



Doktori (PhD) értekezés

**HAZAI EREDETŰ *ERWINIA AMYLOVORA* BAKTERIOFÁGOK
JELLEMZÉSE ÉS FELHASZNÁLÁSÁNAK LEHETŐSÉGE A
BIOLÓGIAI VÉDEKEZÉSBEN**

Kolozsváriné Nagy Judit

**Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont,
Növényvédelmi Kutatóintézet**

**Budapest
2014**

A doktori iskola

megnevezése:	Kertészettudományi Doktori Iskola
tudományága:	Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok
vezetője:	Dr. Tóth Magdolna egyetemi tanár, DSc Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcsstermő Növények Tanszék
témavezető:	Dr. Schwarczinger Ildikó, PhD tudományos főmunkatárs Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Központ, Növényvédelmi Kutatóintézet, Biotechnológia Osztály
társtémavezető:	Dr. Tóth Magdolna egyetemi tanár, DSc Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcsstermő 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. Schwarczinger Ildikó
a témavezető jóváhagyása

.....
Dr. Tóth Magdolna
a társtémavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2014. október 7-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG

Elnöke

Palkovics László, DsC

Tagjai

Barna Balázs, DsC
Damjanova Ivelina, PhD
Olasz Ferenc, PhD
Mergenthaler Emese, PhD

Opponensek

Szegedi Ernő, DSc
Karacs-Végh Anita, PhD

Titkár

Mergenthaler Emese, PhD

Tartalomjegyzék

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
2 BEVEZETÉS	7
2.1 Célkitűzések	8
3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
3.1 A tűzelhalás problémaköre	9
3.1.1 Jelentősége	9
3.1.2 Földrajzi előfordulása	10
3.1.3 A betegség kialakulása és tünetei	10
3.2 A kórokozó jellemzése	14
3.2.1 Elnevezése és rendszertani besorolása	14
3.2.2 A kórokozó főbb jellemzői	14
3.2.3 Gazdaköre	15
3.3 Védekezési lehetőségek, kutatási irányok	16
3.3.1 Növény-egészségügyi szabályok, agrotechnikai módszerek	16
3.3.2 A fertőzés előrejelzése	17
3.3.3 Kémiai védekezés	17
3.3.4 Alternatív védekezési lehetőségek	19
3.4 A bakteriofágok jellemzése	24
3.4.1 Bevezetés	24
3.4.2 A bakteriofágok biológiája	24
3.4.3 Rendszertani besorolásuk	25
3.4.4 Alkalmazási területük	26
3.5 Fágterápia a növényvédelemben	27
3.6 Fágok alkalmazása az <i>Erwinia amylovora</i> ellen	28
3.6.1 Fágizolálás	28
3.6.2 Fágizolátumok jellemzése	28
3.6.3 Fágok hatékonysági vizsgálatai	29
3.6.4 Kihívások és távlatok a fágterápia terén	29
4 ANYAG ÉS MÓDSZER	31
4.1 A vizsgálatok helye és ideje	31
4.2 A vizsgálatok során használt baktérium-izolátumok, illetve törzsek	31
4.3 Referencia bakteriofágok	33
4.4 Táptalajok, tápoldatok	34
4.5 A vizsgált fágok izolálása és tisztítása	34
4.6 A fágizolátumok morfológiai jellemzése	36
4.6.1 Plakkmorfológia	36
4.6.2 Fágpartikulum morfológia	37
4.7 PCR vizsgálat	37
4.8 Szekvencia-analízis	41
4.9 Gazdakörvizsgálat	42
4.10 Fágok és fágkombinációk <i>Erwinia amylovora</i> baktériumra gyakorolt hatásának vizsgálata	43
4.10.1 Fág hatásvizsgálat folyadékkultúrában	43
4.10.2 Fág hatásvizsgálat alma- és birsvirágon	44
4.10.3 Fág hatásvizsgálat éretlen körteszeleten	48
4.10.4 Fág hatásvizsgálat dísznövényeken	50
4.11 A fágkezelés hatékonyságának fokozására irányuló vizsgálatok: fágok növénybe jutása, transzlokációja és az <i>E. amylovora</i> okozta tünetekre gyakorolt hatása	51
4.11.1 A fágok transzlokációs képességének alma csíranövényekben történő vizsgálata - előkísérlet	52
4.11.2 Fágok szállítódása alma csíranövényekben	53
4.11.3 A fágok hatása az <i>E. amylovora</i> okozta tünetekre	54
4.11.3.1 Alma csíranövények gyökérszónájához, illetve föld feletti részeire juttatva ki a fágokat	55

4.11.3.2 A fágokat alma csíranövények sziklelevelébe injektálva	56
5 EREDMÉNYEK	57
5.1 Fágizolátumok	57
5.2 A fágizolátumok morfológiai jellemzése	57
5.2.1 Plakkmorfológia.....	57
5.2.2 Fágpartikulum morfológia.....	59
5.3 Az izolált fágok molekuláris jellemzése.....	61
5.3.1 PCR vizsgálat	61
5.3.2 Szekvencia-analízis	62
5.4 Gazdakörvizsgálat.....	62
5.5 Fágok és fágkombinációk hatásának vizsgálata az <i>Erwinia amylovora</i> baktériumra.....	66
5.5.1 Fág hatásvizsgálat folyadékkultúrában	66
5.5.2 Fág hatásvizsgálat alma-és birsvirágon.....	68
5.5.2.1 Baktériumsejt-számlálás	68
5.5.2.2 Valós idejű PCR vizsgálat	72
5.5.3 Fág hatásvizsgálat éretlen körteszeleten	73
5.5.4 Fág hatásvizsgálat dísnövényeken	75
5.6 A fágkezelés hatékonyságának fokozására irányuló vizsgálatok: fágok növénybe jutása, transzlokációja és az <i>E. amylovora</i> okozta tünetekre gyakorolt hatása	76
5.6.1 A fágok transzlokációs képességének alma csíranövényekben történő vizsgálata - előkísérlet.....	76
5.6.2 Fágok szállítódása alma csíranövényekben	77
5.6.3 A fágok hatása az <i>E. amylovora</i> okozta tünetekre	80
5.6.3.1 Alma csíranövények gyökérszónájához, illetve a növény föld feletti részeire juttatva ki a fágokat	80
5.6.3.2 A fágokat alma csíranövények sziklelevelébe injektálva	81
5.7 Új tudományos eredmények.....	83
6 AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK	85
7 ÖSSZEFOGLALÁS	93
8 SUMMARY	97
9 IRODALOMJEGYZÉK	101
10 MELLÉKLETEK	125
11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	141

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ANOVA	A nalysis of V ariance (varianciaanalízis)
bp	bázispár
CFU	C olony F orming U nit (baktériumkolóniát képző egység)
CPG	C asamino-acid P eptone G lucose táptalaj
EPS	E xtracelluláris p oliszacharid
kb	kilobázis (ezer nukleotid)
KB	K ing's B táptalaj
LB	L uria- B ertani tápoldat
LBA	Agart tartalmazó szilárd LB táptalaj
marker	PCR vizsgálatoknál a DNS-szakaszok méret meghatározására szolgáló standard „létra”
NA	N utrient A gar
NB	N utrient B roth
OD ₆₀₀	O ptical D ensity (optikai sűrűség) 600 nanométer fényhullámhosszon
PCR	P olymerase C hain R eaction (polimeráz-láncreakció)
PFU	P laque F orming U nit (plakkot képző egység)
ppm	p arts p er m illion (mg l ⁻¹ koncentrációnak megfelelő mértékegység)
rpm	r evolutions p er m inute (egy percre eső fordulatok száma)
SSR	S hort- S equen S Repeat (rövid-szekvencia-ismétlődés)
TEM	T ransmission E lectron M icroscopy (transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálati módszer)
Tukey-féle HSD próba	T ukey's H onestly S ignificant D ifference (statisztikai teszt)

2 BEVEZETÉS

Az almatermésűek tűzelhalása az *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* baktérium által előidézett, a *Rosaceae* családba tartozó számos növényfaj legsúlyosabb baktériumos betegsége (**Bonn és van der Zwet 2000**). A betegség elsődleges tünetei kora tavasszal, a virágokon jelentkeznek, amelyek vizenyősek lesznek, majd elfeketednek a kórokozó nektáriumokon keresztül elindított fertőzésének következtében. Miután a baktérium természetes nyílásokon és sebzéseken keresztül bejutott a növénybe, a hajtások, levelek hervadnak, az ágak nekrotizálódnak, majd végül elpusztulnak (**Vanneste és Eden-Green 2000**). Az Amerikai Egyesült Államokban honos kórokozót az 1950-es évek közepén hurcolták be Európába (**OEPP/EPPO 1983**). Magyarországon először 1995-ben azonosították egy Kecskemét termesztési körzetében levő alma ültetvényben (**Hevesi 1996**).

A betegség elleni hatékony védekezés - melynek alapeleme a fertőzési források időben való lokalizálása érdekében végzett folyamatos megfigyelés - a rendelkezésre álló kémiai és egyéb szerekkel nem megoldott, mióta az eddigi legeredményesebb védekezési mód, a virágzáskori sztreptomycin kezelés a legtöbb európai országhoz hasonlóan Magyarországon sem engedélyezett. Sztreptomycin-rezisztens *E. amylovora* törzsek megjelenése (**Miller és Schroth 1972**), valamint az egyre általánosabbá vált nézet, mely szerint csökkentenünk kell a környezeti peszticidterhelést, és kerülni kell a különösen humán toxikológiai szempontok alapján kockázatos antibiotikumok növényvédelmi célú használatát különböző, köztük számos biológiai védekezési mód kutatásához vezetett. Ezek egyike a bakteriofágok használatára épül.

A bakteriofágok, azaz a baktériumok vírusai, korábban már számos vizsgálatban bizonyultak hatékonyak különböző bakteriális eredetű növényi betegségek, köztük az almatermésűek tűzelhalása ellen is (**Jones és mtsai. 2007**). PhD hallgatóként 2011-ben kapcsolódtam be a hazánkban Dr. Schwarczinger Ildikó által 2006-ban megkezdett kutatásba, melynek célja a hazai *E. amylovora* bakteriofágok izolálását, jellemzését és azok *E. amylovora*-ra kifejtett hatásának a vizsgálatát magába foglaló *E. amylovora* elleni bakteriofág-alapú biológiai védekezés megalapozása. Az *E. amylovora* baktérium hazánkban karantén kórokozó, ezért szabadföldi kísérletek végzése e kórokozóval nem engedélyezett. Az *in vitro* kísérletek a Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet (MTA ATK NÖVI) Biotechnológiai osztályának akkreditált *Erwinia*-laboratóriumában történtek a 75280 számú PD OTKA pályázat támogatásával.

2.1 CÉLKITŰZÉSEK

- *E. amylovora*-specifikus bakteriofágok magyarországi gyűjtése és izolálása a tűzelhalás elleni biológiai védekezésben való felhasználásuk vizsgálata céljából
- Az izolált hazai fágok jellemzése és az Amerikai Egyesült Államokban gyűjtött néhány *E. amylovora*-specifikus fágtörzsszel történő összehasonlítása
- A leghatékonyabb fágizolátumok kiválasztása, a fágok *E. amylovora* baktérium szaporodására gyakorolt hatásának *in vitro* vizsgálata különböző tesztnövényeken és növényi mintákon
- Az *E. amylovora* fágok növénybe jutásának, és növényen belüli szállítódásának tisztázása, valamint a tűzelhalás tüneteire gyakorolt hatásának vizsgálata

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A TŰZELHALÁS PROBLÉMAKÖRE

3.1.1 JELENTŐSÉGE

Az almatermésűek tűzelhalása, vagy korábbi elnevezések szerint az alma és a körte hajtásszáradása (**Klement 1965**), a körte (és az alma) erviniás elhalása (**Glits 1993**), az almatermésűek baktériumos hajtásszáradása és elhalása (tűzelhalás) (**Németh 1997**), baktériumos ágelhalás (**G. Tóth 1997**) egy olyan egyedülálló, térben és időben szórványosan előforduló növényi betegség, amelyről elsőként mutatták ki, hogy egy baktérium okozza (**Baker 1971**).

Ez az almatermésű növények egy részének régtől ismert, egyik legjelentősebb bakteriális eredetű betegsége nagymértékű gazdasági károkat képes előidézni alma-, körte- és birsültetvényekben (**van der Zwet és Keil 1979**) mind a mai napig. Tényleges gazdasági hatását nehéz megállapítani, mivel egyrészt a csekély veszteséggel, azaz egy tenyészidőszakon belül csupán kevés fertőzött virágbogból kiinduló és néhány fa kivágásával járó fertőzésekről sokszor nem számolnak be, másrészt már egyetlen, a kórokozó számára optimális környezeti feltételek beálltakor kitörő járvány akár évekre tönkretelheti az adott alma-, illetve körteültetvényen folyó gyümölcstermesztést. Csupán érzékeltetésként: **Bonn (1999)** közlése alapján a tűzelhalás által 1998-ban okozott veszteség mértékét az USA észak-nyugati részén több mint 68 millió amerikai dollárra becsülték.

Ami a magyarországi fertőzések által okozott károk mértékét illeti elmondható, hogy 1996-ban, a betegség hazai megjelenésének évében, 1,1 millió amerikai dollárra volt tehető a több tízezer fertőzött alma-, birs- és körtefa, valamint több száz dísznövény megsemmisítésének összköltsége (**Bonn és van der Zwet 2000**). A fellépő erős fertőzöttség következtében jelentős mértékű fertőzött növényállomány felszámolására volt szükség 2000-ben (**Pálfi és mtsai. 2000**), valamint 2004-ben Szabolcs-Szatmár-Bereg (**Mérő 2004**) és Borsod-Abaúj-Zemplén megyékben (**Csete és mtsai. 2004**) is. Az elmúlt két évben pedig Szabolcs-Szatmár-Bereg és a Hajdú-Bihar megye Nyírségig húzódó részén teremtettek az időjárási viszonyok optimális körülményeket az *E. amylovora* fertőzésére és ennek következtében ezekben a térségekben ismét járványos méreteket öltött a betegség (**Fülep 2014**).

3.1.2 FÖLDRAJZI ELŐFORDULÁSA

Az almatermésűek tűzelhalásának részletes földrajzi elterjedéséről alapos szakirodalom áll rendelkezésünkre (**Bonn és van der Zwet 2000, Végh 2012**). A betegséget az Amerikai Egyesült Államok területén, a New York állambeli Hudson-völgyben észlelték először 1780-ban (**Denning 1794**), ahonnan fertőzött szaporító- és ültetési-anyaggal déli és nyugati irányba terjedve, az 1800-as évek elején már a gyümölcsstermesztés egyik jelentős növényvédelmi problémájának tartották Észak-Amerikában (**Coxe 1817**). Az észak-amerikai kontinensen kívül elsőként Japánból (**Uyeda 1903**), majd Új-Zélandról (**Campbell 1920**) számoltak be a betegségről. Európában 1956-1957-ben figyeltek fel először a tűzelhalás tüneteire Angliában (Kent) (**Lelliott 1959**) és nem sokkal ezt követően észlelték a betegséget Egyiptomban, a Nílus deltavidékén (**El-Helaly és mtsai. 1964**) is. E két helyről mára majdnem valamennyi európai és közel-keleti ország területére eljutott és szét is terjedt a kórokozó. A tűzelhalás magyarországi első megjelenésének közlése Dr. Hevesi Mária nevéhez fűződik (**Hevesi 1996**) aki, miután a dél-alföldi Nyárlőrincen lévő egyik almaültetvényben 1995 késő őszén és 1996 kora tavaszán észlelte a betegség tüneteit, azonosította a kórokozót. Azóta az egész országban elterjedt (**Bubán és mtsai. 2007, Németh 1997, Végh 2012**) és az időjárási viszonyok függvényében időről időre számítani lehet járványszerű fellépésére. 2004-ben már 46 országban fordult elő (**van der Zwet 2006**). A legutolsó európai ország, ahol újonnan észlelték a kórokozót Szlovénia volt, 2001-ben (**Dreo és mtsai. 2006**).

3.1.3 A BETEGSÉG KIALAKULÁSA ÉS TÜNETEI

A tűzelhalás epidemiológiájáról alapos áttekintést nyújt **Thomson (2000)** összefoglaló munkája. A kórokozó életciklusára jellemzően az előző évben fás részekben kialakult rákos sebekben áttelt baktériumok indítják el tavasszal a virágokon az új fertőzéseket. Ennek az elsődleges virágfertőzésnek a kritériumai **Steiner (1990)** alapján a következők: (1) legyenek kinyílt, ép virágok; (2) a 18,3°C feletti óránkénti hőmérsékleti átlagokból adódó úgynevezett kritikus hőösszeg érje el a 110-es értéket, illetve az újabb kutatások eredményeinek fényében **Fülep (2014)** szerint már a 70°C kritikus hőösszeg is elegendő; (3) legyen jelen minimum 0,25 mm mennyiségű csapadék (eső vagy pára), vagy az előző napon hulljon legalább 2,5 mm eső; (4) a napi átlaghőmérséklet érje el a 15,6°C-ot, illetve **Fülep (2014)** utal arra, hogy a 15,3°C is elégséges. A fertőzött fák rákos (üszkös) sebeinek általában a szélén meghúzódó baktériumok gyakorta egy nedvszívó poliszacharid anyagban helyezkednek el, és az így képzett ragadós nyálka vagy folyékony marad, vagy kiszáradva borostyán-sárga, fénylő mázzá keményedik. Ezzel kapcsolatban érdemes kiemelni azt, hogy a fertőzésnek nem feltétele ennek a nyálkának a

sebekből történő kiválása, mivel a baktériumsejtek még a beszáradt nyálkacseppekben is életképesek tudnak maradni egy évig (**Rosen 1938**). Az áttelelt baktériumok tavasszal a baktériumnyálkát látogató rovarok (hangyák és legyek) révén, vagy eső és szél útján kerülnek a bibék felszínére, ahol szaporodni kezdenek. Az elszaporodott epifiton populáció egy része helyben indítja el a fertőzést, illetve viráglátogató rovarok, eső, vagy metszés által távolabbi virágokra terjed át és a virág természetes nyílásain, elsősorban a nektáriumok (**Bubán és mtsai. 2003a, 2003b**), valamint a bibe, a portokok és a csészelevelek természetes résein keresztül (**Hildebrand 1937**) a virág szöveteibe hatol és annak sejt-közötti járataiban szaporodni kezd. Az egyes virágok vagy virágbogok először nedvesen átitatottakká válnak, fonnyadnak, majd megbarnulnak, megfeketednek, elhalnak és rendszerint a fán maradnak (**1-2. ábra**).



