijuttatásával jó eredményeket értek el terepi viszonyok között. A kombináció hatékonynak bizonyult az antibiotikum hatásával összehasonlítva is. **Müller és mtsai. (2010)** négy bakteriofágot vizsgáltak, melyek Németországból és É-Amerikából származtak. Azt tapasztalták, hogy a *Podoviridae* családba tartozó fágok az *E. amylovora* törzseket különböző mértékben voltak képesek megfertőzni. A *Myoviridae* fágjai hatékonyak voltak az összes

vizsgált törzssel szemben. Hazai kutatások alapján **Schwarzinger és mtsai. (2011)** is izoláltak bakteriofágokat fertőzött alma, birs és körte szövetekből. A kinyert bakteriofágokkal kezelték alma virágokat, majd inokulálták a patogénnel. Három almafajta virágait használták fel ('Jonathan Watson', 'Reglindis', 'Freedom'), amelyeket négyféle bakteriofággal kezelték. A fágok hatását táptalajokon is vizsgálták a baktériumokra. A fágok táptalajon és a virágokon is visszaszorították a kórokozó baktériumok szaporodását. **Kolozsvári Nagy és mtsai. (2012)** hazai *E. amylovora* törzsekből izoláltak fágokat, amelyek nem csak hazai törzseket voltak képesek fertőzni.

A bakteriofágok felhasználásának lehetősége nem csupán elméleti szinten áll az újabb kutatások középpontjában. Az első fág-tartalmú biopeszticidet 2005-ben hozták kereskedelmi forgalomba AgriPhage néven (Agriphage, OmniLytics Inc. Salt Lake City, UT, EPA Reg. # 67986-1) az USA-ban paradicsom és paprika kultúrában *Xanthomonas* és *Pseudomonas* fajok ellen ([http://www.omnilytics.com/products/agriphage/agriphage\\_info/agriphage\\_overview.html](http://www.omnilytics.com/products/agriphage/agriphage_info/agriphage_overview.html)). Hazai vonatkozásban említhetjük az Enviroinvest Környezetvédelmi és Biotechnológiai Zrt. által kifejlesztett fág alapú, baktériumölő permetezőszert tűzelhalás ellen. Az Erwiphage nevű szer eseti felhasználási engedélyt kapott 2012. április 1-től 2012. július 30-ig (120 napra). A készítmény felhasználható almatermésű ültetvényekben baktériumos betegség ellen előrejelzés ismeretében a virágzási és szíromhullási időszakban, preventív alkalmazással. A kezelések maximális száma 3, a virágzási időszakban. A kijuttatást napnyugta után ajánlott elvégezni. A szer II. forgalmazási kategóriába tartozik. A cégismertetőben a következőket olvashatjuk a szerről: "Az ERWIPHAGE készítmény alkalmas az almafélék, körte, birs tűzelhalásos megbetegedésének megelőzésére továbbá hatékonynak bizonyult a tűzelhalás terjedésének megállításában még erősen fertőzött területen is. Jelenleg az Erwiphage az egyetlen hatásos tűzelhalás-ellenes szer." (<http://biotechnologia.enviroinvest.hu/erwiphage-tuzelhalas-ellenes-keszitmeny.html>)

### ***Természetes eredetű anyagok***

*In vitro* és *in vivo* körülmények között vizsgálták növényi kivonatok *E. amylovora* gátló hatását. Baktericid hatásúnak bizonyultak a *Berberis vulgaris*, a *Juglans regia*, a *Rhus typhina*, a *Viscum album* és a *Hedera helix* hatóanyagai, de emellett megváltoztatják a kórokozó patogenitással kapcsolatos fehérjéinek ezimatiszus aktivitását is, mellyel rezisztenciát indukálnak

a gazdanövényben (Mosch és Zeller, 1989; Mosch és mtsai., 1996). *In vitro* kísérletekben kipróbáltak illóolajokat (*Myrtus communis*, *Thymus vulgaris*, *Satureia hortensis*) és illóolajok kombinációját rézoxikloriddal a tüzelhalással szembeni védekezésben (Hassanzadeh, 1998, 2006). Törökországban Aksebio 2 és Németországban BioZell 2000-B néven engedélyeztek *Thimbra spicata* illóolajából előállított készítményt, mely Törökországban a 'Santa Maria' körtefajta hatásait 64%-os hatékonysággal védte meg (Bubán, 2004). Hevesi és mtsai. (2006<sup>c</sup>) *in vitro* vizsgálatokban az *Origanum*-, *Mentha*-, *Thymus*- és *Tagetes* fajokban a karvon, dihidrokarvon, timol és karvakrol vegyületek hatásosságát állapították meg *E. amylovora* ellen.

A természetes eredetű anyagok másik csoportját jelentik az ásványi porok és ehhez tartozik pl.: a Mycosin. Berger és mtsai. (1998) előzetes beszámolója alapján a Mycosin, legalább 80%-os védettséget adott különböző almafajtákon. A Mycosin Gloster és Jonagold fákön a sztreptomocinnél hatékonyabb volt, nem befolyásolta a termés kötődést, valamint nem okozott parásodást sem (Römmelt és mtsai., 1998).

### ***Ellenálló fajták természetése***

A növények betegségre való fogékonyságát a fák kora, a környezeti tényezők, a növények vitalitása mellett, főként genetikai adottságaik befolyásolják. Az *E. amylovora*-val szembeni rezisztenciára való nemesítés nagy múltra tekint vissza, ennek ellenére, a gyakorlatban termesztett toleráns fajták száma nagyon kevés. A baktérium szinte a fajták mindegyikét képes megfertőzni, egy részük azonban különböző mértékben túri azt, vagyis tünetekben, termés kiesésben megnyilvánuló jelentős negatív hatás nem érvényesül. Tehát valójában csak toleranciáról beszélhetünk (Németh, 1997). Általánosságban megállapítható, hogy a körte fogékonyabb a tüzelhalásra, mint az alma.

Sok esetben ugyanazon fajták vizsgálatakor, különböző országokban a kutatók eredményei akár jelentős mértékben eltérhetnek egymástól, ami megnehezíti a fajták fogékonysági mutatóinak gyakorlati értelmezését. Ezen eltéréseknek, a következő okai lehetnek: vizsgálati eljárások különbségei (laboratóriumi és szabadföldi körülmények között végzett kísérletek), különböző kiértékelési módszerek, eltérő minősítési kategóriák, valamint éghajlati adottságokban (csapadék, páratartalom) és termesztési körülményekben megnyilvánuló eltérések. Eltérő eredményeket adhat az is, hogy a kutatók az adott országra jellemző, saját izolálású baktérium törzsszel végzik a fertőzéseket, amelyre a fajták eltérő fogékonysággal

reagálhatnak. A kísérletek során megállapított és a gyakorlati megfigyelésekkel többszörösen alátámasztott fogékonysági és ellenállósági adatok bizonyos óvatossággal vehetők figyelembe a gyakorlatban. A fajták fogékonyságáról számos adatot találhatunk az irodalomban (**van der Zwet és Beer, 1995**).

Külföldön már több mint egy évszázada megfogalmazódott a rezisztencianemesítés szükségessége. Elsősorban a termesztési költségek mérséklése miatt, valamint a környezetkímélő technológiák előtérbe helyezése alapján (**Fischer, 1996**). A céltudatos nemesítési munka (varasodással szemben), több mint fél évszázada kezdődött az USA-ban, majd ezt követték a kanadai és az európai programok (**Crosby és mtsai., 1992**). A világ számos országában (Franciaország, Olaszország, Németország, Lengyelország, Hollandia, USA, Új-Zéland, Svájc stb.) jelenleg is foglalkoznak betegségekkel szembeni ellenállóságra való nemesítéssel, mely a feladat jelentőségére és nemzetközi szerepére hívja fel a figyelmet.

Almatermésű növényfajoknál elsődleges szerepe van a biotikus stressz rezisztenciát célzó nemesítésnek. Célul tűzték ki a tűzelhalás, varasodás, lisztharmat, míg a körte esetében még a körtelevélbolha toleráns fajták előállítását. A körtefajták „tűzelhalás”- ellenállóságának értékelésekor a külföldi adatokra támaszkodhattunk (**van der Zwet és Bell, 1990, 1995; Le Lezec és Belouin, 1991; Arsenijevič és Panič, 1992; Sobiczewski és mtsai., 1997; Spotts és Mielke, 1999**). A termesztett körtefajták fogékonyságának/rezisztenciájának értékelésekor az egyes szerzők a növény különböző részein (virág, hajtás) megjelenő betegségtünet súlyosságából következtetnek. A virágzat fogékonysága és ellenálló képessége a fajta egyik legfontosabb tulajdonsága, hiszen a fertőzések leggyakrabban a tavaszi virágzáskor következnek be.

Hazánk eltérő ökológiai körülményei miatt saját vizsgálatokra is szükség van. A '90-es évek eleje óta folyamatos nemesítési program és kutatómunka folyik a Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcsstermő Növények Tanszékén hazai alma- és körtefajták *E. amylovora* baktériummal szembeni fogékonyságára illetve rezisztenciájára. Ennek a programnak része volt, hogy a történelmi körtefajtákat fogékonysági kategóriákba sorolták hajtás, virág valamint érett és éretlen gyümölcsök inokulációs vizsgálatai alapján, amelyekhez három izolátumból álló baktérium törzskeveréket használtak (**Tóth és mtsai., 2004; Honty és mtsai., 2004, 2006**). Valamint az almanemesítés során szintén a betegségekkel (varasodás, lisztharmat, tűzelhalás) szemben fogékonysági kategóriákba sorolták a fajtákat hajtás és virág fertőzés kísérletei alapján, valamint pomológiai tulajdonságok szerint is értékelték őket, hogy

mind a termesztők, mind a fogyasztók szempontjából megfelelő multirezisztens fajtákat állítsanak elő. Hazai viszonylatban már vannak államilag bejelentett alma- fajtajelöltek (MR-3, MR-9, MR-10, MR-11, MR-12, MR-13), melyek igazolták a betegségekkel szembeni toleranciát, rezisztenciát szabadföldi, növényházi és laboratóriumi körülmények között (Tóth, 2005<sup>a, b</sup>).

## 2.9 A kórokozó azonosításának módszerei

A baktériumok azonosítása és jellemzése azok morfológiai (Crosse és Goodman, 1973, King és mtsai., 1954, Miller és Schroth, 1972), biokémiai és fiziológiai (Hugh és Leifson, 1953; Lelliot és mtsai., 1966; Suslow és mtsai., 1982) tulajdonságaik alapján történik. Ha ezen tulajdonságok mellett a baktériumtörzs pontos rokonsági viszonyaira vagyunk kíváncsiak, genetikai vizsgálatokat kell végezni. A genom 16S rRNS gént kódoló szakasza a baktériumok jellemzésére bevált módszer (Hauben és mtsai., 1998). A genom e konzervált régiójára, univerzális primerek tervezhetőek, de a vizsgált rész tartalmaz fajspecifikus szakaszokat (Weisburg és mtsai., 1991). A baktériumok molekuláris vizsgálatainál lehetséges az örökítő anyag egyes részeinek (fragmentumoknak) méretkülönbségeinek a vizsgálata is, mely alkalmas lehet fajon belüli különbségek kimutatására. A nukleinsav alapú markerek egy csoportja a genomban lévő szekvencia ismétlődésekre épül (Kiss, 1999). A rövid szekvencia ismétlődésből álló egységeket SSR-nek (short sequence repeat) (Jacob és mtsai., 1991) nevezzük. Ezek az elemek nagy polimorfizmust mutató részek a genomok nem kódoló régióiban, kodominánsan, a Mendeli törvények szerint öröklődnek.

### 2.9.1 A kórokozó izolálása növényből

Richter (1998) szerint, az *E. amylovora* laboratóriumi izolálásának legegyszerűbb módszere: 1. steril körülmények között, steril szikével történő mintavétel a fertőzött vagy fertőzöttnek vélt növényből, növényi részből, az elhalt és az egészséges szövetek határáról, 2. desztillált víz hozzáadásával homogén szuszpenzió előállítása, 3. a felszaporodott mikroorganizmusok táptalaj felszínére szélesztése, majd 48-72 h múlva a kialakult telepek megfigyelése és 4. tiszta tenyészet előállítása. Tárgylemezen mikroszkóp alatt is vizsgálható 600x-os nagyítással (Bereswill és mtsai., 1998; Balaž, 1999).

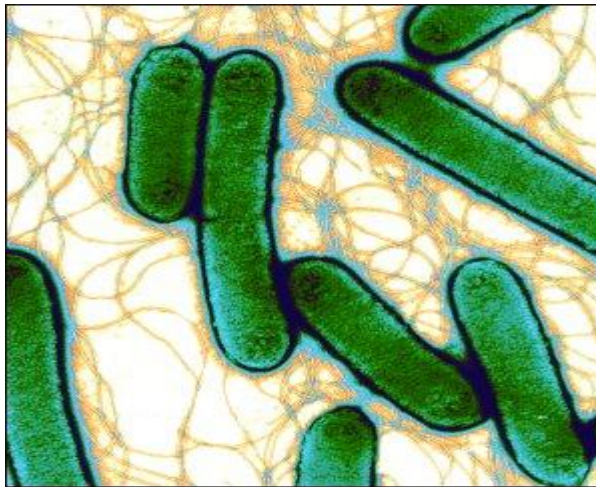


## 2.9.2 A kórokozó tenyésztésének feltételei

A baktérium számára a meleg (22-28 °C), párás, nedves, csapadékos időjárás kedvez (Hevesi, 1996). Steiner és Zeller (1996) vizsgálatai szerint széles hőmérsékleti tartományban, 4-26 °C-on hetekig is képes életben maradni a növény felületén a kórokozó. Bereswill és mtsai. (1998) kísérleteiben a táptalajok pH-ja 7-7,5. A Petri-csészéket 28 °C-on inkubálták.

## 2.9.3 A kórokozó morfológiai és tenyészbélyegei

Az *E. amylovora* Gram-negatív baktérium. Sejtjei 1,0-3,0 µm x 0,5-1,0 µm méretűek, pálcika alakúak (10. ábra). A baktérium peritrich flagellumokkal önálló mozgásra képes. Spórát nem képez (Lelliott és Dickey, 1984).



**10. ábra:** Az *Erwinia amylovora* baktérium  
([http://www.dirtdoctor.com/organic/garden/view\\_question/id/2386/](http://www.dirtdoctor.com/organic/garden/view_question/id/2386/))

Az *E. amylovora* tenyésztéséhez és a kolóniatípus meghatározáshoz számos általános (Nutrient agar, King-B) és szelektív táptalaj (Crosse-Goodman, Miller és Schroth, Kado-Heskett, EMB) áll rendelkezésünkre (Bereswill és mtsai., 1998). Az általános táptalajok a tenyésztéshez, fenntartáshoz szükségesek. Általános táptalajokon, a kolóniatípus alapján a baktérium fajok között és a fajon belüli különbségek nem mutathatóak ki, egységes kolóniákat képeznek (Ishimaru és Klos, 1984). King-B táptalajon az *E. amylovora* egyöntetű krémszínű telepeket hoz létre, fluoreszcensz festék nem képződik (Hevesi, 1996; King és mtsai, 1954).

Szelektív táptalajok esetében a kolóniatípusok nagymértékben a táptalajok összetételétől és a kórokozó növekedési erélyétől függ. A kórokozók tenyésztése során leggyakrabban a kolóniák alakját, állagát, fényességét, színét, szélét, felületét vizsgálják (**Vanneste és Eden-Green, 2000**). A Miller-Schroth szelektív táptalaj jellegzetessége, hogy minden *Erwinia* faj képes rajta növekedni, jól megkülönböztethető kolóniatípusokat alkotva. Az azonosítás fénymikroszkóp segítségével történik jó megvilágítás mellett. Az *E. amylovora* kolóniái narancssárga színűek áttetsző udvarral. Esetenként *Pseudomonas* és más baktérium fajok is megjelenhetnek a táptalajon, melyek színe kéktől- zöldes árnyalatig változhat (**Miller és Schroth, 1972**). A Crosse-Goodman táptalaj kifejezetten *E. amylovora*-ra szelektív, magas szacharóz (40%) tartalmú táptalaj. A kórokozó jól tolerálja a magas szacharóz tartalmú környezetet. Növekedése során a kolóniák felületén jellegzetes kráterek alakulnak ki, mely alapján az *E. amylovora* jól elkülöníthető más szaprofita baktériumoktól (**Crosse és Goodman, 1973**). Az EMB (Eosin Methylene Blue agar) táptalaj, mérsékeltén szelektív táptalaj Gram-negatív, enterikus baktériumok megkülönböztetésére. Ezen belül különbséget tesz a laktózt fermentáló és nem fermentáló mikrobák között. A laktózt bontó baktériumok világos, áttetsző szélű, fekete közepű kolóniát képeznek, míg a laktózt nem bontóak színtelenek (**Holt-Harris és Teague, 1916**). A Kado-Heskett táptalaj kimondottan *Erwinia* fajokra szelektív. A táptalajon piros színű kolóniákat képeznek, melynek intenzitása függ a fajtól. A lágyrothadást okozó fajok színe intenzívebb, mint az *E. amylovora* fajé. A reakcióidő 48 h, majd utána a kolóniák színe egységesen narancssárga színűvé válnak (**Kado és Heskett, 1970**).

#### **2.9.4 A kórokozó biokémiai, fiziológiai tulajdonságai**

A baktérium fluoreszkáló pigmentet nem termel, oxidatív, aerob ritkán fakultatív anaerob (**Lelliott és Dickey, 1984**). Az izolátumok jellemzésére a következő biokémiai és fiziológiai tulajdonságok alkalmazhatók: glükóz fermentálás (+), oxidáz jelenléte (+), kataláz jelenléte (-), indol képzés (-), ammóniaképzés (-), nitrát redukció (-), zselatin hidrolízis (+). Hiperszenzitív reakciót ad dohánylevélen. Szaporodik és nyálkát képez almaszeleteken (**Hevesi, 1996**). **Hevesi és mtsai. (2004<sup>a</sup>)** meghatározták a hazai *E. amylovora* populáció első izolátumának (Ea1) 49 féle szénhidrát hasznosítását, melyhez API 50CH gyorstesztet (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) használtak. A tesztet 20-26, 66 majd pedig 166 óra

elteltével értékelték. Eredményeik alapján az Ea1 izolátum 24 féle szénhidrátot (Erythritol, D-Arabinose, D Xylose, L Xylose, Adonitol,  $\beta$ -Methyl-D-Xyloside, Sorbose, Rhamnose, Dulcitol,  $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside, Maltose, Lactose, Melibiose, Melezitose, Xylitol, D Turanose, D Lyxose, D tagatose, L Fucose, D Arabitol, L Arabitol, Gluconate, 2- Keto- Gluconate, 5- Keto- Gluconate) egyáltalán nem, míg 25 féléét pedig képes volt hasznosítani (Glycerol, L Arabinose, Ribose, Galactose, Glucose, Fructose, Mannose, Inositol, Mannitol, Sorbitol,  $\beta$ -Methyl-D-Glucoside, N-Acetyl-Glucosamine, Amygdalin, Arbutin, Esculin, Salicin, Cellobiose, Sucrose, Trehalose, Inulin, Raffinose, Starch, Glycogen, Gentiobiose, D Fucose) csak lassabban vagy gyorsabban a reakció idő végére.

### 2.9.5 A kórokozó molekuláris azonosítása

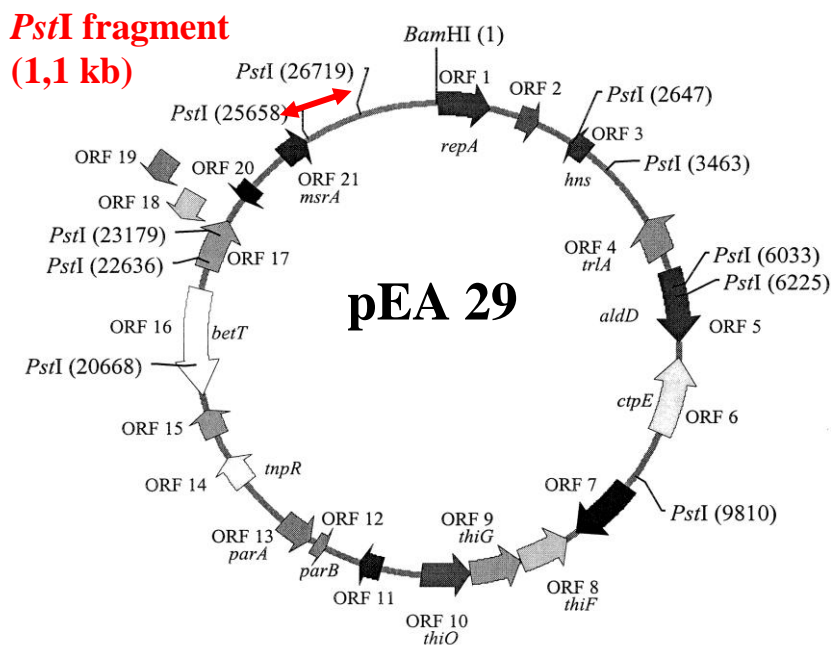
Fenotípusos vizsgálatok mellett, egy egyed, faj vagy fajta genetikai ujjlenyomata, olyan egyedi tulajdonságok összessége, melyek genotípusos megkülönböztetést tesznek lehetővé. Ezek segítségével, valamint a DNS könnyű szállítása, sokszorosítása, konzerválása révén az összehasonlítható vizsgálatok leegyszerűsödtek (**Hajósné Novák, 1999**). A marker szó jelölő funkciót ellátó egységet jelent, ami a genetikában egy tulajdonság meglétét jelző allél, illetve esetenként a nem kódoló régióban található motívum. A molekuláris genetikai markerek két nagy csoportba oszthatók attól függően, hogy nukleinsav, vagy egyéb (pl.: fehérje) alkotóelemet használunk fel a növény vagy más organizmus jellemzésére.

Mind a humán, mind a növénypatogén baktériumok azonosítását molekuláris biológiai módszerekkel, pl.: PCR-el (polimeráz láncreakció) (**Bernet és mtsai., 1989; Mullis és mtsai., 1986**) is végzik. A baktériumok esetében, valamilyen genetikai bélyeg kimutatását célzó, legelterjedtebb a 16S riboszómális RNS-t (rRNS) kódoló gén bázissorrendjének meghatározása szekvencia analízissel. Ezt a módszert ma már széleskörűen használják baktériumok azonosítására és taxonómiai vizsgálatok kivitelezésére (**Choi és mtsai., 1996; Clarridge, 2004**). A bakteriális eredetű 16S rRNS gén nagyon konzervált, különböző fajok esetében is akár 95-96%-os homológiát mutathat. Tartalmaz azonban általában kilenc „hipervariábilis régiót”, mely jelentős eltéréseket mutat különböző baktérium fajok között, ezáltal alkalmas faj szintű identifikációra (**Van de peer és mtsai., 1996**). Baktériumok esetében egy fajhoz tartozónak nevezzük azokat az egyedeket, melyeknek teljes DNS állományuk egymással 70%-nál nagyobb

homológiát mutat. A legtöbb PCR vizsgálat során olyan primereket alkalmaznak, melyek rendkívül specifikusak a vizsgált baktériumra, vagy baktériumok egy kisebb csoportjára.

A nukleinsav alapú markerek általában a genom egyes részeinek (fragmentumok) fizikai méretkülönbségei által, vagy bizonyos szekvenciák megléte révén elvégezhető azonosítást, illetve elkülönítést tesznek lehetővé. A markerek egy csoportja a genomban lévő szekvencia ismétlődésekre épül, ilyenek például a mikro-, és miniszatellitok, amelyeknek közös tulajdonságaik, hogy alléljaik különböző tagszámú tandem-ismétlődésekből állnak. Az 1-2-3-4 tagszámú tandemismétlődések összefoglaló néven mikroszatellitnek, az ennél nagyobb tagszámúak pedig a miniszatellitok (**Kiss, 1999**).

A nukleotid ismétlődésből álló egységeket SSR-nek (short sequence repeat – rövid szekvencia ismétlődés) (**Jacob és mtsai., 1991**) nevezzük. Ezek az elemek nagy polimorfizmust mutató részek a genomok nem kódoló régióiban, kodominánsan, a Mendeli törvények szerint öröklődnek. Az SSR markerek PCR (**Mullis és mtsai., 1986**) technikával, kis mennyiségű DNS felhasználásával amplifikálhatóak. A lokuszok egyedileg definiálhatóak a genomban, a repetitív szekvenciákat határoló konzervált szakaszokra tervezett primerek révén (**Weber és May, 1989**). Az SSR méret szerinti tesztek nagy előrelépést jelentettek a baktérium fajok közötti különbségek és azonosságok kimutatásában. **Geider (2005)** és **Barionovi és mtsai. (2006)** összehasonlítottak különböző *E. amylovora* izolátumokat, melyek különböző helyekről, gazdanövényről származtak. **Schnabel és Jones (1998)**, **Kim és Geider (1999)** beszámoltak az *E. amylovora* izolátumok SSR számainak stabilitásáról, amely vitatott. **Ruppitsch és mtsai. (2004)** is vizsgálták az *E. amylovora* SSR egységeinek stabilitását standard laboratóriumi és stresszes körülmények között. Az SSR adatok sokkal jobban reprodukálhatóak, mint más típusba sorolási módszerek (**Van Belkum és mtsai., 1998; Van Belkum, 1999**). Végül bebizonyosodott, hogy az SSR egységek megfelelnek a genetikai marker feltételeinek. Az *E. amylovora*-ban megtalálható a pEA29 plazmid (**Falkenstein és mtsai., 1988**), melynek mérete megközelítőleg 28,2 kb nagyságú. Az SSR, ami jelen esetben 8 nukleotid (ATTACAGA), a pEA29 plazmid 1,1 kb hosszú *Pst*I fragmentjében (**11. ábra**) 3-15 alkalommal ismétlődik a különböző *E. amylovora* izolátumokban, mely eredmények alkalmasak az *E. amylovora* izolátumok csoportosítására (**Lecomte és mtsai., 1997; Kim és Geider, 1999**).



**11. ábra:** A vizsgált *Pst*I fragment elhelyezkedése a pEA29 plazmidban (McGhee és Jones, 2000)

2004-ben **Ruppitsch és mtsai.** által tervezett primerekkel (pEA29A, pEA29B) a pEA29 plazmid *Pst*I fragmentuma PCR technikával felszaporítható és értékelhető a fragmentum hossz polimorfizmus alapján. Ezek alapján teljes biztonsággal elkülöníthetők az egyes izolátumok (**Ruppitsch és mtsai., 2004**).

**Keck és mtsai. (1997, 2002)** osztrák-magyar kooperáció keretén belül több osztrák és magyarországi *E. amylovora* izolátum genetikai összehasonlítását végezték el. Az *E. amylovora*-ra jellemző pEA29 plazmid *Pst*I fragmentjének ATTACAGA ismétlődő szekvenciája kópiaszámának analízise azt mutatta, hogy az osztrák izolátumok domináns populációjában (94%) ez a szakasz 10-14-szer ismétlődik. A magyar izolátumok 5 csoportra voltak bonthatók, ahol ez a szekvencia 4, 5, 6, 7, 9-szer ismétlődött és az izolátumok domináns populációja (75%) a 4-szer ismétlődő szekvencia csoportba tartozott. Ez a genetikai különbözőség rámutatott arra, hogy az osztrák és magyar izolátumok eredete feltételezhetően nem azonos.

## 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 3.1 A vizsgálat helye és ideje

Az *Erwinia amylovora* Ea1 törzsét a betegség első magyarországi észleléskor Hevesi Mária izolálta Nyárlőrincen almafa rákos elhalásáról (**Hevesi, 1996**). 1996 óta számos *E. amylovora* izolátum megtalálható a Budapesti Corvinus Egyetem Génbankjában, melyek különböző évekből, különböző földrajzi helyekről és gazdanövényekről származnak, melyekből 22 izolátumot a kísérletekbe vontunk.

Az ervíniás tüneteket mutató növényi részeket Magyarország különböző területeiről, Erdélyből és a Vajdaságból gyűjtöttük be 2007 és 2011 között, melyek ültetvényekből, közterületről és magánházak környékéről származtak. A kórokozók azonosítását morfológiai, biokémiai, fiziológiai és molekuláris jellegeik alapján és a patogenitási tesztek, bakteriofág érzékenységi- és virulencia vizsgálatokat a Budapesti Corvinus Egyetem Gyümölcsstermő Növények és a Növénykórtani Tanszékek laboratóriumaiban végeztük el.

A szilváról, mint új gazdanövényről izolált *E. amylovora* izolátum molekuláris azonosításához a 16S rRNS-t kódoló gén bázissorrendjének meghatározását és az összes *E. amylovora* izolátumok genetikai jellemzéséhez, pEA29-es plazmid *Pst*I fragmentjének nukleinsav szekvenciáját Szegeden a BayGen-nél határoztattuk meg.

### 3.2 A vizsgálat anyaga

#### 3.2.1 Izolátumok

Összesen 31 izolátumot vizsgáltunk természetű és vadonélő gyümölcsökről és dísznövényekről (**1. táblázat**). Az izolátumok többsége Magyarországról, míg néhány izolátum külföldről (Ausztria, USA, Ukrajna, Románia, Szerbia) származik. A házi kertekből, ültetvényekből, közterületről származó izolátumok esetében a gazdanövény fajtáját legtöbbször nem sikerült meghatározni.

**1. táblázat:** *Erwinia amylovora* (Ea) izolátumok származásának adatai

<b>Izolátumok jelölése</b>	<b>Gazdanövény</b>	<b>Gyűjtés helyszíne</b>	<b>Izolálás éve</b>	<b>Izolálta</b>
Ea1	<i>Malus domestica</i>	Nyárlőrinc	1996	Hevesi Mária
Ea6	<i>Malus domestica</i>	Sarkad	1997	Hevesi Mária
Ea10	<i>Pyrus communis</i>	Sarkad	1997	Hevesi Mária
Ea12	<i>Cotoneaster horizontalis</i>	Sarkad	1997	Hevesi Mária
Ea15	<i>Cotoneaster dammeri</i>	Békéscsaba	1997	Hevesi Mária
Ea16	<i>Cotoneaster salicifolius</i>	Pécs	1997	Hevesi Mária
Ea19	<i>Cydonia oblonga</i>	Pomáz	1997	Hevesi Mária
Ea22	<i>Crataegus</i> sp.	Pécs	1998	Hevesi Mária
Ea26	<i>Pyrus communis</i>	Zala	1998	Hevesi Mária
Ea29	<i>Cotoneaster</i> sp.	Budapest	1998	Hevesi Mária
Ea31	<i>Pyracantha</i> sp.	Budapest	1998	Hevesi Mária
Ea50	<i>Pyrus x communis</i> 'Dr. Guyot Gyula'	Zala	1999	Hevesi Mária
Ea60	<i>Malus domestica</i>	Érd	2000	Hevesi Mária
Ea67	<i>Malus domestica</i>	Monostorpályi	2000	Hevesi Mária
Ea70	<i>Cydonia oblonga</i>	Monostorpályi	2000	Hevesi Mária
Ea80	<i>Pyrus communis</i>	Zala	2001	Hevesi Mária
Ea88	<i>Malus x domestica</i> 'Idared'	Újfehértó	2002	Hevesi Mária

1. táblázat folytatása

Izolátumok jelölése	Gazdanövény	Gyűjtés helyszíne	Izolálás éve	Izolálta
Ea95	<i>Cydonia oblonga</i>	Rákoskert	2003	Hevesi Mária
Ea47	<i>Malus x domestica</i> 'Idared'	USA, Michigan	1999	Hevesi Mária
Ea96	<i>Cydonia oblonga</i>	Ukrajna, Ungvár	2003	Hevesi Mária
Ea329/98	<i>Malus domestica</i>	Ausztria, Vorarlberg	1998	Hevesi Mária
Eam1	<i>Malus domestica</i>	Románia, Székelyudvarhely	2009	Végh Anita
Eam2	<i>Malus x adstringens</i> 'Helen'	Budapest	2010	Végh Anita
Eam4	<i>Crataegus</i> sp.	Vecsés	2010	Végh Anita
Eam5	<i>Crataegus</i> sp.	Budapest	2010	Végh Anita
Eam6	<i>Crataegus</i> sp.	Debrecen	2010	Végh Anita
Eam7	<i>Prunus</i> sp.	Budaörs	2011	Végh Anita
Eam8	<i>Cydonia oblonga</i>	Budapest	2011	Végh Anita
Eam9	<i>Cydonia oblonga</i>	Szerbia	2011	Végh Anita
Eam10	<i>Pyrus communis</i>	Szerbia	2011	Végh Anita
Ea- PlumBo1	<i>Prunus x domestica</i> D 'Agen'	Budaörs	2011	Végh Anita

### 3.2.2 Bakteriofágok

Az *E. amylovora* izolátumok bakteriofág érzékenységének vizsgálatához 4 különböző fágot használtunk (**2. táblázat**), melyek az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének gyűjteményéből származtak.



**2. táblázat:** Bakteriofágok származásának adatai (Schwarczinger I. közlése alapján)

Fágok jelölése	Gazdanövény	Gyűjtés helyszíne	Izolálás éve
H1A	<i>Cydonia oblonga</i>	Siófok	2007
H4B	<i>Cydonia oblonga</i>	Békéscsaba	2006
H5A	<i>Cydonia oblonga</i>	Békéscsaba	2006
H8	<i>Malus domestica</i>	Siófok	2007

### 3.2.3 Táptalajok

A kórokozók izolálásához, tenyésztéséhez és fenntartásához King-B agar (20 g pepton, 10 g glicerol, 1,5 g  $K_2HPO_4$ , 1,5 g  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ , 15 g agar, 1 l végtérfogatban; pH: 7,2) táptalajt használtunk. Az izolátumokat a további vizsgálatokhoz  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  -on lefagyaszttva glicerinben tároltuk. Megőrzésük, fenntartásuk pedig  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ -on fagyasztó csőben történik. A közeg összetétele: 3 g Beaf extract, 5 g pepton, 20 g glicerol, 1 liter desztillált vízben oldva.

A tenyészbélyegek meghatározáshoz King-B táptalajt, EMB (10 g zselatin, 5 g laktóz, 5 g szacharóz, 2 g  $K_2HPO_4$ , 0,4 g eosin Y, 0,065 g metilénkék, 13,5 g agar 1 l desztillált vízben oldva; pH: 7,2), Crosse-Goodman táptalaj (160 g szacharóz, 12 g nutrient agar (BBL), 0,8 ml kristály viola (0,1% -os oldata abszolút alkoholban) és 20 ml 0,1% -os cikloheximid 380 ml desztillált vízben oldva), Miller-Schroth (800 ml desztillált vízben, 20 g agar; 0,1 ml tergitol, 10 ml nitrilo-trieetsav, 46%-os KOH oldatban oldva, 9 ml bromtimolkék, 2,5 ml neutrálvörös, 1 ml 5N NaOH, 1,7 ml thallium-nitrát, 50 ml 14mM kobalt-klorid (0,83 g/250 ml vízben), 10 g mannitol, 0,5 g nikotinsav, 3 g L-aszparagin, 2g, 0,2 g  $MgSO_4 \times H_2O$ , 2,5 g nátrium-taurokolát, 1 liter desztillált vízre vonatkoztatva, pH: 7,3) és Kado-Heskett (8 g agar, 8 g kazein hidrolizát, 0,0358 g  $MgSO_4$ , 2 g  $K_2HPO_4$ , 10 g szacharóz, 4 g élesztőkivonat) táptalajt használtunk, ahol az inkubációs hőmérséklet  $26\text{ }^\circ\text{C}$  volt.