1. ábra *E. amylovora*-val fertőzött birs (*Cydonia oblonga* Mill.) virág (Fotó: Kolozsváriné N.J., 2004. Siófok)



2. ábra *E. amylovora*-val fertőzött alma (*Malus x domestica* Borkh. 'Golden') virágok (Fotó: Kolozsváriné N.J., 2007, Siófok)

A kórokozó endofiton populációi a fogékony gazdanövényben, kedvező időjárási feltételek mellett gyorsan haladnak a virágból a kocsányon át a hajtásokba, vesszőkbe, majd az ágakba, akár le egészen a törzsig (**Vanneste és Eden-Green 2000**), ahol üszkös sebek alakulnak ki. Néha azonban a xilemben „ragadnak” és mindaddig nem okoznak tüneteket, amíg a hancs parenchima szöveteibe ki nem jutnak (**Vanneste és Eden-Green 2000**). Meleg, párás időszakokban a gyökér kivételével bármely fertőzött növényi részen (virág, levél, hajtás, gyümölcs, ág, törzs, és gyökérnyak) megjelenhetnek baktériumsejteket tartalmazó nyálkacseppek, melyek az eső, rovarok, madarak, és az ember közvetítésével további fertőzéseket indukálnak. A közvetlen virágfertőzés által szisztémikusan fertőződött éretlen gyümölcsök szürkésen vizenyőssé válnak, barnulnak, megfeketednek, lehullanak, vagy mumifikálódva a vesszőkön maradnak (**3. ábra**).



3. ábra A tűzelhalás tünetei naspolya (*Mespilus germanica* L.) éretlen gyümölcsein (Fotó: Kolozsváriné N.J., 2007, Siófok)

Az elsődleges fertőzés kezdetén felszaporodott baktériumsejtek azonban nem csak virágokra szállítódnak el, hanem a nyár folyamán kifejlődő fiatal hajtásokhoz, tősarjakhoz, vízhajtásokhoz is eljutnak, ahol a sztomákon, hidatódákon, lenticellákon, vagy jégeső, szélverés, metszés okozta sebzéseken keresztül a levelekbe és a hajtások szárába hatolnak és így idézik elő a hajtásfertőzést. Az ilyen fiatal hajtások *E. amylovora* baktériummal való fertőzöttségének jellegzetes tünete az elbarnuló, elfeketedő hajtásvégek úgynevezett pásztorbatszerű görbülése (**4-5. ábra**), mely a parenchima sejtek összeomlásának a következménye (Vanneste és Eden-Green 2000).



4. ábra A tűzelhalás tünetei fiatal alma (*Malus x domestica* Borkh. 'Golden') hajtáson (Fotó: Kolozsváriné N.J., 2007, Siófok)



5. ábra *E. amylovora* okozta hajtásfertőzés tünete körtén (*Pyrus x communis* L. 'Vilmos') (Fotó: Kolozsváriné N.J., 2007, Siófok)

A fertőzött levelek erei barnulnak, elfeketednek, majd a levelek egésze elhal, de a hajtáson maradnak (**6. ábra**).



6. ábra *E. amylovora*-val fertőzött birs (*Cydonia oblonga* Mill.) levelek (Fotó: Kolozsváriné N.J., 2007, Siófok)

A hajtásnövekedés és gyümölcsképződés időszakában nemcsak a folyékony, de a megkeményedett, fonalas szerkezetű, baktériumsejteket tartalmazó nyálkaanyag is inokulumként szolgál elsősorban a másodvirágzatok, zsenge hajtások, gyümölcsök fertőződéséhez (**7. ábra**). Az érett gyümölcsökön is a fiatal termésekhez hasonló tünetek alakulnak ki, és megfelelően meleg, párás időjárás esetén a paraszemölcsökön keresztül kiváló sűrű, baktériummal telített nedv a gyümölcs felszínén csepp alakban megjelenik (**8. ábra**) (**van der Zwet és Keil 1979**). A vegetáció vége felé az idősebb növényi részekben az ág és a törzselhalás tüneteként a hánccsszövet felpuhul, vizenyős és ezüstös-barna lesz, majd az elhalt szövetek besüppednek, és az ép és a fertőzött szövetek határán repedés jelentkezik. A rákos sebek szélén a kéreg alatti fás részekben vörösesbarna csíkozottság alakul ki (**van der Zwet és Keil 1979**). Az így kialakuló újabb üszkös sebekben a baktériumsejtek egy része áttelel, majd a következő év tavaszán új fertőzést indít el.



7. ábra A tűzelhalás tünetei alma (*Malus x domestica* Borkh. 'Golden') gyümölcsön (Fotó: Kolozsváriné N.J., 2007, Siófok)



8. ábra Baktériumnyálka cseppek *E. amylovora*-val fertőzött almán (*Malus x domestica* Borkh. 'Golden') (Fotó: Kolozsváriné N.J., 2007, Siófok)

3.2 A KÓROKOZÓ JELLEMZÉSE

3.2.1 ELNEVEZÉSE ÉS RENDSZERTANI BESOROLÁSA

Az almatermésűek tüzelhalásának kórokozója az *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* (1920) baktériumfaj, melyet elsőként *Micrococcus amylovorus* néven **Burrill (1882)** írt le, majd *Bacillus amylovorus* (Burr.) (**Trevisan 1889**), azt követően *Bacterium amylovorum* (Burr.) (**Chester 1897**), végül pedig **Winslow és mtsai. (1920)** nyomán a kórokozó hivatalos neve *Erwinia amylovora* lett. Aktuálisan a *Proteobacteria* törzs *Gamma Proteobacteria* osztályának *Enterobacteriales* rendjébe, azon belül az *Enterobacteriaceae* család *Erwinia* nemzetségébe tartozik (**Paulin 2000**). Ebbe a nemzetségbe 17 Gram-negatív, mozgékony, aerob - fakultatív anaerob, nem sporuláló faj tartozik (**Holt és mtsai. 1994**), amelyek ökológiailag közvetlen kapcsolatban állnak a növényekkel (**Brenner 1984**). Az *E. amylovora* törzseket három fő csoportba lehet sorolni: *Maloideae* (*Maloideae* fajokról izoláltak), *Rubus* (*Rosoideae* növényekről izoláltak) és 'Hokkaido' (Japánból, ázsiai körtéről származók), de ezeken belül további alcsoportok léteznek (**Momol és Aldwinckle 2000**).

3.2.2 A KÓROKOZÓ FŐBB JELLEMZŐI

A kórokozó általános tulajdonságait **Paulin (2000)** összefoglaló munkája részletezi. Az *E. amylovora* mintegy 0,3 µm x 1-3 µm méretű, pálcika alakú, Gram-negatív baktérium, mely 2-7 peritrich flagelluma révén önálló mozgásra képes. Ez a mozgásképeség mesterséges anaerob viszonyok között, megfelelő szénforrás esetén nyilvánul meg (fertőzött növényi szövetek sejtközütti járataiban nem figyeltek meg mozgékony sejteket) és specifikus hőmérséklet- és pH-függő (optimálisan 20°C, pH 6,8), kemotaxis által vezérelt. Ilyen pozitív kémiai ingert vált ki például az almavirág nektárjának egyik alkotója, a dikarbonsav is. A kórokozó szaporodása 3-5°C és 37°C között lehetséges, optimálisan 25-27°C-on történik (**Billing és mtsai. 1961**). Tenyésztett kolóniái az alkalmazott táptalaj összetételétől függően eltérő morfológiájúak és színezetűek (**Paulin 2000**). A baktérium dohánynövény sejtközütti járataiba injektálva hiperszenzitív reakciót vált ki (**Hevesi 1996**).

A baktériumsejtek poliszacharid burkot választanak ki, melynek felépítésről és a kórokozó patogenitásában betöltött szerepéről **Geider (2000)** nyújt áttekintést. Az *E. amylovora* egy összetett (amylovoran) és egy homopolimer (levan) exopoliszacharidot (EPS-t) termel, melyek óvják a baktériumsejtet a gazdasejt védekező mechanizmusaival szemben, védik a kiszáradástól, valamint energiaforrásként is szolgálnak. A baktériumsejtek és EPS együttese alkotta nyálka elősegíti a kórokozó fogékony gazdanövényen való megtelepedését és terjedését (**Bennett és Billing 1978**). Azok az *E. amylovora* törzsek, amelyek nem képesek az amylovoran

szintetizálására nem-patogének (Bernhard és mtsai. 1993, Steinberger és Beer 1988) és nem szaporodnak *in planta* (Bellemann és Geider 1992), míg a leván hiánya az adott törzs virulenciájára hat negatívan (Geier és Geider 1993). Az amylovoran bioszintézisében nagyszámú gén vesz részt, melyek közül a strukturális gének többségének helyet adó *ams* jelölésű kromoszómaszakaszt Bugert és Geider (1995) részletesen is vizsgálta. Az *E. amylovora* eddig tanulmányozott törzsei néhány kivételtől eltekintve egy körülbelül 29 kb hosszúságú, a baktérium patogenitásában szerepet játszó plazmidot (pEA29) hordoznak (Vanneste 1995), mely alapján a kórokozó PCR-rel azonosítható (Bereswill és mtsai. 1992). A pEA29 plazmidon elhelyezkedő *Pst*I fragment ismétlődő régiójának, azaz SSR-ének (rövid szekvencia ismétlődésének) száma alapján különbséget találtak a Magyarországon és Ausztriában károsító *E. amylovora* izolátumok között (Keck és mtsai. 2002). Végh (2012) számos hazai *E. amylovora* izolátumról, azok SSR eredményei alapján megállapította, hogy egy változatos, eltérő törzsekből álló populációt alkotnak. Végh (2012), valamint Végh és mtsai. (2014) közzétették továbbá, hogy az általuk vizsgált hazai izolátumokhoz, melyek többsége 7-8 SSR számmal rendelkezik, legközelebb a 6-7 SSR számú egyiptomi törzsek állnak. Llop és mtsai. (2006, 2011) kimutatták, hogy az általuk leírt és jellemzett 65,8 kb hosszúságú pEI70 elnevezésű, szintén a kórokozó virulenciájára ható plazmid több európai országból származó *E. amylovora* törzsben fellelhető, míg az Európán kívüli törzsekben nem.

3.2.3 GAZDAKÖRE

Noha az *E. amylovora* egyetlen növénycsalád (*Rosaceae*) kórokozójaként ismert, a családon belül széles gazdakörrel rendelkezik; mind a négy alcsalád összesen 40 nemzetségének körülbelül 200 faján idézett már elő tűzelhalásos tüneteket (van der Zwet és Keil 1979). A kórokozó gazdasági jelentőségét az adja, hogy képes megfertőzni a *Maloideae* (*Pomoideae*) alcsaládba tartozó gyümölcstermő fajokat [alma (*Malus x domestica*), körte (*Pyrus communis*), birs (*Cydonia oblonga*), naspolya (*Mespilus germanica*), japán naspolya (*Eriobotrya japonica*)]. Egyéb jelentősebb gazdanövényei is a *Maloideae* alcsaládból kerülnek ki: a japánbirs (*Chaenomeles lagenaria*), a berkenye (*Sorbus*), a galagonya (*Crataegus*), a tűztövis (*Pyracantha*), a madárbirs (*Cotoneaster*) nemzetség tagjai, valamint a sztránvézia (*Stranvaesia davidiana*), a fanyarka (*Amelanchier*) és a korallberkenye (*Photinia*). A *Rosoideae* alcsaládon belüli fő gazdanövénye a málna (*Rubus idaeus*) (Starr és mtsai. 1951) és a tüskétlen szeder (*R. rusticanus* var. *inermis*) (Evans 1996), de beszámoltak már japán rózsa természetes fertőzöttségéről is (Vanneste és mtsai. 2002). A *Rubus* fajokról izolált törzsek (Heimann és Worf 1985) gazdaspecifikusak, nem fertőzik az almát és a körtét. A kórokozó az *Amygdaloideae* (*Prunoideae*) alcsaládon belül az európai szilvát (*Prunus domestica*) (Vanneste és mtsai. 2002,

Végh 2012, Végh és mtsai. 2012a, 2012b), a japán szilvát (*Prunus salicina*) (Mohan és Thomson 1996, Rosen és Groves 1928) fertőzi, továbbá kajszin (*Prunus armeniaca*) is előfordult már Csehországban (Korba és Sillerova 2010), illetve Magyarországon (Végh és Palkovics 2013). Mohan (2007) szilva és kajszi hibridjéről (Pluot®) azonosította. A *Spiraeoideae* alcsaládba tartozó gazdanövényei közül például a hólyagvesszőt (*Physocarpus* sp.) (van der Zwet és Keil 1979) vagy a mesterségesen fertőzhető kerti gyöngyvesszőt (*Spiraea vanhouttei*) (Rosen és Groves 1928) lehet megemlíteni.

3.3 VÉDEKEZÉSI LEHETŐSÉGEK, KUTATÁSI IRÁNYOK

Az almatermésűek tűzelhalása elleni hatékony védekezés jelenleg nem megoldott, ezért különösen fontos mind a mai napig a különböző alapvető védekezési eljárások együttes alkalmazása, kiegészítve azt az aktuális növényvédőszeres és a biológiai védekezés lehetőségeivel (Németh 1997). Azaz az *Erwinia amylovora* elleni küzdelem során is az integrált növényvédelmi szempontokat javasolt figyelembe venni (Steiner 2000).

3.3.1 NÖVÉNY-EGÉSZSÉGÜGYI SZABÁLYOK, AGROTECHNIKAI MÓDSZEREK

A kórokozó elleni védekezésben elengedhetetlen az alapvető növény-egészségügyi rendszabályok követése, így a fertőzésmentes szaporítóanyag előállítása [például hőkezeléssel (Keck és mtsai. 1990)] és forgalmazása.

Németh (1997) részletesen szemlélteti a követendő agrotechnikai eljárásokat. Metszést kizárólag a növényi nedvkeringést megelőzően szabad végezni, kerülve az erőteljes visszavágást, ami intenzív hajtásnövekedést indukálna. Ugyanezen okból különösen ügyelni kell az optimális mennyiségű nitrogén-utánpótlásra. A fertőzött növényi részeket, a gallyakon, ágakon kialakult áttelelő fekélyes sebeket, fertőzést mutató virágokat, hajtásokat, vesszőket, gallyakat és ágakat rendszeresen el kell távolítani ép szövetrésszel együtt. Ez a fertőzött hajtások esetében azt jelenti, hogy 40-60 cm-t a tünetmentes részből is le kell metszeni. A folyamat során elengedhetetlen (lenne) a vágószerszám megfelelő szerekkel (Sobiczewski és mtsai. 1997) való gondos és folyamatos fertőtlenítése. A sebfelületek megfelelő kezelése fertőtlenítő oldat, majd sebzáró készítmény kijuttatásával történhet.

3.3.2 A FERTŐZÉS ELŐREJELZÉSE

Különös tekintettel arra, hogy a betegség tüneteinek előfordulási gyakorisága és súlyossága évenként és ültetvényenként változhat (**Bubán és Dorgai 2003**), a védekezés alappillére a fertőzésveszély előrejelzése, mely alapján a megfelelő védekezés időzíthető, s egyúttal elkerülhetők azok a kezelések, amelyek az inokulum felszaporodásához és a fertőzés létrejöttéhez kedvezőtlen időjárási viszonyok esetén feleslegessé válnak (**Németh 1997**). Több előrejelzési modell ismert (**Billing 2000, Bubán és Dorgai 2003**), közülük is a legelterjedtebbek az USA-ban kidolgozott és alkalmazott Maryblyt™ (**Steiner 1990**), a Cougar blight (**Smith 1993**) és az Európában kifejlesztett Billing-féle rendszer (**Billing 1980a, 1980b, 1984**) átdolgozott változata a Billing's integrated system, BIS (**Billing 1996**). Ezek a rendszerek a virágzás időszaka alatt mérik az időjárási adatokat és meghatározott kritériumok [**Steiner 1990** (a 3.1.3 fejezetben tárgyalva), **Takács 2013**] teljesülése esetén prognosztizálják a fertőzési veszély kialakulását. Magyarországon a Maryblyt™ számítógépes rendszeren alapuló megfigyelő és előrejelző hálózat lett kiépítve.

3.3.3 KÉMIAI VÉDEKEZÉS

Az *E. amylovora* ellen jelenleg hazánkban engedélyezett készítmények (**Ocskó és mtsai. 2014**) közül a kémiai növényvédő szerek egy kivétellel (Aliette 80 WG) mind rézkészítmények, melyek hatóanyaga rézhidroxid, rézoxiklorid, néhány szernél mankoceb és olaj hatóanyaggal kombinálva. Alkalmazásuk az epifiton baktériumpopuláció gyérítése céljából a lombhullás után és a nyugalmi időszak végén, a megmetszett állományra irányuló lemosó permetezés formájában javasolt. Egyéb kijuttatásukkor ugyanis számolni kell a fajtaérzékenység és az időjárási tényezők által befolyásolt fitotoxicitással. A szisztemikus hatásmechanizmusú, foszetil-Al hatóanyagú Aliette 80 WG szert **Sobiczewski és mtsai. (1997)** a rézkészítményeknél hatékonyabbnak találták az *E. amylovora* ellen. A foszetil-Al a növény védekező mechanizmusát stimulálja, ezért annak kijuttatását a növény megfelelő fenológiai fázisához kell időzíteni (**Steiner 2000**).

Antibiotikumok használata

Az antibiotikumok - azaz az olyan, mikroorganizmusok által termelt szerves anyagok, melyek szelektíven gátolják más mikroorganizmusok szaporodását – alkalmazása a bakteriális növényi kórokozók, köztük az *E. amylovora* ellen az 1950-es években kezdődött az addig nehezen gyógyítható humán betegségek sikeres kezeléseinek folyamányaként. Az almatermésűek tüzelhalásának kórokozója számos antibiotikumra érzékeny, de ezek közül csupán a sztreptomycin, az oxitetraciklin és a kasugamicin felelt meg az *in vivo* alkalmazás

követelményeinek (**Psallidas és Tsiantos 2000**). A virágfertőzés ellen az ezidáig leghatékonyabb baktericidnek az aminoglikozidok csoportjába tartozó sztreptomycin (**Schatz és mtsai. 1944**) bizonyult, azonban növényvédelmi célú használata számos országban, így (2004. január 1-től) hazánkban sem engedélyezett (**Takács 2013**). A kasugamicin hatóanyagú Kasumin 2L 2008 óta csak szükséghelyzeti engedéllyel alkalmazható almatermésűek kultúrájában Magyarországon (<https://novenyvedoszer.nebih.gov.hu/Engedelykereso/kereso.aspx>). Az antibiotikumok betiltásának az egyik oka a sztreptomycinre ellenálló *E. amylovora* törzsek megjelenése volt, majd az ennek következtében kialakuló félelem az antibiotikumok növényvédelmi célú felhasználásából fakadó humán egészségkárosodás és környezetszennyezés lehetőségétől, melyet nemcsak az *E. amylovora*, de a kijuttatás helyszínén levő növény felületén, a környező talajban vagy vízben előforduló egyéb mikroorganizmusokban, köztük esetlegesen humán-, illetve állatbetegségeket előidéző kórokozókban kifejlődő sztreptomycin-rezisztencia (**Jones és Schnabel 2000**) jelent. Sztreptomycin-rezisztens *E. amylovora* törzseket elsősorban azokról a területekről izoláltak, ahol a védekezés alapját a sztreptomycin hatóanyagú készítményekkel való rendszeres időközönként végzett nagy számú permetezés jelentette, így az Amerikai Egyesült Államok nyugati részén (**Moller és mtsai. 1981**). Elsőként kaliforniai körte ültetvényből izoláltak sztreptomycin-ellenálló *E. amylovora* törzset 1971-ben (**Miller és Schroth 1972**), majd Oregon és Washington államokból (**Coyier és Covey 1975**), Missouriból (**Shaffer és Goodman 1985**) és Michiganból (**Chiou és Jones 1991**). Amerikán kívül Mexikóban (**de León-Door és mtsai. 2013**), Egyiptomban (**El-Goorani és mtsai. 1989**), Új-Zélandon (**Thomson és mtsai. 1993**) és Izraelben (**Manulis és mtsai. 1996**) is találtak sztreptomycin-rezisztens *E. amylovora* törzseket. Azonban előfordultak spontán rezisztens törzsek olyan ültetvényeken (USA) is, ahol sztreptomocinnal nem permeteztek (**Hevesi M. személyes közlés**).