A bakteriofágok fenntartása SM táptalajban (20 ml 5 M NaCl, 8,5 ml 1 M  $MgSO_4$ , 50 ml 1 M Tris-HCl (pH: 7,5), 10 ml 1%-os gelatin, 1 liter desztillált vízben), sötétben  $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on történt. Megőrzésük  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ -on fagyasztó csőben DMSO-ban, valamint  $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on hűtőszekrényben is hónapokig tárolható.

A transzformálás során steril 2TY (4 g tripton, 2,5 g yeast extract, 1,25 g NaCl, 250 ml végtérfogatban) és steril ampicillines folyékony LB táptalajt (2,5 g tripton, 1,25 g yeast extract,

2,5 g NaCl 250 ml végtérfogatban + 500 µl 50 mg/ml ampicillin), szilárd táptalajhoz 3,75 g agart használunk 250 ml végtérfogathoz. A Mini preparátum készítéséhez steril ampicillines LB szilárd és folyékony táptalajt használtunk.

### 3.2.4 Körtefajták

Az izolátumok virulenciájának vizsgálatához az éretlen körtegyümölcsöket a Pölöskei Fajtakísérleti Állomásáról szereztük be. A kísérletben hét áru- és történelmi körtefajtát vizsgáltunk (3. táblázat).

**3. táblázat:** Vizsgált körtefajták irodalmi adatai (Mohácsy és Porpáczy, 1958; Tomcsányi, 1979; Göndörné, 2000)

Körtefajták	Származás	Betakarítás ideje	Fajták tüzelhalás fogékonyasága irodalmi adatok alapján
<b>Téli esperes</b>	Belgium (1823)	október közepe	Nincs adat
<b>Drouard elnök</b>	Franciaország (1869)	szeptember vége- október eleje	Nincs adat
<b>Serres Olivér</b>	Franciaország (1851)	október eleje	Erősen fogékony (Göndörné, 2000)
<b>Alexander Lucas</b>	Franciaország (1871)	szeptember vége- október eleje	Kissé fogékony (Göndörné, 2000) vagy fogékony (Petzold, 1984)
<b>Stössel tábornok</b>		október eleje	Nincs adat
<b>Diel vajkörte</b>	Belgium (1805)	szeptember közepe, szeptember vége	Fogékony (Göndörné, 2000)
<b>Eldorado</b>	USA (1925)	szeptember közepe, szeptember vége	Fogékony (Lombard és mtsai., 1980) vagy kissé fogékony (Thibault és Le Lezec, 1990) vagy rezisztens (Bellini és Nin, 1997)

### 3.2.5 Növények, termékek

#### Patogenitási tesztekhez

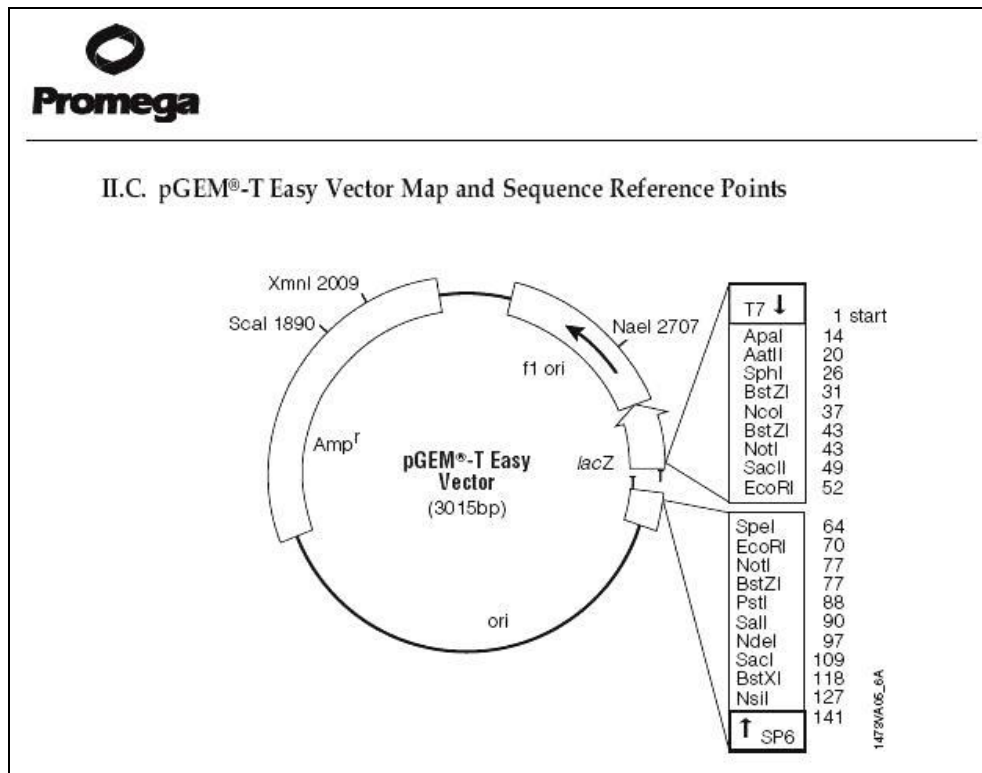
Az izolátumok patogenitásának teszteléséhez éretlen körtegyümölcsöket ('Eldorado' fajta), míg a szilváról (Ea-PlumBo1) származó izolátum esetében éretlen szilva gyümölcsöket (d' Agen fajta) és fiatal szilvahajtásokat (Besztercei fajta) használtunk.

#### Hiperszenzitív reakcióhoz

Az izolátumok hiperszenzitív reakciójának vizsgálatához egészséges dohánynövényt (*Nicotiana tabacum* L. cv. *xanthi*) használtunk (Klement, 1963).

### 3.2.6 Plazmid és baktériumtörzs klónozáshoz

A tisztított PCR-termékeket a Promega 3015 bázispár hosszúságú pGEM-T Easy plazmidjába ligáltuk (12. ábra). A PCR-termékek klónozásához az *Escherichia coli* baktérium DH 5- $\alpha$  törzsét használtuk



12. ábra: A pGEM-T Easy Vektor felépítése

### 3.2.7 Primerek

A molekuláris vizsgálatok során baktériumokra specifikus primereket (**Osborn és mtsai, 2000**) használtuk a PCR reakciókban, amelyek a 16S rRNS-t kódoló gén bázissorrendjét határozzák meg. A módszert ma már széleskörűen használják baktériumok identifikálására és taxonómiai vizsgálatok kivitelezésére (**Choi és mtsai., 1996; Clarridge, 2004**), amely alkalmas faj szintű identifikációra (**Van de peer és mtsai., 1996**).

**1389r** (reverse) primer 5'-ACG GGC GGT GTG TAC AAG-3'

**63f** (forward) primer 5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'

Az *E. amylovora* faj pEA 29 plazmidjára specifikus primereket is használtunk, mely alkalmas a faj azonosítására, valamint a primerek segítségével kiemeltük a plazmidból az 1,1 kb hosszú fragmentumot. Ebben a szakaszban található egy 8 nukleotidből (ATTACAGA) álló ismétlődő régió (SSR), mely száma alapján a fajon belüli különbségek, eltérések mutathatóak ki (**Ruppitsch és mtsai., 2004**).

**pEA29A** (reverse) 5'-CGG TTT TAA CGC TGG G-3'

**pEA29B** (forward) 5'-GGG CAA ATA CTC GGA TT-3'

### 3.2.8 Enzimek

A PCR-hez: Taq DNS polimeráz enzim (rekombináns) (5u/μl); puffere: 10x-es Taq puffer + KCl – MgCl<sub>2</sub>, pH: 8,8 25 °C -on. A ligáláshoz: T4 DNS ligáz enzim (5u/μl); puffere: 10x-es T4 DNS ligáz puffer pH: 7,8 25 °C-on. A plazmidot tartalmazó baktérium kolóniák kék-fehér szín szelekciójához IPTG-t és Xgal-t használtunk. Az inzertet a plazmidból *EcoRI* (10u/μl) restriktív endonukleázzal vágtuk ki. Az enzim puffere: 10x-es *EcoRI* puffer pH: 7,5 37 °C-on. A T4 DNS ligáz enzimet a Promega cégtől, míg a többi enzimet a Fermentas cégtől vásároltuk.

### 3.2.9 Kitek

A kórokozó biokémiai tulajdonságainak vizsgálata során a Biomérieux (Marcy l'Etoile, France) által gyártott API20E és API50CH gyorsteszteket használtuk. A PCR-termék tisztítását

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)-tel végeztük. A szekvenáláshoz Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit-tel (Bio-Rad) tisztítottuk a rekombináns plazmidokat.

### **3.2.10 Eszközök**

Az általános laboratóriumi fém-, műanyag- és üvegeszközök mellett a klasszikus diagnosztikai vizsgálatainkhoz az alábbi eszközt használtuk: Leica MZ6 sztereomikroszkóppal vizsgálatuk az izolátumok kolóniáit.

A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz Applied Biosystem 9700 típusú PCR-készületet használtunk.

## **3.3 A vizsgálat módszere**

### **3.3.1 A betegség tüneteinek megállapítása**

A tüzelhalásra jellemző tüneteket a különböző gyümölcsfajták (*Malus* sp., *Pyrus* sp., *Cydonia* sp., *Prunus* sp., *Crataegus* sp.) hajtásain figyeltük meg. A fiatal hajtásokon pásztorbatszerű görbület volt megfigyelhető. A hajtások és a levelek megbarnultak, megfeketedtek, elhaltak. A fertőzött hajtásokat zacskóba gyűjtöttük és a vizsgálatokig a kórokozó számára kedvező környezeti feltételek mellett tartottuk (párás, meleg). A vizsgálatokat 1-2 napon belül elvégeztük.

### **3.3.2 A kórokozó izolálása táptalajon**

A fertőzött hajtásokat alkohollal fertőtlenítettük, majd steril körülmények között a hajtásról, az egészséges és az elhalt növényi rész határáról mintát vettünk. A növényi szövetet steril desztillált vízzel homogenizáltuk, majd az elegyet steril King-B agar táptalajon szélesztettük, és a Petri-csészéket 26 °C-on inkubáltuk 1-2 napon át. A különálló kolóniákat leoltottunk steril táptalajra, majd tiszta tenyészetet állítottunk elő (**13. ábra**) és 26 °C-on inkubáltuk és ezután a lemezeket 4 °C-on hűtőben tároltuk.

A Génbankból származó liofilizált izolátumokat steril desztillált vízzel homogenizáltunk és a baktériumszuszpenziót Petri-csészékben táptalajra szélesztettük 26 °C-on, majd 2 nap elteltével átoltottuk.



**13. ábra:** Ea-PlumBo1 izolátum 24 órás tenyésztete  
(Fotó: Végh, 2011)

### **3.3.3 Baktérium szuszpenzió előállítása**

A hiperszenzitív reakciókhoz, a patogenitási tesztekhez, a biokémiai vizsgálatokhoz, a bakteriofág érzékenység megállapításhoz és a körtefajták fertőzéséhez szükséges baktérium szuszpenziót a kórokozó 1 napos (26 °C) tenyésztéséből nyertük. A spektrofotométert a vizsgálatok előtt desztillált vízzel kalibráltuk. A 24 órás, friss, tiszta tenyésztetből származó baktérium szuszpenziót a spektrofotométerrel  $5 \times 10^7$  sejt/ml töménységűre állítottuk be.

### **3.3.4 A kórokozó azonosítása klasszikus módszerekkel**

A saját izolátumok esetében fontosnak tartottuk a kórokozó alapvető tulajdonságainak a meghatározását, amely biztosítja a szelektív izolálást, továbbá azonosíthatjuk, hogy a kórokozó az *Enterobacteriaceae* családba tartozik.

#### **3.3.4.1 Gram-féle tulajdonság vizsgálata**

Az izolátumok 24 órás, friss, tiszta tenyésztéséből a Petri-csészéről steril fogpiszkáló segítségével egy-két kolóniát veszünk, és steril tárgylemezre helyezzük. Majd hozzáadjuk a 3%-os kálium-hidroxidot és homogenizáljuk. Gram-negatív a kórokozó abban az esetben, ha a kálium-hidroxid oldotta a sejtfalat (az elegy, nyúlós állagú), míg a Gram-pozitív esetében nem oldja a kórokozó sejtfalát (az elegy vizes hatású).

### 3.3.4.2 Hiperszenzitív reakció

A baktériumszuszpenziót ( $5 \times 10^7$  sejt/ml) a dohánylevél (*Nicotiana tabacum* L. cv. *xanthi*) szövetébe juttattuk injekciós tűvel. Majd 24-48 óra elteltével figyeltük a hiperszenzitív reakció kialakulását, azaz a gyors szöveti nekrozist.

### 3.3.4.3 Patogenitási teszt

A frissen izolált *E. amylovora* izolátumok patogenitási tesztjének elvégzése különböző tesztnövényeken szintén nélkülözhetetlen módszer a kórokozó baktérium meghatározásához (Agrios, 1997). A betegségek mikrobiális eredetére vonatkozóan teljesülniük kell a Koch-féle posztulátumoknak (Koch, 1876), melyek a következők:

1. A kórokozó minden beteg növényből kimutatható
2. A kórokozó izolálva mesterségesen tenyészthető (nem obligát parazita esetében) vagy obligát parazita esetén, fogékony gazdanövényen (tisztá tenyészet).
3. Az eredeti, de egészséges gazdanövény inokulálva a kórokozó a tiszta tenyészetéből azonos tüneteket hoz létre, mint a megfigyelt eredeti növényen.
4. A kórokozó kimutatható ezekből az inokulált növényekből és ismét tiszta tenyészetbe hozva ugyanazok a tenyészbélyegek figyelhetőek meg, mint a 2. lépésben nem obligát parazita esetén.

A patogenitási teszteket izolátumonként 3-6-szor ismételtük. Az összes izolátum esetében körteterméseket, míg a szilváról származó izolátum esetében szilva gyümölcsöket és hajtásokat is inokuláltunk. A patogenitás vizsgálatban használt tesztnövények felületét alkohollal fertőtlenítettük.

A gyenge, fiatal, friss szilvahajtások fertőzéskor 20-25 cm hosszúságúak voltak, melyek nem fásodtak. Hat hajtást inokuláltunk, a baktérium szuszpenziót ( $5 \times 10^7$  sejt/ml) a hajtás csúcsától számolt 2. teljesen kifejlődött levél hónaljába juttattuk be injekciós tűvel. Ezután párás körülmények között (80-90% relatív páratartalom) fólia alatt a laboratóriumban 25-27 °C-on tároltuk, így biztosítva a kedvező körülményeket a betegség kialakulásához. A kontroll növényt desztillált vízbe mártott steril tűvel szűrtük meg és azonos körülmények között, elkülönítve tartottuk.

A gyümölcsök ('Eldorado' körtefajta, d 'Agen szilvafajta) fertőzése steril körülmények között történt. A tesztelésnél a természetes fertőződés mechanizmusát szűrással imitáltuk. A termést 3-6 helyen szűrtük meg baktérium szuszpenzióba ( $5 \times 10^7$  sejt/ml) mártott lándzsatűvel. A kontrollt steril desztillált vízbe mártott tűvel kezeltük. A fertőzött gyümölcsöket 25-27 °C-on inkubáltuk, 70-80%-os páratartalmat biztosítva.

A patogenitási teszt értékelése a gyümölcsökön 5 nap, míg a hajtás esetében 10-14 nap elteltével történt. Az eredményekre a fertőzést követően a gyümölcsökön, hajtásokon kialakult *E. amylovora*-ra jellemző tünetekből (**van der Zwet és Keil, 1979**) következtettünk (a hajtásokon a barnás-feketés hajtás elhalás és pásztorbatszerű görbületből, míg a gyümölcsök esetében a vizenyős, barnuló foltokból következtettünk).

### 3.3.5 A tenyészbélyegek megállapítása és értékelése

A saját növényből izolált és a Génbankból származó *E. amylovora* izolátumok tiszta tenyészetét általános és szelektív táptalajokra szélesztettük. A Petri-csészéket termosztátba helyeztük és a kórokozó számára kedvező környezeti tényezők mellett tároltuk (26 °C-on). A baktériumok tenyészbélyegeit a kolónia típusai alapján lehet megkülönböztetni, csoportokba sorolni (**Mazzucchi, 1977**). 24-48 h elteltével a táptalajokon kifejlődött kolóniákat mikroszkóp alatt megfigyeltük és jellemeztük. A kolóniákat megkülönböztethetjük a telepek állaga, alakja, felszíne, széle és színe alapján, mely módszert mindenki általánosan alkalmazza (**Puskás, 1986; Klement és mtsai., 1990**).

### 3.3.6 Biokémiai tulajdonságok vizsgálata és értékelése

A saját növényből izolált *E. amylovora* izolátumok biokémiai vizsgálatához API 20E és API 50CH (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France), míg a Génbankból származó izolátumok biokémiai tulajdonságainak jellemzéséhez csak API 50CH tesztcsíkokat használtunk. Az API 20E a baktériumfajok meghatározására, az API 50CH a baktériumok biokémiai jellemzésére szolgál.

Az API20E és az API50CH kitek esetében a gyártó utasításait (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) végeztük el. Az összes izolátum esetében a kitek mintahelyeinek megtöltéséhez, a kitekhez tartozó speciális táptalajokhoz  $5 \times 10^7$  sejt/ml töménységű baktérium



szuszpenziót használtunk. Mindkét gyorstesztet 36 °C-on inkubáltuk és 24-48 h elteltével értékeltük.

Az API20E kit értékelése során az eredményeket a gyártó által rendelkezésünkre bocsátott pozitív és negatív minta-tesztcsíkok alapján értékeltük (**14. ábra**).

#### pozitív teszt



#### negatív teszt

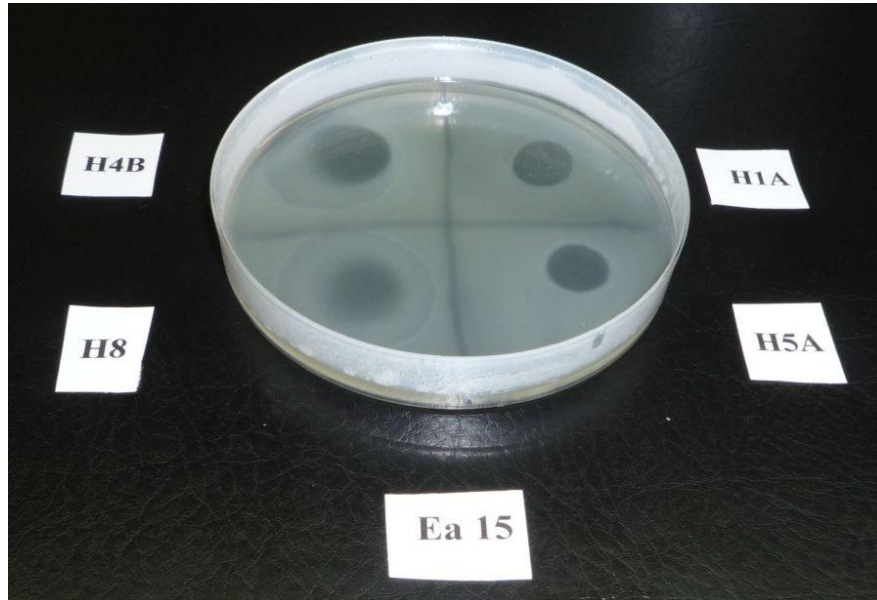
**14. ábra:** API20E pozitív és negatív teszt (Biomérieux, France)  
(<http://www.tgw1916.net/Tests/api.html>)

Az API50CH kit módszer színváltozás megfigyelésén alapszik: ha az adott baktérium hasznosítja az adott szénhidrátot, akkor az eredeti piros színű oldat sárgára változik, míg a zselatinbontás esetében pozitív teszt során elfolyósítja a zselatint és fekete színreakció lép fel. 24 és 48 óra elteltével értékeltük a bekövetkező színváltozásokat.

### 3.3.7 Bakteriofág érzékenység vizsgálat- Felcseppentéses módszer

Az összes *E. amylovora* izolátum bakteriofág érzékenységének vizuális meghatározására a dupla agarlemez módszert (**Adams, 1959**) használtuk. Petri-csészékbe 10 ml King-B agart öntöttünk. Az izolátumok 24 órás tenyészetéből desztillált vízzel szuszpenziót készítettünk, melyeket spektrofotométerrel (560 nm-en)  $10^7$  sejt/ml töménységűre állítottunk be. Ezután a felmelegített (45 °C) 1%-os King-B agarhoz hozzákevertük a baktérium szuszpenziót 3:1 arányban. Az így kapott lágy agart a szilárd agar tetejére öntöttük. A felső agarréteg

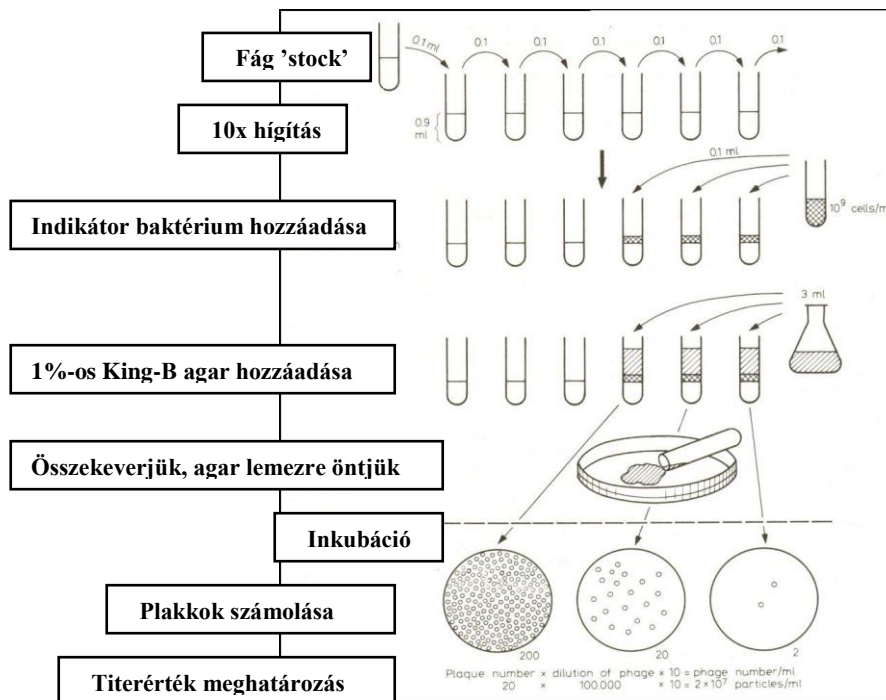
megdermedése után a táptalajok felületére cseppentettük a tesztre kiválasztott fágokat (10 µl, 10<sup>6</sup> PFU/ml). A Petri-csészéket 26 °C-on 24 órán át inkubáltuk (**15. ábra**).



**15. ábra:** Ea 15 izolátum bakteriofág érzékenysége dupla agarlemez módszerrel  
(Fotó: Végh, 2011)

### 3.3.8 Bakteriofágok titerértékének meghatározása

A különböző helyről, évből és gazdanövényről származó fágok titerértéke 10<sup>10</sup> PFU/ml volt, melyet a következőképpen ellenőriztünk: A Petri-csészékbe dupla agarlemez módszerrel 10 ml King-B táptalajra 4 ml fedőréteget öntünk, mely tartalmazza a 24 órás, friss baktérium szuszpenziót (*E. amylovora* Ea1/79-es törzs), valamint az adott fág lizátum különböző hígításait (**16. ábra**).



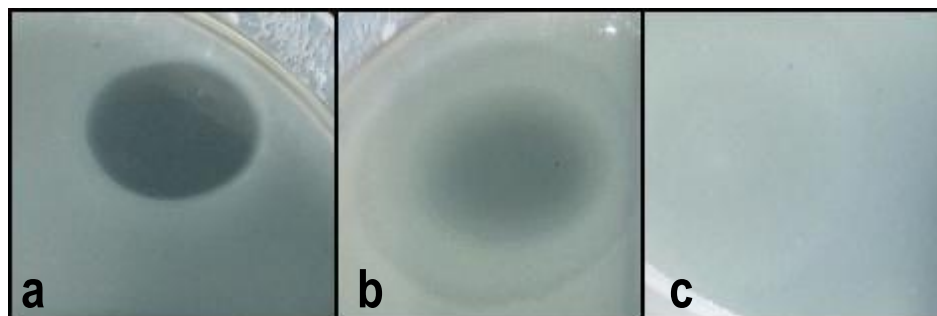
16. ábra: Fág 'stock' hígítása (Klement és mtsai., 1990)

### 3.3.9 Plakkmorfológia

Az izolátumok bakteriofág érzékenységi vizsgálatának kiértékelése vizuálisan, a baktérium tenyészeteken a bakteriofágok által okozott plakkok morfológiája alapján történt. Három csoportot különítettünk el, melyeket 'a'-'c' betűjelzésekkel láttunk el:

- a- Tiszta plakk
- b- Homályos plakk
- c- Nincs semmilyen látható elváltozás, nincs plakk.

Példa az egyes típusokra (17. ábra):



**17. ábra:** Plakkmorfológia (plakktípusok: a-tiszta plakk; b-homályos plakk; c-nincs plakk)  
(Fotó: Végh, 2011)

### 3.3.10 Éretlen körtegyümölcsök inokulálása

A vizsgálati módszereket részben a külföldi (van der Zwet és Keil, 1979) és részben a hazai (Hevesi és mtsai., 2000) rezisztenciakutatásban alkalmazottak közül vettük át. A gyümölcsöket a fertőzés előtt alkoholos vattával lemosva fertőtlenítettük. Az inokuláláshoz az izolátumok 24 órás tiszta tenyészetből  $5 \times 10^7$  sejt/ml töménységű szuszpenziót készítettünk. Az éretlen gyümölcsök tesztelésekor laboratóriumi körülmények között imitáltuk a természetben előforduló külső sérüléseken át történő fertőződést. Fajtánként átlagosan 5 darab (5-6 cm átmérőjű) gyümölcsöt vizsgáltunk. A baktérium szuszpenzióba mártott bonctűvel a gyümölcsöket 6 szúrással fertőztük meg, kontrollként pedig steril desztillált vizet használtunk. A gyümölcsöket nedves szűrőpapírral bélelt polietilén zacskóba helyeztük el. A fertőzött gyümölcsök inkubálása 26 °C-on történt. A körtefajták fogékonyágára a folyamatosan növekedő, vizenyős foltokból, míg rezisztenciájára a határozott szélű, száraz, besüppedő foltokból következtethettünk, figyelembe véve a foltok átmérőjét is (Hevesi és mtsai., 2004<sup>b</sup>). A betegség kialakulását folyamatosan figyeltük és a tüneteket 4-5 nap elteltével értékeltük. A gyümölcsöket 5 fertőzési fokozatba (fertőzési index, Horsfall és Barratt, 1945) soroltuk a fertőzött folt átmérője (mm) szerint: 0-tünetmentes gyümölcs, 1-kissé fogékony (0-5 mm), 2-közepesen fogékony (6-10 mm), 3-fogékony (11-20 mm), 4-erősen fogékony (21-30 mm vagy 30mm-nél nagyobb) (18. ábra).



**18. ábra:** Fertőzési skála (Fotó: Végh, 2010)

(balról jobbra, kontrol, 0-tünetmentes, 1-kissé fogékony, 2-közepesen fogékony, 3-fogékony, 4-erősen fogékony)

### 3.3.11 A kórokozó azonosítása molekuláris módszerekkel

A molekuláris vizsgálatok közül a baktériumok identifikálására és taxonómiai vizsgálatok kivitelezésére a legelterjedtebb módszer a 16S rRNS-t kódoló gén bázissorrendjének meghatározása szekvencia analízissel. Magyarországon az *E. amylovora* megjelenése szilván meghatározó jelentőségű, új eredmény, ezért fontosnak tartottuk ennek az izolátumnak az azonosítását és a szekvencia meghatározását a 16S rRNS gén vizsgálattal.

Míg a többi saját izolátum és a Génbankból származó izolátumok esetében a pEA29 plazmid molekuláris vizsgálatát végeztük el, mely a nukleotid ismétlődésekből álló régiók számát határozza meg. Az SSR méret szerinti tesztek segítenek a baktérium fajon belüli különbségek és azonosságok kimutatásában.

#### 3.3.11.1 A 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata

##### *PCR paraméterei*

A PCR-hez használt indító szekvenciák:

1389r (reverse)

63f (forward)

### A PCR elegy összetétele 50 µl végtérfogatra:

2 µl baktérium szuszpenzió ( $5 \times 10^7$  sejt/ml)

35,5 µl steril H<sub>2</sub>O

1 µl primer 63f (20 pmol/µl)

1 µl primer 1389r (20 pmol/µl)

3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)

5 µl 10x Taq puffer (+ KCl – MgCl<sub>2</sub>)

0,5 µl Taq polimeráz enzim (5 u/µl)

2 µl 5 mM dNTPs

A reakció paramétereit:

1. 94 °C-on 3 perc kezdő denaturálás (1 alkalommal)

2. 94 °C-on 15 másodperc denaturálás (a két komplementer DNS szál szétválása)

3. 55 °C-on 0,5 perc anellálás (a primerként szolgáló oligonukleotid kapcsolódása)

4. 72 °C-on 1,5 perc elongáció (lánc hosszabbítás)

5. 94 °C-on 0,5 perc denaturálás

A reakció (2.-4.) 35 cikluson át ismétlődik, majd egy záró szintézis következik 72 °C-on 10 percig.

### ***Gélelektroforézis***

A PCR terméket GelRed-del (Biotium) festett 1%-os agaróz gélben, vízszintes mini elektroforézis készülékben választottuk el, 140 V-tal, TBE pufferben [1x TBE (12,11 g Tris, 5,135 g bórsav, 0,372 g EDTA 1000 ml desztillált vízben)]. A nukleinsav frakciókat áteső ultraibolya fényben (254 nm) értékeltük és fényképeztük (UVP, BioDoc- It<sup>TM</sup> System).

### ***A PCR-termék tisztítása***

A PCR terméket a High Pure PCR Product Purification Kit-tel (Roche) a gyártó utasításait követve tisztítottuk meg.

### ***Ligálás***

A tisztított PCR-terméket pGEM-T Easy vektorba ligáltuk, melyet kifejezetten PCR-termékekhez fejlesztettek ki.

A ligáláshoz a következőket mértük össze 10 µl végtérfogatra:

5 µl steril H<sub>2</sub>O

1 µl plazmid (pGEM-T Easy)

1 µl puffer (T4 DNS ligáz 10x-es puffere)

1 µl enzim (T4 DNS ligáz enzim, 5 u/µl)

2 µl inzert (tisztított PCR-termék)

Ezt 6 órán át szobahőmérsékleten ligáltuk.

### ***Transzformálás E. coli DH 5α törzsébe***

A -70 °C-on tárolt kompetens sejtet jégen kiolvastottuk, a ligátumot szintén jégre tettük. A már felolvadt kompetens sejtet hozzámértük a ligátumhoz, 30 percig hagytuk jégen állni, majd egy percig 42 °C-on tartottuk, hogy kinyíljanak az *E. coli* baktérium pórusai és a plazmid bejuthasson. Ezután azonnal jégre tettük és öt percig jégen tartottuk. Ezt követően hozzámértünk 500 µl antibiotikum-mentes 2TY folyékony táptalajt, és ezzel összeforgattuk. Egy órán át 37 °C-on rázattuk. Ezalatt ampicillin tartalmú LB szilárd táptalajra 10 µl IPTG-t és 40 µl X-Gal-t (Fermentas) szélesztettünk, és megvártuk, míg megszárad. A rázatás után az előkészített táptalajra 100 µl, ill. 50 µl-t kientünk a már felszaporodott baktérium tenyészetből. Száradás után a lemezeket egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk.

### ***Minipreparátum készítése***

Hat egyedi fehér kolóniából 2-2 ml folyadékkultúrába (ampicillines LB) inokuláltunk, és 37 °C-on éjszaka rázattuk. A baktériumkultúrát 3 percig centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, és a pellethez hozzáadtunk 200 µl „A” oldatot (15 mM TRIS HCl pH: 8, 10 mM EDTA, 50 mM glükóz), Vortex segítségével összekevertük, majd öt percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Aztán hozzámértünk 400 µl „B” oldatot (0,2 M NaOH, 1% SDS), összeforgattuk, majd 300 µl „C” oldatot (60 ml 5 M Na-acetát, 11,5 ml ecetsav, 28,5 ml steril H<sub>2</sub>O) és ezzel is

összeforgattuk, öt percre jégre helyeztük, azután öt percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A felülúszót új Eppendorf csőbe töltöttük, így öt percig centrifugáltuk, majd a felülúszót ismét új Eppendorf csőbe töltöttük, és hozzáadtunk 600 µl izopropanolt, ezzel összeforgattuk, és öt percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten. Elöntöttük a felülúszót, lecsöpögtettük, és a pellettez hozzáadtunk 200 µl „D” oldatot (0,1 M Na-acetát pH: 7, 0,05 M TRIS HCl pH: 8), ezt hagytuk szobahőmérsékleten állni 10 percig, majd Vortex segítségével kevertük, végül 400 µl etanollal öt percig centrifugáltuk, a felülúszót elöntöttük, és a pelletet beszárítottuk 30 perc alatt. Utolsó lépésként a pelletet visszaoldottuk 100 µl RNase TE-ben (1 ml 10x TE, 9 ml steril H<sub>2</sub>O, 10 µl RNase (10 mg/ml)) (Maniatis és mtsai., 1989).

### ***Az inzert ellenőrzése***

A Minipreparátum módszerrel tisztított rekombináns klónok plazmidjaiból *EcoRI* enzimmal ellenőriztük a PCR-termék beépülését. Az *EcoRI* enzim jól használható erre a célra, hiszen a beépülés helye mellett mindkét oldalon megtalálható ez a specifikus hasítóhely.

A hasításhoz az alábbiakat mértük össze, egyenként 10 µl végtérfogatra:

2 µl plazmid (0,5 µg)

1 µl 10x *EcoRI* puffer

0,2 µl *EcoRI* enzim (10 u/µl)

6,8 µl H<sub>2</sub>O

Az Eppendorf csöveket 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk.

A mintákat 1% agaróz gélben elektroforetizáltuk, és ellenőriztük, a megfelelő hosszúságú inzert kivágódását.

### ***Plazmid tisztítás szekvenáláshoz***

A kiválasztott klónt 2 ml folyadékkultúrában (ampicillines LB) újra felszaporítottuk (37 °C, egész éjszakán át történő rázatás). A baktériumkultúrával töltött Eppendorf csövet 3 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten, majd Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit-tel (Bio-Rad) a gyártó utasításai szerint tisztítottuk.



### ***A nukleinsav szekvencia meghatározása és analízise***

Szekvencia meghatározásra a tisztított rekombináns plazmidot M13 reverse és M13 forward primerekkel szekvenáltattuk Szegeden, a BayGen Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetben, ahol a szekvencia meghatározást végezték.