A sztreptomycin tüzelhalás elleni használatának korlátozásához a klinikai céllal alkalmazott baktériumok felé irányuló feltételezett horizontális géntranszfer (**Seveno és mtsai. 2002**) miatti aggodalom is hozzájárult. Ugyanakkor **Rezzonico és mtsai. (2009b)** kimutatták, hogy a növényvédelemben használt sztreptomycin készítmények nem hordozzák az előállításukhoz használt *Streptomyces griseus* ssp. *griseus* baktériumból származó rezisztenciagéneket (**Ohnishi és mtsai. 2008**) s ezáltal nagyon valószínűtlen, hogy közvetlen forrásként szolgálnának ezen géneknek az ültetvény mikrobáiba vagy az ott dolgozók szervezetébe történő jutásához. Az utóbbi időben több kutatás (**Duffy és mtsai. 2011, Stockwell és Duffy 2012, Yashiro és McManus 2012**) eredménye is azt igazolta, hogy a sztreptomycin tüzelhalás elleni alkalmazása csupán kismértékű környezeti hatással bír.

Böszörményi és mtsai. (2009) beszámoltak egy ígéretes, új, széles hatásspektrumú, bizonyos entomopatogén nematódákkal szimbiózisban élő entomopatogén baktériumok

(*Xenorhabdus budapestiensis* és *X. szentirmaii*) által termelt antibiotikumról, mely kísérletükben igen hatékonynak bizonyult az *E. amylovora* ellen.

Egyéb kémiai vegyületek

A sztreptomycin, illetve a rézkészítmények alternatívájaként számos, a tűzelhalás ellen hatásos vegyületről számolhatunk be (**Psallidas és Tsiantos 2000**). Így a növényi szisztémikus szerzett rezisztenciát (SAR-t) indukáló benzothiadiazol (Bion™, Actigard™), a gibberellin bioszintézisének gátlása révén növekedési retardáns prohexadion-Ca (Regalis™, Apogee™), a flumequin (Firestop™, Fructil™), az *E. amylovora* harpin fehérje (Messenger™) vagy az oxolinsav (Starner™) hatóanyagokról, bár **Kleitman és mtsai. (2005)** kimutatták, hogy ez utóbbival szemben már kialakult rezisztencia. A Magyarországon előállított Biomit Plussz® lombtrágya a növények kondicionálása révén fokozza azok betegségekkel szembeni ellenállóságát (**Bubán és mtsai. 2007**). Ismeretesek olyan fertőtlenítő szerek (**Psallidas és Tsiantos 2000**), melyek gátolni tudják a kórokozónak metsző szerszámokkal, az ültetvényben dolgozók testéről, ruházatáról, vagy a leszüretelt gyümölcs felületéről történő terjedését.

3.3.4 ALTERNATÍV VÉDEKEZÉSI LEHETŐSÉGEK

Rezisztencia-nemesítés

Klasszikus növénynemesítés

Az 1970-es évektől kezdődően a különböző fajták fogékonysági kategóriákba sorolására épülve számos nemesítési program került kidolgozásra körte, alma, tűztövis, galagonya és madárbirs esetében (**van der Zwet és Keil 1979**). Mivel a világszerte termesztésbe vont gazdanövényfajok fajtáinak szinte mindegyikét képes az *E. amylovora* megfertőzni, de azok egy része eltérő mértékben tűri azt, valójában csupán toleranciáról lehet szó e növényi betegség esetében (**Németh 1997**). Ezért is különösen fontos a fajták tűzelhalással szembeni fogékonysági csoportokba való sorolása különböző (hajtás-, virág- és gyümölcs-) fertőzési kísérletek eredményei révén. Hazánkban **Honti (2011)** és **Végh (2012)** végzett ilyen irányú kísérleteket körtefajták esetében. Továbbra is jelentős nemesítési munka folyik az USA-ban, Kanadában, Franciaországban, Olaszországban és Németországban (például a pillniti Pi- és Re-almafajták®) (**Lespinasse és Aldwinckle 2000**). Hazánkban az 1990-es évek eleje óta végeznek sikeres nemesítési célú kutatásokat (multirezisztens alma MR- sorozat) hazai történelmi alma- és körtefajták bevonásával a Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcstermő Növények Tanszékén (**Honty és mtsai. 2004, Király és Tóth 2009, Tóth 2005, Tóth és mtsai. 2005**). Ennek eredményeként a közelmúltban államilag elismerésre is került négy

almafajta ('Artemisz', 'Cordelia', 'Hesztia', 'Rosmerta'), melyek mellett, hogy rezisztenciát mutatnak az alma ventúriás varasodásával és az almalisztharmattal szemben, hajtásaik rezisztensnek, illetve mérsékelten rezisztensnek mondhatók az almatermésűek tűzelhalása ellen (Tóth és mtsai. 2012).

Transzgénikus fajták

Egyes, az *E. amylovora*-val szemben rezisztenciát biztosító gének – elsősorban az EPS-depolimeráz, lizozim, attacin és cecropin, gének - alma-, illetve körte növényekbe biotechnológiai úton történő beépítése és expresszáltatása, vagy a bakteriális DspE effektorokkal kölcsönhatásba lépő növényi (*Malus*) proteinek kódoló (*DIPM*) gének lecsendesítése (Borejsza-Wysocka és mtsai. 2006) lehetséges védekezési stratégiát jelenthetnek a tűzelhalás elleni harcban (Aldwinckle és Malnoy 2009, Broggini és mtsai. 2014, Malnoy és mtsai. 2007, Norelli és Aldwinckle 2000).

Az exopoliszacharid depolimeráz növényekben való kifejeztetésének a célja az, hogy lebontásra kerüljön az *E. amylovora* patogenitásában szerepet játszó EPS burkot alkotó fő komponens, az amylovoran, mely által a növény védekező mechanizmusai hatékonyá válhatnak a kórokozóval szemben (Geider 2000), míg a lizozim enzim a sejtfal elvékonyításával, a gazdabaktérium lízisét, felbomlását eredményezi (Norelli és Aldwinckle 2000). A Φ Ea1h *E. amylovora* bakteriofág genomjának egy 3,3 kb hosszúságú szakaszából származó EPS-depolimerázt (*dpo*) (Hartung és mtsai. 1988, Kim és Geider 2000), illetve lizozim enzimet (*lyz*) (Kim és mtsai. 2004) kódoló gének hatékonyak bizonyultak a kórokozó ellen. A *dpo* gén alma (Hanke és mtsai. 2003, Süle és mtsai. 2002), illetve körte (Malnoy és mtsai. 2005) növényekben történő expressziója a betegség tüneteinek csökkenését eredményezte. Az *Escherichia coli* T4 bakteriofág lizozim enzimjét kódoló gént tartalmazó transzformáns 'Galaxy' (Ko és mtsai. 2002), illetve 'Royal Gala' (Aldwinckle és mtsai. 2003) alma növények fokozott rezisztenciája is ismert.

A cecropinok és az attacinok egyaránt olyan antibakteriális hatással bíró lítikus peptidek, melyeket eredetileg egy észak-amerikai molylepke, a *Hyalophora cecropia* bábjából izoláltak (Hultmark és mtsai. 1980, 1983). A cecropinok hatásmechanizmusára jellemző, hogy először pórusokat képezve a sejtmembránban a sejt felbomlását idézik elő (Christensen és mtsai. 1988). Norelli és mtsai. (1999) a cecropin B két szintetikus analógját, az SB-37, illetve a Shiva-1 peptideket kódoló, míg Liu és mtsai. (2001) a cecropin SB-37 gén módosított változatát, a cecropin MB-39 gént tartalmazó különböző bináris vektorkonstrukciókkal transzformált 'Royal Gala' fajtájú almanövények esetében találtak a nem transzformáns kontrollhoz képest ellenállóbbnak bizonyult vonalakat. Az attacinok antibakteriális hatása abban áll, hogy gátolják a

Gram-negatív baktériumok külső membránfehérjéjének szintézisét (Carlsson és mtsai. 1998). Az *attE* gént tartalmazó tanszgenikus M26 almaalanyok (Norelli és mtsai. 1994), 'Galaxy' almafajták (Ko és mtsai. 2000) és 'Passe Crassane' körtefajták (Reynold és mtsai. 1999) esetében is a tűzelhalás tüneteinek a kontroll növényekhez viszonyított szignifikáns csökkenéséről számoltak be a transzformáns klónok egy részénél.

A többek között Koch és Kogel (2014) által átfogóan tárgyalt géncsendesítés vagy nukleinsav alapú növényi immunitás („host-induced gene silencing”) folyamata révén különböző génkonstrukciókkal transzformált 'Galaxy' alma növények hajtásainak *E. amylovora*-val történő inokulációját követően a transzformáns vonalak egy részének fokozott ellenállóságát tapasztalták (Borejsza-Wysocka és mtsai. 2006). A rezisztencia háttere abban áll, hogy normál esetben az *E. amylovora* betegség specifikus génje (*dspE*) által kódolt effektor protein négy specifikus kinázzal (*DIPM* gének által kódolt DspE enzimekkel kölcsönhatásba lépő növényi (*Malus*) proteinek) kölcsönhatásba lépve hozzájárul a betegség kialakulásához. Így a *DIPM* géneket lecsendesítve meggátolható az általuk kódolt fehérjék DspE enzimekkel való kölcsönhatása.

Biológiai védekezés

A már korábban említett sztreptomycin-rezisztens *E. amylovora* törzsek megjelenése és az annak okán teret hódító, az antibiotikumok növényvédelmi célú használatának elkerülését támogató nézet elősegítette többek között különböző biológiai védekezési stratégiák kidolgozását. A tűzelhalás elleni biológiai védekezési módok kutatása és azok eredményeképpen kifejlesztett, gyakorlatban alkalmazható készítmények vizsgálata az utóbbi időszakban számos tudományos cikk témájául szolgált, melyekről átfogó képet Johnson és Stockwell (2000), Vanneste (2011) és Zeller (2006) munkáiból nyerhetünk.

Antagonista szaprofiton baktériumok

A mikroorganizmusokkal történő biológiai védekezés ebben az esetben úgy valósul meg, hogy ezek a baktériumok a bibe felszínén az *E. amylovora*-t megelőzően elszaporodva a kórokozó epifiton populációjának növekedését gátolják (Johnson és mtsai. 1993, Wilson és mtsai. 1992), ezáltal lecsökkentik mind az elsődleges, mind a további virágfertőzés valószínűségét. Ezt a hatásmechanizmust antibiózis is kiegészítheti (Stockwell és mtsai. 2002, Zeller 2006).

A legkorábbitól és az eddig talán legátfogóbban vizsgált antagonista mikroorganizmus törzsek a *Pantoea vagans* (syn. *Pantoea agglomerans*, *Erwinia herbicola*) csoportba (Rezzonico és mtsai. 2009a) tartoznak. Közülük is a nemzetközileg legismertebbek az amerikai EhC9-1

[BlightBan[®] C9-1 (USA), Bloomtime Biological[™] (Új-Zéland)], a P10c [Blossom Bless[™] (Új-Zéland), Poma Vita[™] (Olaszország)] és az Eh252 törzs (**Vanneste 2006, Zeller 2006**). A Magyarországon almalevélről izolált *P. agglomerans* HIP32 izolátum (**Hevesi és Al-Arabi 1999**) az *E. amylovora*-val szembeni hatékonyságát is igazolta (**Al-Arabi 2002, Bubán és mtsai. 2007, Hevesi és mtsai. 2006b**). **Hevesi és mtsai. (2008)** kísérletükben biokémiai és molekuláris módszerekkel több *P. agglomerans* izolátummal összehasonlítva részletesen jellemezték a *P. agglomerans* HIP32-t, továbbá kimutatták, hogy genomjának molekuláris vizsgálata alapján 95-96%-os homológiát mutat (16S rRNS gén) más *Pantoea* fajokkal, illetve 99%-ban megegyezik (*rpoB* gén) a *Klebsiella pneumoniae* fajjal.

Az első, tűzelhalás elleni biokontroll ágens a *Pseudomonas fluorescens* A506 jelzésű törzs volt (**Lindow és mtsai. 1996, Vanneste 2006**), mely 1995-től került kereskedelmi forgalomba (USA) BlightBan[®] A506 néven (**Johnson és Stockwell 2000**). Tűzelhalás elleni hatékonyságát a *P. vagans* C9-1 törzzsel körte- és almavirágokon végzett szabadföldi kísérletekben összevetve (**Stockwell és mtsai. 2010**) a C9-1 eredményesebbnek bizonyult. A két törzs együttes alkalmazása a vártnál kevésbé volt hatékony, melynek oka e törzsek hatásmechanizmusának inkompatibilitásában keresendő.

Igazolt antagonista hatással bír a gram pozitív *Bacillus subtilis* BsBD 170 (BioPro[®], 2001, Németország), QST713 (Serenade[®], USA), illetve a BS-F3 (**Alexandrova és mtsai. 2002**) baktériumtörzs és egy másik epifiton baktérium, a *Rhanelia aquatilis* Ra 39 törzse (**Laux és mtsai. 2003**) is.

A különböző antagonista baktériumok hatékonyságának összehasonlítását tárgyaló számos munka közül kiemelkedik **Sundin és mtsai. (2009)** több évre kiterjedő, átfogó kísérletsorozata.

Egyéb mikroorganizmusok

A tűzelhalás elleni biológiai védekezés egy másik kutatási irányát képezi az úgynevezett genetikailag jellemzett, avirulens inszerciós mutáns *Erwinia amylovora* törzsek esetleges gyakorlati felhasználása (**Tharaud és mtsai. 1997**). Ezek a transzpozon inszercióval előállított *E. amylovora* mutánsok két csoportot képeznek; az egyikben az inszerciók a kórokozó genomjában a nem-gazda növényeken hiperszenzitív reakciót (HR-t), míg gazdanövényeknél patogenitást kiváltó *hrp* géncsaládot (**Steinberger és Beer 1988**), illetve egy részük azon belül egy *dsp* (betegség specifikus), később *hrm* (hiperszenzitív választ moduláló) elnevezésű alcsoportot, a másikban az amylovoran bioszintéziséért felelős *ams* régiót (**Belleman és Geider 1992, Tharaud és mtsai. 1994**) érintik. Ez utóbbi *Ams⁻* mutánsokra a kórokozó patogenitásában és virulenciájában meghatározó szerepet játszó extracelluláris poliszacharid (EPS) - elsősorban amylovoran – termelésének hiánya jellemző (**Tharaud és mtsai. 1997**). A

növényvédelmi alkalmazásuk azonban megfontolandó, mert bár az EPS burkot nem termelő, avirulens *E. amylovora* mutánsok fág rezisztensek (**Roach és mtsai. 2011**), az egyéb típusú, nem EPS⁻ avirulens mutánsok esetében elvileg megvan a kockázata annak, hogy a lizogén fágok által indukált transzdukció révén kialakul egy revertáns mutáns, virulens populáció.

Az *E. amylovora*-val szembeni antagonista hatással kapcsolatos, élesztőgombákkal végzett kutatások (**Kunz és mtsai. 2004, 2011**) is biztató eredményeket szültek. *Aureobasidium pullulans* (Blossom Protect™, USA) és *Metschnikowia pulcherrima*, valamint *Cryptococcus* spp. élesztőgomba törzsekkel végzett kísérletekben (**Jelkmann és Lindner 2008, László 2008, Pusey és mtsai. 2009, Seibold és mtsai. 2006**) kimutatták e fajok *E. amylovora*-val szembeni antagonista hatását. A hazánkban is alma, körte, birs, és naspolya kultúrákban engedélyezett (**Ocskó és mtsai. 2014**) Blossom Protect™ nevű készítményt németországi szabadföldi kísérletekben a sztreptomicinhez hasonló hatásfokúnak találták (**Ertl és mtsai. 2007**).

Bakteriofágok használata is sok esetben bizonyult már eredményesnek (a téma részletes tárgyalását lásd a **3.4, 3.5 és 3.6** fejezetben).

Természetes eredetű anyagok

Növényi kivonatok és illóolajok

Az 1980-as évek végétől kezdődően számos növényi kivonat és illóolaj antibakteriális hatását vizsgálták az *E. amylovora* ellen. **Mosch és mtsai. (1989)** kísérletei alapján a fekete dió (*Juglans nigra*), ecetfa (*Rhus typhina*), közönséges borbolya (*Berberis vulgaris*), közönséges mahónia (*Mahonia aquifolium*) és a fokhagyma (*Allium sativum*) kivonatai bizonyultak a leghatékonyabbaknak. A borostyán (*Hedera helix*) kivonatának hatásossága is igazolást nyert (**Baysal és mtsai. 2002, Mosch és mtsai. 2000**).

Az *E. amylovora* ellen igazolt és jelentős antimikrobiális hatással bír többek között a szurokfű (*Origanum vulgare*), borsikafű (*Satureja hortensis*), kerti kakukkfű (*Thymus vulgaris*) és a *Thymbria spicata* var. *spicata*, egy másik kakukkfűfaj illóolaja (**Basim és mtsai. 2000, Hevesi és mtsai 2006a, Kokoskova és mtsai. 2011, Scortichini és Rossi 1989**). Ez utóbbi növényi illóolaj két készítmény (Aksebio 2, Bio Zell-2000B) hatóanyagát is képezi (**Zeller 2006**).

Ásványi porok

Több, a biogazdálkodásban használt kőpor alapú készítmény németországi tesztelése során kiderült, hogy a Myco-Sin és Ulmasud készítmények ásványi vegyületei igen hatékonyak lehetnek a tűzelhalás ellen (**Roemmelt és mtsai. 1999**). Nyugat-Virginiában (USA) egy másik

vegyülettel, a kaolinnal alma- és körteültetvényekben végzett virágkezelések a virágfertőzés mértékének szignifikáns lecsökkenését eredményezték (**Zeller 2006**).