A szekvenciák összehasonlításához az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázist használtuk fel. A filogenetikai törzsfá elkészítéséhez és a szekvenciák összehasonlításához a CLC SEQUENCE Viewer 6.5.1. szekvencia analizáló programcsomagot használtunk. Az adatbankból a következő hivatkozási számokon található *E. amylovora* izolátumok 16S rDNS szekvenciáit hasonlítottuk össze az általunk meghatározott *E. amylovora* izolátumával: af289542, af141892, aj46201, am980507, ay456710, fn434113, fn666575, fj594363, aj010485, x83265, fj611856, nr041970, ab546196, z96088, fj594366.

### **3.3.11.2 A pEA29 plazmid molekuláris vizsgálata**

#### ***PCR paraméterei***

A PCR-hez használt indító szekvenciák:

pEA29A (reverse)

pEA29B (forward)

A PCR elegy összetétele 50 µl végtérfogatra:

35,5 µl steril H<sub>2</sub>O

2 µl baktérium szuszpenzió ( $5 \times 10^7$  sejt/ml)

5 µl 10x *Taq* puffer

3 µl MgCl<sub>2</sub> (20 mM)

2 µl dNTPs (nukleotidok: A, G, C, T; 5mM)

1 µl primer pEA29A (20 pmol/µl)

1 µl primer pEA29B (20 pmol/µl)

0,5 µl *Taq* polimeráz enzim (5 u/µl)

A reakció paramétereit:

1. 94 °C-on 3 perc kezdő denaturálás (1 alkalommal)
2. 94 °C-on 30 másodperc denaturálás (a két komplementer DNS szál szétválása)
3. 45 °C-on 15 másodperc anellálás (a primerként szolgáló oligonukleotid kapcsolódása)
4. 72 °C-on 1,5 perc elongáció (lánc hosszabbítás)
5. 94 °C-on 0,5 perc denaturálás

A reakció (2.-4.) 35 cikluson át ismétlődik, majd egy záró szintézis következik 72 °C-on 10 percig.

### ***Gélelektroforézis***

A PCR terméket GelRed-del (Biotium) festett 1% -os agaróz gélben, vízszintes mini elektroforézis készülékben választottuk el, 140 V-tal, TBE pufferben [1x TBE (12,11 g Tris; 5,135 g bórsav; 0,372 g EDTA 1000 ml desztillált vízben)]. A nukleinsav frakciókat áteső ultraibolya fényben értékeltük és fényképeztük (UVP, BioDoc- It<sup>TM</sup> System).

### ***A PCR-termék tisztítása***

A PCR terméket a High Pure PCR Product Purification Kit-tel (Roche) a gyártó utasításait követve tisztítottuk meg.

### ***A szekvencia meghatározása és analízise***

A tisztított PCR termékeket Szegedre, a BayGen Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetbe küldtünk a szekvencia meghatározására. A szekvenciák összeillesztéséhez a CLC SEQUENCE Viewer 6.5.1. szekvencia analízáló programcsomagot használtuk.

### **3.3.12 Az eredmények statisztikai értékelése**

A statisztikai értékeléshez az izolátumok tenyészbélyegeinek jellemzései, biokémiai tulajdonságai, bakteriofág érzékenységeinek vizsgálatai, különböző körtefajtákon kialakult virulenciái alapján hierarchikus cluster-analízist végeztünk az SPSS PASW Statistic 18.0 programcsomag segítségével. Az eredményeket dendrogramon ábráztuk.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 A kórokozó azonosítása különböző gazdanövényekről klasszikus módszerekkel

#### 4.1.1 Az *E. amylovora* okozta tünetek

A barnuló, elfeketedő pásztorbatszerűen meggörbülő hajtásokat különböző gazdanövényekről (alma, körte, birs, kerti díszalma, galagonya, szilva) szedtük 2009-2011 között. A tünetek tipikusan *E. amylovora* jelenlétére utaltak (19. ábra, 20. ábra). A szilva fajtát *Prunus domestica* d'Agen fajtaként azonosítottuk.



19. ábra: A tűzelhalás tünetei szilvahajtáson  
(Fotó: Végh, 2011)



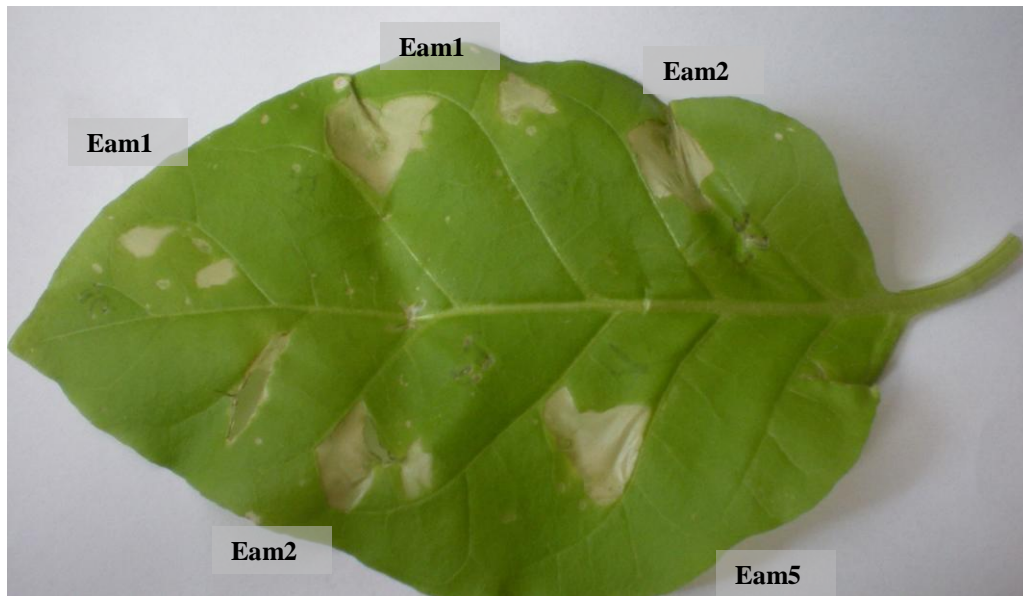
20. ábra: A tűzelhalás tünetei körtehajtásokon  
(Fotó: Végh, 2011)

#### 4.1.2 A Gram-féle tulajdonság

A 3%-os kálium-hidroxid feloldotta a baktérium sejtfalát, így az általunk a különböző gazdanövényekről származó izolátumok Gram-negatívak voltak.

### 4.1.3 Hiperszenzitív reakció vizsgálata

Az izolátumok  $5 \times 10^7$  sejt/ml töménységű szuszpenziójával inokulált dohány növények levelein 24-48 óra elteltével kialakult a hiperszenzitív reakciót jelző gyors szöveti nekrozis (**21. ábra**).



**21. ábra:** Ea izolátumok hiperszenzitív reakciója dohánynövény levelén  
(Fotó: Végh, 2010)

### 4.1.4 Patogenitási teszt

Az általam különböző gazdanövényekről izolált *E. amylovora* izolátumokra elvégeztük a patogenitási tesztet. Ellenőriztük, hogy kialakul-e a betegségre jellemző tünet. Kísérletünkben éretlen körtegyümölcsöket fertőztünk. A szilváról származó izolátum során még szilvaterméseket és hajtásokat is inokuláltunk. A baktérium szuszpenzióval inokulált tesztnövények különböző mértékben fertőződtek. Megállapítottuk, hogy a körtegyümölcsök, szilvatermések és a szilvahajtások 5-14 nap elteltével intenzíven reagáltak, kialakultak a betegségre jellemző tünetek. A mesterséges visszafertőzés sikeres volt.

A körtéken az inokuláció helyén diffúz, besüppedő konzisztenciájú nekrotikus foltok jelentek meg (**22. ábra**) az összes izolátum esetében. A szilvatermések esetén a fertőzési pont körül besüppedő, barnuló, rothadó nagyméretű foltokat figyeltünk meg nyálkacseppekkel, míg a

hajtások fertőzése során a hajtásvégek barnultak, elfeketedtek, majd pásztorbótszerűen elgörbültek (23., 24., 25. ábra).



**22. ábra:** Eam2 izolátummal inokulált körtegyümölcs  
(Fotó: Végh, 2010)



**23. ábra:** Ea-PlumBo1 izolátummal mesterségesen visszafertőzött szilvahajtások  
(Fotó: Végh, 2011)



**24. ábra:** EaPlumBo-1 izolátummal mesterségesen visszafertőzött szilvatermések  
(Fotó: Végh, 2012)

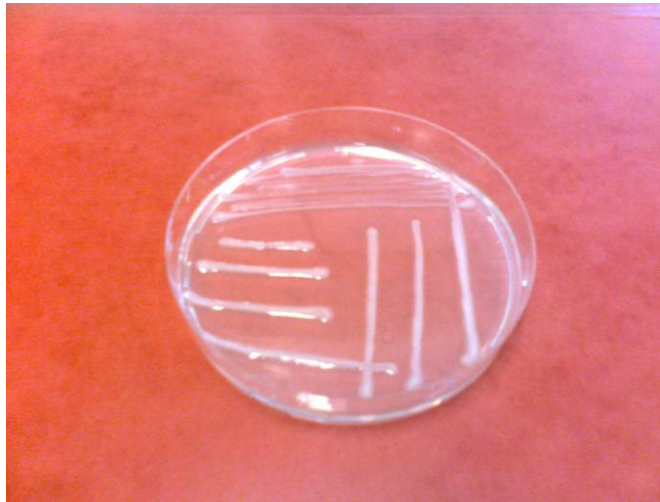


**25. ábra:** Ea-PlumBo1 izolátummal mesterségesen visszafertőzött szilvatermés baktérium nyálkacseppekkel  
(Fotó: Végh, 2012)

## 4.2 Az izolátumok morfológiai jellemzői különböző táptalajokon

Az izolátumokat különböző táptalajokon tenyésztettük. Az általános és szelektív táptalajokon képződött kolóniákat jellemeztük és az izolátumok kolóniáit hasonlítottuk össze és ezek alapján csoportosítottuk őket.

Az izolátumok tenyészbélyegei King-B táptalajon nem mutattak különbségeket. Az *E. amylovora* baktérium King-B táptalajon könnyen tenyészthető, fenntartható, mert gyorsan fejlődik. A kórokozó tenyészete az általános King-B táptalajon krémszínű, ép szélű, sima felületű, tejszerű és mukoid (**26. ábra**).



**26. ábra:** Eam1 izolátum 2 napos tenyészete King-B táptalajon  
(Fotó: Végh, 2011)

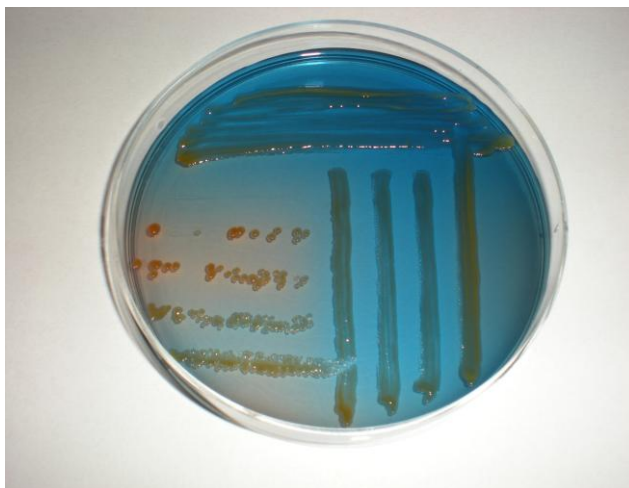
Miller-Schroth táptalajon minden *Erwinia* faj képes növekedni. Az *E. amylovora* tenyészete narancssárga színű, áttetsző udvarral. A tenyészet folyós állagú, a kolóniák felülete sima, ép szélű (**27. ábra**). Ezen a táptalajon az izolátumok szintén nem különíthetők el egymástól, nem alkotnak csoportokat.





**27. ábra:** Ea1 izolátum 2 napos tenyésztete Miller-Schroth táptalajon  
(Fotó: Végh, 2010)

A Kado-Heskett táptalaj kimondottan *Erwinia* fajokra szelektív. A táptalajon piros-narancssárga színű kolóniákat képez, melynek intenzitása függ a fajtól. A reakcióidő 48 h, majd a kolóniák színe egységesen narancssárga színűvé válik. A kolóniák szintén folyós állagúak, felületük sima, szélük ép (**28. ábra**). A Kado-Heskett táptalajon az izolátumok szintén nem különíthetők el egymástól.



**28. ábra:** Ea60 izolátum 2 napos tenyésztete Kado-Heskett táptalajon  
(Fotó: Végh, 2009)

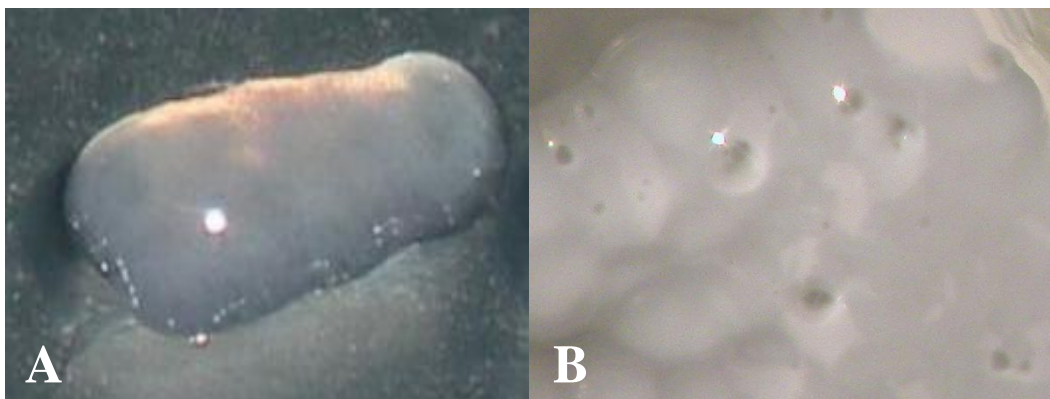


A Crosse-Goodman táptalaj kifejezetten *E amylovora*-ra szelektív. A kórokozó tenyésztete kiemelkedő, ép szélű, szürkés, áttetsző színű (29. ábra).



29. ábra: Ea67 izolátum 2 napos tenyésztete Crosse-Goodman táptalajon (Fotó: Végh, 2009)

Növekedése során a kolóniák felületén jellegzetes kráterek alakulnak ki. Ez a táptalaj a kórokozóra szelektív, ezért fontosnak tartottuk az izolátumok összehasonlítását. Az eredmények alapján az izolátumok két csoportra voltak bonthatóak, mégpedig a kolóniák felülete alapján, ahol az egyik csoportnál a kolóniák felülete sima, míg a másik csoport esetében az izolátumok kolóniáin kráterek jelentek meg (30. ábra). Eredményeink alapján csoportosítottuk az izolátumokat (4. táblázat).

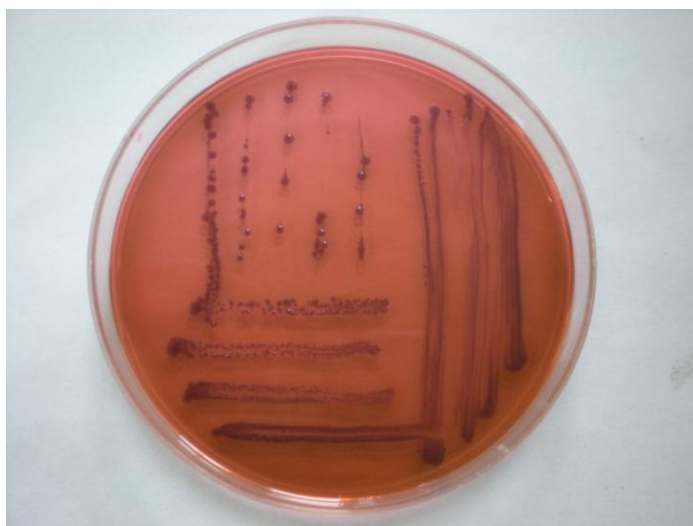


30. ábra: Ea1 (A) és az Ea-PlumBo1 (B) izolátumok tenyésztetei Crosse-Goodman táptalajon (Fotó: Végh, 2009)

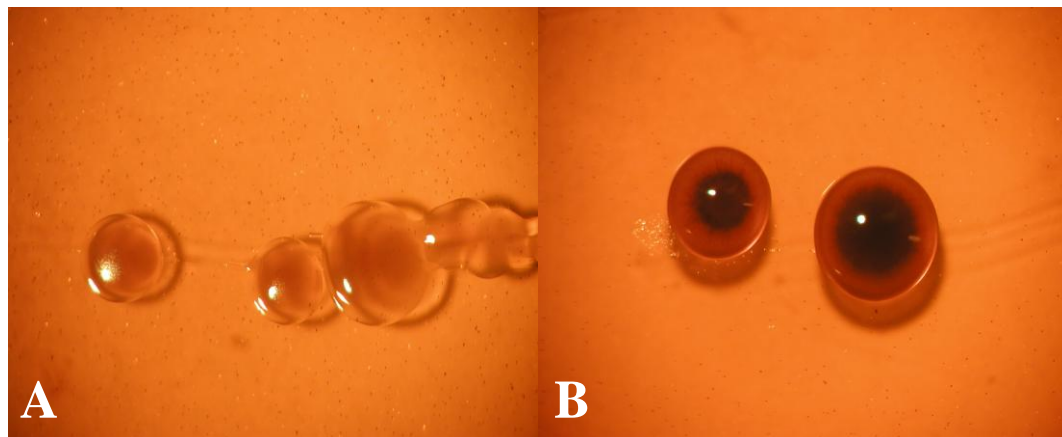
**4. táblázat:** *E. amylovora* izolátumok csoportosítása a Crosse-Goodman táptalajon kialakult különböző kolóniák alapján

<i>E. amylovora</i> izolátumok csoportosítása	
A kolónia sima felületű	A kolónia kráteres
Ea1, Ea6, Ea10, Ea12, Ea15, Ea16, Ea19, Ea22, Ea26, Ea29, Ea31, Ea47, Ea50, Ea70, Ea80, Ea88, Ea96, Ea329/98, Eam4, Eam5, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9, Eam10	Ea60, Ea67, Ea95, Eam1, Eam2, Ea-PlumBo1

Az EMB táptalajon a baktérium tenyésztete kiemelkedő, sima felületű, ép szélű (**31. ábra**). A laktózt, szacharózt bontó és nem bontó baktériumok között tesz különbséget, melyet szintén fontosnak tartottunk az izolátumok összehasonlításánál. Ezeket bontó baktériumok világos, áttetsző szélű, fekete közepű kolóniát képeznek, míg a laktózt, szacharózt nem bontóak szintelenek (**32. ábra**). A kolóniák alapján elmondható, hogy az izolátumok jól elkülöníthetőek egymástól, melyek között van, amely erőteljesen bontja a laktózt, szacharózt, de vannak olyanok is melyek nem. Eredményeink alapján csoportosítottuk az izolátumokat (**5. táblázat**).



**31. ábra:** Ea31 izolátum tenyésztete EMB táptalajon  
(Fotó: Végh, 2010)



**32. ábra:** Ea-PlumBo1 (A) és az Ea1 (B) izolátumok kolóniái EMB táptalajon  
(Fotó: Végh, 2009)

**5. táblázat:** *E. amylovora* izolátumok csoportosítása az EMB táptalajon kialakult különböző kolóniák alapján

<i>E. amylovora</i> izolátumok csoportosítása	
A kolóniák színtelenek	A kolóniák világos, áttetsző szélűek, feketés középpel
Ea10, Ea19, Ea22, Ea26, Ea31, Ea47, Ea67, Ea70, Ea95, Eam1, Ea-PlumBo1	Ea1, Ea6, Ea12, Ea15, Ea16, Ea29, Ea50, Ea60, Ea80, Ea88, Ea96, Ea329/98, Eam2, Eam4, Eam5, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9, Eam10

Eredményeinket összegezve, az izolátumok között az általános táptalajokon nem tudunk különbségeket tenni, míg a szelektív táptalajok esetében igen. Az izolátumokat a Crosse-Goodman és az EMB agaron képződött kolóniák alapján 4 csoportba soroljuk, melyeket a statisztikai adatok is alátámasztanak (**2., 3. melléklet**). Az Eam1, Ea-PlumBo1, Ea67 és az Ea95 izolátumok a CG táptalajon kráteres felületűek és az EMB agaron színtelen kolóniát képeztek. Tehát a kráteres kolóniákat képző izolátumok rokonságot mutatnak az EMB agaron színtelen kolóniákat képző izolátumokkal. Az Ea47, Ea70, Ea10, Ea26, Ea31, Ea19, Ea22 izolátumok a CG táptalajon sima felületűek, az EMB agaron pedig szintén színtelen kolóniát képeztek. Ebben

az esetben a CG táptalajon sima felületű kolóniát képző izolátumok szintén rokonságot mutatnak az EMB agaron szintelen kolóniákat képző izolátumokkal. Az Ea60 és az Eam2 izolátumok a CG táptalajon kráteres felületűek, míg az EMB agaron a kolóniák színe világos, áttetsző feketés középpel, melyek a különböző táptalajokon kialakult kolóniák csoportosítása miatt hasonlóak. Az izolátumok többsége (Eam9, Eam10, Ea1, Eam7, Eam8, Eam5, Eam6, Ea329/98, Eam4, Ea88, Ea96, Ea50, Ea80, Ea16, Ea29, Ea12, Ea15, Ea6) a CG táptalajon sima felületű kolóniát, míg az EMB agaron pedig világos, áttetsző szélű, fekete közepű kolóniát képzett. A CG táptalajon kráteres kolóniát képző izolátumok, feltételezhetően rokonságban vannak az EMB agaron kialakult sötét közepű kolóniát képző *E. amylovora* izolátumokkal. A különböző gazdanövényekről származó izolátumok eltérő eredményeket adtak a tenyészbélyegek alapján, bár a *Cotoneaster* fajokról származó izolátumok egy csoportba tartoztak (Ea12, Ea15, Ea16, Ea29), mely feltételezhető, hogy a genetikai tulajdonságok alapján is egy törzset alkotnak. A hazai és a külföldi izolátumok is az eredmények alapján eltérő eredményeket adtak. Az Ea47 (USA), az Eam1 (Románia) teljesen különálló csoportba, míg az Ea329/98 (Ausztria), az Ea96 (Ukrajna), az Eam9 (Szerbia) és az Eam10 (Szerbia) pedig egy csoportba tartoztak. A külföldi izolátumok többsége a tenyészbélyegek alapján azonos tulajdonságokkal rendelkezik, azonos csoportba sorolhatóak a különböző táptalajokon, míg a magyar izolátumok eltérőek.

### **4.3 Az izolátumok biokémiai jellemzői**

#### **4.3.1 API 20E kit eredményei**

Az API20E kit az *Enterobacteriaceae* családba tartozó fajok meghatározására szolgál, ezért ezt a tesztet csak a saját, növényből izolált *E. amylovora* izolátumokra végeztük el, ezzel is megerősítve, hogy az áltunk izolált kórokozó nagy valószínűséggel *E. amylovora*. Az általunk vizsgált izolátumok (Eam1, Eam2, Eam4, Eam5, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9, Eam10, Ea-PlumBo1) pozitív reakciókat adtak a  $\beta$ -galaktozidáz, citrát hasznosításra, acetoin termelésre valamint glükóz, mannit, szorbit, szacharóz, melibióz, arabinóz vizsgálatokban. Negatív eredményt kaptunk az arginin-dihidroláz, lizin-dekarboxiláz, ornitin-dekarboxiláz, H<sub>2</sub>S termelés, ureáz, triptofán-deamináz, indol termelés, zselatináz, inozit, rhamnóz, amygdalin vizsgálatokban (**33. ábra**).



+ - - - + - - - - + - + + - + - + + - +

**33. ábra:** Az API20E kit 24 órás teszt eredménye Ea-PlumBo1 izolátum esetében  
(Fotó: Végh, 2011)

**6. táblázat:** Az API20E kit 24 órás teszt eredményei a vizsgált *E. amylovora* izolátumok esetében

|                  |                           |   |     |           |   |
|------------------|---------------------------|---|-----|-----------|---|
| ONPG             | β-galaktozidáz            | + | GEL | Gelatináz | - |
| ADH              | arginin-dihidroláz        | - | GLU | Glükóz    | + |
| LDC              | Lizin DeCarboxiláz        | - | MAN | Mannit    | + |
| ODC              | Ornitin DeCarboxiláz      | - | INO | Inozit    | - |
| CIT              | Citrát hasznosítás        | + | SOR | Sorbit    | + |
| H <sub>2</sub> S | H <sub>2</sub> S termelés | - | RHA | Rhamnóz   | - |
| URE              | UREáz                     | - | SAC | Sacharóz  | + |
| TDA              | Triptofán DeAmináz        | - | MEL | Melibióz  | + |
| IND              | INDol termelés            | - | AMY | Amygdalin | - |
| VP               | Acetoin termelés          | + | ARA | Arabinóz  | + |

### 4.3.2 API 50CH kit eredményei

A nektár jelentős, meghatározó cukor komponensei (fruktóz, glükóz, szacharóz) mellett csak néhány adat létezik az irodalomban más kevésbé gyakori szénhidrátok hatásairól az *E. amylovora* szaporodásánál. Ezek mellett más cukrok hatásairól, mint a maltóz, melobióz és raffinóz, melyek előfordulnak számos *Rosaceae* családba tartozó növényfaj nektárjaiban, nem áll adat rendelkezésünkre (Percival, 1961). A nektár oldható cukor komponenseket tartalmazó oldat, amely elősegíti a baktériumok szaporodását. Fontos megjegyezni, hogy a növények virágaiban, a nektár összetétele és koncentrációja eltérő, különböző környezeti körülményektől függően változik, főként a csapadék mennyisége és a levegő relatív páratartalma befolyásolja.

Hevesi és mtsai. (2004<sup>a</sup>) kísérletükben „mű nektárt” vizsgáltak, ahol meghatározták az *Erwinia amylovora* szaporodásához szükséges optimális szénhidrát koncentrációt, valamint az

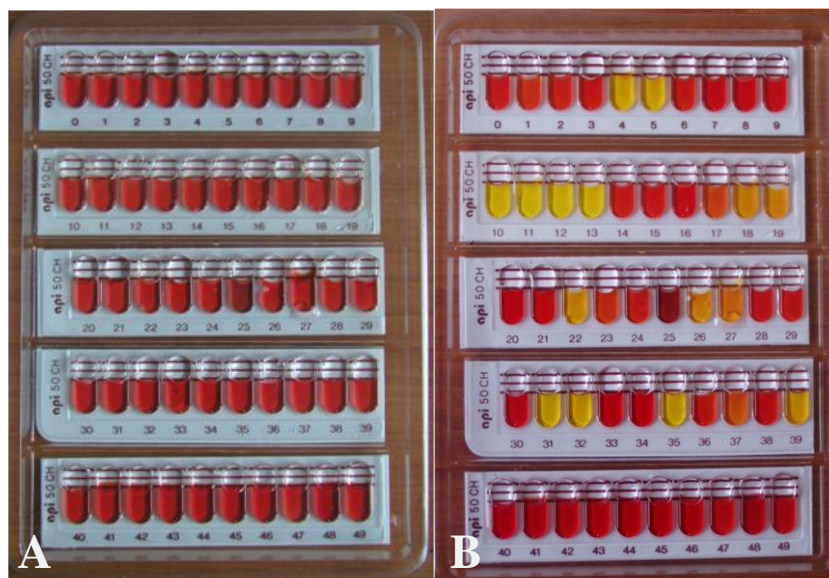
Ea1 izolátum esetében a jelentős szénhidrát komponensek (fruktóz, glükóz, szacharóz) mellett a kevésbé jelentősek hasznosítását is. Az *E. amylovora* esetében a szénhidrátok fermentációjához (savképződés) kis koncentrációjú oldat elegendő (1-0,1% között), míg a magas koncentráció gátolja növekedését (20-30%). Az optimális tartomány 1% körül volt **(Hevesi és mtsai., 2004<sup>a</sup>)**.

Az oldható cukrok (főként a glükóz, a szacharóz és a fruktóz) központi szerepet játszanak a növények szerkezetében és metabolikus folyamataiban mind a sejt, mind a teljes felépítés szintjén. Több szabályozás és lebontó folyamat kapcsolódik az oldható cukrokhoz a reaktív oxigén gyökök termelődése kapcsán, mint pl. a fotoszintézis szabályozás, a mitokondriális légzés. Különböző stresszhatások (amelyekbe az oldható cukrok is bekapcsolódnak) kapcsolatban vannak a reaktív oxigén gyökök egyensúlyának változásával. Az oldható szénhidrátok fontos helyet foglalnak el az antioxidáns egyensúlyban, mivel az összetartó vagy éppen antagonisták kapcsolatok igazoltak az oldható cukrok, a reaktív oxigén gyökök és az antioxidáns folyamatok között **(Couée és mtsai., 2006)**. Különböző stresszhelyzetekre a növény oldható szénhidrátok felhalmozódásával reagál **(Roitsch, 1999)**.

Mind a fogékony és mind a rezisztens növényben a fertőzés hatására kialakuló válaszreakciók összefüggésbe hozhatóak a szénhidrátok mennyiségével. A növénysejtek és baktériumsejtek kapcsolatában a baktériumsejt extracelluláris poliszacharid burka (EPS) meghatározó tényező, amelyet bizonyítottan befolyásol a szénhidrátok mennyiségi és minőségi összetétele. A különböző gazda-parazita kapcsolatban az egyes cukrok mennyisége és minősége is jellemző változáson megy keresztül **(Sárdi és mtsai., 1996, 1999; Végvári és mtsai., 2000)**. **Suleman és Steiner (1994)** szerint a növényi szövetekben a megnövekedett szorbitol koncentráció negatív hatással van az *E. amylovora* szaporodására, viszont **Duffy és mtsai. (2008)** szerint a szorbitol egyáltalán nem befolyásolja a rezisztenciát.

Vizsgálatainkban meghatároztuk az *Erwinia amylovora* által hasznosított szénhidrátokat, melyhez API 50 CH kitet használtunk. A kit a biokémiai tulajdonságok meghatározására, a baktériumfajok jellemzésére szolgál. Az API50CH kit jellegzetessége, hogyha az adott baktérium az adott szénhidrátot hasznosítja, akkor színreakció megy vége: az eredeti piros színű oldat sárgára változik át **(34. ábra)**, a zselatin esetében feketére. A kit a baktériumok 49féle szénhidrát hasznosítását vizsgálja, mely alkalmas az izolátumok összehasonlítására.





**34. ábra:** Ea 10 izolátum szénhidrát hasznosítása különböző időpontokban (A: 0 óra; B: 48 óra) (0-kontroll, 1-49 különböző szénhidrátok; szénhidrát hasznosítás színreakciót eredményez) (Fotó: Végh, 2009)

Az összes izolátum a 49 különböző szénhidrátból 11 félért hasznosított és 27-et egyáltalán nem a reakcióidő (48 h) végére (**7. táblázat**). Az összes izolátum esetében hasznosított 11 szénhidrát között szerepeltek az *E. amylovora* szaporodásánál igen fontos és meghatározó komponensek: glükóz, fruktóz, szaharóz és szorbitol.

**7. táblázat:** *Erwinia amylovora* izolátumok által „hasznosított” és „nem hasznosított” szénhidrátok

| „Nem hasznosított” |                              |         |                  |
|--------------------|------------------------------|---------|------------------|
| Sorszám            |                              | Sorszám |                  |
| 2                  | Erythritol                   | 34      | Melesitose       |
| 3                  | D Arabinose                  | 36      | Starch           |
| 7                  | L Xylose                     | 37      | Glycogen         |
| 8                  | Adonitol                     | 38      | Xylitol          |
| 9                  | $\beta$ -Methyl-D-Xyloside   | 40      | D Turanose       |
| 14                 | Sorbose                      | 41      | D Lyxose         |
| 15                 | Rhamnose                     | 42      | D Tagatose       |
| 16                 | Dulcitol                     | 44      | L Fucose         |
| 20                 | $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside | 45      | D Arabitol       |
| 21                 | $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside | 46      | L Arabitol       |
| 25                 | Esculin                      | 47      | Gluconate        |
| 28                 | Maltose                      | 48      | 2-Keto-Gluconate |
| 29                 | Lactose                      | 49      | 5-Keto-Gluconate |
| 33                 | Inulin                       |         |                  |

7. táblázat folytatása

| „Hasznosított” |             |         |                       |
|----------------|-------------|---------|-----------------------|
| Sorszám        |             | Sorszám |                       |
| 4              | L-Arabinose | 19      | Sorbitol              |
| 5              | Ribose      | 22      | N-Acetyl- Glycosamyne |
| 10             | Galactose   | 31      | Sucrose               |
| 11             | Glucose     | 32      | Trehalose             |
| 12             | Fructose    | 39      | Gentobiose            |
| 18             | Mannitol    |         |                       |

Ezen felül 11 szénhidrátot (glycerol, D-xylose, mannose, inositol, amygdalin, arbutin, salicin, cellobiose, melobiose, raffinose, D-fucose) pedig az izolátumok eltérően hasznosítottak, különbségeket ezek alapján tudunk tenni. Az Eam9, az Ea88, az Ea12, az Ea96 és az Ea15 izolátumok a legtöbb (20 féle), míg az Ea95, az Ea6, az Ea22 és az Ea19 izolátumok pedig a legkevesebb (11 féle) szénhidrátot képesek hasznosítani ezekből (**4. melléklet**). A legtöbb szénhidrátot hasznosító izolátumok közül mindegyik hasznosította a D-xylose-t, az inositol-t, amygdalin-t, salicin-t és a cellobios-t (**8. táblázat**). Az izolátumok a legnagyobb számban (18-20 izolátum) a D-xylos-t, az inositol-t, amygdalin-t és a cellobios-t hasznosították, míg legkevesebb számban (8-10 izolátum) a D-fucos-t, az arbutin-t, a raffinose-t és a glycerol-t. Az izolátumokat kisebb csoportokra tudtuk bontani. Az Ea12, Ea15, Ea16, Ea26, Ea31 izolátumok egy csoportba tartoznak, melyek érdekessége, hogy 1997 és 1998-ban izolált törzsek, eltérő gazdanövényről és helyről származtak, bár az Ea12, Ea15 és az Ea16 mindegyike *Cotoneaster* sp. növényekről származott. Az Eam2, Eam4, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9 izolátumok szintén egy csoportot alkotnak, melyek 2010 és 2011-es évből és különböző gazdanövényekről származnak. Feltételezhetően ezek külön törzseket alkotnak.

Mind a hazai és mind a külföldi izolátumok eltérően hasznosították a szénhidrátokat. Kísérletünkben meghatároztuk az *E. amylovora* szaporodásánál kevésbé jelentős szénhidrátok hatását. A vizsgálatok alapján, az izolátumok (melyek különböző évekből, különböző földrajzi helyről és gazdanövényről származtak, illetve akár hazai, akár külföldi származásúak) eltérő eredményeket adtak.



**8. táblázat:** Az *Erwinia amylovora* izolátumok csoportosítása 11 különböző szénhidrát hasznosítás alapján

| Szénhidrátok | <i>E. amylovora</i> izolátumok  |
|--------------|---|
| Glycerol     | Ea1, Ea10, Ea12, Ea15, Ea16, Ea26, Ea29, Ea31, Ea67, Ea96, Ea329/98   |
| D-Xylose     | Ea1, Ea12, Ea15, Ea16, Ea26, Ea31, Ea47, Ea50, Ea60, Ea67, Ea80, Ea88, Ea96, Eam2, Eam4, Eam6, Eam8, Eam9, Eam10, EaPlumBo1 |
| Mannose      | Ea1, Ea10, Ea12, Ea15, Ea16, Ea26, Ea29, Ea31, Ea60, Ea67, Ea88, Ea329/98, Eam8, Eam9, Eam10, EaPlumBo1                     |
| Inositol     | Ea1, Ea12, Ea15, Ea16, Ea26, Ea31, Ea47, Ea60, Ea67, Ea88, Ea96, Ea329/98, Eam1, Eam2, Eam5, Eam7, Eam8, Eam9, EaPlumBo1    |
| Amygdalin    | Ea12, Ea15, Ea16, Ea26, Ea31, Ea60, Ea67, Ea70, Ea80, Ea88, Eam1, Eam2, Eam4, Eam5, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9                  |
| Arbutin      | Ea60, Ea67, Ea70, Ea88, Ea96, Eam2, Eam5, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9,   |
| Salicin      | Ea12, Ea15, Ea60, Ea88, Ea96, Eam2, Eam4, Eam5, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9, Eam10, EaPlumBo1                                    |
| Cellobiose   | Ea1, Ea10, Ea12, Ea15, Ea31, Ea60, Ea88, Ea96, Ea329/98, Eam2, Eam4, Eam5, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9, Eam10, EaPlumBo1         |
| Melobiose    | Ea1, Ea10, Ea12, Ea15, Ea16, Ea26, Ea31, Ea47, Ea60, Ea67, Ea80, Ea88, Ea96, Eam2, Eam6, Eam9, Eam10                        |
| Raffinose    | Ea10, Ea29, Ea31, Eam2, Eam4, Eam5, Eam6, Eam7, Eam9, EaPlumBo1   |
| D-Fucose     | Ea12, Ea26, Ea80, Ea88, Ea47, Ea95, Eam1, Eam4  |

#### 4.4 Az izolátumok bakteriofág érzékenységének vizsgálata

Bakteriofágok alkalmasak a baktérium törzsek/izolátumok közötti biológiai különbségek kimutatására. Munkánk során vizsgáltuk az összes *Erwinia amylovora* izolátum bakteriofág érzékenységét 4 különböző bakteriofággal szemben. A fágok közül azt tekintjük a leghatékonyabbnak, amelyik a legtöbb tesztbaktérium rétegén teljesen tiszta plakkot képez, tehát a vizsgálati területen az összes baktérium sejtet képes lizálni. Eredményeink értékelése során, az inkubációs idő elteltével kialakult plakkokat vettük figyelembe. Az izolátumok a fágokkal tiszta vagy homályos plakk típusokat képeztek vagy egyáltalán nem képeztek plakkot.

| BAKTERIOFÁGOK |          |   |      |          |      |       |          |   |      |          |      |
|---------------|----------|---|------|----------|------|-------|----------|---|------|----------|------|
| H1A           |          |   | H4B  |          |      | H5A   |          |   | H8   |          |      |
| a             | b        | c | a    | b        | c    | a     | b        | c | a    | b        | c    |
| Ea10          | Ea1      |   | Ea15 | Ea1      | Ea67 | Ea10  | Ea1      |   | Ea29 | Ea1      | Ea67 |
| Ea12          | Ea6      |   | Ea26 | Ea6      |      | Ea15  | Ea6      |   | Ea31 | Ea6      |      |
| Ea15          | Ea19     |   | Ea31 | Ea10     |      | Ea16  | Ea12     |   | Ea50 | Ea10     |      |
| Ea16          | Ea26     |   | Ea60 | Ea12     |      | Ea19  | Ea26     |   | Ea60 | Ea12     |      |
| Ea22          | Ea29     |   | Ea70 | Ea16     |      | Ea22  | Ea29     |   | Ea70 | Ea15     |      |
| Ea67          | Ea31     |   | Ea96 | Ea19     |      | Ea47  | Ea31     |   | Ea88 | Ea16     |      |
| Ea70          | Ea47     |   | Eam2 | Ea22     |      | Ea50  | Ea60     |   | Ea96 | Ea19     |      |
| Ea80          | Ea50     |   | Eam4 | Ea29     |      | Ea67  | Ea70     |   |      | Ea22     |      |
| Ea95          | Ea60     |   |      | Ea47     |      | Ea80  | Ea329/98 |   |      | Ea26     |      |
| Ea96          | Ea88     |   |      | Ea50     |      | Ea88  | Eam1     |   |      | Ea47     |      |
| Eam6          | Ea329/98 |   |      | Ea80     |      | Ea95  | Eam2     |   |      | Ea80     |      |
| Eam8          | Eam1     |   |      | Ea88     |      | Ea96  | Eam4     |   |      | Ea95     |      |
| Eam10         | Eam2     |   |      | Ea95     |      | Eam6  | Eam5     |   |      | Ea329/98 |      |
|               | Eam4     |   |      | Ea329/98 |      | Eam8  | Eam7     |   |      | Eam1     |      |
|               | Eam5     |   |      | Eam1     |      | Eam10 | Eam9     |   |      | Eam2     |      |
|               | Eam7     |   |      | Eam5     |      |       | EamPlum  |   |      | Eam4     |      |
|               | Eam9     |   |      | Eam6     |      |       |          |   |      | Eam5     |      |
|               | EamPlum  |   |      | Eam7     |      |       |          |   |      | Eam6     |      |
|               |          |   |      | Eam8     |      |       |          |   |      | Eam7     |      |
|               |          |   |      | Eam9     |      |       |          |   |      | Eam8     |      |
|               |          |   |      | Eam10    |      |       |          |   |      | Eam9     |      |
|               |          |   |      | EamPlum  |      |       |          |   |      | Eam10    |      |
|               |          |   |      |          |      |       |          |   |      | EamPlum  |      |

**9. táblázat:** *E. amylovora* izolátumok csoportosítása négy különböző bakteriofággal szembeni érzékenység alapján (a-tiszta plakk, b- homályos plakk, c- nincs plakk)  
[A különböző színek azonos tulajdonsággal rendelkező csoportokat jelölnek]

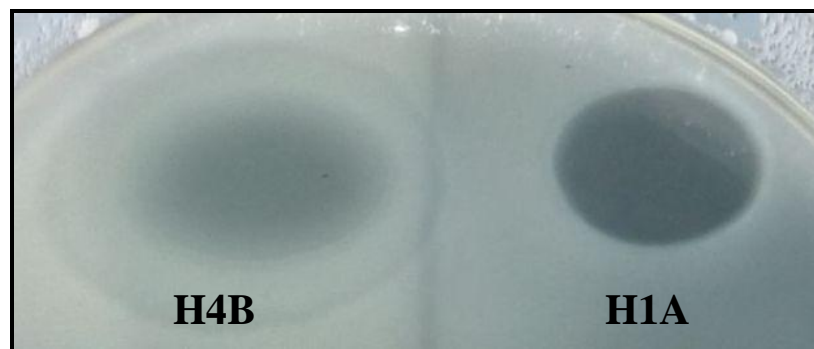
A H1A bakteriofág tiszta plakkot képzett az Ea10, Ea12, Ea15, Ea16, Ea22, Ea67, Ea70, Ea80, Ea95. Eam6, Eam8, Eam10 *E. amylovora* izolátumokon. Csak kevésbé lizálta az Ea1, Ea6, Ea19, Ea26, Ea29, Ea31, Ea47, Ea50, Ea60, Ea88, Ea329/98, Eam1, Eam2, Eam4, Eam5, Eam7, Eam9, EamPlum izolátumokat.

A H4B fág lizálta az Ea15, Ea26, Ea31, Ea60, Ea70, Ea96, Eam2 és Eam4 izolátumokat, viszont homályos plakkot képzett az izolátumok nagy részével (Ea1, Ea6, Ea10, Ea12, Ea16, Ea19, Ea22, Ea29, Ea47, Ea50, Ea80, Ea88, Ea95, Ea329/98, Eam1, Eam5, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9, Eam10, EamPlum). Nem észleltünk semmilyen elváltozást az Ea67 izolátum esetében (35. ábra).

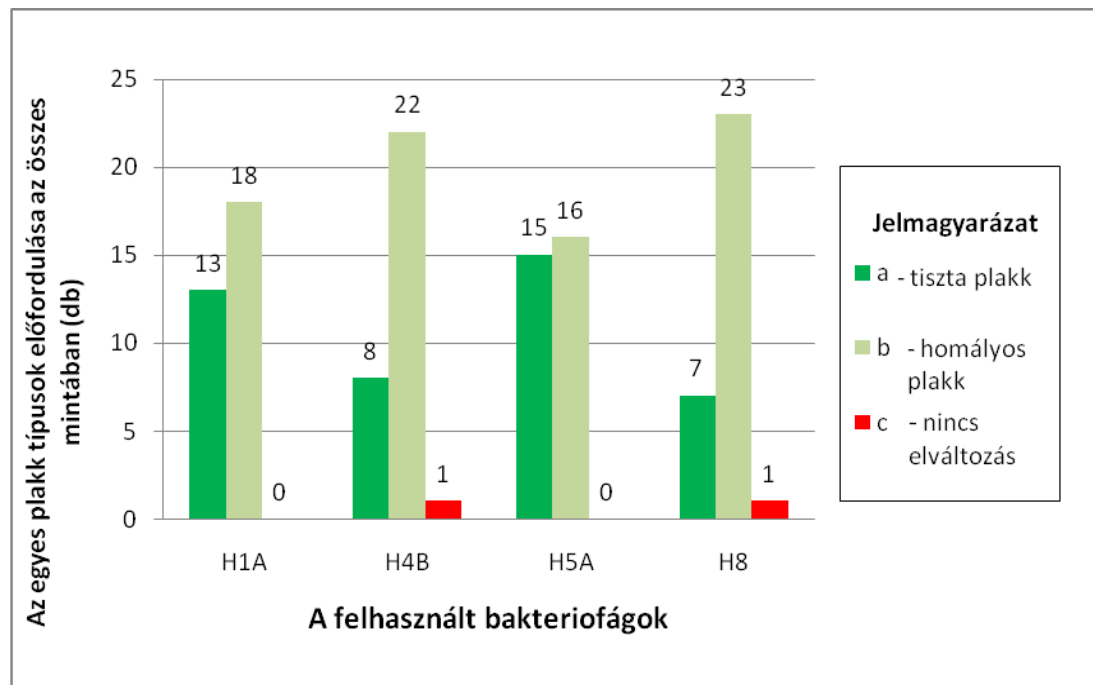
A H5A fág volt képes lizálni a legtöbb izolátumot (Ea10, Ea15, Ea16, Ea19, Ea22, Ea47, Ea50, Ea67, Ea80, Ea88, Ea95, Ea96, Eam6, Eam8, Eam10). Homályos plakkot képzett az Ea1, Ea6, Ea12, Ea26, Ea29, Ea31, Ea60, Ea70, Ea329/98, Eam1, Eam2, Eam4, Eam5, Eam7, Eam9, EamPlum izolátumokon.

A H8 bakteriofág lizálta a legkevesebb izolátumot: Ea29, Ea31, Ea50, Ea60, Ea70, Ea88, Ea96. Ugyanakkor ezek között az izolátumok között volt olyan, amelyet csak ez a bakteriofág volt képes lizálni (Ea29). Homályos plakkot képzett az Ea1, Ea6, Ea10, Ea12, Ea16, Ea19, Ea22, Ea29, Ea47, Ea50, Ea80, Ea88, Ea95, Ea329/98, Eam1, Eam5, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9, Eam10, EamPlum izolátumokon (9. táblázat).

Az izolátumok a fágokkal különböző érzékenységet mutattak, attól függően, hogy tiszta, homályos plakktípusokat képeztek vagy egyáltalán nem képeztek plakkokat. Az egyes fágokkal ugyanazon csoportba tartozó izolátumok egyazon lizotípus csoportba tartoznak.



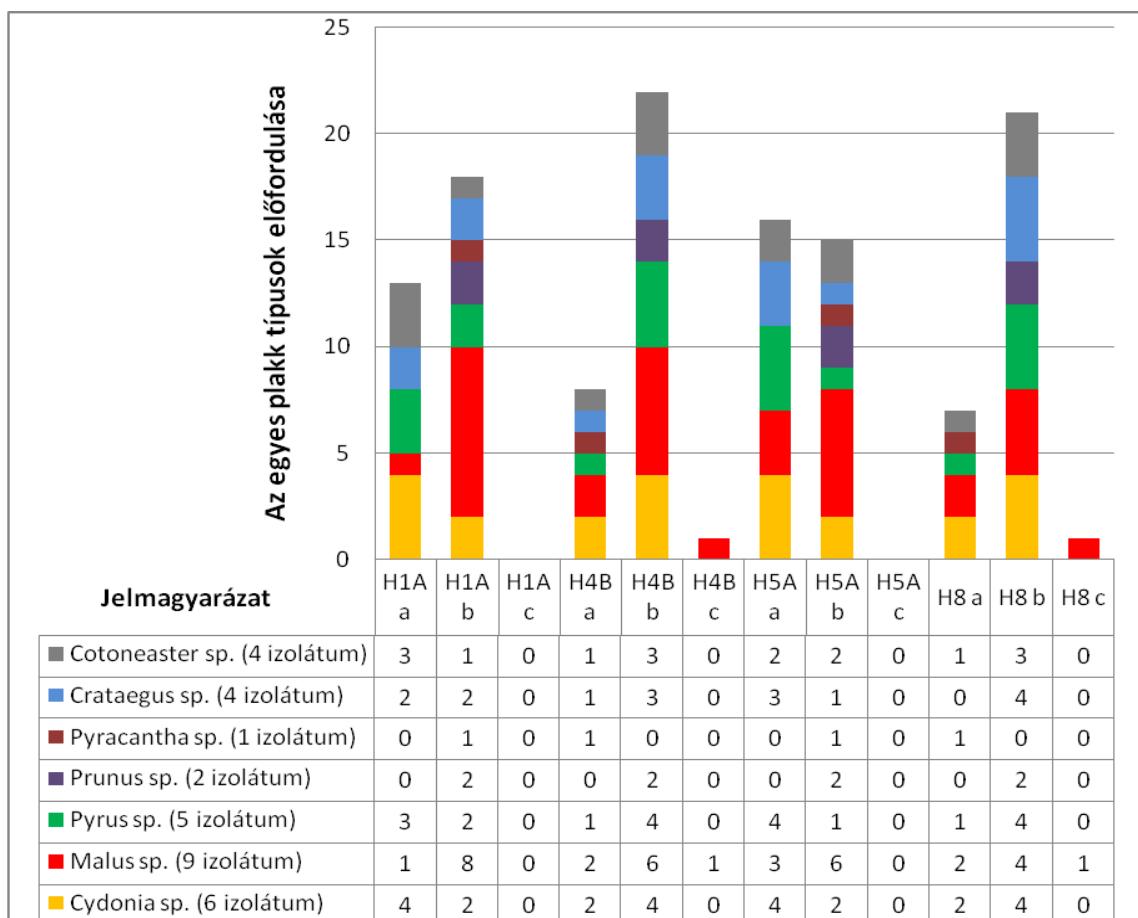
35. ábra: Az Ea10 izolátum bakteriofág érzékenysége a H1A (tiszta plakk) és H4B (homályos plakk) fágokkal (Fotó: Végh, 2012)



36. ábra: A bakteriofágok hatása az *Erwinia amylovora* izolátumokra

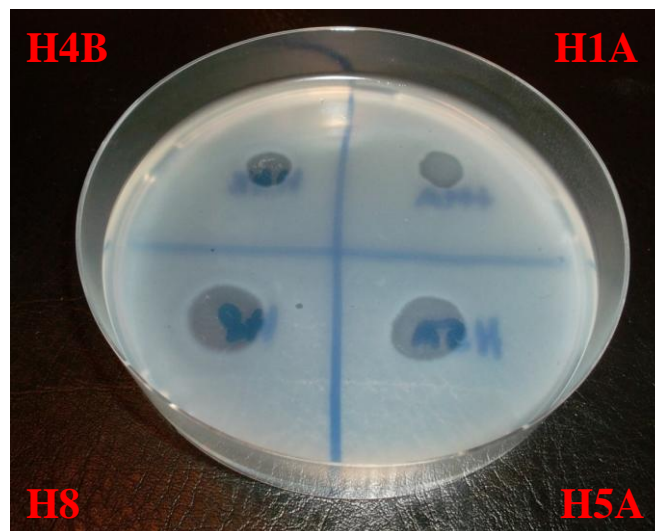
Az eredmények alapján több esetben kaptunk zavaros plakkot, mint tisztát (**36. ábra**). Az összes izolátumot tekintve, nem vonható le olyan általános következtetés, hogy a fágok azonos mértékben lizálták őket, hiszen eltérő mértékben képeztek tiszta és zavaros plakkokat, melyet a statisztikai eredmények is alátámasztanak, hiszen különböző csoportokat alkotnak. Míg a H5A fág majdnem fele-fele arányban bizonyult 'a' vagy 'b' típusúnak, a H8 fág 31 izolátumból csak 7-tel képezett tiszta plakkot. A fágok közül a H1A és H5A bizonyultak a leghatásosabbnak, több esetben voltak képesek tiszta plakkot képezni (13-15 izolátummal), mint a H4B és a H8 fágok (8-7 izolátummal).

A kialakult eredményeket megvizsgáltuk olyan szempontból is, hogy csoportosítottuk az izolátumokat gazdanövény alapján.



**37. ábra:** A vizsgált bakteriofágok hatása az *E. amylovora* izolátumokra gazdanövényenként elkülönítve

A megrajzolt grafikonról leolvashatjuk (37. ábra), hogy melyik gazdanövénynél mennyire voltak hatásosak a különböző fágok. Mindenképpen figyelembe kell vennünk, hogy az egyes gazdanövényekről származó *E. amylovora* izolátumok száma eltérő. Ha a grafikon mellett figyelembe vesszük a kísérlet adatairól szóló táblázatot (5. melléklet) a következő következtetéseket vonhatjuk le. A legérzékenyebbnek a fágokkal szemben az Ea96 izolátum (38. ábra) bizonyult, melynek mintáin mind a négy vizsgált fág tiszta plakkot adott. Ez az *E. amylovora* izolátum birs növényről származik, mint ahogyan a fágok közül is három (H1A, H4B, H5A) birsről lett izolálva. A szintén birsről származó Ea70 izolátum három fággal képzett tiszta plakkot. Ugyanakkor nem vonhatjuk le azt a következtetést, hogy csak azonos gazdanövényről izolált baktérium törzsek és fágok képesek reagálni, hiszen szintén érzékenynek bizonyult a három birsről izolált fágra az Ea15-ös minta, amely *Cotoneaster* növényről származik.

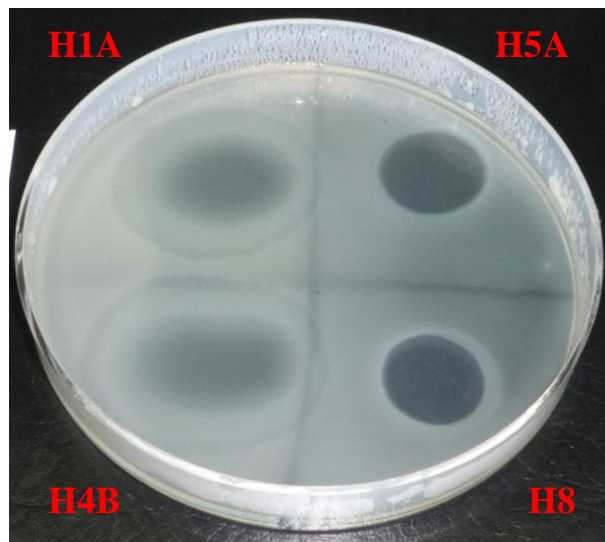


**38. ábra:** Az Ea96 izolátum reakciója a négy különböző bakteriofággal  
(Fotó: Végh, 2012)

A legérzékenyebbnek a fágokkal szemben az Ea96-os izolátum bizonyult, melyen mind a négy tesztelt fág tiszta plakkot képzett. Két izolátum volt, amely három fágtól is tiszta plakkot (Ea15 a H1A, H4B és H5A fágokkal; Ea70 a H1A, H4B és H8 fágokkal) képzett. Hat izolátum volt, amely három fágtól is homályos, zavaros plakkot (Eam2, Eam4, Ea26, Ea29, Ea12, Ea47) adott. Az esetek nagy többségében (13 izolátum: Ea10, Ea16, Ea22, Ea31, Ea50, Ea60, Ea67, Ea80, Ea88 (39. ábra), Ea95, Eam6, Eam8, Eam10) az izolátumok két fággal szemben is

érzékenyek voltak és tiszta plakkot mutattak. Nyolc izolátum volt, amelyeknél zavaros plakkot adott mind a négy bakteriofág (Ea1, Ea6, Ea329/98, Eam1, Eam5, Eam7, Eam9, EaPlumBo1). A legkevésbé fogékony vizsgált *Erwinia* törzs az Ea 67-es, amelyen csak a H1A és a H5A fág tudott tiszta plakkot képezni, míg a másik két fággal szemben rezisztensnek bizonyultak/ a másik két fág (H4B, H8) egyáltalán nem lizálta e törzset a felső, baktériumot tartalmazó agar rétegen (**6. melléklet**).

A hazai izolátumok a különböző fágokkal eltérően viselkedtek, ugyanúgy mint a külföldről származó izolátumok. A vizsgált *Erwinia* izolátumok között külön csoportot képvisel az Ukrajnában izolált Ea96-os izolátum, amely a vizsgált baktérium izolátumok közül egyedülállóan az összes fággal szemben fogékonyak bizonyult. Az USA-ból származó Ea47 csak a H5A-ra volt fogékony, a másik 3 fág csak homályos plakkot képezett e baktérium rétegen. A vizsgálatba bevont ausztriai (Ea329/98), romániai (Eam1) és szerbiai (Eam9) izolátumok mindannyian egy csoportba tartoznak, mivel mind a négy fág zavaros plakkot képezett rajtuk.



**39. ábra:** Az Ea88 izolátum reakciója a négy különböző fággal  
(Fotó: Végh, 2011)

Legkevésbé fogékonyak az Ea1; Ea6; Ea329/98; Eam1; Eam5; Eam7, Eam9 és EaPlumBo1 törzsek bizonyultak. Érdekességként említhető, hogy az Eam7 és EaPlumBo1 törzsek *Prunus* fajokról lettek izolálva. Így megállapíthatjuk, hogy vizsgálatainkban egyik *Prunus* fajról származó izolátum sem volt érzékeny a felhasznált fágokra. A *Malus* fajokról nyert izolátumok meglepően kevésbé voltak érzékenyek az almáról származó fág izolátumra. A

9 *Malus*-ról származó izolátumból csak 2 adott tiszta plakkot a H8 fággal reagáltatva (Ea88 és Ea60). Olyan fág nem volt, ami egyik izolátummal sem lizált volna tiszta plakkot.

A vizsgált négy fág közül a leghatékonyabbnak a H5A fág bizonyult, amely a legtöbb Ea törzset képes volt teljesen lizálni, és legtöbbjükön - még a legellenállóbb Ea 67-es törzsön is - szép, tiszta plakkot képzett (Ea10, Ea15, Ea16, Ea19, Ea22, Ea47, Ea50, Ea67, Ea80, Ea88, Ea95, Ea96, Eam6, Eam8, Eam10). Az Ea67-es törzs volt az egyetlen, amely egyáltalán nem reagált a fágok jelenlétére a H4B és H8 fágok esetében.

A bakteriofágok felhasználásának kettős szerepe lehet. A különböző *E. amylovora* izolátumok bakteriofágokkal szembeni érzékenysége két aspektusból lehet fontos. Egyrészt kiválaszthatjuk a vizsgált fágok közül azt, amely a legtöbb tesztbaktériumot teljesen képes volt lizálni, tehát az adott baktérium tenyészetén tiszta plakkot képzett. Az ilyen, lítikus fág perspektivikus lehet biológiai védekezés szempontjából, felhasználhatjuk őket a betegség elleni védekezésben. Másrészt segítségükkel tipizálhatjuk az egyes *E. amylovora* izolátumokat, mivel egy adott baktérium törzs, vagy izolátum, különböző fágokkal szembeni érzékenysége jellemző az adott baktérium törzsre, vagy izolátumra. Az orvostudományban a fágok ezen tulajdonságát régóta használják baktérium törzsek azonosítására, szelektálására, ezt nevezik fágtypizálásnak.

#### **4.5 Az izolátumok virulenciájának értékelése éretlen körtefajták gyümölcsein**

Kísérletünk során meghatároztuk a különböző *E. amylovora* izolátumok virulenciáját. Az izolátumok virulenciájának tesztelésekor laboratóriumi körülmények között imitáltuk a természetben előforduló külső sérüléseken át történő gyümölcsfertőződést (**40. ábra**). A virulenciára a fertőzést követő 4. napon, a gyümölcsökön az inokuláció helyén kialakult diffúz, vízzel átitatott foltok méretéből következtettünk (**41. ábra, 7. melléklet**). A fajtákat fogékonyság alapján 5 fertőzési fokozatba soroltuk: 0-tünetmentes, 1-kissé fogékony, 2-közepesen fogékony, 3-fogékony, 4-erősen fogékony (**10. táblázat**).



**40. ábra** Különböző *Erwinia amylovora* izolátumokkal inokulált körte gyümölcsök a fertőzés után közvetlenül  
(Fotó: Végh, 2010)



**41. ábra:** Körte gyümölcsök négy nappal az inokulálás után  
(Fotó: Végh, 2010)



**10. táblázat:** Éretlen gyümölcsök értékelése

| <b>Fertőzési index</b> | <b>Nekrotikus foltok átmérője<br/>(mm)</b> |
|------------------------|--|
| 0                      | tünetmentes gyümölcs                       |
| 1                      | 0-5 mm                                     |
| 2                      | 6-10 mm                                    |
| 3                      | 11-20 mm                                   |
| 4                      | 21-30 vagy > 30 mm                         |

Az izolátumok virulenciájának vizsgálatakor a különböző körtefajtákon kialakult tünetek alapján, megállapíthatjuk, hogy a fajták eltérően viselkedtek. A 'Téli esperes', a 'Drouard elnök' igen erősen fogékonyak, az 'Eldorado', 'Serres Olivér', és a 'Diel vajkörte' közepesen, míg az 'Alexander Lucas' és a 'Stössel tábornok' csak kevésbé fogékonyak bizonyult a tūzelhalással szemben **(8., 9. melléklet)**.

A 'Téli esperes' és a 'Drouard elnök' fajták erősen fogékonyak a kórokozóra, az izolátumok nagy többsége (mindkét fajta esetében 19 izolátum) erősen virulensnek bizonyult. A 'Téli esperes' 8 izolátummal (Ea1, Ea6, Ea19, Ea47, Ea67, Ea95, Eam8, Eam9) erősen fogékony, míg csak 4 izolátummal (Ea50, Ea329/98, Eam7, EaPlumBo1) volt kissé fogékony. A 'Drouard elnök' pedig 6 izolátummal (Ea1, Ea10, Ea19, Ea29, Eam8, Eam9) erősen fogékony, míg 8 izolátummal (Ea26, Ea50, Ea96, Eam1, Eam6, Eam7, Eam10, EaPlumBo1) kissé fogékony volt. A fogékony fajták esetében az Ea1, Ea19, Eam8 és Eam9 izolátumok erősen virulensek, míg az Ea50, az Eam7 és EaPlumBo1 izolátumok pedig kevésbé virulensek.

Az 'Eldorado', 'Serres Olivér', és 'Diel vajkörte' közepesen fogékonyak a kórokozóra. Az izolátumok több mint 50%-a rendelkezik nagyobb megbetegítő képességgel a fajtákra. Az 'Eldorado' fajta 5 izolátummal (Ea1, Ea19, Ea22, Ea67, Eam8) fogékony, 13 izolátummal közepesen fogékony, míg 12 izolátummal (Ea10, Ea12, Ea16, Ea31, Ea60, Eam2, Eam4, Eam5, Eam7, Eam9, Eam10, EaPlumBo1) kissé fogékony volt. Az 'Eldorado' fajta esetén megállapítható, hogy 18 izolátum erősen virulens volt rajta, valamint az Ea50 izolátum nem volt virulens. A 'Serres Olivér' körtefajta csak 3 izolátummal szemben fogékony (Ea1, Ea29, Ea31), 15 izolátummal közepesen fogékony és 13 izolátummal kissé fogékony volt (Ea12, Ea15, Ea22,

Ea50, Ea80, Ea88, Ea95, Ea96, Ea329/98, Eam1, Eam7, Eam10, EaPlumBo1). Az 'Serres Olivér' fajta esetén megállapítható, hogy 18 izolátum szintén erősen virulens volt ebben a kapcsolatban. A 'Diel vajkörte' az előző két fajtához képest fogékonyabb, de erős fogékonytságot mutató tüneteket egyik izolátum sem okozott. A 'Diel vajkörte' 10 izolátummal fogékonynak (Ea1, Ea10, Ea15, Ea22, Ea47, Ea67, Ea88, Eam4, Eam5, Eam9), 14 izolátummal közepesen fogékonynak, míg 7 izolátummal (Ea12, Ea19, Ea31, Ea95, Ea329/98, Eam1, Eam8) bizonyult csak kissé fogékonynak. A 'Diel vajkörte' esetén megállapítható, hogy 24 izolátum erősen virulens volt. A közepesen fogékony fajták esetében az Ea1 izolátum erősen virulens, míg az Ea12 izolátum kevésbé virulens. Mindhárom fajta esetében az Ea95 és az Eam8 izolátumok eltérő eredményeket adtak, eltérő virulenciával rendelkeztek.

Az 'Alexander Lucas' és a 'Stössel tábornok' csak kevésbé fogékonyak, mivel az izolátumok kb. 75%-a kevésbé virulens. Az 'Alexander Lucas' fajta esetében csak 8 izolátummal közepesen (Ea1, Ea6, Ea16, Ea29, Ea31, Ea67, Ea95, Eam9), míg 21 izolátummal kissé fogékony. A 'Stössel tábornok' pedig 6 izolátummal közepesen (Ea1, Ea47, Ea50, Ea60, Ea95, Eam9) és 25 izolátummal kissé fogékony. Mindkét fajta esetében az Ea95 és az Eam9 izolátum virulens volt.

Vizsgálataink szerint a körtéfajták az egyes izolátumokkal szemben eltérően viselkedtek, így nem volt megállapítható, hogy mely izolátumok rendelkeznek nagyobb megbetegítő képességgel, pl. az Ea 10, 19 és 29 izolátumok igen erős tüneteket okoztak a 'Drouard elnök' fajtán a többi izolátummal összehasonlítva, ugyanakkor más körtéfajtákon nem ezek az izolátumok okozták a legsúlyosabb elváltozásokat. Az Ea 50 izolátum csak az 'Eldorado' fajtánál nem volt virulens. Korábbi vizsgálatokban **Honty (2011)** ugyanilyen eredményeket kapott az 'Eldorado' fajta esetében. Összességében van néhány izolátum amelyek mindegyik fajta esetében erősen virulensek (Ea1, Ea67) és kevésbé virulensek (Eam7, Eam10, EaPlumBo1) voltak.

A nagyobb virulenciával rendelkező izolátumok többsége nem a körtéről, hanem almáról, birsről származtak, míg kisebb virulenciával rendelkező izolátumok a *Prunus* fajokról származtak. A körtéről származó izolátumok (Ea10, Ea26, Ea50, Ea80, Eam10) az 'Alexander Lucas', 'Stössel tábornok', a 'Serres Olivér' és az 'Eldorado' fajták esetében kis virulenciával, míg a 'Diel vajkörte', a 'Drouard elnök' és a 'Téli esperes' fajták esetén nagyobb virulenciával rendelkeztek. A vizsgált hazai és külföldi izolátumok is eltérően viselkedtek, mert különböző tünetek okoztak a körtéfajtákon. A hazai izolátumok nagyobb megbetegítő képességgel

rendelkeztek, mint a külföldről származóak. A 'Serres Olivér', az 'Alexander Lucas', az 'Eldorado' és a 'Stössel tábornok' fajták mindegyik külföldi izolátummal kevésbé fogékonyak. A 'Diel vajkörte', a 'Drouard elnök' és a 'Téli esperes' fajták az Ea96, az Ea329/98, az Eam1 és az Eam10 izolátumokra szintén kevésbé fogékonyak, míg az Ea47 és az Eam9 izolátumokra pedig erősen fogékonyak.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a különböző gazdanövényről származó izolátumok eltérően viselkedtek a különböző körtefajtákkal, ezért fontosnak tartjuk, hogy a fajták fogékonyságának vizsgálatánál ne egy izolátumot, hanem törzskeveréket használjunk. Fontos szempont még, hogy a fertőzési kísérletek (gyümölcs) előtt az izolátumok virulenciájának tesztelésekor melyik körtefajtán végezzük el a tesztelést.

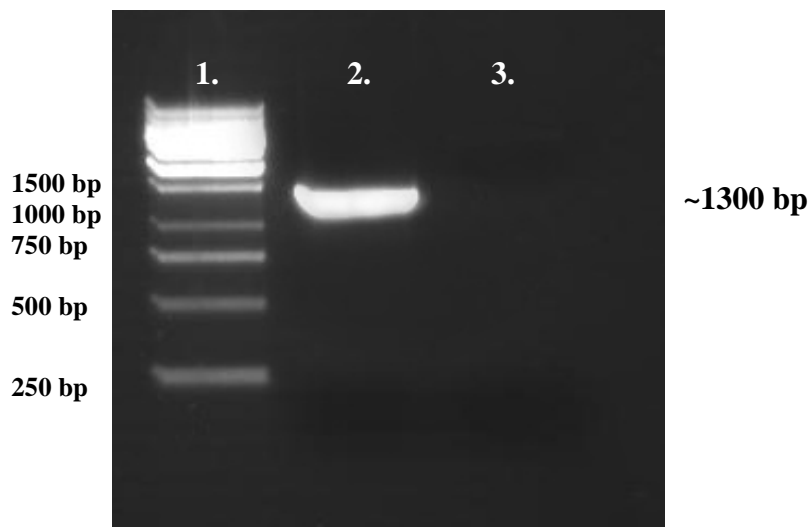
Az ellenállóság megítéléséhez elsősorban a virág rezisztenciáját tartjuk elsődlegesnek, de szükségesnek tartjuk, hogy ezek az adatok kiegészüljenek a hajtás- és gyümölcsfertőzés vizsgálatok eredményeivel is, hogy hozzásegítsenek a minél sikeresebb jövőbeli nemesítési programokhoz.

## 4.6 Az izolátumok molekuláris vizsgálata

### 4.6.1 Az Ea-PlumBo1, szilváról származó izolátum 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata

#### PCR vizsgálat

A reakció eredményeként kb. 1300 bp hosszúságú PCR-termék keletkezett (**42. ábra**).