3.4 A BAKTERIOFÁGOK JELLEMZÉSE

3.4.1 BEVEZETÉS

A bakteriofágok vagy röviden fágok baktériumokat fertőzni képes vírusok, melyeket a bioszféra egyik leggyakoribb, legszéleskörűbben elterjedt és legváltozatosabb szervezeteként tartanak számon (**Adams 1959, Kutter és Sulakvelidze 2005**). Egyes bakteriológusok már az 1890-es években felfigyeltek egy ismeretlen baktériumgátló ágensre, de senki sem tisztázta az ágens pontos mibenlétét (lásd pl. **Sulakvelidze és mtsai. 2001**). A fágokat a 20. század elején fedezték fel vagy pontosabban ekkor kerültek újra felfedezésre egymástól függetlenül **Twort (1915)** és **d'Herelle (1917)** által. Tudományos munkájukban mindketten bakteriális lízisből származó szűrhető ágensekről számoltak be, de d'Herelle volt az, aki rájött arra, hogy baktérium vírusokat fedezett fel, melyeknek a bakteriofág nevet adta (eredetiben: „un bactériophage obligatoire”) (**Summers 2005**).

3.4.2 A BAKTERIOFÁGOK BIOLÓGIÁJA

Maga a fág, a virion részecske, az adott fagra jellemzően DNS-ből, ritkábban RNS-ből áll. Ezt kívülről egy fehérjeburok, kapszid övezi, mely egyrészt védi az egy lineáris vagy cirkuláris kromozómát tartalmazó haploid fággenomot a fág életsiklusának extracelluláris szakaszában a különféle nukleinsavbontó enzimektől, hozzájárul a virion fogékony baktériumsejthez történő tapadásához, és azt követően annak a sejt citoplazmájába juttatásához (**Gill és Abedon 2003**). Életsiklusuk több alaplépésre különíthető el. Az első a fent említett extracelluláris fázis, mely során a fág várakozik, míg alkalmas gazdasejtre nem lel. Ezt követi egy infekciós szakasz, melyben a fág fiziológiai folyamatainak nagy része lejátsszódik (**Guttman és mtsai. 2005**), úgymint a megtapadás és a penetráció, a fág nukleinsav-tartalmának baktériumsejtbe való behatolása (**Molineux 2006**), melyet gyorsan követ a gazdasejt nukleinsav- és fehérjeszintézisének felborulása és a sejt a fággenom hatására virális alkotóelemek termelésébe kezd, majd végül az új vírusrészecskék összeszerelődnek. Az adott fágtól függően ezek a virionok aztán vagy akkumulálódnak a baktérium citoplazmájában - az úgynevezett lítikus fágok esetén -, vagy, mint a fonális fágoknál a sejt folyamatosan új vírusrészecskék kiválasztására kényszerül, saját membránját adva burokként. Az infekció - rendszerint fág-indukált bakteriális lízis révén - a fág részecskék baktériumsejtből való kiáramlásával ér véget, melyet követően kezdetét veszi egy újabb extracelluláris szakasz (**Abedon 2014, Gill és Abedon 2003**).

A lítikus fágok, melyek esetében az érett virionok csak a gazdasejt teljes felbomlása (lízise) után szabadulnak ki a baktériumból két csoportra oszthatók: az obligát lítikus vagy virulens, illetve a mérsékelt vagy temperált fágokra (pl. P1 *Escherichia coli* fág). Csak ez utóbbiak képesek úgynevezett lizogén életciklusra, amikor is a penetrációt követően rövid időn belül leáll az infekció folyamata és a legtöbb esetben a fág örökítőanyaga profágként a baktériumsejt kromoszómájába integrálódik és egyfajta nyugalmi állapotban a gazdabaktériummal együtt replikálódik. A gazdaszervezet anyagcseréjében bekövetkező változások és magának a fertőzést indukáló fágnek a sajátosságai révén az endogén fág később aktivizálódhat, mely a baktériumsejt líziséhez vezet (**Gill és Abedon 2003, Putnoky és Hoffmann 2007**).

A fágokat gazdaspecifitás jellemzi. Gazdakörük (host range) azt jelzi, hogy az adott fág mely baktériumtörzsön képes szaporodni (**Putnoky és Hoffmann 2007**). A fág táptalaja a megfelelő gazdabaktérium. A fágokkal folyó vizsgálatokban egy lágyabb, úgynevezett fedőagar rétegbe belekeverik a baktériumot és a megfelelően hígított fágot, mely a növekvő baktériumgyepen szaporodni kezd. A fágpopuláció lágyagar rétegben történő növekedése tarfoltok (plaques vagy magyarul plakkok) formájában figyelhető meg. Ezek a fág által indukált, bakteriális lízis előidézte terjedő régiók egy-egy fág infekció több fertőzési cikluson keresztül kialakuló következményei. A plakk morfológiájának meghatározó bélyege a méret és a tisztaság foka. A nagy plakk gyors, a kicsi lassú fág szaporodásra utal. Amennyiben a fág nem képes minden baktériumot elpusztítani a tarfolt területén akkor zavaros (turbid plaque), ha képes erre, akkor tiszta plakkot (clear plaque) ad (**Gill és Abedon 2003, Putnoky és Hoffmann 2007**). A tiszta plakk a fág által kódolt lizin hatására alakul ki, nem tartalmaz élő bakteriális sejteket (**Hartung és mtsai. 1988**). A bakteriofágok gazdakörének vizsgálata nem csupán egy adott fágizolátum, illetve törzs egyik meghatározó bélyegét írja le, de ennek során történik a kórokozó baktériumra specifikus fágok elsődleges szelekciója. E teszt során kiválaszthatók a fágok közül azok, amelyek a legtöbb vizsgált patogén törzset képesek lizálni a baktériumgyepen tiszta plakkot képezve, ugyanakkor más, nem cél baktériumon nem alakítva ki tarfoltokat. Az ilyen lítikus fágok lehetnek alkalmasak fágterápiás célra, míg a baktériumrétegen zavaros plakkot képező temperált fágok, melyek felhasználását el kell kerülni, kiszűrendők a vizsgált fágok közül.

3.4.3 RENDSZERTANI BESOROLÁSUK

A bakteriofágok rendszerezésének alapja a morfológiájuk – a farokkal rendelkező fágok esetében a fej és a farok mérete, illetve típusa a meghatározó bélyeg - és a nukleinsav típusa, mely lineáris vagy körkörös elrendezésű, egy - vagy kétszálú RNS, illetve DNS lehet. A rendszerezéssel a Bacterial Virus Subcommittee of the International Committee on Taxonomy of

Viruses (ICTV) foglalkozik (**Maniloff és Ackermann 1998**). A farokkal és kettős szálú lineáris DNS-sel rendelkező, *Caudovirales* rendbe sorolt fágok (**Ackermann 1998, 2007**) adják az irodalomból ismert fágok döntő többségét. A rendbe a *Myoviridae* (burok nélküli, összehúzódó farok, pl. T4 fág), a *Siphoviridae* (burok nélküli; hosszú, nem-összehúzódó farok, pl. λ fág) és a *Podoviridae* (burok nélküli; rövid, nem-összehúzódó farok pl. T7 fág) családok tartoznak (**Mc Grath és van Sinderen 2007**).

3.4.4 ALKALMAZÁSI TERÜLETÜK

Fágterápia

A bakteriofágok humán terápiás felhasználása 1919-től (**Summers 1999**) vette kezdetét és a fágterápiát Oroszországban, valamint Grúziában (G. Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology, Tbilisi) azóta is széles körben kutatják és alkalmazzák (**Kutter 2009**). Noha a korai, nem megfelelően kontrollált kísérletek nem igazolva a várakozásokat az antibiotikumok térhódításával karöltve nyugaton visszavetették a fágterápiás kísérleteket, mára a fágok számos, humán- és állatgyógyászatban (**Abedon és mtsai. 2011, Haq és mtsai. 2012, Johnson és mtsai 2008, Kutateladze és Revaz 2010, Milch 2000, Sulakvelidze és mtsai. 2001**), valamint a növényvédelemben (lásd 3.5 fejezet) alkalmazott, eredményes felhasználása ismert.

Genetikai és biológiai alkalmazások

A molekuláris genetikában ismert általános bakteriális transzdukció jelensége (**Lederberg és mtsai. 1951**) - azaz amikor a fág bármely baktériumgént képes átvinni egyik baktériumsejtből a másikba - úgynevezett finomtérképezésre használható (**Putnoky és Hoffmann 2007**).

A fág „display” molekuláris módszerénél, melyet új tulajdonságokkal bíró polipeptidek szintetizálására használnak, az adott polipeptidet kódoló DNS-t a fág köpenyfehérje génjeivel fúzionálják, majd az adott fehérjét a fág felületén expresszáltatják (**Smith 1985**).

A járványtani vizsgálatoknál a fágtypizálás vagy fágtípus meghatározás során fertőző baktériumokat bakteriofágok segítségével azonosítanak (**Milch és Pászti 2008**). A módszer azon alapszik, hogy a vizsgálatban használt úgynevezett típusfágok az azonosítandó baktériumtörzseket azok fogékonysága esetén lizálják (**Haq és mtsai. 2012**).

A fágok, gazdaspecifitásukat adó receptor kötő fehérjéken alapuló molekuláris próbák révén, kórokozó baktériumok gyors kimutatására (**Singh és mtsai. 2012**) is használhatók, továbbá potenciálisan terapeuta gének (**Barry és mtsai. 1996**) és vaccinák antigénjeinek (**Clark**

és **March 2004**) szállítására, valamint hidrológiai modellezésekben jelölőanyagként (**Martin 1988**) is alkalmasak.

Szerepük lehet a biztonságos élelmiszergyártás folyamataiban (**Goodridge és Bisha 2011**), de kórházi felületek fertőtlenítésére (**Brusina és mtsai. 2013**) is eredményesen használhatók.

3.5 FÁGTERÁPIA A NÖVÉNYVÉDELEMBEN

Bár már az 1920-as években felmerült az az ötlet, hogy bakteriofágokat használjanak fel növényi kórokozó baktériumok ellen (**Mallmann és Hemstreet 1924**), az antibiotikumok felfedezése visszavetette a bakteriális betegségek fágokkal való kezelésére irányuló, Nyugaton folyó kutatásokat (**Summers 2001**). A fágok sikeres orvosi alkalmazása terén bővülő ismeretek, a réz- és antibiotikum-rezisztens növénykórokozó baktériumtörzsek megjelenése, valamint a környezetbarát növényvédő szerek iránti igény azonban ismét felkeltette az érdeklődést a bakteriofág-alapú növényvédelmi módszerek kidolgozására. Az első fág-tartalmú módszert 1983-ban szabadalmaztatták az Amerikai Egyesült Államokban, amelyet a fagykárt előidéző jégmag-képző baktériumok [(pl. *Erwinia herbicola* (syn. *Pantoea agglomerans*), *Pseudomonas syringae*] ellen dolgoztak ki (**Kozloff és Schnell 1983**). A fágok növényvédelmi alkalmazására vonatkozó máig legismertebb készítmény az AgriPhage™ (<http://omnilytics.com/products/agriphage>), amely a paprika és a paradicsom pszeudomónászos és xantomónászos betegsége ellen hatékony; a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* és *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* vad típusú és ún. gazdakör-mutáns („host range mutant”) (**Jackson 1989, Flaherty és mtsai. 2000**) fágjainak a kombinációját tartalmazza. Az első *E. amylovora* elleni bakteriofág-alapú biopeszticid, mely a PhiEaH1 (GenBank-i leltári szám: KF623294) és PhiEaH2 (JX316028.1) fágtörzseket valamint UV elleni védőanyagot tartalmaz, Erwiphage néven 2012-től szükséghelyzeti engedéllyel alkalmazható Magyarországon (**Meczker és mtsai. 2014**). A növényvédelmi célú fágterápiás kutatások eddigi eredményeit több cikk is feldolgozta (**Balogh és mtsai. 2010, Frampton és mtsai. 2012, Jones és mtsai. 2007, Nagy és mtsai. 2012, Svircev és mtsai. 2010**).

A bakteriofágokat érintő kutatások hazánkban nagy múltra tekintenek vissza (**Klement 1959, Klement és Király 1957, Klement és Lovas 1957, 1959, 1960**). A bakteriofágok már hatékonynak bizonyultak számos patogén baktérium okozta növényi betegség ellen (**Balogh és mtsai. 2010**). Így az *Erwinia* spp. által okozott kála baktériumos lágyrothadása (**Ravensdale és mtsai. 2007**), az almatermésűek tüzelhalása (**Kovács és mtsai. 2012, Meczker és mtsai. 2014, Lehman 2007, Schnabel és mtsai. 1999, Schwarczinger és mtsai. 2011, Svircev és mtsai. 2006**); a *Xanthomonas* spp. által okozott paradicsom xantomónászos betegsége (**Balogh és**

mtsai. 2003, Flaherty és mtsai. 2000, Iriarte és mtsai. 2012); az őszibarack (**Civerolo és Kiel 1969, Saccardi és mtsai. 1993**), a muskátli (**Flaherty és mtsai. 2001**), a citrusfélék (**Balogh és mtsai. 2008**), a dió (**McNeil és mtsai. 2001**) bakteriózisa; a hagyma xantomónászos betegsége (**Lang és mtsai. 2007**), a káposzta feketeerősége (**Marroni és Germani 2014**); citrusfélék xantomónászos betegségei (**Balogh és mtsai. 2008**); a *Ralstonia solanacearum* által okozott dohány baktériumos hervadása (**Iriarte és mtsai. 2012, Tanaka és mtsai. 1990**); termesztett gombában a *Pseudomonas* spp. által okozott baktériumos foltosodás (**Munsch és Olivier 1995**); a *Streptomyces scabies* által okozott burgonya varasodása (**McKenna és mtsai. 2001**) és a szőlő agrobaktériumos gyökérgolyvája (**Boyd és mtsai. 1971**) ellen.

3.6 FÁGOK ALKALMAZÁSA AZ *ERWINIA AMYLOVORA* ELLEN

3.6.1 FÁGIZOLÁLÁS

A növénykórokozó baktériumok elleni bakteriofágokkal való védekezés elsődleges lépése az adott kórokozóra specifikus fágok izolálása. Ez az *E. amylovora* esetében mind a tűzelhalás tünetét mutató, vagy ritkábban tünetmentes növényi részről, mind a növény közvetlen környezetében lévő talajból történhet, mely utóbbi feltételezett fágrezervoárként szolgál (**Crosse és Hingorani 1958**). Noha korábban többen beszámoltak *E. amylovora*-t lizálni képes bakteriofág izolátumokról (**Billing 1960, Okabe és Goto 1963**), elsőként **Erskine (1973)** tett átfogó javaslatot a tűzelhalás elleni bakteriofág alapú biológiai védekezés alkalmazására, aki talajmintából izolált *E. amylovora*-specifikus fággal végzett kísérleteket. A folyamat, melyben egy (**Ritchie és Klos 1977**), illetőleg több (**Gill és mtsai. 2003**) gazdabaktérium törzzsel történik a fágizolálás gazdaspecifikus, illetve szélesebb gazdakörű fág izolálásához vezet.

3.6.2 FÁGIZOLÁTUMOK JELLEMZÉSE

A korai vizsgálatokat (**Erskine 1973, Ritchi és Klos 1979**) követően mára egyre több kutatás tárta fel a különböző *E. amylovora* fágizolátumok sajátosságait, vizsgálva többek között gazdakörüket, partikulum-, illetve plakkmorfológiájukat, molekuláris felépítésüket PCR, RFLP (restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus) technikával és szekvencia analízissel (**Born és mtsai. 2011, Boulé és mtsai. 2011, Dömötör és mtsai. 2012, Gill és mtsai. 2003, Lehman és mtsai. 2009, Meczker és mtsai. 2014, Müller és mtsai. 2011a, 2011b, Schnabel és Jones 2001**). Mára 11 *E. amylovora*-specifikus bakteriofág [Era103 (GenBank-i leltári szám: EF160123.1); ΦEa21-4 (**Lehman és mtsai. 2009**); ΦEa1h, ΦEa100, ΦEa104 (**Müller és mtsai. 2011b**); vB_EamP-L1, vB_EamM-M7, vB_EamP-S6, és vB_EamM-Y2 (**Born és mtsai. 2011.**), phiEaH2 (**Dömötör és mtsai. 2012**), phiEaH1 (**Meczker és mtsai. 2014**)] teljes genomja ismert.

3.6.3 FÁGOK HATÉKONYSÁGI VIZSGÁLATAI

A fágizolátumok gazdabaktériumra gyakorolt hatását folyadékkultúrában, körte- (Boulé és mtsai. 2011, Lehman 2007), illetve almavirágokon (Schwarczinger és mtsai. 2011, Müller és mtsai. 2011a) éretlen zöld körtegyümölcs szeleteken (Müller és mtsai. 2011a) vizsgálják *in vitro*. Ezek közül a virágokon végzett tesztekkel lehet a potenciálisan leghatékonyabb fágizolátumokat kiválasztani, mivel a kórokozó elleni biológiai védekezés fő stratégiája az *E. amylovora* populáció bibéken történő tavaszi felszaporodásának (Thomson 1986), ezáltal az elsődleges virágfertőzésnek a megakadályozása. Azokban az országokban, ahol tiltó rendelkezések miatt a természetben mesterséges inokuláció nem végezhető, a szabadföldi kísérletekben (Kovács és mtsai. 2012) csak a természetes *E. amylovora* fertőzésekkel lehet „dolgozni”.

3.6.4 KIHÍVÁSOK ÉS TÁVLATOK A FÁGTERÁPIA TERÉN

A növénypatogén baktériumokat fertőző fágok, köztük az *E. amylovora*-specifikus fágok életmódjáról, ökológiai igényeiről, és genetikai felépítéséről napjainkra jelentős mennyiségű információ halmozódott fel (Ackermann és DuBow 1987, Adams 1959, Civerolo 1972, Gill és Abedon 2003, Gill és mtsai. 2003, Lehman és mtsai. 2009, Müller és mtsai. 2011a, 2011b, Schnabel és Jones 2001). Ezek alapján fény derült arra, hogy e fágok számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, amely lehetővé teszi a növényvédelemben való eredményes felhasználásukat: nagy számban fordulnak elő a természetben, veszélytelenek az eukarióta szervezetekre, meghatározott baktériumfajokra, illetve törzsekre specifikusak és ezáltal a honos, nem patogén baktérium flórát nem károsítják, továbbá a fág izolálás, felszaporítás, és tárolás viszonylag egyszerű és nem költséges folyamat (Jones és mtsai. 2007, Nagy és mtsai. 2012). Noha a fágoknak szembe kell nézniük bakteriális védekező mechanizmusokkal (Hyman és Abedon 2010) és ismeretes, hogy fennáll a lehetősége fág-rezisztens baktérium törzsek kialakulásának (Okabe és Goto 1963, Roach és mtsai. 2008), ezek a hátrányok lítikus és gazdakör-mutáns fágok és fágkombinációk alkalmazásával kezelhetők (Schnabel és mtsai. 1999, Svircev és mtsai. 2010).