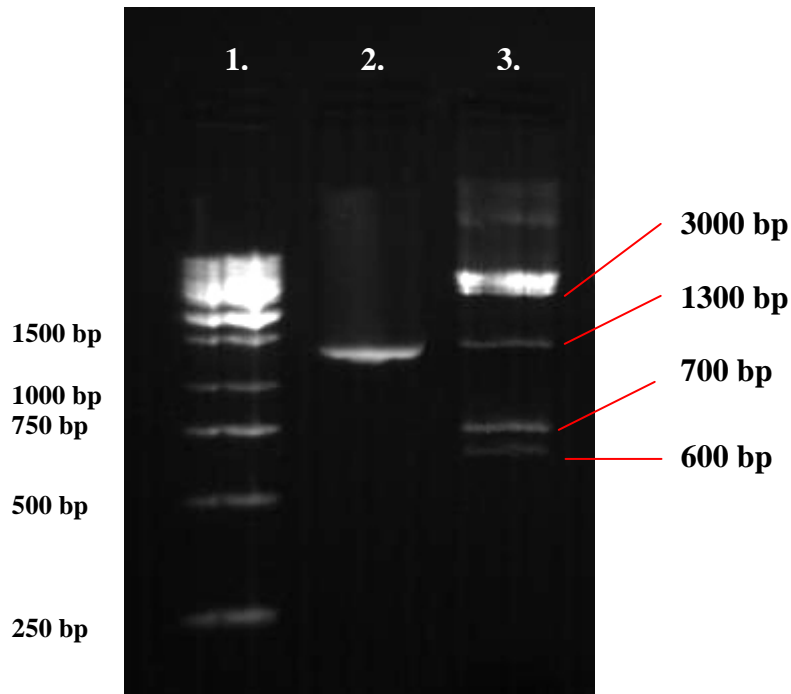
**42. ábra:** Szilváról származó izolátum (EaPlumBo1) PCR analízise  
Jelmagyarázat: 1. 1 kB méretmarker, 2. PCR termék, 3. negatív kontroll

#### Minipreparátum

A hat minipreparátum mindegyikénél a plazmid tartalmazta a kívánt hosszúságú PCR terméket. Az 5-ös számú klónt választottuk ki, és szaporítottuk fel a szekvencia meghatározásához.

#### Tisztított, *EcoRI* enzimmel hasított plazmid

Az *EcoRI* enzimmel hasított rekombináns plazmidból különböző hosszúságú részlegesen vágott, ill. egy 600 bp és egy 700 bp hosszúságú teljesen hasított inzertek vágódtak ki (**43. ábra**). A szekvencia analízis megerősítette két *EcoRI* restrikciós enzim hasítóhely jelenlétét a bakteriális szekvenciárészben.



**43. ábra:** Ea-PlumBo1 izolátum hasított plazmidja

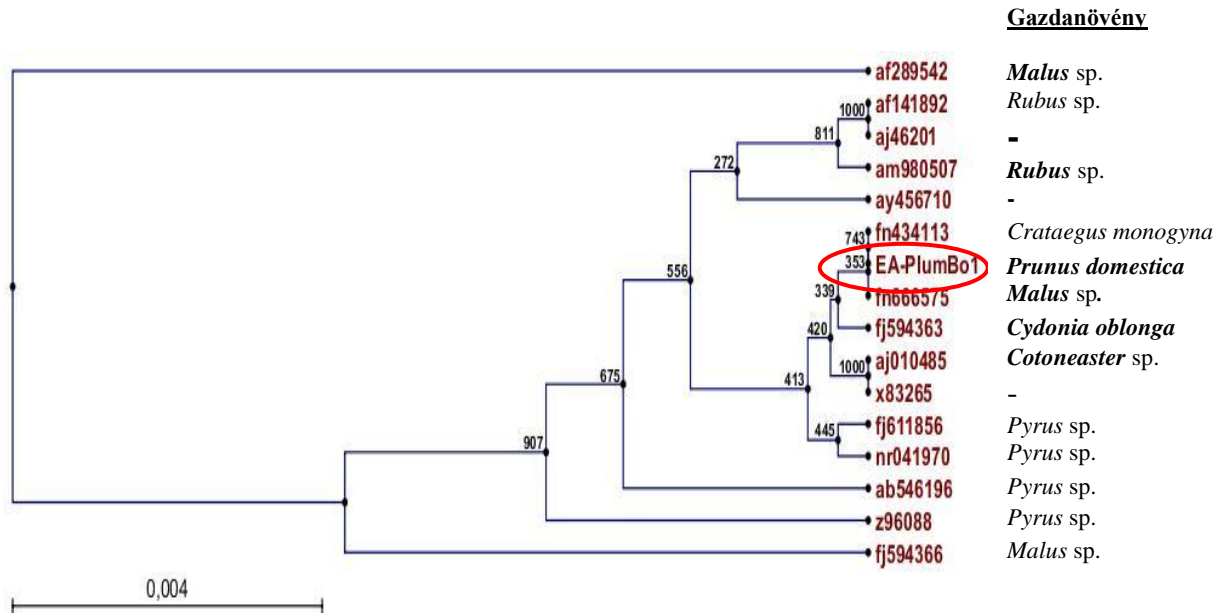
Jelmagyarázat: 1. 1 kb méretmarker, 2. PCR termék, 3. *EcoRI* enzimmel vágott rekombináns plazmid, a specifikus hasítási termékeket jelöltük, méretük feltüntetésével, a többi részlegesen vágott hasítási termék

#### Rokonsági kapcsolatok feltárása

A magyar izolátum (Ea-PlumBo1) részlegesen meghatározott 16S rDNS nukleotid szekvenciáját (1323 bázis) elküldtük a nemzetközi adatbankba, amely az HE610678 hivatkozási számon található (**10. melléklet**).

A nemzetközi adatbázisban található szekvenciákkal összehasonlítottuk a szilváról származó izolátum szekvenciáját. Az összehasonlítás alapján a vizsgált szakaszon 100% homológiát mutatott a szilva izolátum két másik izolátummal, az fn434113 hivatkozási számon található német izolátummal, amely galagonyáról származik, illetve az fn666575 számú angol izolátummal, melynek gazdanövénye az alma. Míg a többi vizsgált izolátumokkal a szilva izolátum 98-99%-os homológiát mutatott, melyek különböző gazdanövényekről, almáról, körtéről, japán körtéről valamint *Rubus* fajokról származtak. Az adatok alapján elkészítettük a filogenetika törzsfát (**44. ábra**). A filogenetikai fán megfigyelhető, hogy a szilva izolátum a legtávolabbi rokonságban az af289542 azonosítási számú kanadai izolátummal van, amelyet

almáról izoláltak. A szekvenciák homológiája alapján a *Rubus* fajokról származó izolátumok külön csoportot alkotnak. A szilváról származó izolátumunk közeli rokonságot mutat az almáról, birsról, körtéről, valamint dísznövényekről származó izolátumokkal.

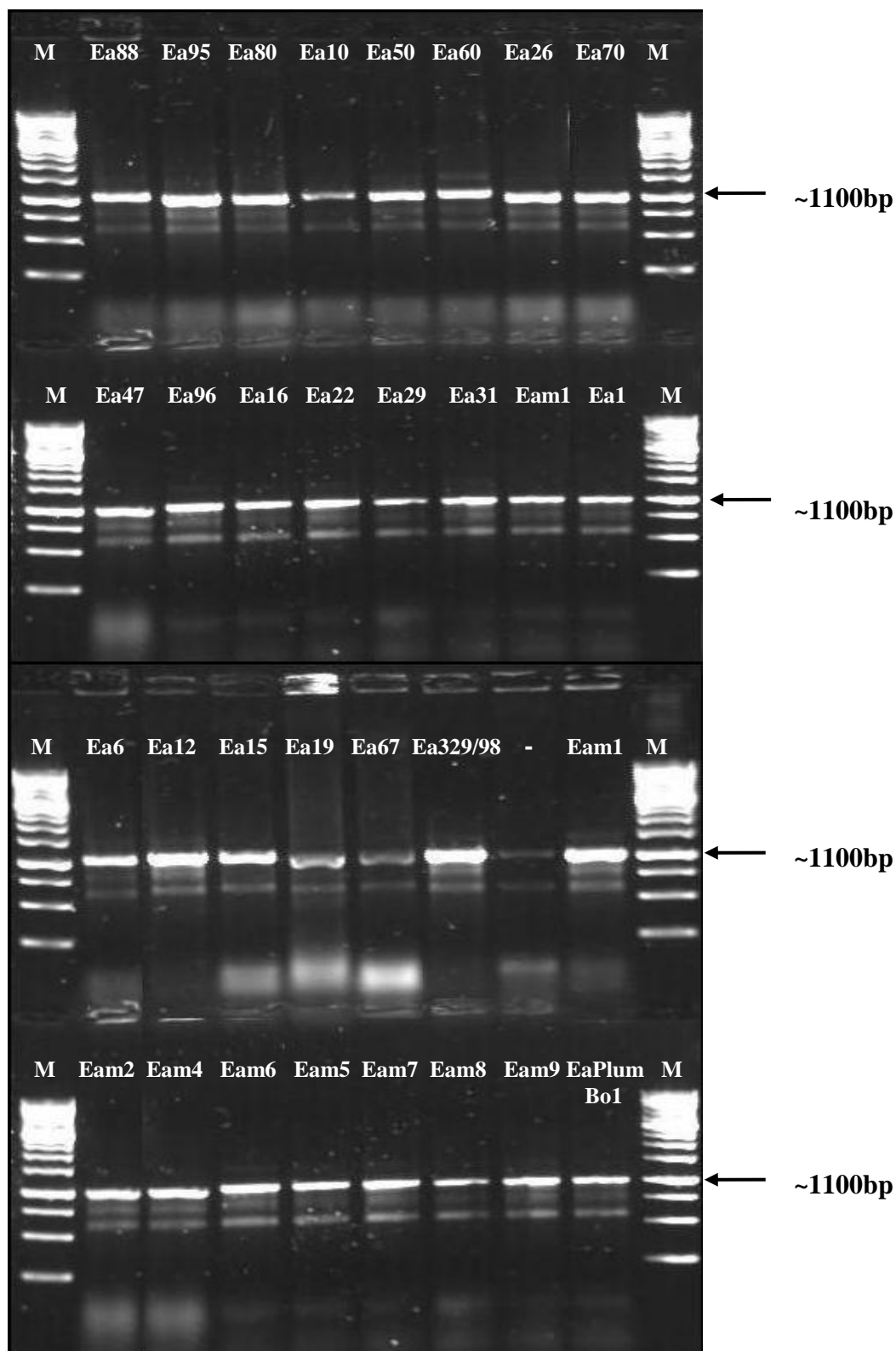


**44. ábra:** *E. amylovora* izolátumok filogenetikai törzsfája, NCBI adatbanki hivatkozási számmal, izolátumok gazdanövényének megjelölésével, Ea-PlumBo1 a saját izolátumunk.

Magyarázat: A vízszintes vonalak az izolátumok egymástól való genetikai távolságát mutatják, a függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményeit mutatják, 1000 mintavétel esetén, mely filogenetikai fa megbízhatóságát mutatja. A törzsfá alatti skála 4 bázis változást mutat 1000 bázisonként.

#### 4.6.2 Az izolátumok pEA29 plazmidjának molekuláris vizsgálata

Munkánk során az összes *E. amylovora* izolátumot vizsgáltunk SSR molekuláris vizsgálat alapján. A PCR során az *E. amylovora* izolátumok pEA29 plazmidjának ismétlődő régiójára specifikus pEA29A és pEA29B primerekkel megközelítőleg 1100 bázispár (bp) hosszú szakaszát sikerült felszaporítanunk (**45. ábra**).



**45. ábra:** Az *E. amylovora* izolátumok PCR termékeinek gélelektroforézis fotója  
 Jelmagyarázat: M DNS-méretmarker, Invitrogen 1Kb méretmarker  
 (- jelzés a dolgozatban nem szereplő *E. amylovora* izolátum PCR termékét jelzi)

A PCR termékek nukleotid szekvenciáját meghatároztuk. A szekvenciákban megtaláltuk a pEA29 plazmid ismétlődő régióját (**11. melléklet**), a SSR-eket (short sequence repeat, rövid szekvencia ismétlődés), mely alapján az *E. amylovora* izolátumok jól elkülöníthetők egymástól. Az *E. amylovora*-ra jellemző pEA29 plazmid ATTACAGA, ismétlődő szekvencia, analízise azt mutatta, hogy a hazai törzsek domináns populációjában ez a szakasz 5-10-szer ismétlődik, míg a külföldi izolátumoknál 5, 7, 12-szer ismétlődik. Az izolátumok domináns populációja (51%) a 7 és 8-szor ismétlődő szekvencia csoportba tartozott. Az Ea19, Ea22, Ea50, Ea80, Ea 47 és az Eam1 izolátumok a legkisebb (5), míg az Ea95 (10) és az Ea329/98 (12) a legnagyobb SSR számmal rendelkezett. A külföldről származó izolátumok és a hazai izolátumok eltérő SSR számmal rendelkeztek. Az *E. amylovora* izolátumok eltérő SSR számai azt mutatják, hogy eltérő törzseket alkotnak. Az izolátumok izolálásának helye, ideje és gazdanövénye nem függ össze az ismétlődő régió számával (**11. táblázat**). Érdekességként említhető, hogy a 2010 és 2011-ben izolált baktériumok SSR számai 7 és 8, pedig eltérő helyről, gazdanövényről származnak.

**11. táblázat:** Hazai *E. amylovora* izolátumok jellemző tulajdonságai

| Izolátumok jelölése | Gazdanövény                                  | Gyűjtés helyszíne            | Izolálás éve | SSR száma (ATTACAGA) |
|---------------------|--|------------------------------|--------------|----------------------|
| <b>Ea19</b>         | <i>Cydonia oblonga</i>                       | Pomáz                        | 1997         | <b>5</b>             |
| <b>Ea22</b>         | <i>Crataegus</i> sp.                         | Pécs                         | 1998         | <b>5</b>             |
| <b>Ea50</b>         | <i>Pyrus x communis</i><br>'Dr. Guyot Gyula' | Zala                         | 1999         | <b>5</b>             |
| <b>Ea80</b>         | <i>Pyrus communis</i>                        | Zala                         | 2001         | <b>5</b>             |
| <b>Ea47</b>         | <i>Malus x domestica</i><br>'Idared'         | USA, Michigan                | 1999         | <b>5</b>             |
| <b>Eam1</b>         | <i>Malus domestica</i>                       | Románia,<br>Székelyudvarhely | 2009         | <b>5</b>             |
| <b>Ea10</b>         | <i>Pyrus communis</i>                        | Sarkad                       | 1997         | <b>6</b>             |



11. táblázat folytatása

| Izolátumok jelölése    | Gazdanövény                           | Gyűjtés helyszíne | Izolálás éve | SSR száma (ATTACAGA) |
|------------------------|---------------------------------------|-------------------|--------------|----------------------|
| <b>Ea15</b>            | <i>Cotoneaster dammeri</i>            | Békéscsaba        | 1997         | <b>6</b>             |
| <b>Ea16</b>            | <i>Cotoneaster salicifolius</i>       | Pécs              | 1997         | <b>6</b>             |
| <b>Ea88</b>            | <i>Malus x domestica</i><br>'Idared'  | Újfehértó         | 2002         | <b>6</b>             |
| <b>Ea6</b>             | <i>Malus domestica</i>                | Sarkad            | 1997         | <b>7</b>             |
| <b>Ea12</b>            | <i>Cotoneaster horizontalis</i>       | Sarkad            | 1997         | <b>7</b>             |
| <b>Ea26</b>            | <i>Pyrus communis</i>                 | Zala              | 1998         | <b>7</b>             |
| <b>Ea60</b>            | <i>Malus domestica</i>                | Érd               | 2000         | <b>7</b>             |
| <b>Ea67</b>            | <i>Malus domestica</i>                | Monostorpályi     | 2000         | <b>7</b>             |
| <b>Ea70</b>            | <i>Cydonia oblonga</i>                | Monostorpályi     | 2000         | <b>7</b>             |
| <b>Ea96</b>            | <i>Cydonia oblonga</i>                | Ukrajna, Ungvár   | 2003         | <b>7</b>             |
| <b>Eam8</b>            | <i>Cydonia oblonga</i>                | Budapest          | 2011         | <b>7</b>             |
| <b>Eam9</b>            | <i>Cydonia oblonga</i>                | Szerbia           | 2011         | <b>7</b>             |
| <b>Eam10</b>           | <i>Pyrus communis</i>                 | Szerbia           | 2011         | <b>7</b>             |
| <b>Eam2</b>            | <i>Malus x adstringens</i><br>'Helen' | Budapest          | 2010         | <b>8</b>             |
| <b>Eam4</b>            | <i>Crataegus</i> sp.                  | Vecsés            | 2010         | <b>8</b>             |
| <b>Eam5</b>            | <i>Crataegus</i> sp.                  | Budapest          | 2010         | <b>8</b>             |
| <b>Eam6</b>            | <i>Crataegus</i> sp.                  | Debrecen          | 2010         | <b>8</b>             |
| <b>Eam7</b>            | <i>Prunus</i> sp.                     | Budaörs           | 2011         | <b>8</b>             |
| <b>Ea-<br/>PlumBo1</b> | <i>Prunus x domestica</i><br>'Ageni'  | Budaörs           | 2011         | <b>8</b>             |

11. táblázat folytatása

| Izolátumok jelölése | Gazdanövény            | Gyűjtés helyszíne       | Izolálás éve | SSR száma (ATTACAGA) |
|---------------------|------------------------|-------------------------|--------------|----------------------|
| <b>Ea29</b>         | <i>Cotoneaster</i> sp. | Budapest                | 1998         | <b>9</b>             |
| <b>Ea31</b>         | <i>Pyracantha</i> sp.  | Budapest                | 1998         | <b>9</b>             |
| <b>Ea1</b>          | <i>Malus domestica</i> | Nyárlőrinc              | 1996         | <b>9</b>             |
| <b>Ea95</b>         | <i>Cydonia oblonga</i> | Rákoskert               | 2003         | <b>10</b>            |
| <b>Ea329/98</b>     | <i>Malus domestica</i> | Ausztria,<br>Vorarlberg | 1998         | <b>12</b>            |

Eredményeinket összehasonlítottuk az NCBI adatbázisban szereplő összes *Erwinia amylovora* izolátummal, mely vizsgálatok a pEA29 plazmid ismétlődő régiójára terjedtek ki. Az adatbázisban 27 izolátumot találtunk, melyek különböző országokból származtak és különböző SSR számokkal rendelkeztek (**12. táblázat**).

Eredményeinket összehasonlítva az adatbázisban szereplő összes *E. amylovora* izolátum szekvenciájával megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált izolátumok 5-10 SSR számmal rendelkeznek, míg az NCBI adatbázisban szereplő izolátumok között az amerikai 4 (NC-005706, AF264948), az angol 4 (NC\_013972, FN666576) és a német izolátumok (FR719212, FN434114, NC\_013957) 4-5 SSR számmal, tehát kisebb számmal rendelkeznek.

Az adatbázisban lévő bolgár izolátumok pedig magasabb SSR számmal rendelkeznek (10-13 SSR) a mieinkhez viszonyítva. A bolgár EU725790 izolátum SSR száma (8) megegyezik az Eam2, Eam4, Eam5, Eam6, Eam7 és EaPlumBo1 hazai izolátumokkal, illetve az Ea95 izolátum és az EU725787 izolátum szintén azonos SSR számmal (10) rendelkezik, míg az EU725789 11-szer, az EU725791 12-szer, míg az EU725788 13-szor ismétlődő szekvencia csoportba tartozik.

**12. táblázat:** A nemzetközi adatbázisban szereplő összes *Erwinia amylovora* izolátum SSR vizsgálatának eredménye

| NCBI adatbázis azonosító                       | Izolátum származása | SSR száma (ATTACAGA) |
|--|---------------------|----------------------|
| AF264948<br><b>(McGhee és Jones, 2000)</b>     | USA                 | 4                    |
| NC_005706<br><b>(McGhee és Jones, 2000)</b>    | USA                 | 4                    |
| NC_013972<br><b>(Sebaihia és mtsai., 2010)</b> | Anglia              | 4                    |
| FN666576<br><b>(Sebaihia és mtsai., 2010)</b>  | Anglia              | 4                    |
| FR719212<br><b>(Powney és mtsai., 2011)</b>    | Németország         | 4                    |
| FN434114<br><b>(Smits és mtsai., 2010)</b>     | Németország         | 5                    |
| NC_013957<br><b>(Smits és mtsai., 2010)</b>    | Németország         | 5                    |
| EU725787                                       | Bulgária            | 10                   |
| EU725788                                       | Bulgária            | 13                   |
| EU725789                                       | Bulgária            | 11                   |
| EU725790                                       | Bulgária            | 8                    |
| EU725791                                       | Bulgária            | 12                   |
| FN668618                                       | Egyiptom            | 8                    |
| FN668619                                       | Egyiptom            | 6                    |
| FN668620                                       | Egyiptom            | 8                    |
| FN668621                                       | Egyiptom            | 8                    |
| FN668622                                       | Egyiptom            | 7                    |
| FN668623                                       | Egyiptom            | 8                    |
| FN668624                                       | Egyiptom            | 6                    |
| FN668625                                       | Egyiptom            | 6                    |

12. táblázat folytatása

| NCBI adatbázis azonosító | Izolátum származása | SSR száma (ATTACAGA) |
|--------------------------|---------------------|----------------------|
| FN668626                 | Egyiptom            | 6                    |
| FN668627                 | Egyiptom            | 6                    |
| FN668628                 | Egyiptom            | 4                    |
| FN668629                 | Egyiptom            | 9                    |
| FN668630                 | Egyiptom            | 7                    |
| FN668631                 | Egyiptom            | 6                    |
| FN668632                 | Egyiptom            | 6                    |

Az egyiptomi vizsgálatok során kapott eredmények hasonlítanak legfőképpen a saját vizsgálatainkhoz, hiszen ezek az izolátumok 4, 6, 7, 8, 9 SSR számmal rendelkeznek. Az általuk vizsgálat 15 izolátum közül 1-1 rendelkezett a legnagyobb (FN668629- 9 SSR) és a legkisebb (FN668628- 4 SSR) SSR számmal, az összes többi 13 izolátum 6-8 SSR számmal rendelkezett. Az egyiptomi izolátumok domináns populációja a 6-7-szer ismétlődő, míg a mi izolátumaink többsége a 7-8-szor ismétlődő csoportba tartozik.

**Keck és mtsai. (2002)** osztrák-magyar kooperáció keretén belül elvégezték több magyarországi és ausztriai *E. amylovora* izolátumok összehasonlító molekuláris vizsgálatát a pEA29 plazmid *PstI* fragmentjében található ismétlődő szakaszokra. Eredményeik szerint az osztrák izolátumok domináns populációjában (94%) ez a szakasz (ATTACAGA) 10-14-szer ismétlődik, míg a magyar izolátumok esetében az izolátumok domináns populációja (75%) a 4-szer ismétlődő szekvencia csoportba tartozott. A magyar izolátumok alma, körte, birs és galagonya növényekről származtak. Vizsgálataink során meghatároztak több magyarországi *E. amylovora* izolátumot is (Ea16, Ea1, Ea31, Ea10, Ea329/98), melyek a mi kísérletünkben is szerepeltek, ahol az Ea1 (9SSR) és az Ea16 (6SSR) eredményei megegyeznek, míg a többi izolátum esetében különbségeket véltünk felfedezni (**Keck és mtsai., 1997; 2002**). A saját vizsgálataink során az Ea10 hat, az Ea31 kilenc és az Ea329/98 tizenkettő ismétlődő régióval, míg az osztrák vizsgálatok során az Ea10 öt, az Ea31 hét és az Ea329/98 tizenhárom SSR-rel rendelkezett. A magyar izolátumok összességében vizsgálataink szerint alacsonyabb SSR számmal rendelkeznek, mint az osztrák izolátumok.

## 4.7 Új tudományos eredmények

- Magyarországon elsőként, Európában másodikként azonosítottuk klasszikus és molekuláris bakteriológiai módszerekkel a tűzelhalás kórokozóját, az *Erwinia amylovora*-t szilvafa (*Prunus domestica* d'Agen') fiatal hajtásáról.
- Magyarországon elsőként csoportosítottunk 31 *Erwinia amylovora* izolátumot tenyészbélyegek alapján különböző táptalajokon.
- Magyarországon elsőként jellemeztük és soroltuk csoportokba az *Erwinia amylovora* izolátumokat szénhidrát hasznosításuk alapján.
- Új adatokat szolgáltatam 4 különböző bakteriofág a tűzelhalás kórokozójára gyakorolt eltérő hatásáról *in vitro* körülmények között.
- Munkám során új adatokat szolgáltatam 31 *Erwinia amylovora* izolátum virulenciájáról és a gyümölcsök érzékenységről 7 régi körtefajta esetében.
- Magyarországon elsőként jellemeztük 31 *Erwinia amylovora* izolátum pEa29 plazmid *PstI* fragmentjének ismétlődő régióját (SSR), valamint ezeket összevetve a nemzetközi adatbázisban szereplő referencia izolátumokkal, feltérképeztük ezek rokonsági viszonyait.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

Az *Erwinia amylovora* gazdanövénykörében nem találtunk eltérést az irodalmi adatokhoz képest. A tűzelhalás kórokozóját, az *E. amylovora*-t 2010-2011 között több gazdanövény hajtásáról sikeresen azonosítottuk. 2011 nyarán, Budaörsön, fiatal szilvafa hajtásáról sikeresen izoláltuk az *Erwinia amylovora*-t. Eddig a tűzelhalás szilván történő természetes fertőződéséről az irodalmak alapján csak az USA-ban (**Mohan és Thomson, 1996; Mohan és Bijman, 1998; Mohan, 2007**) és Németországban (**Vanneste és mtsai., 2002**) számoltak be. A kórokozó *Prunus* gazdanövényen való magyarországi megjelenéséről a hazai irodalomban még nincsenek adatok. Vizsgálataink során az irodalomtól eltérő tünetekkel nem találkoztunk (**van der Zwet és Keil, 1979**).

A bakérium Gram-negatív, dohánynövényen hiperszenzitív reakciót vált ki (**Hevesi, 1996**), saját megfigyeléseink is megegyeztek ezzel. Az inokulált dohányleveleken 24-48 óra elteltével erőteljes szöveti nekrozis jelentkezett. **Bereswill (1998)** kísérletei alapján a baktérium fejlődésének a 26 °C kedvez, de **Steiner és Zeller (1996)** szerint 4-26 °C-ig jól fejlődik. A kórokozó megfigyeléseink alapján jól tenyésztethető 24-26 °C-on.

**Bereswill és mtsai. (1998)** alapján a King-B, Miller-Schroth, Kado-Heskett, Crosse-Goodman táptalajok alkalmasak az *E. amylovora* tenyésztésére és más fajoktól való megkülönböztetésre, illetve fajok közötti különbségek kimutatására.

A kórokozó izolátumainak tenyésztési megegyeznek a szerzők által leírtakkal. A kórokozó tenyésztete King-B táptalajon folyós, tejszerű, mukoid, krémszínű, mely táptalajon egységes kolóniákat képez, amely eredménnyel eltéréseket az irodalmi adatoktól nem tapasztaltunk (**King és mtsai, 1954**). Miller-Schroth táptalajon minden *Erwinia* faj képes növekedni, tenyésztetük narancssárga színű, áttetsző udvarral, mely eredmények egybevágó az irodalmi adatokkal (**Miller és Schroth, 1972**). Kado-Heskett táptalaj (**Kado és Heskett, 1970**) kimondottan *Erwinia* fajokra szelektív, melyen piros-narancssárga színű kolóniákat képez; míg Crosse-Goodman táptalaj (**Crosse és Goodman, 1973**) kifejezetten *E. amylovora*-ra szelektív, ahol növekedésük során a kolóniák felületén jellegzetes kráterek alakulnak ki. A Crosse-Goodman táptalajon kialakult kolóniák alapján különbségeket tudtunk tenni az izolátumok között. **Holt-Harris és Teague (1916)** leírása szerint az Eosin Methylene Blue agar táptalajon a

baktérium tenyésztete kiemelkedő, sima felületű, ép szélű, mely a laktózt, szacharózt bontó és nem bontó baktériumok között tesz különbséget. Ezeket bontó baktériumok világos, áttetsző szélű, fekete közepű kolóniát képeznek, míg a laktózt, szacharózt nem bontóak szintelenek. Eredményeink az izolátumok összehasonlító vizsgálata során alátámasztja ezt a megállapítást.

Az API 20E kit eredményei alapján az általunk vizsgált izolátumok pozitív reakciókat adtak a  $\beta$ -galaktozidáz, citrát hasznosításra, acetoin termelésre valamint glükóz, mannit, szorbit, szacharóz, melibióz, arabinóz vizsgálatokban és oxidáz-teszt során is, mely eredmények egybevágóak **Hevesi (1996)** megállapításaival.

Az API 50CH kit vizsgálatnál összehasonlítottuk az *E. amylovora* izolátumokat. Az összes izolátum hasznosította 48 óra elteltével az L-arabinózt, ribózt, galaktózt, glükózt, fruktózt, mannitot, szorbitot, N-acetil-glükózamint, szacharózt, trechalózt és a gentobiózt. Ezeken felül még 11 szénhidrátot (glicerol, D-xilóz, mannóz, inozitol, amygdalin, arbutin, szalicin, cellobióz, raffinóz és D-fukóz) eltérő módon hasznosítottak, melyek alapján különbségeket lehetett tenni az izolátumok között. A hazai és külföldi izolátumok között, melyek eltérő helyről, évből és gazdanövényről származnak, eltérések vannak a biokémiai vizsgálatok alapján. **Hevesi és mtsai. (2004<sup>a</sup>)** kísérletük során „mű-nektárt” vizsgáltak. Meghatározták az Ea1 izolátum szaporodásához kevésbé fontos szénhidrátok hasznosítását is, melyhez API 50CH gyorsesztesztet használtak. Eredményeiket 20-26, 64 és 166 óra elteltével értékelték, mely alapján megkülönböztettek „nem hasznosított”, „lassan és alig hasznosított”, „lassan és teljesen hasznosított”, „gyorsan és teljesen hasznosított” szénhidrát csoportot. Vizsgálatuk során az Ea1 izolátum 24 szénhidrátot hasznosított és 25-öt egyáltalán nem. A saját kísérletünk során is az izolátumok között szerepelt az Ea1 izolátum. Az API tesztet mi 24 és 48 óra elteltével értékeltük, a gyártó utasításait követve, mely esetben mi is elkülönítettünk „nem hasznosított” és „hasznosított” szénhidrát csoportokat. Az Ea1 izolátum esetében hasonló eredményeket kaptunk, bár néhány szénhidrát hasznosítása során eltéréseket tapasztaltunk. **Hevesi és mtsai. (2004<sup>a</sup>)** eredményeihez képest, kísérletünkben az Ea1 izolátum hasznosította a D-xylózt, melibiózt is, míg nem hasznosította az amygdalint, arbutint, szalicint, inulint, raffinózt, keményítőt, D fukózt, eszkulint és az  $\alpha$ -metil-D glükozidot. Vizsgálatunkban az Ea1 izolátum 48 óra elteltével 32 szénhidrátot egyáltalán nem, míg 17 szénhidrátot hasznosított. A különbségek következhetnek az eltérő időpontokban történő értékelés miatt.

Az API tesztek hozzájárulnak az izolátumok biokémiai tulajdonságainak meghatározásához, jellemzéséhez. Az API 50CH kit alapján pedig különbségeket lehet tenni az

izolátumok között. Eredményeink megegyeznek az irodalmi adatokkal (**Percival, 1961**), hogy a nektár meghatározó cukor komponenseit (fruktóz, glükóz, szacharóz) mindegyik izolátum hasznosította. Ezek mellett más cukrok hatásairól, mint a maltóz, melobióz és raffinóz, melyek előfordulnak számos *Rosaceae* családba tartozó növényfajok nektárjaiban, nem áll elegendő adat rendelkezésünkre (**Percival, 1961**), melyeket vizsgálataink során meghatároztunk. Valószínűleg a szénhidráttartalom jelentős szerepet játszhat az *Erwinia amylovora* virágfertőzésében.

Irodalmi adatokat megerősítve, a különféle bakteriofágok eltérő mértékben reagálnak a különböző *E. amylovora* törzsekkel. Nem állapítható meg az, hogy az almáról izolált fágok csak az almáról izolált *E. amylovora* izolátumot képesek lizálni vagy, hogy a birsről származó fágokra érzékenyebbek lennének a birsről származó izolátumok. A bakteriofágok specifikitása ismert, de feltételezhető, hogy a fágok és baktériumok koevolúciójában a kölcsönösen kiváltott szelekciós nyomás nem olyan mértékű, hogy egy adott fág csak egy adott *E. amylovora* izolátumot legyen képes lizálni. Több vizsgálatban is tapasztalták, hogy az *E. amylovora* izolátumok több fágra is érzékenyek voltak egyidejűleg (**Jones és Schnabel, 2000; Müller és mtsai., 2010; Kolozsvári Nagy és mtsai., 2012**), melyet a kísérletünk is bizonyított.

A szakirodalomban az éretlen gyümölcsök fertőződésére kevés figyelmet fordítottak, de a fertőzött gyümölcs is fertőzési forrássá válhat a szállítással, ezért fogékonysága szintén a fajta értékmérő tulajdonságai közé tartozik. A fajták fogékonyságáról az irodalomban mind a hajtások, illetve mind a virágok ellenállóságát vizsgálják, azonban a gyümölcsök fogékonyságáról csak egy irodalmat találtam (**Paulin és mtsai., 1990**). A körtefajták *Erwinia amylovora* fogékonyságának vizsgálataira hazánk eltérő ökológiai körülményei miatt saját vizsgálatokra is szükség van. 1999 óta folyamatos nemesítési program és kutatómunka folyik a Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcsstermő Növények Tanszékén hazai alma- és körtefajták *E. amylovora* baktériummal szembeni fogékonyságára illetve rezisztenciájára. Ennek a programnak része volt, hogy a történelmi körtefajtákat fogékonysági kategóriákba sorolták hajtás, virág valamint érett és éretlen gyümölcsök inokulációs vizsgálatai alapján, amelyekhez három izolátumból álló baktérium törzskeveréket használtak (**Tóth és mtsai., 2004; Honty és mtsai., 2004, 2006; Honty, 2011**).

**Honty (2011)** kidolgozta a gyümölcsök fertőzésének módszerét, ahol a külső sérüléseken át történő fertőzést imitálják (szúrással történő inokuláció), míg **Paulin és mtsai. (1990)** más módszerrel végezte a gyümölcsök fertőzését (gyümölcszszeleteket az *E. amylovora*



szuszpenzióba mártja), ahol megnehezíti az értékelést, hogy a körteszeletek könnyebben fertőződhetnek másodlagosan (**Honty, 2011**). **Honty (2011)** módszerét jobbnak tartjuk és az alapján végeztük a fajták fogékonyságának és az izolátumok virulenciájának vizsgálatát.

A körtefajták fogékonyságát vizsgálva megállapítottuk, hogy a 'Téli esperes', a 'Drouard elnök' igen erősen fogékonyak, az 'Eldorado', 'Serres Olivér', és a 'Diel vajkörte' közepesen, míg az 'Alexander Lucas' és a 'Stössel tábornok' csak kevésbé fogékonyak bizonyult a tüzelfalással szemben. Korábbi vizsgálatokban **Honty (2011)** ugyanilyen eredményeket kapott az 'Eldorado' fajta esetében.

Vizsgálataink szerint a körtefajták az egyes izolátumokkal szemben eltérően viselkedtek, így nem volt megállapítható, hogy mely izolátumok rendelkeznek nagyobb megbetegítő képességgel, pl. az Ea10, 19 és 29 izolátumok igen erős tüneteket okoztak a 'Drouard elnök' fajtán a többi izolátummal összehasonlítva, ugyanakkor más körtefajtákon nem ezek az izolátumok okozták a legsúlyosabb elváltozásokat. Az Ea50 izolátum csak az 'Eldorado' fajtánál nem volt virulens. Ebből adódóan, hogy az izolátumok eltérő virulenciát mutatnak a különböző körtefajtákon, fontos a fajták gyümölcsseinek fogékonyság vizsgálatainál törzskeveréket (**Tóth és mtsai., 2004; Honty és mtsai., 2004, 2006; Honty, 2011**) használni, hogy megbízható eredményt kapjunk a fajták fogékonysága tekintetében.

**Paulin és mtsai. (1990)** kísérletükben megállapították, hogy az általuk vizsgált gyümölcsök fogékonysága nagyban eltér a gyümölcsösből tapasztalható hajtás- és virágfogékonyságtól, melyet **Honty (2011)** is alátámaszt, mert több fajta ('Packham's Triumph', 'Pap körte') esetében tapasztalta, hogy a laboratóriumi körülmények között végzett hajtás- és virágfertőzések alapján nagyon fogékonyak, míg az éretlen gyümölcsök fertőzése során pedig mérsékelt rezisztenciát mutattak. **Thibault és mtsai. (1989)**, valamint **Le Lezec és mtsai. (1998)** megállapították, hogy a vizsgált fajták különböző szervei (hajtás, virág, gyümölcs) közül az egyik az adott évben mérsékelt rezisztenciát, majd később nagyfokú fogékonyságot mutatott, másrészt pedig a legtöbb fajtánál az egyes szervek az inokuláció hatására eltérő módon reagáltak. A vizsgált szerv a különböző években eltérő módon viselkedett a fertőzés hatására a legtöbb esetben (**Honty, 2011**).

A molekuláris vizsgálatok során vizsgáltuk a 16S rRNS-t kódoló gén bázissorrendjét, valamint az *E. amylovora*-ban megtalálható pEA29 plazmid nukleinsav szekvencia részletét.

A szilváról, hazánkban új gazdanövényről izolált kórokozó esetében a 16S rRNS gén vizsgálat során PCR technika segítségével 1300 bp hosszúságú PCR termék keletkezett, mely

szekvenciáját meghatároztuk. Az összehasonlítás alapján a vizsgált szakaszon 100% homológiát mutatott a szilva izolátum (EaPlumBo1) a német (FN434113) galagonyáról és az angol (FN666575) almáról származó izolátumokkal, míg a többi izolátummal (alma, körte, japán körte, *Rubus* fajok) a hasonlóság 98-99 %-os.

Az *E. amylovora* pEA29 plazmid ismétlődő régiójára specifikus pEA29A és pEA29B primerekkel megközelítőleg a PCR során 1100 bp hosszú szakaszt sikerült felszaporítanunk (Geider, 2005). A PCR termék nukleotid szekvenciáját meghatároztuk. A szekvenciákban megtaláltuk a pEA29 plazmid ismétlődő régióját (ATTACAGA), az SSR-eket. A hazai törzsek domináns populációjában ez a szakasz 5-10-szer ismétlődik. Az izolátumok domináns populációja (51%) a 7 és 8-szor ismétlődő szekvencia csoportba tartozott.

Keck és mtsai. (2002) osztrák-magyar kooperáció keretén belül elvégezték több magyarországi és ausztriai *E. amylovora* izolátumok összehasonlító molekuláris vizsgálatát a pEA29 plazmid *Pst*I fragmentjének ismétlődő régiójára. Eredményeik szerint az osztrák izolátumok domináns populációjában (94%) ez a szakasz (ATTACAGA) 10-14-szer ismétlődik, míg a magyar izolátumok esetében az izolátumok domináns populációja (75%) a 4-szer ismétlődő szekvencia csoportba tartozott. A magyar izolátumok alma, körte, birs és galagonya növényekről származtak. Vizsgálatuk során vizsgáltak több magyarországi *E. amylovora* izolátumot is (Ea16, Ea1, Ea31, Ea10, Ea329/98), ahol az Ea1 9 SSR-t és az Ea16 6 SSR-t tartalmazott, mely eredményekkel egybevágunk a mi vizsgálataink tapasztalatai, míg a többi izolátum esetében különbségeket találtunk (Keck és mtsai., 1997; 2002). A saját vizsgálatunk során az Ea10 hat, az Ea31 kilenc és az Ea329/98 tizenkettő ismétlődő szekvenciával, míg az osztrák vizsgálatok során az Ea10 öt, az Ea 31 hét és az Ea329/98 tizenhárom SSR-rel rendelkezett. A magyar izolátumok alacsonyabb SSR számmal rendelkeznek. A hazai izolátumok domináns populációja a 7-8-szor ismétlődő csoportba tartozik.

Ruppitsch és mtsai. (2004) kísérletei alapján megállapítható, hogy a különböző gazdanövényekről (alma, körte, tűztövis) származó izolátumok eltérő SSR-eket (3-14 SSR) tartalmaznak, melyet Geider (2005) is alátámaszt azzal, hogy galagonyáról származó két különböző izolátum eltérő SSR számmal rendelkezett. Vizsgálatunk során mi is megállapítottuk, hogy a különböző gazdanövényekről származó izolátumok SSR számai különbözőek. Az almáról származó izolátumok 5-9 és 12 ismétlődő régióval, körtéről származó izolátumok 5-7 SSR számmal, a dísnövényekről (tűztövis, madárbirs) származó izolátumok pedig 6, 7, 9 SSR számmal, míg a birsről származó izolátumok többsége 7, de van, amelyik 5 és

10 ismétlődő régióval rendelkezett. A *Prunus* fajokról származó, 2011-ben izoláltuk mindkét izolátum SSR száma megegyezik.

**Ruppitsch és mtsai. (2004)** vizsgálták az *E. amylovora* SSR egységeinek stabilitását standard laboratóriumi és stressz körülmények között. Kísérletükben vizsgáltak olyan izolátumokat (295/93, 674/94), melyeket 4 évvel azelőtt is vizsgáltak már, és SSR számaik megegyeztek, amelyeket részben mi is alátámasztunk az Ea1 és az Ea16 izolátumok esetében **(Keck és mtsai., 2002)**. **Ruppitsch és mtsai. (2004)** azt valószínűsítik, hogy az izolátumok SSR számai stabilak természetes körülmények között hosszú éveken át, esetükben az 1993-ból izoláltak a 2003-ban izoláltakal megegyeznek, valamint ők stressz körülmények között sem tapasztaltak különbségeket. **Ruppitsch és mtsai. (2004)** valamint **Geider (2005)** felhívja a figyelmet arra, hogy az SSR technika hátránya lehet, hogy az SSR számok kis mértékben, de változhatnak **(Jock és mtsai., 2003)**, mégpedig a DNS szintézis során a szálak illeszkedése elcsúszhat, valamint stressz is válthat ki ilyen változásokat. Eredményeink alapján mi is tapasztaltunk a hazai és az osztrák **(Keck és mtsai., 2002)** izolátumok (Ea10, Ea31, Ea329/98) vizsgálata során az SSR számok közötti különbségeket.

Az SSR adatok sokkal jobban reprodukálhatók, mint más típusba sorolási módszerek **(Van Belkum és mtsai., 1998; Van Belkum, 1999)**. Végül bebizonyosodott, hogy az SSR egységek megfelelnek a genetikai marker feltételeinek **(Van Belkum és mtsai., 1998)**. **Ruppitsch és mtsai (2004)** eredményeik során megállapították, hogy néhány izolátum esetében, ahol az SSR számok eltérőek voltak, az *E. amylovora* izolátumok diverz populációhoz tartoztak. Eredményeik is ezt valószínűsítik, hogy a hazai izolátumok eltérő törzseket alkotnak, melyek egy változatos populációhoz tartoznak.

**Geider (2005)** szerint az SSR szám szolgálhat arra, hogy törzseket különítsenek el, bár maga a növényből való izolálás kockázatot jelenthet (pl.: patogenitás vizsgálat során), mert eredményezhet SSR szám változást. Az SSR számok használata a törzsek elkülönítésére egy szűkebb területen alkalmas lehet, de ez egy gyorsan változó tulajdonság (evolúciós léptékben vizsgálva). Feltételezik, hogy azokban az országokban, ahol a kórokozó korábban jelent meg és évtizedek óta jelen van ott az SSR gyakran 6 és az alatti, míg azokban az országokban, ahol a kórokozó csak később terjedt el az izolátumok 6 vagy még magasabb SSR számmal rendelkeznek. Angliában (1957), ahol Európában elsőként írták le a kórokozó megjelenését, Németországban és Lengyelországban (1966-1970), valamint Egyiptomban (1967) izolált törzsek alacsonyabb SSR számmal rendelkeznek, mint az 1990-es években, más országokban

(Bulgária, 1990; Ausztria, 1995; Magyarország, 1996) izoláltak. Eredményeink is megerősítik ezt a megfigyelést, mert a vizsgálatunk során a hazai izolátumok többsége 7-8 SSR számmal, az osztrák izolátumok magasabb 10-14 SSR számmal, a bolgár izolátumok 8-10-11-12-13 SSR számmal, míg a német (4), angol (4), egyiptomi (4, 6, 7) és amerikai (4, 5) izolátumok, ahol a kórokozó korábban jelent meg, ténylegesen alacsonyabb SSR számmal rendelkeznek. A saját vizsgálatainkhoz az egyiptomi vizsgálatok eredményei hasonlítanak a legjobban, mely feltételezi, hogy hazánkba a kórokozó Egyiptomból, a déli országok felől terjedt el, mivel az európai igen gyors elterjedése a kórokozónak két irányból, Angliából és Egyiptomból indult **(van der Zwet, 1996)**.

Az SSR (ATTACAGA-nukleotidokból álló ismétlődő régió) vizsgálat gyors és megbízható módszernek bizonyult az *Erwinia amylovora* izolátumok azonosítására, jellemzésére, mint ahogyan ezt **Van Belkum és mtsai. (1998)** és **Van Belkum (1999)** is említik. A molekuláris azonosítás mindenképpen szükséges a klasszikus bakteriológiai módszerek kiegészítésére, hiszen a különböző vizsgálatok eredményei (tenyészbélyegek, szénhidrát hasznosítás, virulencia) nem bizonyulnak mindig alkalmasnak a különbségek kimutatására, valamint a törzsek elkülönítésére. Az SSR vizsgálat alkalmazható a fajok közötti különbségek kimutatására, a törzsek elkülönítésére, mégha néhány esetben tapasztaltuk egyes izolátumok SSR számának eltérését, mint ahogyan ezt **Ruppitsch és mtsai. (2004)**, valamint **Geider (2005)** is publikációjukban említik.

A hazai *Erwinia amylovora* populáció homológiáját vizsgálva a különböző tulajdonságok alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a populáció eltérő törzsekből áll, melyet a molekuláris vizsgálat eredményei is alátámasztanak. A tenyészbélyegek, biokémiai tulajdonságok, virulencia és molekuláris vizsgálat (SSR) alapján több kisebb csoportot tudunk elkülöníteni az izolátumok között, de a csoportokba nem ugyanazon Ea izolátumok tartoznak. Ez a hazai törzsek diverzitását mutatja. Az összes vizsgálat során az Ea1, Ea67, Ea12, Ea15, Ea16, Ea26, Ea31 izolátumok, valamint az Eam2, Eam4, Eam6, Eam7, Eam8, Eam9 izolátumok legtöbbször egy-egy csoportot alkotnak. Az első csoportba tartozóak 1996 és 1998 között lettek izolálva, míg a másik csoportba tartozóak 2009-2012 között, melyek 6-7-8-9 SSR számmal rendelkeznek. Az Ea12, Ea15, Ea16 izolátumok *Cotoneaster* sp. növényekről származnak. Az Ea67 izolátum a körtefajtákon erősen virulens, de bakteriofág érzékenység vizsgálat során ez az egyetlen izolátum, amely két fággal (H4B, H8) szemben is rezisztensnek bizonyult. Az Ea1 izolátum a körtefajtákon szintén erősen virulens, míg mind a négy fággal homályos plakkot

képzett. Az Eam7 és az EaPlumBo1 izolátumok eltérő tenyészbélyeggel rendelkeznek a szelektív táptalajokon, de biokémiai, bakteriofág érzékenység, virulencia és a molekuláris vizsgálat (SSR) eredményei alapján megegyeznek, mindig ugyanazon csoportba tartoznak. Az Eam7 és az EaPlumBo1 izolátumokat 2011-ben izoláltuk és *Prunus* fajokról származnak. **Momol és mtsai. (1997)** vizsgálták különböző gazdanövényekről, különböző földrajzi helyekről izolált 16 *E. amylovora* törzs genetikai diverzitását. Megállapították, hogy a *Maloideae* alcsalád növényeiről izolált Ea izolátumok egy csoportot képeznek, míg a *Rosoideae* alcsaládba tartozó *Rubus*-okról származóak egy második csoportot alkotnak. A szilva izolátum 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata is alátámasztja, hogy a *Rubus* fajokról származó izolátumok a szekvencia alapján 100% homológiát mutatnak és a filogenetikai törzsfán külön ágon helyezkednek el. Feltételezhető, hogy a *Prunus* fajokról származó izolátumok is egy külön csoportot képeznek, bár ehhez több izolátum vizsgálata szükséges.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az almatermésű növényfajok legrégebbi és legveszélyesebb betegségét, az ún. „tűzelhalást” az *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. nevű baktérium okozza, mely Magyarországon zárlati (karantén) károsító. A tűzelhalás elnevezés egyértelműen utal a kórokozó által okozott perzseléses, égésszerű tünetekre. A *Rosaceae* családon belül 40 nemzetségbe tartozó 200 növényfaj tekinthető a baktérium gazdanövényének. Gazdasági szempontból a legfontosabb gazdanövényei: *Pyrus*, *Malus*, *Cydonia*, *Eryobotria*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Pyracantha*, *Photinia* és *Sorbus* fajok. A kórokozó megjelenését az elmúlt években egyre több új gazdanövényről publikálták. A világ mintegy 40 országában előfordul. A kórokozó Amerikában őshonos, Európában 1955-ben (Anglia) jelent meg, majd fokozatosan terjedt északkelet, kelet felé. Magyarországon a kórokozót és tüneteit először 1995 telén észlelték Nyárlőrinc térségében almafákon. Megjelenése óta évről-évre előfordul és a baktérium számára optimális időjárási feltételek (meleg, páras) esetén az okozott kár igen jelentős.

1996 óta számos hazai és külföldi *Erwinia amylovora* izolátum áll rendelkezésünkre, mely megtalálható a Budapesti Corvinus Egyetem Génbankjában, melyek közül 21-et választottunk a kísérletünkhöz, melyek különböző helyről, évből és gazdanövényről származnak. Valamint összesen 10 *Erwinia amylovora* izolátumot izoláltam 2009 és 2011 között termesztett gyümölcsökről és dísznövényekről. Munkánk során a fentiek tükrében célul tűztük ki az *E. amylovora* populáció jellemzését különböző tulajdonságok (tenyészbélyegek, biokémiai tulajdonságok, bakteriofág érzékenység, virulencia, genetikai tulajdonságok) alapján klasszikus és molekuláris módszerekkel.

Az *E. amylovora* izolátumokat a különböző gazdanövényekről sikeresen izoláltuk, majd tiszta tenyészetet állítottunk elő. Ezek után sikeresen elvégeztük az alapvető biokémiai és fiziológiai tulajdonságok meghatározását. Az izolátumok Gram-negatívak és dohánynövényen hiperszenzitív reakciót okoztak. Patogenitás vizsgálatuk során sikeresen fertőzték a körte gyümölcsöket. Biokémiai tulajdonságaikban az API 20E esetében megegyeznek az *E. amylovora* faj leírt tulajdonságaival.

Magyarországon elsőként azonosítottuk az *E. amylovora* kórokozót új gazdanövényről, szilváról (*Prunus domestica* d 'Agen'). Ennek az izolátumnak a klasszikus bakteriológiai módszerek mellett meghatároztuk a 16S rRNS-t kódoló DNS szakaszának nukleotid sorrendjét.

A magyar izolátum (Ea-PlumBo1), mely az NCBI adatbázisban a HE610678 nyilvántartási számon található, rokonsági viszonyainak elemzésénél megállapítottuk, hogy legközelebbi rokonságban egy német és egy angol izolátummal áll. A patogenitási tesztben körte gyümölcsöt, szilvaterméseket és fiatal szilvahajtásokat inokuláltunk, melyek erősen fertőződtek. A kórokozó klasszikus és molekuláris azonosítása és a patogenitás igazolása után bizonyítottuk, hogy a szilva új gazdanövénye a kórokozónak Magyarországon, hiszen az irodalmak alapján az USA-ból, Európában pedig csak Németországból közölték.

Az összes 31 vizsgálatba vont *E. amylovora* izolátumot először tenyészbélyegek alapján (általános és szelektív táptalajokon) hasonlítottuk össze. A King-B, a Miller-Schroth és a Kado-Heskett táptalajokon nem tudtunk különbségeket tenni az izolátumok között. A Crosse-Goodman és az Eosine Methylen Blue agar pedig alkalmas a fajon belüli csoportosításra.

Az izolátumokat összehasonlítottuk szénhidrát hasznosítás alapján, melyhez API 50CH gyorstesztet használtunk. A 49 különböző szénhidrátból mindegyik izolátum 11 félért hasznosított és 27-et egyáltalán nem a reakcióidő (48 h) végére. Az összes izolátum esetében hasznosított 11 szénhidrát között szerepeltek az *E. amylovora* szaporodásánál igen fontos és meghatározó komponensek: glükóz, fruktóz, szaharóz és szorbitol. Ezen felül pedig még volt 11 különböző szénhidrát, melyet az izolátumok eltérően hasznosítottak. A 49 féle szénhidrát hasznosítás során különbségeket fedeztünk fel a különböző gazdanövényről származó izolátumok között, amely feltételezi, hogy nem egy törzsbe tartoznak, valamint alkalmas a fajok közötti különbségek kimutatására.

Megvizsgáltuk négy különböző bakteriofág hatását is mind a 31 különböző *E. amylovora* izolátumra laboratóriumi körülmények között. Az eredmények kiértékelését a plakk-morfológia alapján végeztük, vizuális vizsgálattal. A fágok az izolátumokkal tiszta, homályos plakkokat vagy egyáltalán nem képeztek plakkokat. A tiszta plakkokat képző fágok teljesen lizálták az izolátumokat, míg a homályos plakkot képzők nem képesek teljes mértékben lizálni az izolátumokat. Két eset kivételével a bakteriofágok képesek voltak megfertőzni az *E. amylovora* izolátumokat, de több esetben hoztak létre homályos plakkot, mint tisztát. Összesen egy izolátumra bizonyult hatásosnak mind a négy fág (Ea96). Két mintában találtunk három fágtól is tiszta plakkot (Ea15, Ea70). Legkevésbé fogékonyak az Ea1; Ea6; Ea 329/98; Eam1; Eam5; Eam7 és EaPlumBo1 izolátumok bizonyultak. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a hazai fág izolátumok képesek lizálni a különböző gazdanövényekről származó *E. amylovora* izolátumokat táptalajon, bár egy-egy *E. amylovora* izolátumnak nagyon eltérő lehet az

érzékenysége a különböző fágokra. Ugyanazon fággal ugyanolyan plakkot képző izolátumok azonos csoportba, lizotípusba sorolhatóak, tehát a bateriofág érzékenység alapján szintén különbségeket lehet tenni az izolátumok között.

Az összes *E. amylovora* izolátum virulenciáját értékeltük 7 régi körtefajta gyümölcssein kialakult foltok méretéből, fertőzési skála alapján. Az Ea10, az Ea19 és az Ea29 izolátumok igen erős tüneteket okoztak a 'Drouard elnök' fajtán, míg a többi fajtán nem ezek az izolátumok okozták a legsúlyosabb elváltozásokat. Azonban van néhány izolátum, amely mindegyik fajta esetében erősen virulensnek (Ea1, Ea67) és kevésbé virulensnek (Eam7, Eam10, EaPlumBo1) bizonyult. A fajták többségében nagyobb virulenciával nem a körtéről származó izolátumok rendelkeztek, hanem az almáról, birsról származóak. Kisebb virulenciával rendelkeztek a *Prunus* fajokról származó izolátumok. A virulencia alapján különbségeket lehet tenni az *E. amylovora* izolátumok között. A körtefajtákon kialakult foltok átmérője alapján pedig meghatározhatjuk a különböző körtefajták tűzelhalás fogékonyságát is. Eredményeink alapján a 'Téli esperes', a 'Drouard elnök' igen erősen fogékonyak, az 'Eldorado', 'Serres Olivér', és a 'Diel vajkörte' közepesen, míg az 'Alexander Lucas' és a 'Stössel tábornok' csak kevésbé fogékonyak a tűzelhalással szemben. Az eredmények azt bizonyítják, hogy nem mindegy, hogy milyen körtefajtán ellenőrizzük az izolátumok virulenciáját a fertőzések elvégzése előtt, mivel a fajták fogékonysága eltérő. Valamint a fertőzési kísérletek során az izolátumok eltérő virulenciája miatt, lényeges, hogy törzskeveréket használjunk.

Minden izolátum esetében az *E. amylovora*-ra specifikus primerek segítségével megsokszorozott nukleinsav szakasz (PCR termékek) nukleotid szekvenciáját meghatároztuk. A szekvenciákban megtaláltuk az pEA29 plazmid ismétlődő régióját, az SSR-eket (short sequence repeat, rövid szekvencia ismétlődés), mely alapján a hazai *E. amylovora* izolátumok és a nemzetközi NCBI adatbázisban lévő *E. amylovora* izolátumok jól elkülöníthetők egymástól. Az *E. amylovora*-ra jellemző pEA29 plazmid ATTACAGA (ismétlődő kópiaszámának) szekvenciájának analízise azt mutatta, hogy a hazai törzsek domináns populációjában ez a szakasz 5-10-szer ismétlődik. A hazai izolátumok többsége a 7-8 szor ismétlődő szekvencia csoportba tartozik. Az SSR vizsgálat alkalmas az *E. amylovora* izolátumok közötti egyes törzsek elkülönítésére. Eredményeink alapján a hazai *E. amylovora* izolátumok között különbségeket tudunk tenni, mely alapján megállapítottuk, hogy egy változatos *E. amylovora* eltérő törzsekből álló populációt alkotnak, ahol a gazdanövény, a földrajzi hely, valamint az izolálás éve, nem függ össze az izolátumok SSR számaival.



A hazai *Erwinia amylovora* populáció homológiáját vizsgálva a különböző tulajdonságok alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a populáció eltérő törzsekből áll, melyek nagy diverzitást mutatnak. Az Eam7 és az EaPlumBo1 izolátumokat 2011-ben izoláltuk és *Prunus* fajokról származnak, melyek eltérő tenyészbélyeggel rendelkeznek a szelektív táptalajokon, de biokémiai, bakteriofág érzékenység, virulencia és a molekuláris vizsgálat (SSR) eredményei alapján megegyeznek, egy csoportot alkotnak. Feltételezhető, hogy a *Prunus* fajokról származó izolátumok az *Erwinia amylovora* egy külön csoportját (rasszát) alkotják, bár ehhez több izolátum összehasonlító vizsgálata szükséges.

## 7. SUMMARY

The oldest and most dangerous disease of pome fruits, the fire blight is caused by the so-called *Erwinia amylovora* bacteria, (Burrill) Winslow *et al.*, which is a quarantine pathogen in Hungary. The term 'fire blight' clearly indicates the symptoms of burning caused by the pathogen. Within the *Rosaceae* family, 200 plant sorts belonging to 40 genera can be considered host plants for the bacterium. Major host plants from an economic viewpoint: *Pyrus*, *Malus*, *Cydonia*, *Eryobotria*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Pyracantha*, *Photinia* and *Sorbus* sorts. The appearance of the pathogen has been published for an increasing number of new host plants in the recent years. It occurs in ca. 40 countries of the world. The pathogen is native in America, and appeared in Europe (England) in 1955, then gradually spread towards north-east and east. The pathogen and its symptoms were first discovered in Hungary on apple trees in the region of Nyárlőrinc in the winter of 1995. Since its appearance, it has been occurring year from year, and the damage caused by it can be very significant in the case of optimal weather terms (high temperature and humidity).

Since 1996, several Hungarian and foreign *Erwinia amylovora* isolates have been available for us in the Gene Bank of the Corvinus University of Budapest, from which 21 have been selected for our experiment from different locations, years and host plants. All of the 10 *Erwinia amylovora* isolates have been made by me from fruits and or ornamental plants grown between 2009 and 2011. During our work, our aim was to characterise the *E. amylovora* population on the basis of various properties (breed stamps, biochemical properties, bacteriophage sensitivity, virulence, genetic properties) with classic and molecular methods.

The *E. amylovora* isolates were successfully prepared from various host plants and then pure cultures were made. Subsequently, basic biochemical and physiological properties were specified. The isolates are Gram negative and caused hypersensitive reaction on tobacco plants. During their pathogenic study the successfully infected pear fruits. Their biochemical properties are identical to the specified properties of the *E. amylovora* sort in the case of API 20E.

We were the first in Hungary to identify the *E. amylovora* pathogen from a new host plant, the plum (*Prunus domestica* d 'Agen'). In addition to the classic bacteriologic methods, the nucleotide sequence of the DNA section coding the 16S ribosomal RNA was also specified for

this isolate. As regards the relationships of the Hungarian isolate (Ea-PlumBo1) available under accession number HE610678 in the NCBI database, during the analysis we have found that a German isolate and an English one are most closely related to it. In the pathogenicity test, fruits, plums and young plum growths were inoculated, which then got heavily infected. After classical and molecular identification of the pathogen and confirmation of pathogenicity, we proved that the plum is a new host plant for the pathogen in Hungary, since based on the literature it has been announced in the US, and - within Europe – only in Germany.

All the 31 *E. amylovora* isolates involved in the test were compared first on the basis of breed stamps (in general and selective mediums). In King-B, Miller-Schroth and Kado-Heskett mediums, we could not distinguish the isolates. The Crosse-Goodman and Eosine Methylene Blue agars are already suitable for classification within the sort.

The isolates were compared on the basis of carbohydrate utilisation, for which API 50CH fast test was used. From the 49 various carbohydrates, each isolate utilised 11 types and did not utilise 27 types at all by the end of the reaction time (48 h). The 11 hydrocarbons utilised by all isolates included very important and decisive components in the growth of *E. amylovora*: glucose, fructose, saccharose and sorbitol. In addition, there fore 11 additional various carbohydrates which were utilised by the isolates in a different way. In the utilisation of the 49 types of carbohydrate, differences were found between the isolates from various host plants, based on which we can assume that they do not belong to the same breed, and that they are suitable for the detection of differences between the sorts.

We have examined also the effect of the four various bacteriophages on the 31 different *E. amylovora* isolates under laboratory conditions. The results were evaluated with visual tests on the basis of the plaque morphology. The phages formed clear or cloudy plaques or did not form plaques at all with the isolates. Phages forming clear plaques fully lysated the isolates, while those forming cloudy plaques are not able to fully lysate the isolates. Except for two cases, the bacteriophages were able to infect the *E. amylovora* isolates; however, they created cloudy plaques more often than clear ones. The four phages proved to be effective only on one isolate (Ea96). Clear plaque was found in two samples of three phages (Ea15, Ea70). Ea1, Ea6, Ea 329/98, Ea1, Ea5, Ea7 and EaPlumBo1 isolates proved to be the least susceptible. Based on our results we found that the Hungarian phage isolates are able to lysate *E. amylovora* isolates deriving from various host plants in a medium, though any *E. amylovora* isolate may have very different sensitivities to the various phages. Isolates forming the same plaques with

the same phages can be classified into the same group, lysotype, i.e. isolates can be distinguished also on the basis of their bacteriophage sensitivity.

All *E. amylovora* isolates were evaluated for their virulence on the basis of the sizes of spots developing on the fruits of 7 old pear sorts, in accordance with the infection scale. Isolates Ea10, Ea19 and Ea29 caused very intensive symptoms on sort ‘Drouard elnök’, while the most severe damages to the other sorts were caused by not these isolates. However, there are several isolates which proved to be very virulent (Ea1, Ea67) and less virulent (Eam7, Eam10, EaPlumBol) in the case of each sort. Instead of isolates from pear, those deriving from apple and quince had the most intensive virulence in the majority of the sorts. Isolates from *Prunus* sorts had lower virulence. *E. amylovora* isolates can be distinguished on the basis of virulence. The sensitivity of the various pear sorts to fire blight can be determined also on the basis of the diameter of spots developing on the pear sorts. Based on our results ‘Téli esperes’, ‘Drouard elnök’ are very intensively sensitive, ‘Eldorado’, ‘Serres Olivér’ and ‘Diel vajkörte’ are moderately sensitive, while ‘Alexander Lucas’ and ‘Stössel tábornok’ are only slightly sensitive to fire blight. The results prove that testing of the virulence of the isolates before infections depend on the pear sort as the sensitivities of the sorts are varying. In addition, it is important to use a breed mix due to the varying virulence of the isoletes.

We have determined the nucleotide sequence of the PCR products multiplied by means of primers specific to *E. amylovora* in the case of each isolate. In the sequences, we have found plasmid repetitive regions of the pEA29, the SSRs (short sequence repeats), based on which the Hungarian *E. amylovora* isolates and *E. amylovora* isolates included in the international NCBI database can be well distinguished. The analysis of the ATTACAGA sequence (repetitive copy number) of the pEA29 plasmid characteristic of *E. amylovora* showed that this section repeats 5 to 12 times in the dominating populations of the Hungarian isolates. The majority of the Hungarian isolates belong to the sequence group of 7 to 8 repetitions. The SSR test is suitable for the distinguishing of the individual breeds between the *E. amylovora* isolates. Based on our results, we can make distinctions between the Hungarian *E. amylovora* isolates, based on which we have found that they constitute a population of varying *E. amylovora* lines, where the host plant, the geographic location and the year of isolation do not depend on the SSR numbers of the isolates.

Examining the Hungarian *Erwinia amylovora* population based on the different characteristics we can draw the conclusions that the population consists of different strains,

which show great diversity. We isolated Eam7 and EaPlumBo1 isolates from *Prunus* host plants in 2011, which have different colony types on the selective medium. According to the results of biochemical, bacteriophages sensitivity, virulence and molecular examinations (SSR) of the above mentioned Eam7 and EaPlumBo1 isolates can be considered the same, they make one group. We can assume that the isolates from *Prunus* host plants belong to a separate group of *Erwinia amylovora*, but although we need to further isolate testing necessary.

## MELLÉKLETEK

### 1. melléklet: Irodalomjegyzék

1. **Adams, M. H.** (1959): Bacteriophages. Interscience Publishers, New York. 592 p.
2. **Agrios, N. G.** (1997): Plant Patology (4th Edition). London: Academic press. 413 p.
3. **Al-Arabi, K. F.** (2002): Novel anatagonistic bacteria as prospective agents for the biocontrol of some plant bacterial disease. Doktori disszertáció.
4. **Arsenijević, M., Panić, M., Antonijević, D.** (1991): Fire blight of pomoceous trees in Yugoslavia. *Plant Protection* 42: 87-97 p.
5. **Arsenijević, M., Panić, M.** (1992): First apperance of fire blight, caused by *Erwinia amylovora*, on quince and pear in Serbia. *Plant Disease* 76 (12): 1283 p.
6. **Balaž, J.** (1999): Status of *Erwinia amylovora* in Yugoslavia: Distribution, identification and control. *Acta Horticulturae* 489: 99-103 p.
7. **Balaž, J., Knežević, T., Smiljanić, A., Stojšin, V.** (2004): *Chaenomeles Japonica Cotoneaster horisontalis*, new host of *Erwinia amylovora* in Serbia. *Abstracts of 10th International Workshop on Fire Blight*, Bologna, Italy 5-9 July 2004. Abstracts 22.
8. **Balaž, J., Keserović, Z., Aćimović, S., Nikolić, Z., Mažić, J.** (2009): *Erwinia amylovora* u Vojvodini i postupci za stavljanje pod kontrolu. Biljni lekar, vanredni broj, 46-56 p.
9. **Baranyi T., Valovics A.** (2011): Engedélyezett biológiai készítmények kertészeti kultúrákban. *Mezőhír* 11-12: 96-97 p.
10. **Barionovi, D., Giorgi, S., Stoeger, A. R., Ruppitsch, W., Scortichini, M.** (2006): Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using repetitive-sequences PCR analysis, and restriction fragment lenght polymorphism and short-sequence DNA repeats of plasmid pEA29. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1084-1094 p.
11. **Bastas, K. K., Katircioglu, Y. Z.** (1998): Studies on fireblight (*Erwinia amylovora* Burr. Winslow et al.) on pome fruit trees in Konya province in Turkey. *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 21.

12. **Battilani, P., Mazzoli, L., Mazzucchi, U.** (1998): A geophytopathological study of fireblight in pear growing-area of the Po valley (Northern Italy). *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 17.
13. **Bellini, E., Nin, S.** (1997): Il miglioramento genetico del pero nel mondo. *Rivista di Frutticoltura* 3:19-30 p. In: Göndör J- né. (szerk.) (2000): *Körte*. Budapest: Mezőgazda Kiadó.
14. **Benlioglu, K., Özakman, M.** (1998): Characterization of Turkish isolates of *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al. *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 24.
15. **Bereswill, S., Jock, S., Belleman, P., Geider, K.** (1998): Identification of *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containig copper sulfate and by capsule stainig with lecitin. *Plant Disease* 82 (2) 158-164 p.
16. **Berger, F., Frehland, E., Köstler, N., Pick, T., Schuster, M., Wesche, J., Zeller, W.** (1998): Biocontrol of fire blight with bacterial antagonists. *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 122.
17. **Bernet, C., Garret, M., de Barbeyrac, B., Bebear, C., Bonnet, J.** (1989): Detection of *M. pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 27 (11) 2492-2496 p.
18. **Bonn, W. G., van der Zwet, T.** (2000): Distribution and economic importance of fire blight. In: Vanneste J. L. (ed.): *Fire blight. The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing 37- 54 p.
19. **Boyd, R. J., Hildebrandt, A. C., Allen, O. N.** (1971): Retardation of crown gall enlargement after bacteriophage treatment. *Plant Disease Reorter* 55: 145–148 p.
20. **Böszörményi, É., Érsek, T., Fodor, A., Földes, L. Sz., Hevesi, M., Hogan, J. S., Katona, Z., Klein, M. G., Kormány, A., Pekár, Sz., Szentirmai, A., Sztaricskai, F., Taylor, R. A. J.** (2009): Isolation and activity of *Xenorabdus* antimicrobial compounds against the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Phytophthora nicotianae*. *Journal Applied Microbiology* 107 (3): 746-759 p.
21. **Bubán T.** (2004): A 10. Nemzetközi Tüzelhalás Munkaértekezlet tapasztalatai. *Növényvédelem* 40 (12): 619-632 p.