A változó környezeti körülményekre való nagyfokú érzékenységük, miszerint szélsőséges hőmérséklet, pH, és csapadék viszonyok, valamint erős UV sugárzás mellett könnyen inaktiválódhatnak (Iriarte és mtsai. 2007), igazi kihívást jelent biopeszticidként való felhasználásuk során. A fágok növényi zöldfelületen való fennmaradását és ezáltal hatékonyságukat nagyban elősegíti az, ha megfelelő időben (Balogh és mtsai. 2007), koncentrációban, és védőanyagokkal (Balogh és mtsai. 2003), vagy bizonyos antagonisták

szaprofiton baktériumokkal együtt (**Boulé és mtsai. 2011, Lehman 2007, Svircev és mtsai. 2006**) történik a védendő növény felületére való kijuttatásuk.

A fágok életképességének fokozását célzó másik lehetséges irány a fágok védendő növénybe történő juttatása. A rizoszféra (a talajnak a gyökeret körülvevő zónája, amelyben közvetlen kapcsolat alakul ki a növény és a talaj mikroorganizmusai között) kedvezőbb környezetet biztosíthat a fágok számára (**Jones és mtsai. 2007**) figyelembe véve, hogy a talaj szerkezetétől, állapotától függően (például alacsony pH) a fágok talajszemcsékhez történő adszorpciója lecsökkenti a szabad, fertőzőképes fágok számát (**Assadian és mtsai. 2005, Sykes és mtsai. 1981**). A vírusok azon képessége, hogy a gyökéren keresztül a növénybe tudnak jutni régtől ismert (**Mazur és Paciorkiewicz 1973, Murphy és Syverton 1958, Helms és Wardlaw 1976, Oron és mtsai. 1995**). Számos tudományos munka számolt be arról, hogy a bakteriofágok is képesek a gyökéren keresztüli penetrációra és azt követően a növény távolabbi részeibe történő transzlokációra (**Rao és Srivastava 1973, Ward és Mahler 1982**) életképességüket napokig megőrizve (**Boyd és mtsai. 1971, Iriarte és mtsai. 2012**). Az is igazolást nyert, hogy adott növénypatogén baktériumokra specifikus fágok talajra irányuló kijuttatását követően a baktériumkórokozó által kiváltott betegség mértéke lecsökkent (**Boyd és mtsai. 1971, Fujiwara és mtsai. 2011, Iriarte és mtsai. 2012**). A fágoknak a növény földfelszíni részein keresztül való penetrációs képességéről azonban kevés információ áll rendelkezésre (**Kovács és mtsai. 2012, 2013**) és az *E. amylovora* fágjaival kapcsolatban ez a fajta fág-növény interakció eddig még nem került jellemzésre.

4 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 A VIZSGÁLATOK HELYE ÉS IDEJE

A bakteriofágok gyűjtése Magyarország különböző földrajzi területeiről, ültetvényeken, közterületen, illetve kertekben fellelt gazdanövények tűzelhalás tüneteit mutató növényi részeiről az adott év (2006, 2007) áprilisától késő augusztusig terjedő időszaka alatt történt.

A bakteriofágok izolálása és tisztítása, plakkmorfológiai, molekuláris, gazdakör, valamint az *E. amylovora* okozta tünetekre gyakorolt hatásuk különböző *in vitro* vizsgálatai a fágtranszlokációs tesztekkel együtt az MTA ATK Növényvédelmi Intézet, Biotechnológiai osztályának akkreditált *Erwinia*-laboratóriumaiban történtek 2006-2013 között.

A fágpartikulumok transzmissziós elektronmikroszkóppal végzett morfológiai jellemzése az MTA Természettudományi Kutatóközpont Anyag- és Környezetkémiai Intézetében, Szabó László vezetésével történt.

Az általunk tervezett primerek előállítását az Invitrogen, Life Technologies (Budapest, Magyarország) és a Microsynth (Balgach, Svájc) laboratóriumaiban végezték.

Egyes fágizolátumaink adott géneket kódoló szakaszai bázissorrendjét az Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Németország) laboratóriumában határozták meg 2008 és 2013-ban.

4.2 A VIZSGÁLATOK SORÁN HASZNÁLT BAKTÉRIUM-IZOLÁTUMOK, ILLETVE TÖRZSEK

A vizsgálatokban szereplő, Süle Sándor, Hevesi Mária, Klaus Geider és Bozsó Zoltán által a rendelkezésünkre bocsátott baktérium-izolátumokat, illetve törzseket az **1.a-b táblázat** foglalja magába.

1.a táblázat A vizsgálatainkban szereplő tesztbaktériumok: magyarországi *E. amylovora* izolátumok (Ea1-Ea31), egyéb *E. amylovora* törzsek, és más *Erwinia* fajok

Baktérium-izolátum / törzs	Forrás / Hivatkozás ^b
Ea1	Hevesi M. / Hevesi (1996)
Ea2, Ea3, Ea4, Ea5, Ea6, Ea7, Ea8, Ea10, Ea11, Ea12, Ea13, Ea14, Ea15, Ea17, Ea18, Ea19, Ea20, Ea21, Ea22, Ea24, Ea25, Ea26, Ea27, Ea28, Ea30, Ea31	Németh J. és Süle S. / (nk)
Ea1/79	Falkenstein és mtsai. (1988)
Ea1/79del100	K. Geider / Bugert és Geider (1995)

1.a táblázat folytatása

Baktérium-izolátum / törzs	Forrás / Hivatkozás ^b
Ea1/79Sm	K. Geider / Bellemann és mtsai. (1994)
EaDS02	K. Geider
EaDS05	K. Geider
EaRW1/06	K. Geider
EaOR1/07	K. Geider
Ea63/05	K. Geider
EaCFBP1430	K. Geider, CFBP
<i>E. billingiae</i> Eb661	K. Geider / Mergaert és mtsai. (1999)
<i>E. persicina</i>	K. Geider / Hao és mtsai. (1990)
<i>E. rhapontici</i> CFBP 3618T	K. Geider / Hauben és mtsai. (1998)
<i>E. tasmaniensis</i> Et1/99	K. Geider / Kube és mtsai. (2010)

^b nk: nem közölt; CFBP: Collection Francaise de Bactéries Phytopathogenes

1.b táblázat A vizsgálatainkban szereplő tesztbaktériumok: *Pantoea agglomerans* izolátumok és törzsek, *Pantoea* fajok, valamint egyéb baktériumfajok, illetve törzsek

Baktérium fajok / izolátumok, törzsek	Forrás / Hivatkozás ^a
<i>Pantoea agglomerans</i> NB2	Süle S.
<i>Pantoea agglomerans</i> MB96	Süle S.
<i>Pantoea agglomerans</i> JCM 1236	BCE, NMGY, B02248 / Gavini és mtsai. (1989)
<i>Pantoea agglomerans</i> hu82245	Süle S.
<i>Pantoea agglomerans</i> hu82647	Süle S.
<i>Pantoea agglomerans</i> C9-1	Süle S.
<i>Pantoea citrea</i> CCM 4319	BCE, NMGY, B02244 / Kageyama és mtsai. (1992)
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> DC283	BCE, NMGY / Coplin és mtsai. (2002)
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> SW2	Süle S. / Coplin és mtsai. (1981)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Süle S. / Hamilton és Fall (1971)
<i>Agrobacterium vitis</i> F2/5	Süle S. / Staphorst és mtsai. (1985)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Bozsó Z. / Hanahan (1985)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>zinniae</i>	Schwarczinger I. / Schwarczinger és mtsai. (2008)
<i>Pseudomonas cichorii</i>	Süle S. / Kerstens és mtsai. (1996)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> H9	Süle S. / Seemüller és Arnold (1978)

1.b táblázat folytatása

Baktérium fajok / izolátumok, törzsek	Forrás / Hivatkozás ^a
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 19111	Németh J. / Hauben és mtsai. (1998)
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atroseptica</i> D2	Németh J./ Hauben és mtsai. (1998)

^a BCE NMGY: Budapesti Corvinus Egyetem Nemzeti Mikrobiológiai Gyűjtemény

Tesztbaktériumok profágtartalmának ellenőrzése

A baktérium-izolátumok és törzsek közül az Ea18, az Ea1/79, az Ea1/79Sm és az EaCFBP1430 profág (a baktérium örökítő anyagába integrálódott fággenom) tartalma előzetesen mitomycines kezeléssel (**Hevesi M. személyes közlés**) lett ellenőrizve a következők szerint: 100 µl egyéjszakás tesztbaktérium kultúrát 10 ml LB-hez adtunk, amit 10 µl (2 mg ml⁻¹) mitomicin-C-vel egészítettünk ki. Három órán át rázattuk, majd ismét 10 ml LB-t adtunk hozzá. Ezt ismét rázatás követte. Az így nyert baktériumkultúrából 24 és 48 óra elteltével 1-1 ml mintát vettünk, amit kloroformoztunk (a baktériumsejtek 2% kloroform hozzáadásával, 10 perc inkubációs időszak alatt előlésre kerültek) és centrifugáltunk (13500 rpm, 10 perc, 4°C), majd a felülúszóból 10µl-t cseppentettük fel az indikátor baktériummezőre és megfigyeltük, hogy 24, illetve 48 óra elteltével alakulnak-e ki plakkok.

4.3 REFERENCIA BAKTERIOFÁGOK

A hazai fágizolátumaink plakkmorfológiai és molekuláris összehasonlító vizsgálataihoz referenciaként Alan L. Jones (Michigan State University, USA) által, az Amerikai Egyesült Államokban izolált fág törzseket használtunk, amelyeket Klaus Geider (Julius Kühn-Institut, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Dossenheim, Németország) bocsátott rendelkezésünkre (**2. táblázat**).

2. táblázat Az összehasonlító vizsgálatoknál referenciaként használt amerikai (Michigan, USA) *E. amylovora* fágok származási adatai

Fágtörzs	Eredete	Hivatkozás
ΦEa1h	tűzelhalásos almahajtás (<i>Malus x domestica</i> 'Jonathan'), 1975	Ritchie és Klos (1975)
ΦEa100	talajminta, 1996	Schnabel és Jones (2001)
ΦEa104	talajminta almaültetvényből, 1996	
ΦEa116	tűzelhalás tünetét mutató alma-szövet, 1996	

4.4 TÁPTALAJOK, TÁPOLDATOK

Tesztbaktériumok számára

Az *Erwinia* és a *Pantoea* nemzetségbe tartozó fajok többsége LB (Luria-Bertani) tápoldatban, illetve agar tartalmú szilárd LBA táptalajon (az *E. amylovora* Ea1/79Sm törzs szelektív, 300 vagy 500 ppm sztreptomycin-szulfáttal (Duchefa Biochemie) kiegészített LBA-n), 28°C-on volt tenyésztve. Kivételt képeztek a *P. agglomerans* MB96 és a *P. stewartii* subsp. *stewartii* törzsek, amelyek CPG (Casamino-acid Peptone Glucose) tápoldatban voltak tenyésztve. Az *Agrobacterium* törzsek tenyésztése NB (Nutrient Broth)-ben 28°C-on, az *Escherichia coli* törzsé LB-ben 37°C-on, a *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* NB, illetve NA (Nutrient Agar)-ban, míg a *Pseudomonas* fajok és a *Pectobacterium* törzsek tenyésztése NA táptalajon történt. Az egyes tápoldatok, táptalajok összetételét illetően **Schaad és mtsai. (2001)** szerint jártunk el.

A fág hatásvizsgálatok során tesztbaktériumként alkalmazott *E. amylovora* törzseket sztreptomycin (300 ppm) tartalmú szelektív (Ea1/79Sm), illetve antibiotikum-mentes (Ea1/79) LBA táptalajon, rendszeresen átoltva 4°C-on tároltuk, majd a kísérletekhez a sztreptomocinnal kiegészített (500 ppm), vagy antibiotikum-mentes LB tápoldatban egy éjszakán át folyamatosan rázatva szaporítottuk fel.

Az egyes baktérium-izolátumok és törzsek megőrzése -70°C-on fagyasztó csőben, az adott baktérium számára optimális tápoldatban történt, amit 30% glicerinnel egészítettünk ki.

Bakteriofágok részére

A bakteriofágok izolálásához, felszaporításához zselatint tartalmazó SM puffert használtunk, melynek összetétele a következő: 100 mmol l⁻¹ NaCl, 8 mmol l⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O, 50 mmol l⁻¹ Tris-Cl (1 mol l⁻¹, pH 7,5), 0,002% (w/v) zselatin.

A fágok tárolása sötétben 4°C-on 2% végtérfogató kloroformmal (CHCl₃), illetve -70°C-on fagyasztó csőben, 15% glicerint tartalmazó LB-ben történt.

4.5 A VIZSGÁLT FÁGOK IZOLÁLÁSA ÉS TISZTÍTÁSA

A vizsgálat anyaga

Tűzelhalás tünetét mutató alma (*Malus x domestica* Borkh.), körte (*Pyrus communis* L.), birs (*Cydonia oblonga* Mill.) különböző növényi részeiből (ág, levél, virág, termés) történt az izolálás.

Három hazai baktérium-izolátumot (Ea12, Ea18, Ea26) alkalmaztunk a fágizolálás, illetve a fágdetektálás során. Az izoláláshoz az izolátumok keverékét, a fágdetektáláshoz az izolátumokat külön-külön használtuk.

A vizsgálat módszere

Izolálás

Az izolálást **Crosse és Hingorani (1958)** módosított módszerével végeztük. Tüzelhalás tünetét mutató növényi mintából 20-60 grammnyit 60 ml LB tápoldatba tettünk, amit az egyes *E. amylovora* izolátumok egyéjszakás rázatott kultúrájából, izolátumonként 200 µl-rel egészítettünk ki, majd rázattunk 28°C-on, 48 órán át. Az így felszaporított fágokat tartalmazó oldatban a baktériumsejtek 2% kloroform hozzáadásával, 10 perc inkubációs időszak alatt előlésre kerültek. Ezt követően a baktériumok 4°C-on, 13500 rpm-en, 20 percig tartó centrifugálással lettek leülepítve.

A fágok kimutatása

Módosított cseppteszt (Adams 1959)

A mintegy 45°C-ra kihűlt, 2 ml, 0,7% agart tartalmazó, úgynevezett LB fedőagarhoz 100 µl, 10^8 CFU ml⁻¹ egyéjszakás baktériumkultúrát adtunk, amit az előzetesen Petri csészébe kiöntött és megszilárdult LBA táptalaj felszínére öntöttünk. Az izolálási folyamat végén nyert felülúszóból százszoros hígítási sort készítettünk. Ezekből 10-10 µl-t pipettáztuk a fedőagar réteg megdermedését követően a táptalaj felszínére, majd 28°C-on, egy napig sötétben, termosztátban inkubáltuk a mintákat.

Adams-féle dupla agar réteg (Adams 1959) módosított módszerével történő szélesztés

Azokat a hígításokat, amelyek a lágyagar rétegen a felcseppentés helyén különálló, szabad szemmel könnyen számolható tiszta foltot (plakkot) adtak, szélesztettük: a fent leírt, tesztbaktériumot (100 µl) tartalmazó fedőagarhoz hozzáadtuk az adott hígítású fáguszuspenziót (100 µl), és azt, alaposan összekeverve öntöttük a szilárd LBA táptalajra. A megszilárdult lemezeket 28°C-on, egy napig sötétben, termosztátban inkubáltuk.

Fáglizátumok tisztítása

Az egy napos inkubációt követően a lágyagar rétegen kialakuló különálló tiszta foltok, azaz plakkok képezték az egyes izolátumok kiinduló forrásait. Ezt követően egy-egy mintából több különböző plakkmorfológiájú, tehát eltérő alakú, nagyságú, tisztaságú plakkokat szúrtunk ki steril pipettaheggyel. Az így kiszúrt plakkokat zselatint tartalmazó SM pufferbe pipettáztuk, majd 2% kloroform hozzáadásával 13500 rpm-en, 10 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót a fent leírtak alapján ismét szélesztettük. Ezt a procedúrát mindaddig ismételtük míg a szélesztéskor egyöntetű morfológiájú plakkokat nem kaptunk egy-egy lemezen.

4.6 A FÁGIZOLÁTUMOK MORFOLÓGIAI JELLEMZÉSE

4.6.1 PLAKKMORFOLÓGIA

A vizsgálat anyaga

Huszonkettő megtisztított bakteriofág izolátumunk (H1A, H1B, H2A, H2B, H4A, H4B, H5A, H5K, H5B, H6A, H6B, H7A, H7B, H8A, H8B, H9A, H9B, H10A, H10B, H11, H12A, H12B) és 4 amerikai fágtörzs (**2. táblázat**) jellemzéséhez tesztbaktériumként az EaCFBP1430 számú francia *E. amylovora* törzset használtuk.

A vizsgálat módszere

A fágok jellemzésének és elkülönítésének első lépése a tesztbaktériumot tartalmazó fedőrétegen kialakult plakkok méretének és a plakk körül képzett körkörös sáv szélességének vizsgálata, melyhez a megtisztított bakteriofág izolátumokat a módosított Adams-féle dupla agar réteg módszerrel (lásd **4.5** fejezet), a tesztbaktériumot tartalmazó, 1% szacharózzal kiegészített, LBA fedő lemezre szélesztettük.

A 24 órás inkubációt követően kialakult plakkok méretének és a plakkokat körülvevő sáv szélességének meghatározása 50 plakk mm-ben mért értékeinek átlagában történt.

4.6.2 FÁGPARTIKULUM MORFOLÓGIA

A vizsgálat anyaga

Munkánk során tizenkilenc fágizolátum (H1A, H1B, H2A, H2B, H4A, H4B, H5A, H5B, H6A, H7A, H7B, H8A, H8B, H9A, H9B, H10A, H10B, H11, H12B) vizsgálatát végeztük el, izolátumonként legkevesebb 50 fágot mérve.

A vizsgálat módszere

A fágok rendszertani besorolásának egyik alapja a vírus partikulumok morfológiai jellemzése, vagyis a fágok feji és farki része alakjának és méretének elektronmikroszkóppal történő vizsgálata. A vizsgálatot megelőzően a friss fágizolátum 2% kloroform hozzáadásával és 13500 rpm-en, 4°C-on, 20 percig tartó centrifugálással került bakériummentesítésre, majd 15300 rpm-en 3 órán át 4°C-on újra le lett centrifugálva. A fágokat tartalmazó üledék 50-100 µl steril desztillált vízben lett felvéve. Az így előkészített mintákat negatív festési eljárással, **Gill és mtsai. (2003)** módszere alapján, Morgagni 268D típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) vizsgáltuk.

4.7 PCR VIZSGÁLAT

PCR vizsgálattal mutattuk ki különböző DNS szakaszok meglétét, illetve hiányát az adott hazai fágizolátumokban.

A vizsgálat anyaga

Fágizolátumok és törzsek

Huszonegy fágizolátumunkat (H1A, H1B, H2A, H2B, H4A, H4B, H5A, H5K, H5B, H6B, H7A, H7B, H8A, H8B, H9A, H9B, H10A, H10B, H11, H12A, H12B) és a négy amerikai fágtörzset (**2. táblázat**) vizsgáltuk.

Primerek

Ehhez 13, a vizsgált DNS szakaszokra specifikus indító szekvenciát, azaz primer párt használtunk (**3. táblázat**). Az EPS depolimeráz, a holin, a lizozim, a termináz, a peptidáz és a Mu-szerű profág proteinekre specifikus primer párokat K. Geider, a PEa1A/B indító szekvenciákat **Gill és mtsai. (2003)**, a többi primert Kolozsváriné N.J. és Schwarczinger I. tervezte.

3. táblázat A magyar fágizolátumok PCR vizsgálatait során használt indító szekvenciák paraméterei

Vizsgált DNS szakasz	Indító szekvencia jelölése	Indító szekvencia nukleotid sorrendje (5'-3')	Várható termék hossza (bp)	PCR	
EPS depoli- meráz	Dpo-1 (forward)	GGACATACCGTGGGAAGTG	1006	MM2 A _t =47°C	
	Dpo-2c (reverse)	ATTGAGCCGGAGTTGATG			
holin	Hol-F	GCTAACGGTGTCGTCTCATA	361		
	Hol-R	CAGTTGCCGCGTTCTTGTTT			
lizozim	Lys-F	GCTGGACTTCTGGTAGACTT	537		
	Lys-R	GCTTGCTGGTAACTCCTGTA			
termináz	Term-F	GAAGCTGTGTAAGCCTCTGT	1079		
	Term-R	GTGAGGCTGGTTCGTCAACT			
peptidáz	Pep-F	CAACTGTCCAAGACGGTGTA	551		
	Pep-R	CAGAGATACCGCGAGAACTT			
Mu-szerű profág protein	Mu-F	CCGAGGTAGTGAATGGCTAA	614		
	Mu-R	CTCTGTCCAGAAGCCATGT			
ΦEa1h	PEa1A (forward)	AATGGGCACCGTAAGCAGT	304	MM3 A _t =60°C	
	PEa1B (reverse)	TAATGGGTATGATAGAAGGCAGA			
ΦEa100	Ea100F	ACTTGCGTGAGTGGTGCAA	344		
	Ea100R	GCAGACTAGCCACCTTCGAC			
ΦEa104	Ea104F	GGCTGCTGGCGCTCCTTACC	665		
	Ea104R	ATCAGGCCGTGCGCCAAGTC			
ΦEa1h kapszid	1hcapF	GGTAGGCACCAATAGC	474	MM3 A _t =56°C	
	1hcapR	CAGTTGAACGCAGTCC			
ΦEaH2 kapszid	H2capF	GTATTCTGAACGCGCTGCTG	508		
	H2capR	CAGTCCAGAGACTTGGCGTT			
Ea7/74 amsF gén	EaFF	CAGAAGATGACGGCGGCTAT	677		MM3 A _t =57°C
	EaFR	GCAGCGCGGTAAATTAAGCA			

3. táblázat folytatása

Vizsgált DNS szakasz	Indító szekvencia jelölése	Indító szekvencia nukleotid sorrendje (5'-3')	Várható termék hossza (bp)	PCR
ΦEaH2 <i>amsF</i> gén-szerű régió	phiEaH2-F	AGCTGTCAAACCTTCAACGTGC	609	MM3 A _t =57°C
	phiEaH2-R	TGACGTTCTTCACCGGACAG		

Az indítószekvenciák jelölésénél a név végén szereplő F, illetve R betű a primer irányultságára utal: F = forward, R = reverse; A_t = az anellálás hőmérséklete; MM2, illetve MM3 az adott PCR program jelölése.

A 3. táblázatban szereplő első három primer pár az amerikai ΦEa1h fágban jelenlévő génekre specifikus, amelyek három enzimet, az extracelluláris poliszacharid (EPS) depolimerázt, a holint, illetve a lizozimet kódolják. Az EPS depolimeráz (*dpo*) gén egy olyan depolimeráz típusú köpenyfehérjét kódol, amely hozzákötődik a baktérium EPS burkához, majd addig bontja a polimert, míg a sejt felszíne szabaddá válik. Ez által lehetővé teszi, hogy a fág a baktériumsejt egy külső membrán receptorához kötődhessen és azt követően nukleinsavtartalmát a sejtbe injektálva elindíthassa lítikus sejtciklusát (Kim és Geider 2000). A holin és a lizozim (Koch és Dreyer 1958) olyan kisméretű membránfehérjék, melyek a baktérium líziséhez járulnak hozzá: a holin nem-specifikus léziókat hoz létre a gazdasejt citoplazmatikus membránjában (Bläsi és Young 1996), melyeken keresztül a lizozim a periplazmába juthat (Kim és mtsai. 2004). A 3. táblázatban feltüntetett 4-6. primer párok a ΦEa116 fág különböző génjeinek meghatározott szakaszaira specifikusak: egy termináz, egy peptidáz, illetve egy Mu-szerű profág protein gént kódolnak. A dupla szálú DNS fág termináz a DNS elvágásával annak becsomagolási folyamatának elindításért felelős enzim (Black 1995). A peptidázok proteinek hasítását végző enzimek (Cheng és mtsai. 2004), míg a Mu-szerű profág (a gazdabaktérium kromoszómájába épült vírusgenom) protein az *E. coli* Mu1 temperált fagra (Taylor 1963) jellemző fehérje. A PEa1A/B primer pár a ΦEa1h-ra, míg az Ea100F/R primer pár a ΦEa100 fág törzsre lett tervezve. A PEa1A/B primer pár a ΦEa1h fág genomjának a 10364-10667 nukleotidokra terjedő olyan szakaszát kódolja, amely részben egy HNH endonukleázt, illetve egy hipotetikus fehérjét határoz meg. Az Ea100F/R primer pár a ΦEa100 genomjának a 10337-10662 bázispárig terjedő, részben egy HNH DNÁzt, illetve egy hipotetikus fehérjét, míg az Ea104F/R primer pár a ΦEa104 genomjának a 6271-től a 6935 bázispárig terjedő, hipotetikus fehérjéket kódoló DNS szakaszára specifikus. Az Ea1hcapF/R primer pár az ΦEa1h, a H2capF/R primer pár egy magyar fág törzs, a ΦEaH2 (Dömötör és mtsai. 2012) kapszid proteint kódoló génjére specifikus. A kapszid (a vírus örökítőanyagát körülvevő fehérjeburok) protein a nukleinsav becsomagolásának folyamatában

játszik szerepet (Xhu és Black 1990). A Φ EaH2 fágtörzsben fellelt, az *E. amylovora* egyik virulenciafaktorával, az *amsF* génnel nagyfokú hasonlóságot mutató génszakaszra terveztük a ϕ iEaH2-F/R primerpárt, az EaFF/R primerek pedig az *E. amylovora* Ea7/74 (Bugert és Geider 1995) *amsF* génjére specifikusak.

A vizsgálat módszere

Primertervezés

Az egyes indító szekvenciák tervezését az amerikai fágok bizonyos DNS szakaszainak a nemzetközi gén adatbázisokból (GenBank®) ismert bázis sorrendje alapján az NCBI Primer-BLAST program segítségével végeztük.

A PCR vizsgálat menete

Mintaelőkészítés

Az adott fáguszuspenzióból 100 μ l-t a kettős agarlemez módszernél leírtaknak megfelelően sztreptomocinnal (300 ppm) kiegészített LBA táptalajra szélesztettünk, majd az Ea1/79Sm tesztbaktériumot tartalmazó fedőagar lemezen sötétben, 28°C-on való inkubálást követően a másnapra kialakult önálló plakkokból egyet steril pipettahegygel kiszúrtunk és a pipettahegyet 200 μ l steril bidesztillált vízbe áztattuk. Ezután 4 μ l (2%) kloroform hozzáadásával és 10 perc szobahőmérsékleten történő inkubációs idő után lecentrifugáltuk (4°C, 13500 rpm, 10 perc) a mintákat, végül a tiszta fáguszuspenziót tartalmazó felülúszót a felhasználásig 2% kloroformmal kiegészítve 4°C-on tartottuk.

Nátrium-azidos DNS feltárás

Az egyes megtisztított fáguszuspenziók 50 μ l-éhez hozzáadtunk 50 μ l 2x nátrium-azid (NaN_3) oldatot (2% Triton X-100, 0,5% NaN_3 , 0,1 mol l^{-1} , pH 8-as Tris pufferben). Vortex segítségével összekevertük, majd 99°C-on 10 percig tartottuk. Ezt követően a szuszpenziót lehűtöttük és centrifugáltuk 4°C-on 13500 rpm fordulatszámon 10 percig. Az új Eppendorf csövekbe pipettázott felülúszó szolgált DNS templátként.

PCR elegy összeállítása

A 18 μ l végtérfogatú PCR elegyek 1 μ l lizált fágsejt szuszpenziót, 9 μ l Thermo Scientific 2X PCR Master Mix-et (0,05 U/ μ L *Taq* DNA polimeráz, reakció puffer, 4 mmol l^{-1} MgCl_2 , és 4 mmol l^{-1} az egyes dNTP-ből) és 4-4 μ l 2,5 pmol μl^{-1} koncentrációjú primert tartalmaztak.

PCR program lefutása

A reakció elegyek egy MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler PCR készülékben (GMI, Ramsey, MN, USA) az alábbiak szerint kerültek vizsgálatra.

MM2: (1) 94°C-on 2 perc kezdő denaturálás, (2) 92°C-on 1 perc denaturálás (a két komplementer DNS szál szétválása), (3) 47°C-on 1 perc anellálás (a primerként szolgáló oligonukleotid homológ DNS szakaszhoz történő kapcsolódása), (4) 72°C-on 1,5 perc elongáció (lánc hosszabbítás), a reakció 2-4-ig terjedő szakasza 34x ismétlődik, (5) 72°C-on 7 perc záró szintézis, majd 4°C-on tartás.

MM3: (1) 95°C-on 1 perc kezdő denaturálás, (2) 94°C-on 30 másodperc denaturálás, (3) az adott primerpároknak megfelelő hőmérsékleten 30 másodperc anellálás, (4) 72°C-on 30 másodperc elongáció, a reakció 2-4-ig terjedő szakasza 34x ismétlődik, (5) 72°C-on 7 perc záró szintézis, majd 4°C-on tartás.

Gélelektroforézis

A PCR termékek 10 µl-es mennyiségét 2 µl 6x Loading Dye (Thermo Scientific) festékkel elegyítve GelRed-del (Biotium) festett 1%-os agaróz (Invitrogen) gélben, vízszintes elektroforézis készülékben (Biorad, Power Pac Basic) választottuk el 90 V-on, 1x TAE pufferben. A felszaporított PCR termékek ellenőrzésére 6 µl markert (Thermo Scientific) futtatunk a minták mellett. A felszaporított nukleinsav szakaszokat áteső ultraibolya fényben fényképeztük (AlphaImager EP).

4.8 SZEKVENCIA-ANALÍZIS

A vizsgálat anyaga

Eddigi vizsgálataink hét hazai fágizolátumunk (H4A, H4B, H5A, H5B, H6A, H7A, H9B) genomjának depolimerázt kódoló szakaszaira és két hazai fágizolátum (H2A, H5K) genomjának részleges nukleotid sorrendjének meghatározására terjedtek ki. A H2A fágizolátum esetén a peptidáz, a Mu-szerű profág protein és a termináz, a H5K fágnál a Mu-szerű profág protein és a termináz génekre specifikus indító szekvenciákkal PCR során felszaporított DNS szakaszokat vizsgáltuk.

A vizsgálat módszere

PCR termék tisztítása szekvenáláshoz

A mintánként 50 µl mennyiségű PCR terméket PCR-M Clean Up System (Viogene) kittel a gyártó utasításai szerint tisztítottuk. A tisztított termékek DNS koncentrációját spektrofotometriás (nanodrop) méréssel (Nano maestrogen), 260 nm hullámhosszon, mintánként

2 µl-t véve meghatároztuk. Ezt követően a PCR termékeket a szekvenálást végző labor előírásainak megfelelő koncentrációra hígítottuk, és 15 µl termékhez külön 2-2 µl forward, illetve reverse primert ($10 \mu\text{mol l}^{-1}$) adtunk.

A nukleinsav szekvencia meghatározása és analízise

Az előkészített mintákat megszekvenáltattuk, és a kapott nukleotid sorrendeket a BioEdit Biological Sequence Alignment Editor (www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html) programmal értékeltük ki, majd az NCBI (National Center for Biotechnology Information) Nucleotide BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) segítségével hasonlítottuk össze a GenBank adatbázisában (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) szereplő törzsek szekvenciáival.

4.9 GAZDAKÖRVIZSGÁLAT

A fágok gazdakörének vizsgálata nem csupán azt tárja fel, hogy az adott fágok milyen gazdabaktériumon képesek szaporodni, de egyúttal megteremti a lehetőséget a kórokozó baktériumra specifikus fágok elsődleges szelekciójához.

A vizsgálat anyaga

Tizenhat hazai fágizolátumunk (H1A, H1B, H2A, H2B, H4A, H4B, H5A, H5B, H6A, H7A, H7B, H8A, H9B, H10B, H11, H12B) és a négy amerikai fágtörzs (**2. táblázat**) gazdakörét vizsgáltuk.

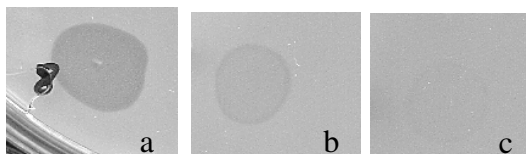
Tesztorganizmusként 31 magyar és 8 külföldi *E. amylovora* izolátum, illetve törzs, 4 egyéb *Erwinia* faj, 6 *Pantoea agglomerans* törzs és 10 más növényi kórokozó baktérium faj, illetve törzs szolgált (**1.a-b táblázat**).

A vizsgálat módszere

A tesztbaktériumok fágfogékonyságának megállapítása

Az egyes baktérium tenyészeteket a számukra optimális tápoldatban (lásd **4.4** fejezet) 12 órán át rázattuk, majd titerüket egységesen 10^8 CFU ml⁻¹-re állítottuk be. Ezt követően az Adams-féle csepptesztet (lásd **4.5** fejezet) alkalmazva állapítottuk meg az adott tesztbaktérium fággal szembeni fogékonyságát. A teszthez 10-10 µl 10^6 PFU ml⁻¹ koncentrációjú fágizolátumot használtunk.

A tesztbaktériumok fogékonysága az indikátor baktériumot tartalmazó felső agar rétegen kialakult plakkok tisztasága alapján felállított háromfokozatú skálával került jellemzésre, ahol a '++' a tiszta plakkot; a '+' a homályos vagy zavaros plakkot és a '-' a plakk hiányát jelölte (9. ábra).



9. ábra A fágok gazdakörvizsgálata során megfigyelt különböző plakktípusok. ++ : tiszta plakk (a); + : homályos plakk (b); - : nincs plakk (c).

4.10 FÁGOK ÉS FÁGKOMBINÁCIÓK *ERWINIA AMYLOVORA* BAKTÉRIUMRA GYAKOROLT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

4.10.1 FÁG HATÁSVIZSGÁLAT FOLYADÉKKULTÚRÁBAN

Fágizolátumaink *E. amylovora* elleni potenciális alkalmazásának felmérése céljából különböző hatásvizsgálatokat végeztünk *in vitro* körülmények között. Első lépésként a fágok és kombinációik baktériumszám-csökkentő hatását teszteltük folyadékkultúrában.

A vizsgálat anyaga

Tizenhat magyar fágizolátumunkat (H1A, H2A, H2B, H4A, H4B, H5K, H5B, H6B, H7A, H7B, H9A, H9B, H10A, H11, H12A, H12B) és meghatározott fágkombinációit (H2A+H5K, H2A+H7B, H5K+H7B, H2A+H5K+H7B), valamint három amerikai fágtörzset (ΦEa1h, ΦEa100, ΦEa116) vizsgáltunk.

Tesztbaktériumként sztreptomycin-rezisztens *E. amylovora* Ea1/79Sm törzset használtunk.

A vizsgálat módszere

Bakteriofág-titerérték meghatározása

Az egyes felszaporított és megtisztított fáguszuspenziókból SM pufferben százszoros hígítási sort készítünk, és csepptesztet végzünk oly módon, hogy a kiindulási fág törzsoldatnak (stock) és hígításainak 10-10 µl-ét az Adams-féle dupla agarlemez módszerrel a tesztbaktériumot tartalmazó, megdermedt fedőagar rétegre pipettázzuk. Egynapos inkubáció után az önálló plakkokat adó hígításokat (2-4 db hígítást, szükség szerint) szélesztjük (100 µl fáguszuspenziót 100 µl tesztbaktériumot tartalmazó fedőagarban) és másnap a kialakult plakkok számából a hígítás mértékének ismeretében számítjuk ki a törzsoldat koncentrációját.

Hatásvizsgálat

A vizsgálatokhoz használt fáguszuspenziók titerét 10^{10} PFU ml⁻¹ koncentrációra hígítottuk. Üvegcsövekbe kimért folyékony LB táptalajban 1 ml fáguszuspenziót, illetve az adott fáguszuspenziók kombinációjának 1:1 arányú keverékét és 1 ml 10^5 CFU ml⁻¹ koncentrációjú tesztbaktériumot mértünk be, majd 28°C-on 22 órán át rázattuk.

Az így kapott folyékony kultúrák fénytörését 600 nanométeren mértük, majd ezek alapján értékeltük a kísérletet. Minden kezelés három ismétlésben lett elvégezve. A kapott adatok statisztikai értékelése egytényezős varianciaanalízissel (one-way ANOVA) és azt követően a csoportok páronkénti összehasonlításához alkalmazott Tukey-féle HSD post hoc próbával történt.

4.10.2 FÁG HATÁSVIZSGÁLAT ALMA- ÉS BIRSVIRÁGON

Virágkísérlettel a természetes *E. amylovora* okozta elsődleges fertőzés helyén tudjuk vizsgálni a fágok hatékonyságát laboratóriumi körülmények között. A vizsgálat célja az, hogy egy-egy bakteriofág-izolátum, illetve kombinációjuk baktériumszám-csökkentő hatását összehasonlíthassuk.

A vizsgálat anyaga

Virág

Különböző tűzelhalás-fogékonyságú alma (*Malus x domestica* Borkh.) fajták ['Idared' (nagyon fogékony), 'Golden delicious Reinders' és 'Gala Schniga' (fogékony) (**Lespinasse és Aldwinckle 2000**); 'Pinova' (alig fogékony) (**G. Tóth 1997**)], és egy (fogékony) (**Severin és mtsai. 1999**) birsfajta (*Cydonia oblonga* 'Berecki') virágain teszteltük a fágok *E. amylovora* baktériumra gyakorolt hatását *in vitro* körülmények között. Az ollóval levágott, ballon fenofázisú virágok a BCE Gyümölcstermő Növények Tanszék soroksári kísérleti telepéről, illetve az MTA ATK NÖVI Herman Ottó úti szabadtéri konténeres gyümölcsfáiról származtak.