22. **Burrill, A. C.** (1882): The bacteria: an account of their nature and effects, together with a systematic description of the species. III. Indus. Univ. Ann. Rpt. 11: 93-157 p.
23. **Calzolari, A., Finelli, F., Mazzoli, G. L.** (1998): A severe unforeseen outbreak of fireblight in the Emilia-Romagna-Region. *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 32.
24. **Chester, F. D.** (1897): A preliminary arrangement of the species of the genus bacterium; bacteria associated with diseases of plants; notes on pear blight; pear canker treatment. Del. Agr. Expt. Sta. Ann. Rpt. 9: 127 p.
25. **Choi, S. T., Ahn, H. K., Chang, Y. D.** (1996): Effect of crude extracts and chopped shoot application of *Allium* spp. on rice growth. *Korean Journal of Crop Science* 41: 625-633 p.
26. **Civerolo, E. L., Keil, H. L.** (1969): Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology* 59: 1966–1967 p.
27. **Clarridge, J. E.** (2004): Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 840-862.
28. **Couée, I., Sulmos, C., Gousbet, G., El Armani, A.** (2006): Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 57 (3): 449-459 p.
29. **Coxe, W.** (1817): Pears. His Cultivation of Fruit Trees. Philadelphia. 175-176 p.
30. **Crosby, J. A., Janick, J., Pecknold, P. C., Korban, S. S., O'connor, P. A., Ries, S. M., Goffreda, J., Voordeckers, A.** (1992): Breeding apples for scab resistance: 1945–1990. *Fruit Var. J.* 46 (3): 145–166 p.
31. **Crosse, J. E., Goodman, R. N.** (1973): A selective medium for and a definitive colony characteristic of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 63: 1425-1426 p.
32. **Csete S., Garai A., Zsolnai G.** (2004): Helyzetkép a tűzelhalásról 2004 tavaszán Borsod-Abaúj-Zemplén megyében. *Gyakorlati Agroforum* 15 (3): 68-69 p.
33. **Demir, G., Gondogdu, M.** (1993): Fire blight of pomefruit trees in Turkey: distribution of the disease, chemical control of blossom infection and susceptibility of some cultivars. *Acta Horticulture* 338: 67-74 p.
34. **Dénes Z.** (2007): Újra itt a tűzelhalás. <http://mno.hu/portal/415108>, 2007. június 9.



35. **Dreo, T., Zupancic, M., Demsar, T., Ravnikar, M.** (2006): First outbreak of fire blight in Slovenia. *Acta Horticulturae* 704: 37-41 p.
36. **Duffy, B., Patocchi, A., Dandekar, M.** (2008): S6PDH- altered transgenic apples demonstrate a lack of sorbitol shoot content influence on fire blight. *Acta Horticulturae* 573: 279-283 p.
37. **Edgecomb, D. W., Manker, D.** (2006): *Bacillus subtilis* QST 713, bacterial disease control in fruit, vegetable and ornamental production. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International symposium on biological control of bacterial plant diseases* 408: 167-169 p.
38. **Elkins, R. B., Ingels, C. A., Lindow, S. E.** (2005): Control of fire blight by *Pseudomonas fluorescens* A506 Introduced into unopened pear flowers. *Acta Horticulturae* 671: 585-594 p.
39. **Erskine, J. M.** (1973): Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in epidemiology of fire blight. *Canadian Journal of Microbiology* 19 (7): 837-845. p.
40. **Ertl, C., Mögel, G., Kunz, S., Donat, C., Danner, H.** (2007): From the laboratory to the market – The success story of Blossom Protect. *Abstracts of 11<sup>th</sup> International workshop on Fire Blight*, Portland, Oregon 12-17 August, 2007. Abstracts: 79.
41. **Evans, I. R.** (1996): Fire blight of raspberries in Alberta. *Acta Horticulturae* 41:69-72 p.
42. **Falkenstein, H., Bellemann, P., Walter, S., Zeller, W., Geider, K.** (1988): Identification of *Erwinia amylovora*, the fireblight pathogen, by colony hybridization with DNA from plasmid pEA29. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2798-2802 p.
43. **Fischer, C.** (1996): Schorfresistenzzüchtung beim Apfel-Ergebnisse und Strategie zur Stabilität der Resistenz. *Erwerbsobstbau* 38: 71–76 p.
44. **Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., Deley, J.** (1989): Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck, 1988) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. Nov. as *Pantoea agglomerans* comb. Nov. and discription of *Pantoea dispersa* sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 337-345 p.
45. **Gavrilović, V., Arsenijević, M.** (1998): Vatreni trn- novi domaćini bakterije *Erwinia amylovora* za našu zemlju. *Biljni lekar*. 1: 52-55 p.

46. **Geider, K.** (2005): Molecular detection of fire blight and differentiation of *Erwinia amylovora* strains. *Phytopathol. Pol.* 35: 57-68 p.
47. **Gill, J. J., Svircev, A. M., Smith, R., Castle, A. J.** (2003): Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2133–2138 p.
48. **Göndör J. -né.** (szerk.) (2000): Körte. Budapest: Mezőgazda Kiadó.
49. **Hajósné Novák M.** (1999): Genetikai variabilitás a növénynemesítésben. Budapest: Mezőgazda Kiadó.
50. **Hauben, L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J.** (1998): Phylogenetic Position of Phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*; System. *Journal Applied Microbiology* 21: 384-397 p.
51. **Hasler, T., Vogelsanger, K., Schoch, B.** (1996): Disinfection of fire blight contaminated tools. *Acta Horticulturae* 411: 369-371 p.
52. **Hassanzadeh, N.** (1998): An integrated approach to control the fireblight disease in Iran. *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 126.
53. **Hassanzadeh, N.** (2006): An attempt to increase to efficacy of copper compounds emended with essential oils against fire blight. *Acta Horticulturae* 704: 265-269 p.
54. **Hevesi M.** (1996): Az *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al. hazai megjelenése almán. *Növényvédelem* 32 (5): 225-228 p.
55. **Hevesi, M., Al-Arabi, K. F.** (1999): Isolation of epiphytic bacterium antagonistic to *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* 489: 619-622 p.
56. **Hevesi, M., Papp, J., Jámor- Benczúr, E., Kaszáné Csizmár, K., Pozsgai, I., Gazdag, Gy., Balla, I.** (2000): Testing of virulence of some Hungarian *Erwinia amylovora* strains on in vitro cultured apple rootstocks. *Horticultural Science* 6 (4): 52-55 p.
57. **Hevesi, M., Farkas, Á., Kása, K., Orosz-Kovács, Zs.** (2004<sup>a</sup>): Carbohydrate utilization of *Erwinia amylovora* in vitro. *International Journal of Horticultural Science* 10 (2): 31-34 p.
58. **Hevesi, M., Göndör, M., Kása, K., Honty, K., Tóth, M.** (2004<sup>b</sup>): Traditional and commercial apple and pear cultivars as sources of resistance to fire blight. *OEPP/EPPO Bulletin* 34: 377-380 p.

59. **Hevesi, M., Al-Arabi, K. F., Göndör, M., Papp, J., Honty, K., Kása, K., Tóth, M.** (2006<sup>a</sup>): Development of eco-friendly strategies for the control of fire blight in Hungary. *Acta Horticulturae* 704: 345-348 p.
60. **Hevesi, M., Al-Arabi, K. F., Tóth, M., Palkovics, L.** (2006<sup>b</sup>): *Pantoea agglomerans* is effective against different plant bacterial diseases.; 126-128 p.. In: Stich K. et al.: Pome Fruit Health Research in Europe. Current Status 2006. Proceedings of the combined Working Groups 1-4 and Executive Committee Meeting of Cost Action 864: 20-21 p.
61. **Hevesi, M., Bója, N., Bánátfy, R., Babulka, P., Tóth, M.** (2006<sup>c</sup>): *In vitro* inhibition of growth of *Erwinia amylovora* by plant oils. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases* 408: 262-264 p.
62. **Hevesi, M., Hudák, I., Dorgai, L., Szentkirályi, A., Bubán, T.** (2006<sup>d</sup>): *Pantoea agglomerans* HIP32: a new bacterial antagonist to *Erwinia amylovora*. *Phytopathol Pol* 39: 79-85 p.
63. **Hevesi, M., Tornai-Lehoczki, J., Tóth, M., Végh, A., Petróczy, M., Palkovics L.** (2008): Characterization of HIP 32 bacterium antagonistic to *Erwinia amylovora*. Host Pathogen Interactions In Pome Fruits. Abstracts of the Working Groups 1-3 and Management Committee Meeting and Joint Meeting of Cost Action 864: 52-53 p.
64. **Hevesi M., Végh A., Tóth M.** (2009): A tűzelhalás múltja és jelene. *Agrofórum Extra* 28: 90-91 p.
65. **Holt-Harris, J. E., Teague, O.** (1916): A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosa* from stools. *Journal of Infectious Diseases* 18: 596 p.
66. **Honty, K., Hevesi, M., Göndör, M., Tóth, M., Bács-Várkuti, V., Ferenczy, A.** (2004): Susceptibility of some traditional pear cultivars of Hungarian and foreign origin to the pathogenic bacterium *Erwinia amylovora*. *International Journal of Horticultural Science* 10: 41-45 p.
67. **Honty, K., Göndör, M., Tóth, M., Kása, K., Hevesi, M.** (2006): Susceptibility of pear cultivars to fire blight in Hungary. *Acta Horticulturae* 704: 583-587 p.
68. **Honty K.** (2011): Körtefajták tűzelhalással szembeni ellenállósága és a betegség folyamatának jellemzése néhány biokémiai paraméter vizsgálatával. Doktori disszertáció.
69. **Horsfall, J. G., Barratt, R. W.** (1945): An improved grading system for measuring plant disease. *Phytopathology* 35: 655 p.

70. **Hugh, R., Leifson, E.** (1953): The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 66: 24-26 p.
71. **Ishimaru, C., Klos, E. J.** (1984): New Medium for Detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology* 74: 1342-1345 p.
72. **Jacob, H. J., Lindpaintner, K., Lincoln, S. E., Kusumi, K., Bunker, R. K., Mao, Yi-Pei., Ganten, D., Dzau, V. J., Lander, E. S.** (1991): Genetic mapping of gene causing hypersensitive rat. *Cell* 67: 213-224 p.
73. **Jock, S., Jacob, T., Kim, W.-S., Hildebrand, M., Vosberg, H.-P., Geider, K.** (2003): Instability of short-sequence DNA repeats of pear pathogenic *Erwinia* strains from Japan and *Erwinia amylovora* fruit tree and raspberry strains. *Molecular Genetics and Genomics* 268: 739–749 p.
74. **Johnson, K. B., Stockwell, V. O.** (1998): Management of fire blight. A case study in microbial ecology. *Annual Review of Phytopathology* 36: 227-248 p.
75. **Kado, C. I., Heskett, M. G.** (1970): Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976 p.
76. **Keck, M., Chartier, R., Zislavsky, W., Paulin, J. P.** (1990): Sensitivity of *Erwinia amylovora* to high temperatures- possible use of heat treatment for plant propagation material. *Acta Horticulturae* 338: 311-316 p.
77. **Keck, M., Zislavsky, W., Chartier, R., Lecomte, P., Paulin, S. P.** (1993): Use of heat treatment to free propagation plant material from contamination of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulture* 338: 311-316 p.
78. **Keck, M., Reich, H., Chartier, R., Paulin, J. P.** (1996): First record of fire blight (*Erwinia amylovora*) in Austria. Preliminary Experiments on The Survival on Fruit Boxes. *Acta Horticulturae* 411:9-11 p.
79. **Keck, M., Chartier, R., Lecomte, P., Reich, H.** (1997): First characterization of *Erwinia amylovora* isolates from Austria and fire blight susceptibility of some genotypes from Central Europe. *Journal of Plant Diseases and Plant Protection* 104: 17-22 p.
80. **Keck, M., Hevesi, M., Ruppitsch, W, Stoeger, A., Richter, S.** (2002): Spread of fire blight in Austria and Hungary-variability of *Erwinia amylovora* strains. *Plant Protection Science* 38: 49-55 p.

81. **Kim, W. S., Geider, K.** (1999): Analysis of variable short-sequence DNA repeats on the 29 kp plasmid of *Erwinia amylovora* strains. *European Journal of Plant Pathology* 105: 703-713 p.
82. **King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E.** (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307 p.
83. **Kiss Gy. B.** (1999): A növényi molekuláris DNS szerveződése 11-36. In: Balázs E. és Dudits D. (szerk.): Molekuláris növénybiológia. Szemelvények. Budapest: Akadémiai Kiadó. 706 p.
84. **Klement, Z.** (1963): Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* 199- 300 p.
85. **Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C.** (1990): Methods in Phytobacteriology. Budapest: Akadémiai Kiadó. 53-210 p.
86. **Koch, R.** (1876): Untersuchungen Über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten. Leipzig: F. C. W. Vogel. 8-62 p.
87. **Kolozsvári Nagy, J., Király, L., Schwarczinger, I.** (2012): Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Central European Journal of Biology* 7 (1): 1-12 p.
88. **Korba, J., Sillerova, S.** (2010): First occurrence of fire blight infection on apricot (*Prunus armeniaca*) in Czech Republic. *Abstracts of 12<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Warsaw, Poland 16-20. August 2010. Abstracts: 107.
89. **Kokosková, B.** (1996): Uncinnost antagonistických bakterií a chemikálií proti bakteriím *Erwinia amylovora* v podmínkách in vitro. *Ochrana Rostlin*. 29 (1): 31-39 p.
90. **László Gy.** (2008): Az almatermésűek tűzelhalása (*Erwinia amylovora*) elleni új védekezési lehetőség Magyarországon. *Növényvédelem* 44 (3): 147-149 p.
91. **Lecomte, P., Manceau, C., Paulin, J. P., Keck, M.** (1997): Identification by PCR analysis on plasmid pEA29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. *European Journal of Plant Pathology* 103: 91-98 p.
92. **Lecomte, P., Paulin, J. P., Audusseau, C., Huberdeau, D.** (1996): Az *Erwinia amylovora* szerepe az almaalanyok elhalásában (in French, ford. Böszörményi E.) *Phytoma* 486: 36-40 p.

93. **Le Lezeč, M., Belouin, A.** (1991): L'Amélioration du poirier pour la resistance au feu bacterien. *L' Arboriculture Fruitière* 440: 29-37 p.
94. **Le Lezeč, M., Laurens, F., Michelesi, J.** (1998): Suscettibilità varietale del melo e del pero al „colpo di fuoco batterico”. *Rivista di Frutticoltura* 98 (3): 9-14.
95. **Lelliot, R. A., Billing, E., Hayward, A. C.** (1966): A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. *Journal of Applied Bacteriology* 29: 470-489 p.
96. **Lelliot, R. A., Dickey, R. S.** (1984): Genius VII. *Erwinia amylovora* Winslow et al. In: N. R. Krieg (ed.): *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore 1: 169-471 p.
97. **Lindow, S. E., McGourty, G., Elkins, R.** (1996): Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A 506 in the control of fire blight and frost injury to pear. *Phytopathology* 86 (8): 841-848 p.
98. **Lombard, P., Hull, J., Westwood, M. M.** (1980): Pear cultivaries of North America. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 34 (4): 74-83 p.
99. **López, M. M., Gorris, M. T., Llop, P., Berra, D., Borrueal, M., Plaza, B., Garcia, P., Palomo, J. L., Cambra, M.** (1998): Fire Blight in Spain: situation and monitoring. *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 34.
100. **Mallmann, W. L., Hemstreet, C.** (1924): Isolation of an inhibitory substance from plants. *Journal of Agricultural Research* 28: 599-602. p.
101. **Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E. F.** (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd volume). New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
102. **Mazzucchi, P.** (1977): *Elementi di batteriologia fitopatologica*. Vol. I. Pitagora. Editrice Bologna, 176 p.
103. **McGhee, G. C., Jones, A. L.** (2000): Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain Ea88: gene organization and intraspecies variation. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 66 (11): 4897-4907 p.
104. **Mérő F.** (2004): Helyzetkép a tűzelhalásról 2004 tavaszán Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében. *Gyakorlati Agroforum* 15 (3): 70-71 p.
105. **Miller, T. D., Schroth, M. N.** (1972): Monitoring the Epiphytic Population of *Erwinia amylovora* on Pear with a Selective Medium. *Phytopathology* 62: 1175-1182 p.

106. **Mitrev, S.** (1996): Fire blight of pomaceous fruit trees in Macedonia- characteristics of the pathogen *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* 411: 189 p.
107. **Mohan, S. K.** (2007): Natural infection of shoot blight in Pluot® caused by *Erwinia amylovora*. *Abstracts of 11<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Portland, Oregon 12-17. August 2007. Abstracts: 64.
108. **Mohan, S. K., Bijman, V. P.** (1998): Susceptibility of *Prunus* species to *Erwinia amylovora*. *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 27.
109. **Mohan, S. K., Thomson, S. V.** (1996): An outbreak of fire blight in plums. *Acta Horticulturae* 411: 73-76 p.
110. **Mohácsy M., Porpáczy A.** (1958): A körte termesztése és nemesítése. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó.
111. **Momol, M. T., Momol, E. A., Lambay, W. F., Norelli, J. L., Beer, S. V., Aldwinckle, H. S.** (1997): Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). *Journal of Applied Microbiology* 82: 389–398 p.
112. **Moore, E. S.** (1926): d’Hellere’s bacteriophage in relation to plant parasites. *South African Journal of Science* 23: 306 p.
113. **Mosch, J., Zeller, W.** (1989): Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) with selected plant extracts. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 41 (8-9) 149-151 p.
114. **Mosch, J., Zeller, W., Rieck, M., Ulrich, W.** (1996): Further studies on plant extracts with a resistance induction effect against *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae* 411: 361-366 p.
115. **Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.** (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (1): 263-273 p.
116. **Müller, I., Jelkmann, W., Geider, K., Lurz, R.** (2010): Properties of *Erwinia amylovora* Phages from North America and Germany and Their Possible Use to Control Fire Blight. *Acta Horticulturae* 896: 417-419 p.
117. **Németh J.** (1997): Az almatermésűek baktériumos hajtásszáradása és elhalása (tűzelhalás) kórokozó: *Erwinia amylovora*. Alapvető ismeretek a betegségről és az ellene

- való védekezés lehetőségéről: Szakmai információs anyag. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft.
118. **Németh, J.** (1999): Occurrence and spread of fire blight (*Erwinia amylovora*) in Hungary (1996-1998), management of the disease. *Acta Horticulturae* 489: 177-185 p.
  119. **Ocskó Z., Erdős Gy., Molnár J., Eke I.** (2011): Növényvédő szerek, termésmenvelő anyagok I. Budapest: Agrinex Bt..
  120. **OEPP/EPPO.** (1983): Data sheets on quarantine organisms No. 52., *Erwinia amylovora*. *OEPP/EPPO Bulletin* 13: 1-6 p.
  121. **Osborn, A. M., Moore, E. R. B., Timmis, K. N.** (2000): An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* 2:39-50.
  122. **Öden, S.** (1998): Occurrence of fire blight in pear trees grown in Van and around. *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 20.
  123. **Özaktan, H., Bora, T.** (2006): Studies on biological control of fire blight with some antagonistic bacteria. *Acta Horticulturae* 704: 337-339 p.
  124. **Pálfi K., Vendrei Zs., Csete S., Simon Z., Sótónyi J., Lőrinczné Izsáki G.** (2000): Az almatermésűek tűzelhalásos betegsége (*Erwinia amylovora*) Magyarországon, 2000-ben. *Integrált termesztés a kertészeti és szántóföldi kultúrában* 21: 12-17 p.
  125. **Paulin, J. P., Keck, M., Chartier, R., Zislavsky, W.** (1990): Versuche zur Beurteilung der Feuerbrandanfälligkeit von Kernobstsorten nach Infektion unreifer Früchte. *Pflanzenschutzberichte* 51 (2): 91-98 p.
  126. **Pejchinovski, F. D.** (1996): Fire blight in Republic of Macedonia (distribution and control). *Acta Horticulturae* 411: 17-20 p.
  127. **Percival, M. S.** (1961): Types of nectar in angiosperms. *New Phytologist* 60: 235- 281 p.
  128. **Petzold, H.** (1984): Birnensorten. Leipzig: Neumann Verlag.
  129. **Powney, R., Smits, T. H., Sawbridge, T., Frey, B., Blom, J., Frey, J. E., Plummer, K. M., Beer, S. V., Luck, J., Duffy, B., Rodoni, B.** (2011): Genome sequence of an *Erwinia amylovora* strain with pathogenicity restricted to Rubus plants. *Journal Bacteriology* 193 (3): 785-786 p.



130. **Puskás A.** (1986): Ipari mikrobiológiai gyakorlatok. Kézirat, Budapesti Műszaki Egyetem, Vegyészmérnöki Kar. Tankönyvkiadó, Budapest. 48-50 p.
131. **Richter, K.** (1998): Detection of *Erwinia amylovora* cells in apple shoot. *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 104.
132. **Roitsch, T.** (1999): Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion of Plant Biology* 2: 198-206 p.
133. **Römmelt, S., Plagge, J., Treutter, D., Zeller, W.** (1998): Fire blight control in apple using products based on mineral powders. *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 127.
134. **Ruppitsch, W., Stoeger, R. A., Keck, M.** (2004): Stability of short sequence repeats and their application for the characterization of *Erwinia amylovora* strains. *FEMS Microbiology Letters* 234 (1): 1-8 p.
135. **Saccardi, A., Gambin, E., Zaccardelli, M., Barone, G., Mazzucchi, U.** (1993): *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* control trials with phage treatments on peaches in the orchard. *Phytopathologia Mediterranea* 32: 206–210 p.
136. **Sárdi, É., Velich, I., Hevesi, M., Klement, Z.** (1996): The role of endogenous carbohydrates in the Phaseolus-Pseudomonas host-plantage interaction. 1. *Bean ontogenesis and endogenous carbohydrate components*. *Horticultural Science* 28: 65-69 p.
137. **Sárdi, É., Velich, I., Hevesi, M., Klement, Z.** (1999): Ontogenesis- and biotic stress-dependent variability of carbohydrate content in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 54 (9-10): 782-787 p.
138. **Schnabel, E. L., Fernando, W. G. D., Meyer, M. P., Jones, A. L., Jackson, L. E.** (1998): Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol. *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 135.
139. **Schnabel, E. L., Fernando, W. G. D., Meyer, M. P., Jones, A. L., Jackson, L. E.** (1999): Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol. *Acta Horticulturae* 489: 649–654 p.
140. **Schnabel, E. L., Jones, A. L.** (1998): Instability of a pEA29 Marker in *Erwinia amylovora* previously used for strain classification. *Plant Disease* 82: 1334-1336 p.

141. **Schnabel, E. L., Jones, A. L.** (2001): Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (1): 59-64 p.
142. **Schwarzinger, I., Tóth, M., Hevesi, M.** (2011): Control of Fire Blight by Bacteriophages on Apple Flowers. *Acta Horticulturae* 896: 457-462. p.
143. **Sebahia, M., Bocsanczy, A. M., Biehl, B. S., Quail, M. A., Perna, N. T., Glasner, J. D., DeClerck, G. A., Cartinhour, S., Schneider, D. J., Bentley, S. D., Parkhill, J., Beer, S. V.** (2010): Complete genome sequence of the plant pathogen *Erwinia amylovora* strain ATCC 49946. *Journal Bacteriology* 192 (7): 2020- 2021 p.
144. **Seibold, A., Giesen, N., Jelkmann, W.** (2006): Antagonistic activities of different yeast spp. against *Erwinia amylovora*. *Proceedings of 1<sup>st</sup> International symposium on Biological Control of Bacteria Plant Diseases* 408: 254-257 p.
145. **Severin, V., Constantinescu, F.** (1998): Appearance, expansion and chemical control of fire blight (*Erwinia amylovora*) in Romania. *Abstracts of 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight*, Kusadasi, Turkey 12-15. October 1998. Abstracts: 15.
146. **Shabi, E., Zutra, D.** (1987): Outbreaks of fire blight in Israel in 1985 and 1986. *Acta Horticulturae* 217: 23-31 p.
147. **Smits, T. H., Rezzonico, F., Kamber, T., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J. E., Duffy, B.** (2010): Complete Genome Sequence of the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and Comparison to Other *Erwinia* spp. *Journal Molecular Plant- Microbe Interactions* 23 (4): 384-393 p.
148. **Sobiczewski, P.** (1996): Fire blight (*Erwinia amylovora*) in Poland and its control. *7th EPPO Workshop*, Nitra, Slovak Republik.
149. **Sobiczewski, P., Deckers, T., Pulawska, J.** (1997): Fire blight (*Erwinia amylovora*), Some Aspects of Epidemiology and Control. *Research Institute of Pomology and Floriculture*, Poland 43-46 p.
150. **Spotts, R. A., Mielke, E. A.** (1999): Resistance of pear cultivars in Oregon to natural fire blight infection. *Fruit Varieties Journal* 53 (2): 110-115 p.
151. **Stanier, T., McSharry, J., Speitel, T.** (1967): *Agrobacterium tumefaciens* conn IV. bacteriophage PB2 and its inhibitory effect on tumor induction. *Journal of Virology* 1: 268–273 p.

152. **Starr, M. P.** (1981): The genus *Erwinia*; In: Starr M. P., Stolp H., Truper H. G., Balows A., Schlegel H. G. (ed.): The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Vol 2. New York, Springer Verlag. 1260-1271 p.
153. **Steiner, P. W.** (1990): Predicting Apple Blossom Infections by *Erwinia amylovora* Using the Maryblyt Model. *Acta Horticulturae* 273: 139-148 p.
154. **Steiner P., Zeller W.** (1996): A tűzelhalás Magyarországon. Jelentés a Magyar Köztársaság Földművelésügyi Minisztériuma számára.
155. **Suleman, P., Steiner, P. W.** (1994): Relationship between sorbitol and solute potential in apple shoots relative to fire blight symptom development after infection by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 84: 1244-1250 p.
156. **Summers, W. C.** (2005): Bacteriophages research: early history. In Kutter E. and Sulakvelidze A. (ed.): Bacteriophages: Biology and Applications. BocaRaton, FL: CRC Press. 5-27 p.
157. **Suslow, T. W., Schroth, M. N., Isaka, M.** (1982): Application of rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72: 917-918 p.
158. **Svircev, A. M., Lehman, S. M., Kim, W. S., Barszcz, E., Schneider, K. E., Castle, A. J.** (2005): Control of the fire blight pathogen with bacteriophages. *1st Symposium Biocontrol of Bacterial Plant Diseases* 259-261. p.
159. **Szentkirályi A.** (2007): Biológiai védekezés lehetősége az almatermésűek tűzelhalásával szemben. Diplomamunka.
160. **Tanaka, H., Negishi, H., Maeda, H.** (1990): Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 56: 243–246 p.
161. **Thibault, B., Belouin, A., Lecomte, P.** (1989): Sensibilité variable du poirier au feu bacterien. *L'Arboriculture Fruitière*, 421: 29-34 p.
162. **Thibault, B., Le Lezec, M.** (1990): Sensibilité au feu bacterien des principales variétés de pommier et de poirier utilisées en Europe. In: Fire Blight of Pomoideae (*Erwinia amylovora*, Burrill, Winslow et al.). *Applied Research in Europe* (1978 – 1988), EUR 12601, ECSC-EEC-EAEC, Brussels-Luxembourg, 96-109 p.
163. **Thomson, S. V.** (1986): The role of the stigma in fire blight infections. *Phytopathology* 76: 476-482 p.

164. **Tomcsányi P.** (szerk.) (1979): Gyümölcsfajtáink, gyakorlati pomológia. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó.
165. **Tomcsányi E., Károssy A., Bodor L.** (1999): A tűzelhalás (*Erwinia amylovora*) nem gyümölcsstermő gazdanövényei. *Növényvédelem* 35: 437-441 p.
166. **Tóth M.** (2005<sup>a</sup>): Új fajtajelöltek a hazai almaválaszték megújításához. Kertgazdaság Különkiadás: A fajtaválaszték fejlesztése a kertészetben. 7-21 p.
167. **Tóth, M.** (2005<sup>b</sup>): Six promising selections from the Hungarian apple breeding program for multiple resistance. *International Journal of Horticultural Science* 11 (3): 23-28 p.
168. **Tóth, M., Honty, K., Kása, K., Hevesi, M., Göndör, M.** (2004): Susceptibility of pear cultivars to fire blight in Hungary. *10th International Workshop on Fire Blight*, Bologna, Italy 5-9. July 2004.
169. **Trevisan, V.** (1889): Bacilli endofitobii destruenti. His, Generi e le Specie delle Batteriaceae, Milano, 19 p.
170. **Twort, F. W.** (1915): An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet*, 186 (2): 1241-1243 p.
171. **Van Belkum, A.** (1999): The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. *Current Opinion in Microbiology* 2: 306-311 p.
172. **Van Belkum, A., Scherer, S., Van Alphen, L., Verbrugh, H.** (1998): Short-sequence DNA repeats in Prokariotic Genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 275-293 p.
173. **Van de Peer, Y., Rensing, S. A., Maier, U. -G., De Wachter, R.** (1996): Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies chlorarachniophyte endosymbionts as remnants of green algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (15): 7732-7736 p.
174. **van der Zwet, T.** (1996): Present worldwide distribution of fire blight. *Acta Horticulturae* 411:7-8 p.
175. **van der Zwet, T., Bell, R. L.** (1990): Fire blight susceptibility in *Pyrus* germplasm from Eastern Europe. *Horticultural Science* 25 (5): 566-568 p.
176. **van der Zwet, T., Bell R. L.** (1995): Response of Central European *Pyrus* germplasm to natural fire blight infection and artificial inoculation. *Horticultural Science* 30 (6): 1287-1291 p.

177. **van der Zwet, T., Beer, S. V.** (1995): Fire Blight- Its Nature, Prevention and Control. *USDA Bulletin* 631-697 p.
178. **van der Zwet, T., Keil, H. M.** (1979): Fire Blight – A bacterial disease of *Rosaceous* plants. Agriculture Handbook 510. US Department of Agriculture, Washington, DC, 200 p.
179. **van der Zwet, T., Walter, J.** (1996): Presence of *Erwinia amylovora* in apparently healthy nursey propagating material. *Acta Horticulturae* 411: 127-130 p.
180. **Vanneste, J. L.** (1996): Honey bees and epiphytic bacteria to control fire blight, a bacterial disease of apple and pear. *Biocontrol news and Information* 17 (4): 67-78 p.
181. **Vanneste, J. L.** (2000): What is fireblight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it? Epidemiology of fireblight. In: Vanneste J. L. (ed) Fire Blight. The Disease and its Causative Agent *Erwinia amylovora*. CAB Publishing 1-6. p.
182. **Vanneste, J. L.** (2006): Biological control of fire blight: an overview of the work carried out in New Zealand. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International symposium on biological control of bacteria plant disease* 408: 224-227 p.
183. **Vanneste, J. L.** (2011): Biological Control Agents of Fire Blight: Successes and Challenges. *Acta Horticulturae* 896: 409-416 p.
184. **Vanneste, J. L., Eden-Green, S.** (2000): Migration of *Erwinia amylovora* in Host Plant Tissues. In: Vanneste J. L. (ed.): Fire Blight. The Disease and its Causative Agent *Erwinia amylovora*. CABI Publishing 73- 84 p.
185. **Vanneste, J. L., Lex, S., Vermeulen, M., Berger, F.** (2002): Isolation of *Erwinia amylovora* from blighted plums (*Prunus domestica*) and potato roses (*Rosa rugosa*). *Acta Horticulturae* 590: 89-94 p.
186. **Végyvári, A., Sárdi, É., Csóke, B., Stefanovits-Bányai, É., Szarka, J., Velich, I.** (2000): Changing of carbohydrates by inoculation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on bean lines with different resistance. *International Journal Horticultural Science* 6 (1): 82-85 p.
187. **Weber, J. L., May, P. E.** (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *The American Journal of Human Genetics* 44: 388-396 p.
188. **Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J.** (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703 p.

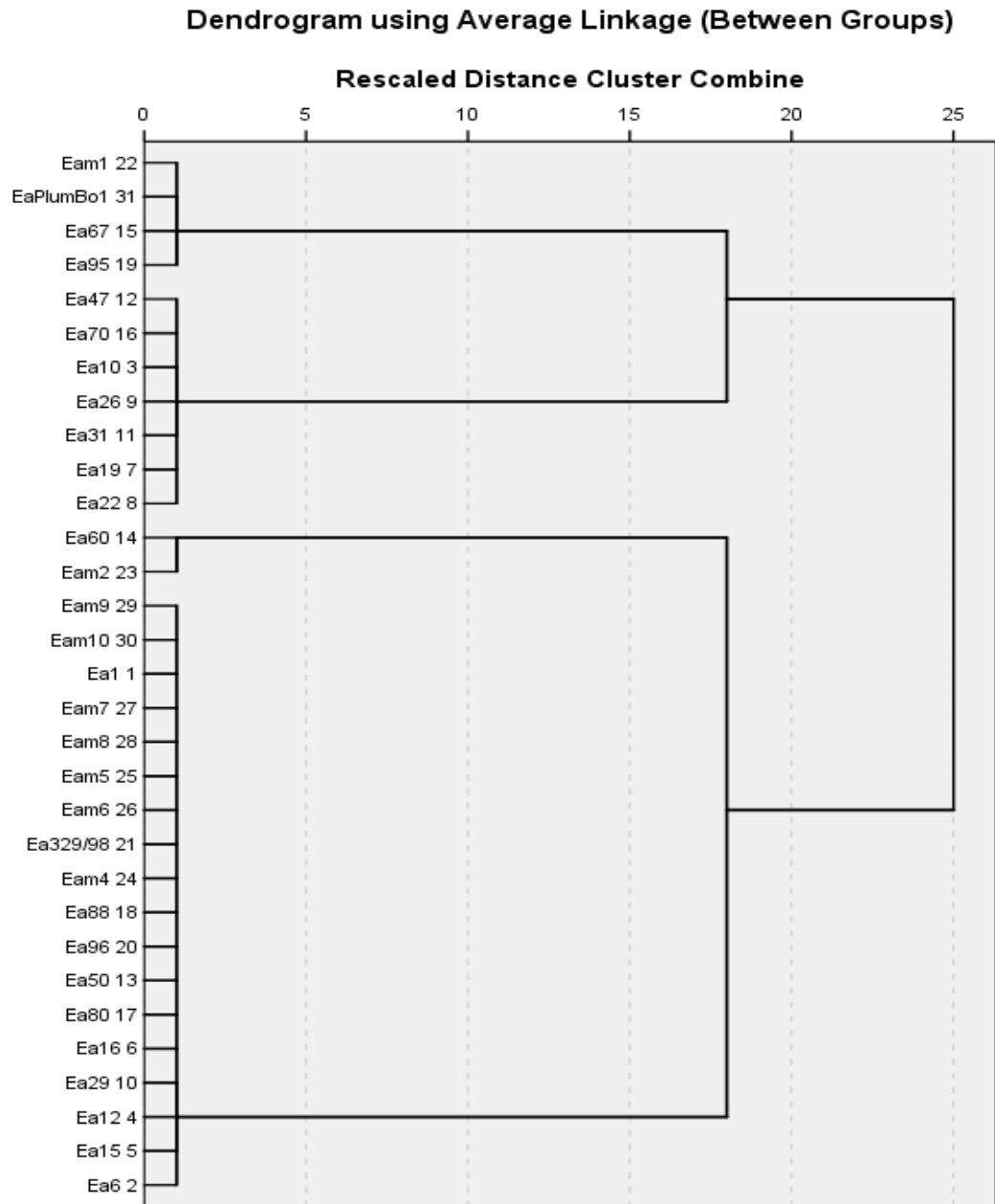
189. **Werner, N. A., Aldwinckle, H. S.** (2006): Two years of research on biological control of fire blight in New York. *Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases* 408: 274-278. p.
190. **Winslow, C. E. A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, Jr. C., Rogers, L. A., Smith, G. H.** (1920): The families and genera of the bacteria. Final report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *Journal of Bacteriology* 5: 191-229 p.