Bakteriofágok és tesztbaktérium

A folyadékkultúrás vizsgálatban leghatékonyabbnak bizonyult fágizolátumokat (H2A, H5K és H7B) és azok hármas kombinációjának (H2A+H5K+H7B) hatását teszteltük.

Az *E. amylovora* Ea1/79Sm törzset használtunk tesztbaktériumként.

A vizsgálat módszere

Patogenitás teszt

Egy éjszakán át 500 ppm sztreptomycin-szulfátot tartalmazó LB tápoldatban felszaporított baktérium szuszpenzióval ($OD_{600}=1,0=10^9$ CFU ml⁻¹) egészséges dohánynövényen (*Nicotiana tabacum* L. 'Xanthi') patogenitás tesztet végeztünk (Klement 1963). Ezt követően a hiperszenzitív reakciót (HR-t) kiváltó, azaz igazoltan patogén kórokozót használtuk a virágok inokulálásához.

Fágszuszenziók előkészítése

A fágokat először a korábbiakban leírtak szerint (lásd 4.5 fejezet) felszaporítottuk, tisztítottuk és szélesztettük, majd a 24 órás, majdnem egybefüggő plakkokat tartalmazó lemezekre 4-4 ml, zselatinos SM puffert öntöttünk és a Petri csészéket sötétben, 22-23°C-on 4 órán keresztül rázattuk (Mini Rocker MR-1, Biosan). Ezt követően az így továbbszaporított fágokat tartalmazó szuszpenziót lepipettáztuk a felső táptalajrétegről és további 1-1 ml SM pufferrel lemostuk az agarlemezt. Az összegyűjtött fágszuszenziót 2% végtérfogató kloroformmal tisztítottuk, centrifugáltuk (13500 rpm, 10 perc, 4°C), majd a fágszuszenziót képző felülúszó titerét meghatároztuk, és a szuszpenziót felhasználásig sötétben, 4°C-on tartottuk.

A virágok előkészítése

A virágokat 4-4 ml 1%-os szacharóz oldattal feltöltött csövekbe helyeztünk, melyeket előzetesen kilyuggatott hungarocell lapokba állítottunk. Végül a lapokat 200 ml 87%-os glicerines oldattal felöntött, sterilizált (10%-os hypo, háromszori steril desztillált vízzel való öblítés, UV fény alatti szárítás 20 percig), átlátszó műanyag dobozokba helyeztük és kb. 12 órán át inkubáltuk növénynevelő kamrában (Binder KBW), míg az összes virág ki nem nyílt.

A virágok kezelése

A kinyílt virágok bibéjére egy időben pipettával juttattuk ki a fágglizátum (10^{12} PFU ml⁻¹) és baktérium-szuszenzió (5×10^5 CFU ml⁻¹) 1:1 arányú keverékét 20 µl végtérfogóban (10. ábra) az alábbi kezelések szerint: (A) H2A+Ea1/79Sm baktérium (a későbbiekben Ea), (B) H5K+Ea, (C) H7B+Ea, (D) (H2A+H5K+H7B)+Ea, (Ea) Ea+víz, (H₂O) víz.

A kezeléseket követően az inkubáció a lefedett dobozokban, 16/8 óra fény/sötét és 22-23°C/19-20°C nappali/éjszakai hőmérséklet mellett történt 4 napig, növénynevelő kamrában (Binder KBW).

Almafajtánként és kezelésenként 15-15 (az erviniás kontroll esetében 20-20) virágot használtunk. A kísérletet két ismétlésben végeztük.



10. ábra Fág hatásvizsgálat alma és birsvirágon: almavirágok ('Pinova') közvetlenül a kezeléseket követően.

Baktérium-visszaizolálás

A fertőzést követő négy nap elteltével a virágokról eltávolítottuk a szirmokat, levágtuk a virágszárat és bibéikkel lefelé, egyenként steril (1,5 ml-es) Eppendorf csövekbe helyeztük őket. Egy ml steril bidesztillált vizet pipettáztunk rájuk, majd 10 perc 22-23°C-on való inkubációt követően centrifugáltuk (3 perc, 13500 rpm) (**11. ábra**), és végül óvatosan kivettük a csövekből a virágokat. Az így kapott vizes szuszpenzió szolgált mintaként.



11. ábra Fág hatásvizsgálat alma és birsvirágon: a baktérium-visszaizolálás lépéseként a kezelt virágok steril desztillált vízben való inkubációja Eppendorf-csőben.

A kísérlet értékelése

a) Baktériumsejt-számlálás

A baktérium-visszaizolálási folyamat végén nyert vizes szuszpenziót vortex segítségével összekevertük és hígítottuk, majd 50 µl 10000-szeres hígítású vizes baktérium-szuszenziót antibiotikum [500 ppm sztreptomycin és 50 ppm cikloheximid (SIGMA)] tartalmú LBA táptalaj

felszínére pipettáztunk, majd lelángolt és 70%-osra hígított etanolban (Reanal) lehűtött, L-alakban hajlított üvegbottal szélesztettük.

Két nap, 28°C-on, termosztátban való inkubációt követően a kialakult telepek száma alapján értékeltük az adott kísérletet. Két egymást követő év adatai kerültek statisztikailag kiértékelésre többszörös varianciaanalízis (MANOVA), illetve ANOVA és Tukey-féle HSD próba alapján.

b) Valós idejű PCR vizsgálat

Az 'Idared' fajta 2012-es mintáiban az *E. amylovora* titerét valós idejű („real time”) PCR alkalmazásával is vizsgáltuk, majd a kapott eredményeket összevetettük a baktériumtelepszámlálási adatokkal.

A referencia baktérium-koncentráció meghatározása

Egyéjszakás (500 ppm sztreptomicint tartalmazó LB tápoldatban 28°C-on rázatva felszaporított) Ea1/79Sm *E. amylovora* baktérium-szuszpenziót OD₆₀₀=1,5 értékre beállítunk, majd abból 8 tagú tizedelő hígítási sort készítettünk steril bidesztillált vízben. Az egyes hígításokból 50-50 µl-t, lelángolt üvegbottal, sztreptomicint (500 ppm) tartalmazó LBA táptalajra szélesztettünk, majd két napos inkubációt (28°C, termosztát) követően a kifejlődött kolóniák számából meghatároztuk az egyes hígítások titerét.

Mintaelőkészítés

A viszonyítási alapul szolgáló *E. amylovora* kontrollhígításokat és az 'Idared' kezelt virágairól a visszaizolálási procedúra végén nyert mintákat a korábban (lásd 4.7 fejezet) ismertetett módon Na-aziddal feltártuk, majd elvégeztük valós idejű PCR vizsgálatukat. A referencia *E. amylovora* minták koncentrációját a korábban (lásd 4.7 fejezet) említett módon gélelektroforézissel is ellenőriztük. Az egyes fág kezeléseknél 15-15 biológiai ismétléssel, az *E. amylovora* kontroll esetében 20 párhuzamossal dolgoztunk.

PCR elegy összeállítása

A 18 µl végtérfogatú PCR elegyek 1 µl lizált fágsejt szuszpenziót, 9 µl kétszeres KAPA SYBR®FAST Master Mix-et (KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal, KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) és 4-4 µl 2,5 pmol µl⁻¹ koncentrációjú primereket tartalmaztak. A P29TF (5' CACTGATGGTGCCGTTG 3') és a P29TR (5' CGCCAGGATAGTCGCATA 3') primerek (Salm és Geider 2004) az *E. amylovora*-ra jellemző

pEA29 plazmidra specifikusak. A minták vizsgálatát Real-Time PCR készülék (BIO-RAD, C1000Touch™ Thermal Cycler, CFX96™ Real-Time System) segítségével végeztük.

PCR program lefutása és kiértékelése

P29: (1) 95°C-on 3 perc kezdő denaturálás, majd 40x [(2) 94°C 20 másodperc, (3) 52°C 20 másodperc, (4) 72°C 20 másodperc] (5) melting analízis (65°C - 95°C, 0,5°C-ként felvételezve), (6) 10°C-on tartás.

A SYBRGreen interkalálódó festék, vagyis a DNS kettős szálak árkaiba kötve gerjeszthető. A kibocsátott fluoreszcens jelek ciklusonkénti felvételezése nyomán a program egy szigmoid görbét szerkeszt, mely a fluoreszcenciát a ciklusszámok függvényében ábrázolja. A program ezután a görbék együttesére egy a fluoreszcencia tengelyre merőleges egyenest illeszt, mely minden görbét már az exponenciális szakaszban metsz. Ez a fluoreszcencia küszöbérték. Az ehhez tartozó ciklusszámot C_q értéként jelölve jeleníti meg a program (**Bustin 2009**). Ezeket az értékeket összevetve egy ismert koncentrációjú *E. amylovora* szuszpenzió hígítási sorából nyert görbékkel kaptuk meg a relatív koncentrációkat, azaz az egyes minták egymáshoz viszonyított templát tartalmát. A méréseket 3 ismétlésben végeztük. A kapott termék hosszát agaróz gélen ellenőriztük, a későbbiekben pedig az olvadási görbéjük alapján is igazoltuk, hogy a mérések során a megfelelő termék lett vizsgálva.

4.10.3 FÁG HATÁSVIZSGÁLAT ÉRETLEN KÖRTESZELETEN

A fágok és fágkombinációk hatásvizsgálatát - az antagonista mikroorganizmusok tesztelésénél is használatos - éretlen, zöld körteszeleteken is elvégeztük.

A vizsgálat anyaga

Körtegyümölcs

Jelen munkánkban három körte (*Pyrus communis* L.) fajtaival ('Conference', 'Dr. Guyot Gyula' és 'Erdei vajkörte') dolgoztunk, melyek éretlen körte gyümölcsei az OMMI pölöskei Fajtakísérleti Állomásáról származtak.

Bakteriofágok, tesztbaktérium, antibiotikum

A virágkísérletek során is tesztelt fágizolátumok (H2A, H5K és H7B) és azok hármas kombinációjának (H2A+H5K+H7B) baktérium-visszaszorító hatását teszteltük.

A fertőzéshez az Ea1/79 vad típusú ervinia törzset használtuk, hogy az *E. amylovora* elleni védekezési kísérletekben „gold standard”-ként alkalmazott sztreptomycin-szulfát hatásával is össze tudjuk hasonlítani az egyes fágkezelések hatékonyságát.

A sztreptomycin antibiotikumot 100 ppm-es koncentrációban használtuk.

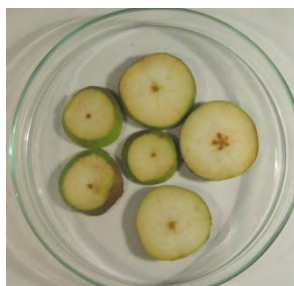
A vizsgálat módszere

Patogenitás teszt

A mesterséges bakteriális inokulációhoz a virágkísérletekben ismertetett módon (lásd 4.10.2 fejezet) ellenőriztük a tesztbaktérium patogenitását.

A körteszeletek kezelése

A 0,5 cm vastagságúra vágott éretlen, zöld körteszeleteket (6 darab/kezelés) üveg Petri csészékben elhelyezve (12. ábra) az adott kezelésnek megfelelő 10 ml fáguszuspenzióban (10^{12} PFU ml^{-1}), vízben, illetve sztreptomycin oldatban (100 ppm) áztattuk oldalanként 5-5 percre, majd mesterségesen inokuláltuk a kórokozó baktérium 10 μl -ét (5×10^5 CFU ml^{-1}) a szeletek közepére pipettázva. Az egyes kezelések a következők voltak: (A) H2A+Ea1/79 baktérium (a későbbiekben Ea), (B) H5K+Ea, (C) H7B+Ea, (D) (H2A+H5K+H7B) + Ea, (Ea) víz+Ea, (H_2O) víz, (Sm) sztreptomycin+Ea.



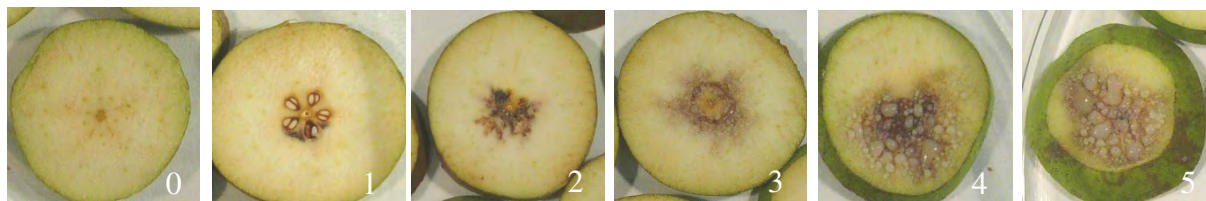
12. ábra Fág hatásvizsgálat éretlen körteszeleteken: körteszeletek ('Erdei vajkörte') üveg Petri csészében a kezelést megelőzően.

A kezeléseket követő 4 napos inkubáció a lefedett Petri csészékben 16/8 óra fény/sötét és 22-23°C/19-20°C nappali/éjszakai hőmérséklet mellett történt növénynevelő kamrában (Binder KBW).

A kísérlet értékelése

Az inkubációt követően a fertőzés eredményeként megjelent tünetek súlyosságát egy előre felállított bonitálási skála alapján értékeltük, ahol az egyes értékek a következőknek feleltek meg: (0) tünetmentes; (1) az inokuláció helye körül a szelet közepe barna, nyálkacseppes; majd

fokozódó nyálkakiválás mellett (2) az 1/8 része barna; (3) az 1/4 része barna; (4) az 1/2 része barna; (5) a 3/4 része barna; (6) a szelet egésze barna (**13. ábra**).



13. ábra Éretlen körteszeleteken végzett fág hatásvizsgálat – bonitálási skála 0-tól 5-ig (6-os skála nem volt megfigyelhető az inkubációs időn belül).

4.10.4 FÁG HATÁSVIZSGÁLAT DÍSZNÖVÉNYEKEN

Ebben a vizsgálatban az alábbi, *E. amylovora* baktériumra fogékony (**Lespinasse és Aldwinckle 2000**) növényfajok képezték a teszt növények körét: tűztövis [*Pyracantha angustifolia* (Franch.) Schneid. sp.], kerti madárbirs (*Cotoneaster horizontalis* Decne sp.), házi berkenye (*Sorbus domestica* L. sp.) és egybibés galagonya (*Crataegus monogyna* Jacq. sp.).

A teljes virágzásban lemetezett vesszők egy solymári (Pest megye) magánkertből származtak.

A vizsgálat anyaga

Bakteriofágok és tesztbaktérium

A vizsgálatban a H2A, H4A és H5A fágizolátumok, valamint azok hármas kombinációjának (H2A+H4A+H5A) baktérium-visszaszorító hatását teszteltük.

A fertőzéshez az *E. amylovora* Ea1/79Sm törzset használtuk.

A vizsgálat módszere

Patogenitás teszt

A mesterséges bakteriális inokulációhoz a virágkísérletekben ismertetett módon (lásd **4.10.2** fejezet) ellenőriztük a tesztbaktérium patogenitását.

A virágok kezelése

A vízzel teli Erlenmeyer lombikba helyezett lemetezett virágos vesszők az egyes fágizolátumokkal külön-külön, illetve ezek kombinációjának vizes szuszpenziójával (10^4 PFU ml⁻¹), majd 20 perc elteltével baktérium-szuszpénzióval (10^9 CFU ml⁻¹) lettek lepermetezve. Az egyes kezelések a következők voltak: (A) H2A+*E. amylovora* (Ea), (B) H4A+Ea, (C) H5A+Ea, (D) (H2A+H4A+H5A)+Ea, (Ea) H₂O+Ea (pozitív kontroll).

A kezeléseket követő 4 napos inkubáció 16/8 óra fény/sötét és 22-23°C/19-20°C nappali/éjszakai hőmérséklet mellett történt növénynevelő kamrában (Binder KBW).

A kísérlet értékelése

A fágkezelések baktérium-elimináló hatása a szerint került értékelésre, hogy 100 véletlenszerűen kiválasztott virágból hány darabnál volt megfigyelhető vacokbarnulás (fertőzés %) a fertőzést követő negyedik napon.

4.11 A FÁGKEZELÉS HATÉKONYSÁGÁNAK FOKOZÁSÁRA IRÁNYULÓ VIZSGÁLATOK: FÁGOK NÖVÉNYBE JUTÁSA, TRANSZLOKÁCIÓJA ÉS AZ *E. AMYLOVORA* OKOZTA TÜNETEKRE GYAKOROLT HATÁSA

Igazolt, hogy a fág alapú biológiai védekezés egyik nehézségét képezi a fágok nagyfokú érzékenysége a változó és szélsőséges környezeti körülményekhez. Azonban a fágok életképességét és ezáltal a fágkezelések hatékonyságát nagyban megnöveli például a fágok UV-fénnyel szembeni védelme. Annak tisztázására, hogy fennáll-e a lehetőség ezt a fajta védelmet azáltal biztosítani, hogy a fágokat közvetlenül a védendő növénybe juttatjuk, különböző transzlokációs és hatásvizsgálatokat állítottunk be.

A vizsgálat anyaga

Bakteriofágok és tesztbaktérium

A H5K jelzésű hazai fágizolátumot és az amerikai ΦEa104 fágtörzset használtuk ezekben a kísérletekben.

A fágok felszaporításához, kimutatásához, valamint a hatásvizsgálatoknál végzett baktériumos inokulációhoz az Ea1/79Sm *E. amylovora* törzset használtuk.

Tesztnövények

A vizsgálatokhoz *Malus x domestica* Borkh. 'Pinova' magoncokat használtunk. A 'Pinova' almafajta magjait, melyeket áru almagyümölcsből nyertünk, csíráztatás előtt 20%-os hypo oldatban 10 percig áztatva, majd háromszor, steril csapvízzel leöblítve felületileg sterilizáltuk. Ezt követően a Petri csészében steril csapvízzel átitatott perlitre helyezett magokat 4°C-on, hűtőszekrényben, sötétben tartottuk 6-8 hétig, majd a fiatal csíranövényeket külön-külön, vízzel átitatott, perlittel feltöltött 10 cm magas üvegedényekbe ültettük és műanyagdobozba helyeztük.

A növényeket steril körülmények között növénynevelő kamrában neveltük tovább (16/8 óra fény/sötét és 20°C/18°C nappali/éjszakai hőmérséklet).

Valamennyi kísérlet lefolyása steril áttetsző, műanyag dobozokban, 16/8 óra fény/sötét és 22-23°C/19-20°C nappali/éjszakai hőmérséklet mellett történt növénynevelő kamrában (Binder KBW).

A vizsgálat módszere

Fágdetektálás

A fágok kimutatásához az Adams-féle cseppeszt módosított változatát használtuk: a 100 µl tesztbaktériumot tartalmazó LBA fedőlemez közepére 100 µl fágizátumot cseppentettünk. Az egy napig sötétben, 28°C-on történő inkubációt követően került sor a fágok meglétének, illetve hiányának a megállapítására, a fágok jelenlétére utaló, a baktériumrétegen megjelenő plakkok alapján.