**2. melléklet:** Az *Erwinia amylovora* izolátumok csoportosítása a szelektív táptalajokon (CG és EMB agar) kialakult kolóniák színe, felülete alapján

| C-G táptalaj <b>kráteres</b> felület,<br>EMB agar <b>színtelen</b> kolónia | C-G táptalaj <b>sima</b> felület,<br>EMB agar <b>színtelen</b> kolónia | C-G táptalaj <b>kráteres</b> felület,<br>EMB agar áttetsző kolónia<br><b>sötét középpel</b> | C-G táptalaj <b>sima</b> felület,<br>EMB agar áttetsző kolónia<br><b>sötét középpel</b>  |
|--|--|---|--|
| <b>Eam1, EaPlumBo1,</b><br><b>Ea67, Ea95</b>                               | <b>Ea47, Ea70, Ea10,</b><br><b>Ea26, Ea31, Ea19,</b><br><b>Ea22</b>    | <b>Ea60, Eam2</b>   | <b>Eam9, Eam10, Ea1,</b><br><b>Eam7, Eam8, Eam5,</b><br><b>Eam6, Ea329/98,</b><br><b>Eam4, Ea88, Ea96,</b><br><b>Ea50, Ea80, Ea16,</b><br><b>Ea29, Ea12, Ea15,</b><br><b>Ea6</b> |

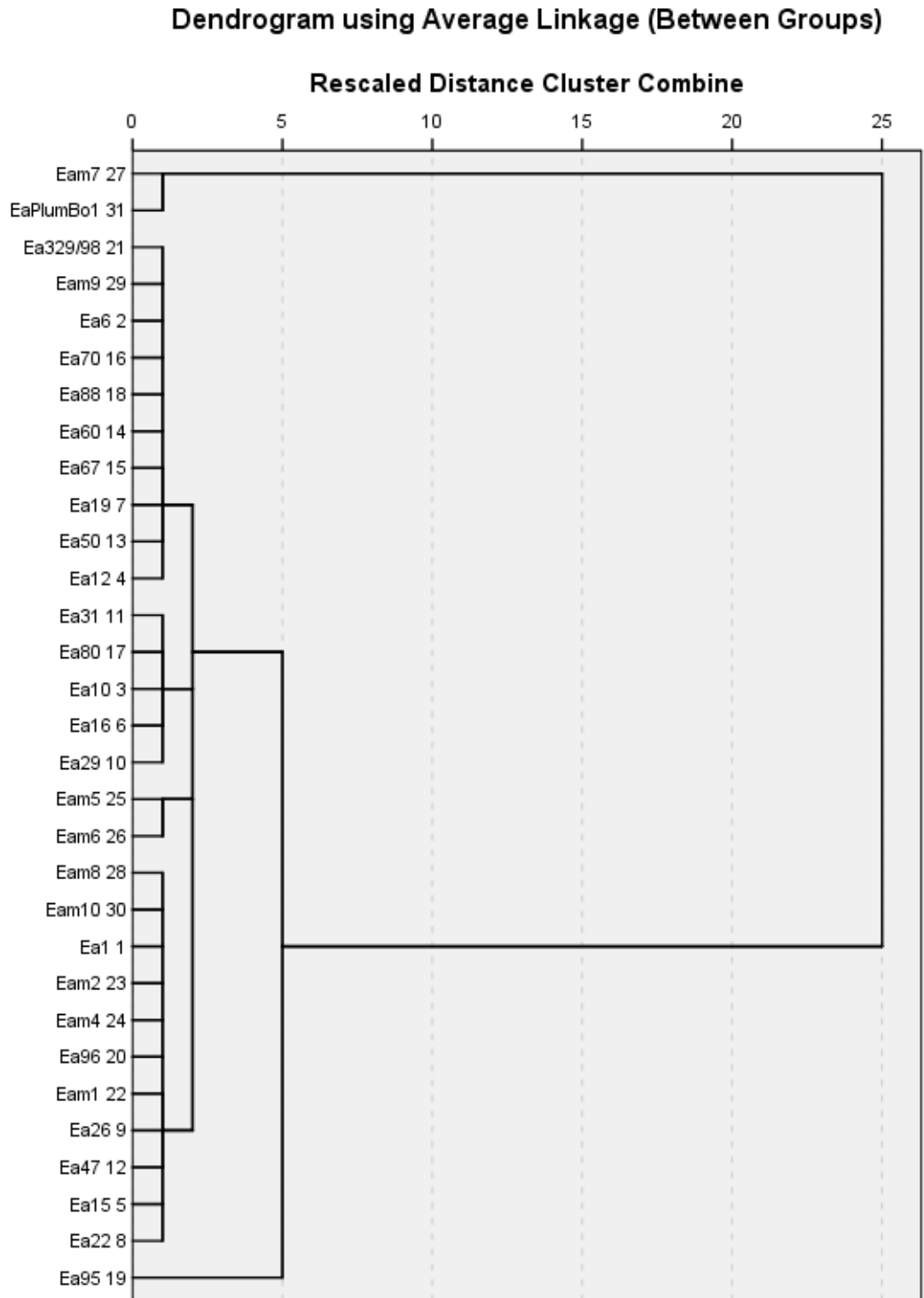
(A különböző gazdanövényekről származó Ea izolátumokat eltérő színekkel jelöltük. Az egyes növényeket jelölő színek: sárga - *Cydonia* sp.; piros - *Malus* sp.; zöld - *Pyrus* sp.; lila - *Prunus* sp.; bordó - *Pyracantha* sp.; kék - *Crataegus* sp.; szürke - *Cotoneaster* sp.)

**3. melléklet:** Az *Erwinia amylovora* izolátumok szelektív táptalajokon adott eredményéből készített cluster analízis





**4. melléklet:** Az *Erwinia amylovora* izolátumok biokémiai vizsgálatának (API50CH) eredményéből készített cluster analízis

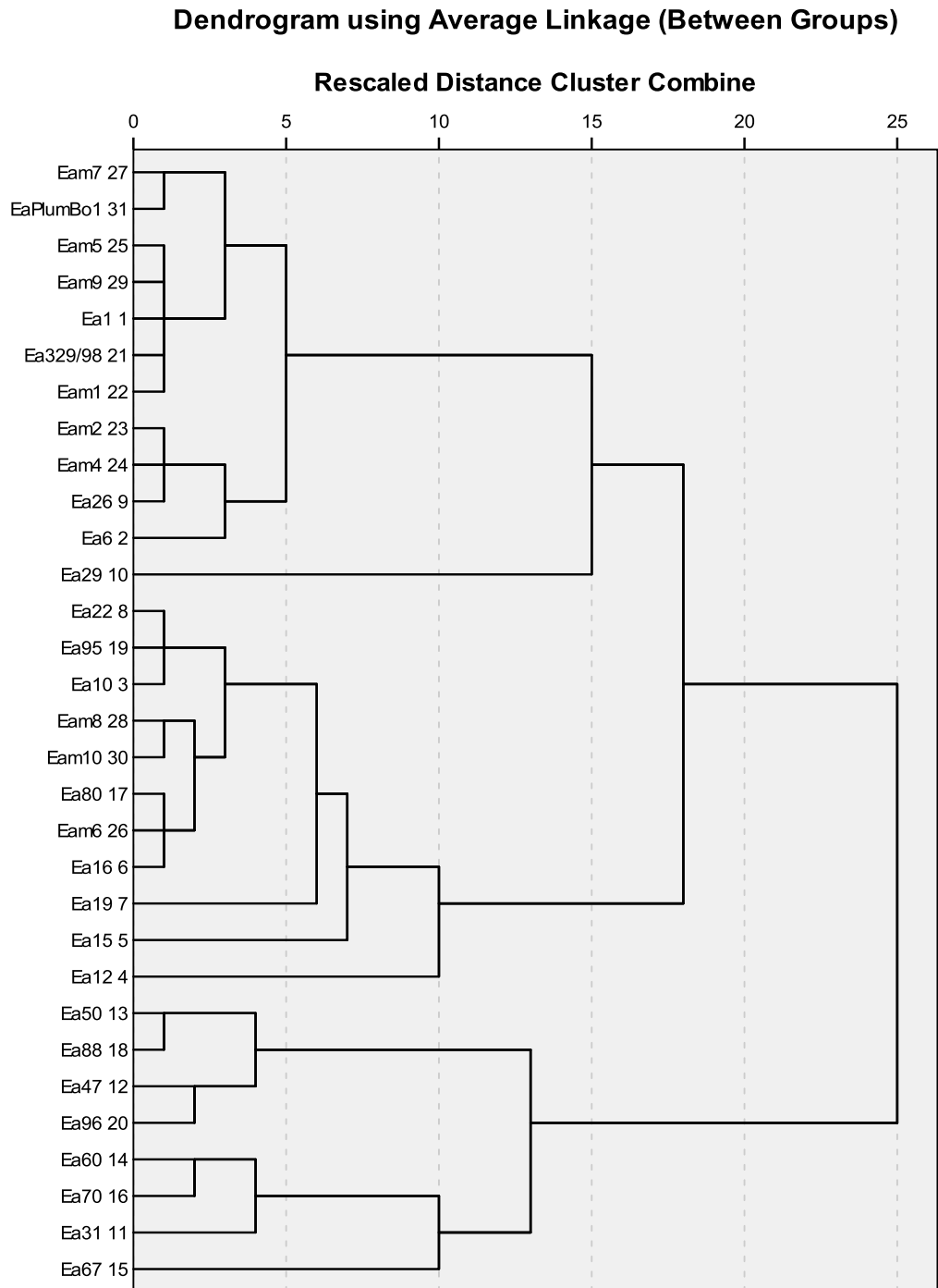


**5. melléklet:** Négy különböző bakteriofág hatása a vizsgált *Erwinia amylovora* izolátumokra

| Izolátumok       | H1A             | H4B             | H5A             | H8              |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Ea1</b>       | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b><u>b</u></b> |
| <b>Ea6</b>       | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b><u>b</u></b> |
| <b>Ea10</b>      | <b>a</b>        | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b>b</b>        |
| Ea12             | <b>a</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        |
| Ea15             | <b>a</b>        | <b>a</b>        | <b>a</b>        | <b>b</b>        |
| Ea16             | <b>a</b>        | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b>b</b>        |
| <b>Ea19</b>      | <b><u>b</u></b> | <b><u>b</u></b> | <b><u>a</u></b> | <b>b</b>        |
| <b>Ea22</b>      | <b>a</b>        | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b>b</b>        |
| <b>Ea26</b>      | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        |
| Ea29             | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>a</b>        |
| <b>Ea31</b>      | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b>b</b>        | <b>a</b>        |
| <b>Ea47</b>      | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b><u>b</u></b> |
| <b>Ea50</b>      | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b>a</b>        |
| <b>Ea60</b>      | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b>b</b>        | <b><u>a</u></b> |
| <b>Ea67</b>      | <b>a</b>        | <b>c</b>        | <b>a</b>        | <b><u>c</u></b> |
| <b>Ea70</b>      | <b><u>a</u></b> | <b><u>a</u></b> | <b><u>b</u></b> | <b>a</b>        |
| <b>Ea80</b>      | <b>a</b>        | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b>b</b>        |
| <b>Ea88</b>      | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b><u>a</u></b> |
| <b>Ea95</b>      | <b>a</b>        | <b><u>b</u></b> | <b><u>a</u></b> | <b>b</b>        |
| <b>Ea96</b>      | <b><u>a</u></b> | <b><u>a</u></b> | <b><u>a</u></b> | <b>a</b>        |
| <b>Ea329/98</b>  | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b><u>b</u></b> |
| <b>Eam1</b>      | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b><u>b</u></b> |
| <b>Eam2</b>      | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b>b</b>        | <b><u>b</u></b> |
| <b>Eam4</b>      | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        |
| <b>Eam5</b>      | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        |
| <b>Eam6</b>      | <b>a</b>        | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b>b</b>        |
| <b>Eam7</b>      | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        |
| <b>Eam8</b>      | <b><u>a</u></b> | <b><u>b</u></b> | <b><u>a</u></b> | <b>b</b>        |
| <b>Eam9</b>      | <b><u>b</u></b> | <b><u>b</u></b> | <b><u>b</u></b> | <b>b</b>        |
| <b>Eam10</b>     | <b>a</b>        | <b>b</b>        | <b>a</b>        | <b>b</b>        |
| <b>EaPlumBo1</b> | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        | <b>b</b>        |

**Jelmagyarázat:** A különböző gazdanövényekről származó Ea izolátumokat eltérő színekkel jelöltük. (A Bakteriofágok származását szintén ezekkel a színekkel jelöltük). Az egyes növényeket jelölő színek: sárga - *Cydonia* sp.; piros - *Malus* sp.; zöld - *Pyrus* sp.; lila - *Prunus* sp.; bordó - *Pyracantha* sp.; kék - *Crataegus* sp.; szürke - *Cotoneaster* sp. A táblázatban 'a' betű jelöli a tiszta plakkokat és 'b' betű a homályos plakkokat; 'c' betű azokat a mintákat, amelyekben nem tapasztaltunk változást. Aláhúzással és félkövér kiemeléssel jelöltük azokat az eseteket, melyeknél a gazdanövény típusa azonos a fagnál és a baktériumnál. A zöld szín jelzi a hatásos eredményeket, az összes többi eset hatástalan és pirossal jelölt.

**6. melléklet:** Az *Erwinia amylovora* izolátumok bakteriofág érzékenység vizsgálatának eredményéből készített cluster analízis

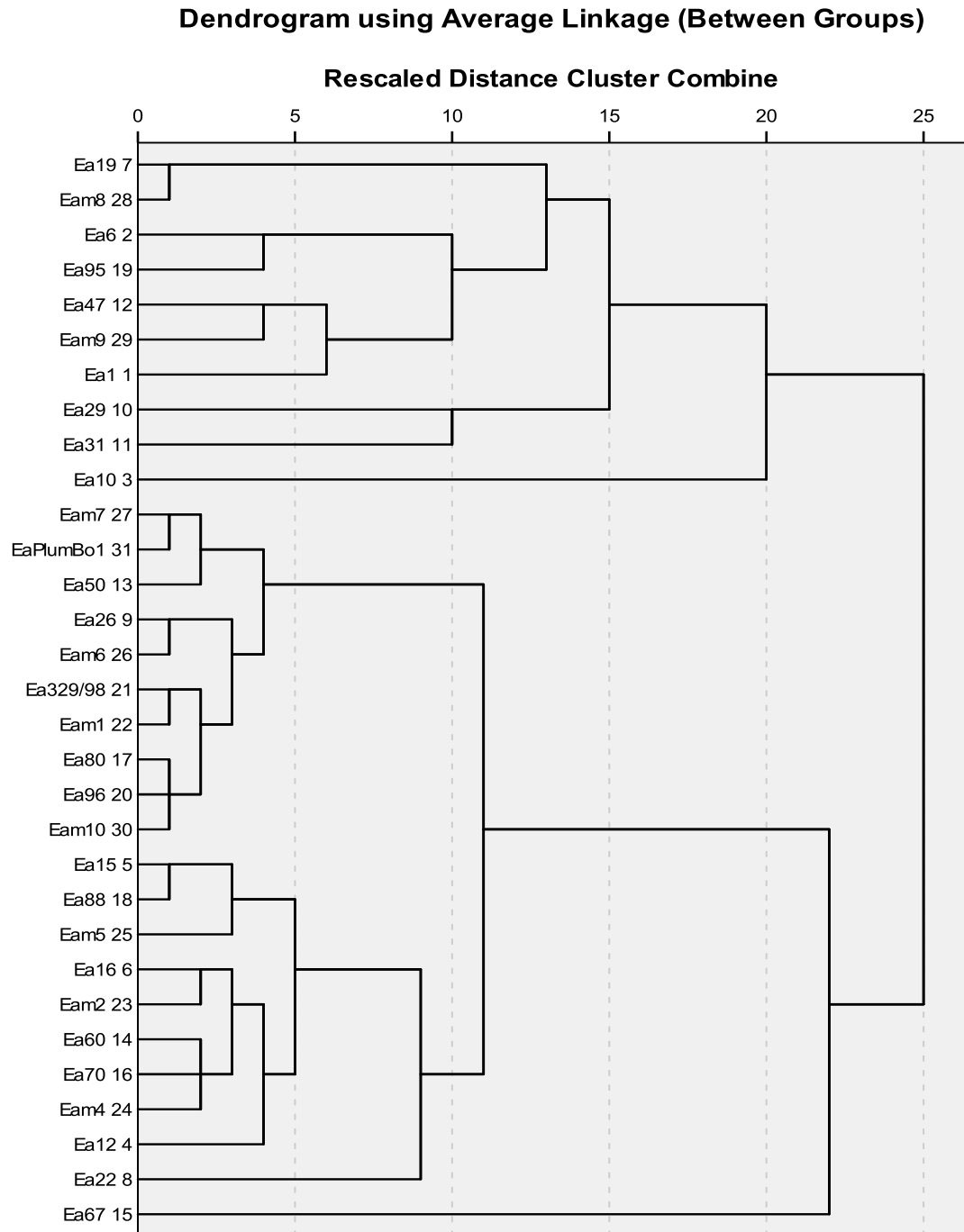


**7. melléklet:** Különböző körtefajták éretlen gyümölcsseinek fogékonysága *Erwinia amylovora* izolátumokkal a fertőzést követően az inokulációt követő 4. napon. (A számok az egyes körtefajtákon az adott *Erwinia amylovora* izolátumok által okozott nekrotikus foltok átmérőjének átlagát jelzik, fertőzési index alapján)

| Izolátumok       | Eldorado | Téli esperes | Drouard elnök | Serres Olivér | Alexander Lucas | Stössel tábornok | Diel vajkörte |
|------------------|----------|--------------|---------------|---------------|-----------------|------------------|---------------|
| <b>Ea1</b>       | 11,2     | 22,4         | 24,23         | 12,5          | 6,23            | 7,33             | 11,6          |
| <b>Ea6</b>       | 6,8      | 22,13        | 16,43         | 6,43          | 6,81            | 2,75             | 7,36          |
| <b>Ea10</b>      | 3,11     | 7,33         | 25,25         | 7,65          | 2,4             | 4,33             | 15,06         |
| <b>Ea12</b>      | 4,36     | 13,65        | 12,3          | 2,43          | 1,73            | 2,4              | 4,15          |
| <b>Ea15</b>      | 8,16     | 13,36        | 16,38         | 2,6           | 2,2             | 4,53             | 12,46         |
| <b>Ea16</b>      | 4,6      | 14,63        | 12,35         | 8,33          | 6,35            | 3,46             | 6,38          |
| <b>Ea19</b>      | 13,2     | 22,28        | 27,36         | 6,05          | 3,25            | 3,5              | 3,26          |
| <b>Ea22</b>      | 13,3     | 7,63         | 16,26         | 3,55          | 3,23            | 2,75             | 13,23         |
| <b>Ea26</b>      | 7,36     | 7,85         | 4,33          | 7,55          | 2,61            | 3,15             | 8,51          |
| <b>Ea29</b>      | 7,4      | 15,26        | 28,33         | 16,46         | 6,5             | 4,58             | 6,5           |
| <b>Ea31</b>      | 3,33     | 15,8         | 15,46         | 16,26         | 6,8             | 4,23             | 3,33          |
| <b>Ea47</b>      | 7,26     | 23,66        | 17,33         | 8,4           | 2,13            | 6,46             | 14,28         |
| <b>Ea50</b>      | 0        | 4,16         | 3,41          | 2,56          | 2,13            | 7,61             | 7,26          |
| <b>Ea60</b>      | 3,5      | 12,5         | 11,25         | 7,43          | 1,96            | 6,43             | 8,83          |
| <b>Ea67</b>      | 13,36    | 23,2         | 7,3           | 6,55          | 6,3             | 2,55             | 16,61         |
| <b>Ea70</b>      | 6,75     | 12,43        | 12,73         | 7,26          | 2,7             | 3,76             | 7,63          |
| <b>Ea80</b>      | 6,7      | 7,78         | 6,25          | 4,2           | 2,6             | 3,33             | 6,26          |
| <b>Ea88</b>      | 7,1      | 15,6         | 14,36         | 4,26          | 3,5             | 4,3              | 11,2          |
| <b>Ea95</b>      | 6,4      | 24,16        | 15,36         | 3,36          | 7,2             | 8,36             | 3,33          |
| <b>Ea96</b>      | 6,2      | 7,63         | 5,03          | 2,2           | 2,36            | 2,03             | 6,76          |
| <b>Ea329/98</b>  | 6        | 4,6          | 6,46          | 3,41          | 1,86            | 2,4              | 4,3           |
| <b>Eam1</b>      | 6,63     | 6,7          | 4,33          | 1,36          | 0,83            | 2,45             | 3,4           |
| <b>Eam2</b>      | 2,3      | 14,7         | 14,33         | 6,3           | 4,33            | 3,13             | 9,3           |
| <b>Eam4</b>      | 4,4      | 11,6         | 8,7           | 6,21          | 2,42            | 4,14             | 11,5          |
| <b>Eam5</b>      | 1,9      | 15,66        | 18,63         | 6,5           | 3,26            | 3,63             | 12,43         |
| <b>Eam6</b>      | 7,3      | 8,4          | 4,56          | 8,6           | 3,42            | 3,17             | 9,5           |
| <b>Eam7</b>      | 1,23     | 2,97         | 3,4           | 2,91          | 4,6             | 2,56             | 7,6           |
| <b>Eam8</b>      | 13,2     | 21,4         | 28,2          | 5,78          | 3,25            | 3,5              | 3,4           |
| <b>Eam9</b>      | 3,25     | 21,53        | 22,33         | 8,53          | 6,23            | 7,9              | 17,33         |
| <b>Eam10</b>     | 3,13     | 6,53         | 4,3           | 2,73          | 2,45            | 2,63             | 7,6           |
| <b>EaPlumBo1</b> | 0,9      | 3,23         | 2,63          | 2,73          | 3,56            | 1,63             | 6,33          |



**9. melléklet:** A körtefajták éretlen gyümölcseinek *Erwinia amylovora* izolátumok fogékonyságából (nekrotikus folt mérete alapján) készített cluster analízis



## 10. melléklet: EaPlumBo1 16S rRNS gén szekvenciája és jellemzői a nemzetközi adatbázisban

Accession#: HE610678  
 Status: confidential until 09-NOV-2011  
 Description: *Erwinia amylovora* partial 16S rRNA gene, isolate EA-PlumBo1, clone 2A2.5

ID HE610678; SV 1; linear; genomic DNA; STD; PRO; 1323 BP.  
 DT 08-NOV-2011 (Rel. 110, Created)  
 DT 08-NOV-2011 (Rel. 110, Last updated, Version 0)  
 DE *Erwinia amylovora* partial 16S rRNA gene, isolate EA-PlumBo1, clone 2A2.5  
 OS *Erwinia amylovora*  
 OC Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;  
 OC Enterobacteriaceae; *Erwinia*.  
 RP 1-1323  
 RA Palkovics L.;  
 RL Submitted (07-NOV-2011) to the INSDC.  
 RL Department of Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, Menesi Road  
 RL 44., H-1118, HUNGARY.  
 RA Vegh A., Hajagos L., Palkovics L.;  
 RT "First report of *Erwinia amylovora* on plum in Hungary";  
 RL Unpublished.

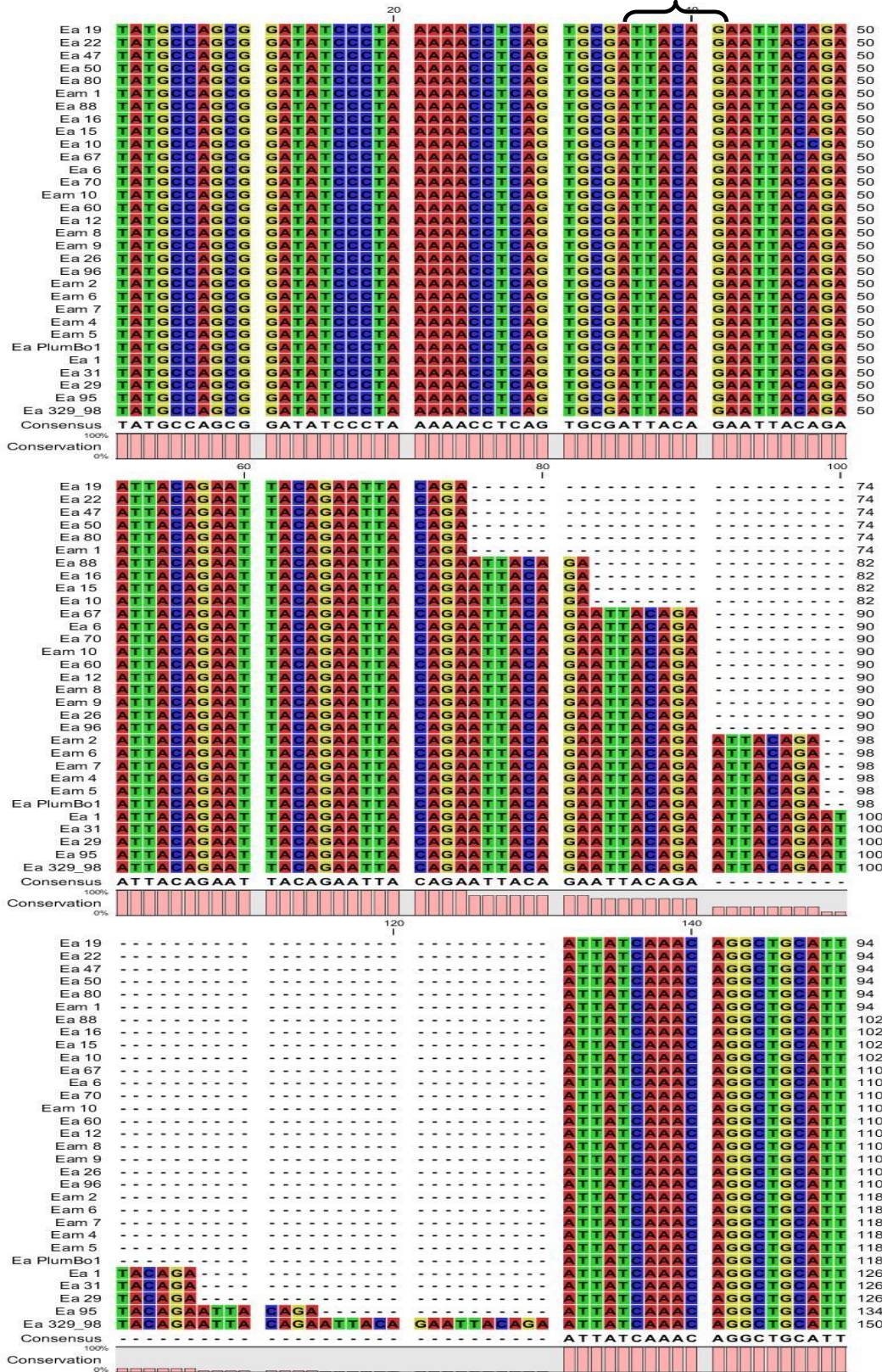
FH Key Location/Qualifiers  
 FT source 1..1323  
 FT /organism="Erwinia amylovora"  
 FT /isolate="EA-PlumBo1"  
 FT /mol\_type="genomic DNA"  
 FT /country="Hungary:Budaors"  
 FT /isolation\_source="Prunus domestica"  
 FT /clone="2A2.5"  
 FT /PCR\_primers="fwd\_name: 63f, fwd\_seq:  
 FT caggcctaacacatgcaagtc, rev\_name: 1389r, rev\_seq:  
 FT acgggcggtgtgtacaag"  
 FT /db\_xref="taxon:552"  
 FT rRNA <1..>1323  
 FT /gene="16S rRNA"  
 FT /product="16S ribosomal RNA"  
 SQ Sequence 1323 BP; 329 A; 309 C; 431 G; 254 T; 0 other;

|            |            |            |            |             |             |      |
|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| gaacggtagc | acagagagct | tgctcttggg | tgacgagtgg | cggacgggtg  | agtaatgtct  | 60   |
| gggaaactgc | ccgatggagg | gggataacta | ctggaaacgg | tagctaatac  | cgcataacgt  | 120  |
| ctacggacca | aagtggggga | ccttcgggcc | tcacaccatc | ggatgtgccc  | agatgggatt  | 180  |
| agctggtagg | tggggtaacg | gctcacctag | gcgacgatcc | ctagctggtc  | tgagaggatg  | 240  |
| accagccaca | ctggaactga | gacacggtcc | agactcctac | gggaggcagc  | agtggggaat  | 300  |
| attgcacaat | gggcgcaagc | ctgatgcagc | catgccgcgt | gtatgaagaa  | ggccttcggg  | 360  |
| ttgtaaagta | ctttcagcgg | ggaggaaggg | gaagaggtta | ataacctttt  | ccattgacgt  | 420  |
| tacccgcaga | agaagcaccg | gctaactccg | tgccagcagc | cgcggttaata | cggaggggtgc | 480  |
| aagcgттаат | cggaattact | gggcgtaaaг | cgcacgcagg | cggtctgtca  | agtcggatgt  | 540  |
| gaaatccccg | ggcttaacct | gggaactgca | ttcgaaactg | gcaggctaga  | gtctcgtaga  | 600  |
| ggggggtaga | attccaggtg | tagcggtgaa | atgcgtagag | atctggagga  | ataccgggtg  | 660  |
| cgaaggcggc | cccctggagc | aagactgagc | ctcaggtgcg | aaagcgtggg  | gagcaaacag  | 720  |
| gattagatac | cctggtagtc | cacgccgtaa | acgatgtcga | cttgagggct  | gttcccctga  | 780  |
| ggagtggcct | ccggagctaa | cgcgттааgt | cgaccgcctg | gggagtacgg  | ccgcaaggtt  | 840  |
| aaaactcaaa | tgaattgagc | ggggcccgca | caagcgggtg | agcatgtggt  | ttaattcgat  | 900  |
| gcaacgcgaa | gaaccttacc | tggccttgac | atccacggaa | ttctgcagag  | atgcggaagt  | 960  |
| gccttcggga | accgtgagac | aggtgctgca | tggctgtcgt | cagctcgtgt  | tgtgaaatgt  | 1020 |
| tgggttaagt | cccgcaacga | gcgcaacct  | tatcctttgt | tgccagcgat  | tcggtcggga  | 1080 |
| actcaaagga | gactgccggt | gataaaccgg | aggaaggtgg | ggatgacgtc  | aagtcatcat  | 1140 |
| ggcccttacg | gccagggcta | cacacgtgct | acaatggcgc | atacaaagag  | aagcgacctc  | 1200 |
| gcgagagcaa | gcggacctca | taaagtgcgt | cgtagtcggg | atcggagtct  | gcaactcgac  | 1260 |
| tccgtgaagt | cggaatcgct | agtaatcgta | gatcagaatg | ctacggtgaa  | tacgttcccc  | 1320 |



11. melléklet: Az *Erwinia amylovora* izolátumok *PstI* fragment ismétlődő régiójának szekvencia összehasonlítása

SSR ismétlődő régió kezdő szakasza (ATTACAGA)





## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, **Dr. Palkovics László** tanszékvezető, egyetemi tanárnak, aki bizalmat adott és PhD hallgatónak fogadott. Köszönöm, hogy megteremtette a kutatáshoz szükséges anyagi és technikai feltételeket, valamint a nyugodt háttérrel. Széleskörű szakmai ismereteivel, gyakorlati tapasztalataival és hasznos tanácsaival a kezdetektől mindvégig segítette munkámat és biztosította a disszertáció elkészítésének feltételeit. Segítsége nélkül dolgozatom nem készülhetett volna el. Köszönöm, hogy hallgatóként és munkatársként is bármikor fordulhattam Hozzá, mindig segítőkészen fogadott, munkám során támogatott, biztatott és emberileg is mindvégig mellettem állt.

Hálával tartozom továbbá másik konzulensemnek, **Dr. Hevesi Máriának**, aki emberi és szakmai képességeinek köszönhetően megosztotta velem magas színvonalú bakteriológiai szaktudását, segítséget nyújtott a fertőzések, illetve a kísérletek tervezése terén, valamint a rendelkezésemre bocsátott *E. amylovora* izolátumokért.

Köszönet illeti a Gyümölcstermő Növények Tanszék vezetőjét, **Dr. Tóth Magdolnát**, aki biztosította a lehetőséget a kísérleteim egy részének elvégzéséhez és támogatott a munkámban.

Hálás vagyok a Növénykórtani és a Gyümölcstermő Növények Tanszék valamennyi volt és jelenlegi munkatársainak, doktorandusz hallgatóinak a segítőkészségükért, kedvességükért és türelmükért.

**Dr. Némethy Zsuzsannának** hálás szívvel tartozom a szakmai segítségéért, biztatásáért, valamint a növényanyagokért, melyeket rendelkezésemre bocsátott.

Köszönöm **Dr. Schwarzingert Ildikónak**, az MTA Növényvédelmi Kutatóintézet munkatársának a kísérletben felhasznált fágokat, szakmai segítségét, illetve a fágokkal kapcsolatos témában elérhető irodalmakhoz való hozzájutást.

Köszönöm **Dr. Szani Zsolt** segítségét, akinek a növényanyagok, a körtefajták beszerzését köszönhetem.

Köszönöm **Pájtli Évának** a molekuláris vizsgálatoknál nyújtott segítségét.

Köszönöm **Dr. Erdélyi Évának** az eredmények kiértékelésénél, illetve a statisztikai programok használatánál nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom szakkörös hallgatóinknak, **Hajagos Laurának** és **Horváth Boglárkának** szorgalmas munkájukért, akik a témához kapcsolódóan készítették el TDK és diplomadolgozatukat.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani **édesanyámnak, testvéremnek, páromnak, keresztszüleimnek** folyamatos támogatásukért, segítségükért, biztatásukért, valamint, hogy a dolgozatom elkészülése alatt mindvégig mellettem álltak.

A kutatásokat a TÁMOP 4.2.1./B-09/01-KMR-2010-0005 és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023 pályázatok támogatták.