Az adatok statisztikai kiértékelése

A kísérleteket két ismétlésben végeztük. A kísérleti adatok statisztikai elemzése egytényezős varianciaanalízissel (one-way ANOVA) és azt követően Tukey-féle HSD post hoc próbával történt.

4.11.1 A FÁGOK TRANSZLOKÁCIÓS KÉPESSÉGÉNEK ALMA CSÍRANÖVÉNYEKBEN TÖRTÉNŐ VIZSGÁLATA - ELŐKÍSÉRLET

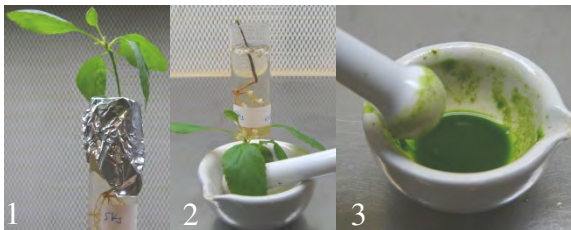
A vizsgálat anyaga

A H5K fágizólátum gyökéren keresztül való felvételét teszteltük steril körülmények között nevelt öt hónapos almamagoncokon.

A vizsgálat módszere

A tesztnövények egy részét steril bidesztillált vizet tartalmazó üvegedénybe (hidroponikus kultúra) helyeztük, más részük a növénynevelő perlites közegben maradt. Kezelésként öt-öt növényt használtunk. A hidroponikus vizsgálatnál 30 ml, a perlitbe helyezett magoncoknál 10 ml 10^{13} PFU ml⁻¹ koncentrációjú vizes fáguszuspenziót adtunk egy-egy növényhez. A kontroll növények sterilizált bidesztillált vizet kaptak. Az egyszeri kezelést követően két időpontban (három-három növényből a második napon, két-két növényből a hatodik napon) vettünk mintát, a növények felső szárrészét és leveleit együttesen feltárva steril dörzsmozsárban, SM pufferben elhomogenizálva a növény szöveteit (**14. ábra**). Számolva azzal, hogy a kijuttatott

fágszuspenzió titere esetleg a közvetlen visszaizolálással kimutatható szint alá süllyed, a kétnapos inkubáció után vett minták 200-200 µl-ét további négy napig, baktériumkultúrával (10^8 CFU ml⁻¹) LB (sztreptomicin 500 ppm) tápoldatban együtt rázattuk.



14. ábra A fágok transzlokációs képességének alma csíranövényekben történő vizsgálata – előkísérlet. Hidropónikus kultúrában fággal (H5K, 10^{13} PFU ml⁻¹) kezelt almamagoncból történő mintavétel folyamata: (1) növényi minta; (2) a feltárandó növényi részek lemetszése; (3) a lemetszett minta homogenizálása.

4.11.2 FÁGOK SZÁLLÍTÓDÁSA ALMA CSÍRANÖVÉNYEKBEN

A vizsgálat anyaga

Kísérletünkben a ΦEa104 fágtörzset és a H5K fágizolátumot használtuk, 17-18 hetes almamagoncokon.

A vizsgálat módszere

A teszt növények kezelése

A fágszuspenziók (10^{13} PFU ml⁻¹) kétféle módon lettek kijuttatva a teszt növényekhez: a perlit felszínére, a gyökérszónához pipetázva (10 ml/növény), illetve a növény föld feletti részére permetezve (500 µl/növény), egy alkalommal. Ez utóbbi kezelést megelőzően a növényt tartalmazó edény szája alufóliával és parafilmmel le lett zárva (**15. ábra**). A kontroll növények steril desztillált vizet kaptak. A kezelésenkénti 15 növényből 3-3 szolgált mintául, 1, 2, 3, 5 és 7 nappal a kezelést követően. A kontroll esetében csak az első napon történt mintavétel. A gyökérszóna kezelése esetén mintavételkor külön a növények alsó, sziklevél alatti, illetve a felső, leveles szárrésze, míg a föld feletti részekre való kipermetezést követően a növények gyökérzete lett feltárva SM pufferben, steril mozsárban elhomogenizálva az egyes mintákat.



15. ábra Fágtranszlokációs teszt során a fágok tesztnövényekhez való kijuttatása: alma csíranövények közvetlenül a H5K fáguszuspenzióval (10^{13} PFU ml⁻¹) történő lepermetezést (500 µl/növény) követően.

A fágok kimutatása

a) Az Adams-féle cseppteszt módosított változatával történt közvetlenül a mintavétel után, illetve további két napon át tartó fág-felszaporítási eljárást követően.

b) A szélesztéssel plakkot adó pozitív mintákban a fágok jelenlétét PCR módszerrel is vizsgáltuk. A DNS feltárás 2x Na-aziddal, a korábbiakban leírtak szerint (lásd **4.7** fejezet) történt. A PCR során két primer párt használtunk. A Term-F és a Term-R indító szekvenciák (**3. táblázat**) a H5K fágizolátum, míg az Ea104F és Ea104R primer pár (**3. táblázat**) a ΦEa104 fágtörzs egy-egy meghatározott DNS szakaszának felszaporításával szolgáltak az adott fág kimutatására.

PCR elegy összeállítása

A 18 µl végtérfogatú PCR elegyek a már korábban ismertetett módon (lásd **4.7** fejezet) lettek összeállítva.

PCR program lefutása

A Term-F/R primerpár esetében az MM2, az Ea104F/R primer párral végzett PCR alkalmával az MM3 program szerint (lásd **4.7** fejezet) történt a minták molekuláris vizsgálata.

Gélelektroforézis

A PCR termékek kimutatásakor a **4.7** részben leírtak alapján jártunk el.

4.11.3 A FÁGOK HATÁSA AZ *E. AMYLOVORA* OKOZTA TŰNETEKRE

A vizsgálat anyaga

Ezekben a fág hatásvizsgálatokban a ΦEa104 fágtörzset és a H5K fágizolátumot használtuk.

4.11.3.1 Alma csíranövények gyökérzónájához, illetve föld feletti részeire juttatva ki a fágokat

A vizsgálat anyaga

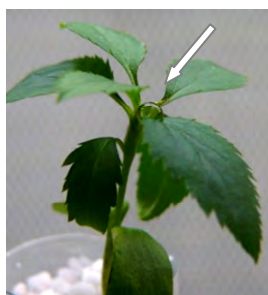
Húsz hetes almanövények szolgáltak tesztnövényként.

A vizsgálat módszere

A tesztnövények kezelése

A hatásvizsgálatok sorában először a transzlokációs kísérlethez hasonló módon juttattuk ki a fágokat: a tesztnövények gyökérzónájához pipetázva (12 ml), illetve a növények lombzatára permetezve (körülbelül 500 μl /növény) az adott fáguszuspenziót (10^3 , illetve 10^{13} PFU ml^{-1}).

A fágkezelést követő első napon a negatív kontrollok kivételével mesterségesen megfertőztük a magoncokat: 10 μl baktérium-szuspenziót (5×10^5 CFU ml^{-1}) pipetáztunk a második-harmadik legfiatalabb levél hónaljába, majd steril injekciós tűvel a baktériumcseppen keresztül megsúrtuk a növény szövetét (**16. ábra**). Az egyes kezelések a következők voltak: (A) víz, (B) fág kijuttatása és vízzel történő inokuláció, mint negatív kontrollok, (C) fágkezelés egy nappal a baktériumos inokulációt megelőzően (H5A+Ea és $\Phi\text{Ea104+Ea}$), és (D) víz kijuttatása az inokuláció előtt egy nappal ($\text{H}_2\text{O+Ea}$) a pozitív kontrollként. Fágizolátumonként három növény vett részt egy-egy kezelésben mindkét alkalmazott fáguszuspenzió-koncentráció esetén.



16. ábra A fágok hatása az *E. amylovora* okozta tünetekre alma csíranövények gyökérzónájához, illetve föld feletti részeire juttatva ki a fágokat – a kezelést követő napon végzett bakteriális inokuláció (Ea1/79Sm, 10 μl , 5×10^5 CFU ml^{-1}). A nyíl a baktériumcsepp és a tűszúrás helyét mutatja.

A kísérlet értékelése

A kialakult betegségtünetek mértékét a fertőzést követő 5. és 13. napon egy 0-5-ig terjedő bonitálási skála alapján értékeltük, ahol az egyes értékek a következőket jelentik: (0) nincs tünet; (1) a fertőzés helye barnás fekete; (1,5) a fertőzés helye körül a levélnyel 1/3 része barnás fekete; (2) a fertőzés helye körül a levélnyel 1/2 része barnás fekete és hervadt a növény; (2,5) a teljes levélnyel barnás fekete és hervadás jellemző; (3) a fertőzés helye körül a szár is barnás fekete; (3,5) a növény 1/4 részére kiterjedt nekrozis; (4) a növény 1/3 részére kiterjedt nekrozis; (4,5) a növény 1/2 részére kiterjedt nekrozis; (5) széles körű nekrozis.

4.11.3.2 A fágokat alma csíranövények sziklevelébe injektálva

A vizsgálat anyaga

Nyolc hetes alma csíranövények szolgáltak tesztnövényként.

A vizsgálat módszere

A tesztnövények kezelése

Ebben a kísérletben a fágok vizes szuszpenziója (10^{13} PFU ml⁻¹) a tesztnövények egyik sziklevelébe lett juttatva: a sziklevelet először steril injekciós tűvel megszúrva majd az adott szuszpenziót a növény szövetébe injektálva. Közvetlenül ez után (a negatív kontrollok kivételével) megfertőztük a növényeket 10 µl baktérium szuszpenziót (10^6 CFU ml⁻¹) cseppentve a fágok oldatával teljesen átitatott sziklevelek színére, majd a cseppen keresztül ismét megszártuk a növény szövetét. A következő kezeléseket alkalmaztuk: (A) víz injektálva és a levélre cseppentve, (B) fág injektálva és vizet cseppentve (negatív kontrollok), (C) fág injektálva és baktérium-szuszpénzió cseppentve (H5K+Ea és ΦEa104+Ea), valamint (D) víz injektálva, majd baktérium-szuszpénzió a levélre cseppentve (H₂O+Ea) (pozitív kontroll). Fágizolátumonként öt növény vett részt egy-egy kezelésben.

A kísérlet értékelése

Egy öt napos inkubációs időszakot követően a szikleveleken kialakult tűzelhalás tünetek mértékét megfigyeltük és a következő, 0-5-ig terjedő bonitálási skála alapján értékeltük (**17. ábra**): (0) ép, zöld sziklevel; (0,5) apró, nekrotikus foltok a fertőzés helyén; (1) a kezelt sziklevel 1/6 része barna; (1,5) a kezelt sziklevel 1/5 része barna (2) a kezelt sziklevel 1/4 része barna; (2,5) a kezelt sziklevel 1/3 része barna (3) a kezelt sziklevel 1/2 része barna; (3,5) a kezelt sziklevel 3/4 része barna; (4) az egész kezelt sziklevel barna; (4,5) a kezeletlen sziklevel is barnult; (5) mindkét sziklevel barna.



17. ábra A fágok hatása az *E. amylovora* okozta tünetekre a fágokat alma csíranövények sziklevelébe injektálva - bonitálási skála.

5 EREDMÉNYEK

5.1 FÁGIZOLÁTUMOK

Összesen 22 fágizolátummal rendelkezünk, amelyeket Magyarország különböző földrajzi területeiről gyűjtött alma, körte és birs fák erviniás tüneteket mutató növényi részeiről izoláltunk. Ezek közül eddig 16 izolátum lett széles körűen is megvizsgálva (**4. táblázat**).

4. táblázat Hazai fágizolátumok származási adatai

Fágizolátum	Növény	Gyűjtés helye, ideje
H1A, H1B	birs (<i>Cydonia oblonga</i> Mill.) levél, ág, termés	Siófok, 2007
H2A, H2B	birs (<i>Cydonia oblonga</i> Mill.) virág	Békéscsaba, 2006
H4A, H4B	birs (<i>Cydonia oblonga</i> Mill.) levél, termés	
H5A, H5B, H5K	birs (<i>Cydonia oblonga</i> Mill.) virág	
H6A, H6B, H9A, H9B, H12A, H12B	körte (<i>Pyrus communis</i> L. 'Conference') ág	Bekecs, 2006
H7A, H7B	alma (<i>Malus x domestica</i> Borkh. 'Idared') levél, ág, termés	Siófok, 2007
H8A, H8B	alma (<i>Malus x domestica</i> Borkh. 'Johnny') levél, ág, termés	
H10A, H10B	alma (<i>Malus x domestica</i> Borkh. 'Golden') levél, ág, termés	
H11	birs (<i>Cydonia oblonga</i> Mill.) levél, ág	

5.2 A FÁGIZOLÁTUMOK MORFOLÓGIAI JELLEMZÉSE

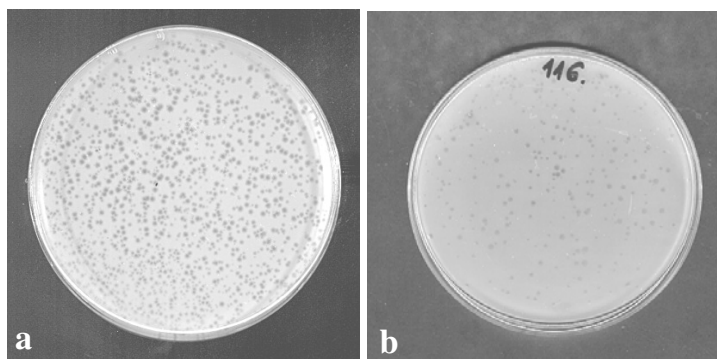
5.2.1 PLAKKMORFOLÓGIA

A baktériumot tartalmazó agarlemezen kialakult plakk és az azt körülvevő sáv mérete alapján 22 magyar fágizolátum, négy amerikai fágtörzzsel összehasonlítva került jellemzésre (**2. táblázat**). A különböző bakteriofág izolátumok eltérő méretű, 0,5 – 7,1 mm átmérőjű plakkokat képeztek a tesztbaktériumot tartalmazó lágyagar rétegen. A magyar bakteriofág izolátumok közül a legkisebb plakkokat a H10A (0,5 – 0,6 mm) képzí, míg a tarfoltokat övező sávval együtt a H5K plakkjai a legkisebbek, s e tekintetben kevésbé maradnak el a ΦEa116-os amerikai fágtól (**18.a ábra**). Izolátumaink közül a legnagyobb plakkokat a H6B, a H9B és a H7B képezte. Az amerikai bakteriofágok közül a ΦEa100-as törzsnek vannak a legnagyobb átmérőjű plakkjai,

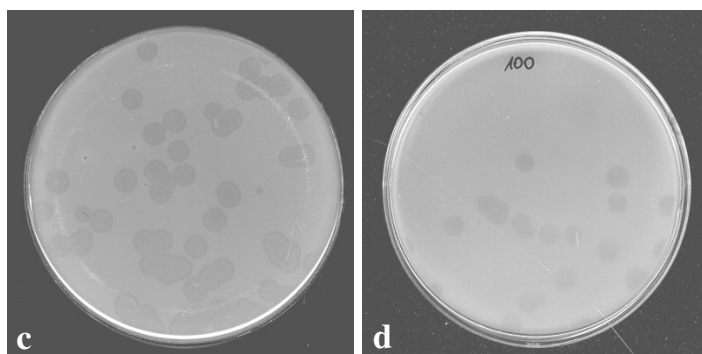
melyek körül széles sáv is kialakul, azonban a H7B fág plakkja körül szélesebb sáv húzódik, ami annak nagyobb lítikus enzimaktivitására utal (**18.b ábra**).

5. táblázat A vizsgált fágok által képzett plakkok jellemzői. A megadott értéktartományok milliméterben (mm) kifejezett minimum-maximum méreteket jelölnek 50 plakk vizsgálata alapján

Fág	Plakkátmérő (mm)	Plakk körüli sáv szélessége (mm)
H1A	3,0-5,0	1,0-2,0
H1B	2,0-3,0	0-1,0
H2A	0,75-1,5	0,1-0,3
H2B	4,0-5,0	1,0-1,1
H4A	2,0-3,0	0,5-1,0
H4B	2,0-4,0	1,5-2,0
H5K	0,5-0,75	0,2-0,4
H5A	3,0-4,0	0,8-2,0
H5B	2,0-4,0	0,8-2,0
H7A	2,0-3,0	1,0-2,0
H7B	4,0-5,0	1,5-5,0
H6A	2,0-4,0	0-1,0
H6B	7,0-7,1	1,5-2,0
H8A	2,0-4,0	0,8-1,0
H8B	6,0-6,1	1,8-2,0
H9A	1,5-5,0	1,0-2,0
H9B	5,0-7,0	1,0-2,0
H10A	0,5-0,6	1,0-1,2
H10B	2,0-5,0	1,0-2,0
H11	1,0-5,0	1,0-1,5
H12A	1,0-1,2	0
H12B	3,0-5,0	1,0-2,0
ΦEa1h	2,0-3,0	0,5
ΦEa100	3,0-7,0	0,5-3,0
ΦEa104	2,0-3,0	0
ΦEa116	1,0-2,0	0



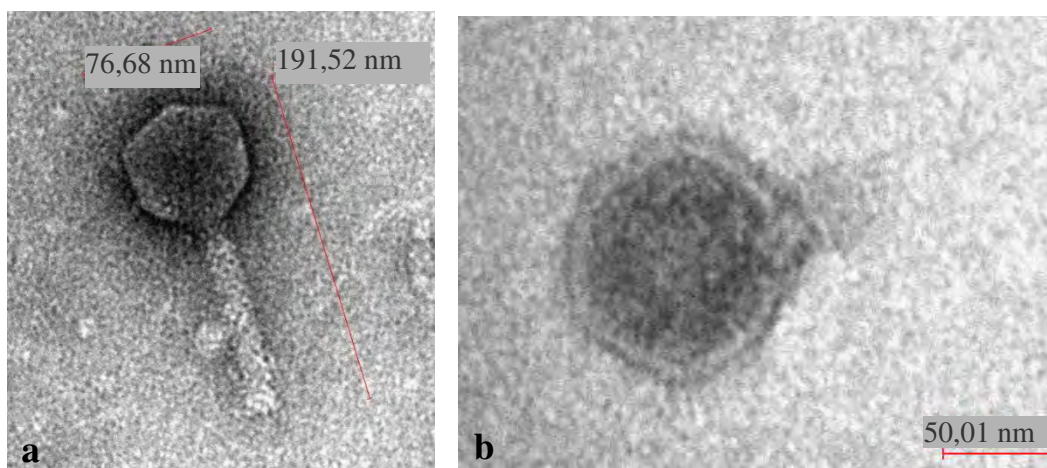
18.a ábra A H5K (a) magyar fágizolátum és a ΦEa116 (b) amerikai fágtörzs EaCFBP1430 tesztbaktériumot tartalmazó LBA táptalajon (10 cm átmérőjű Petri csészében) képzett plakkjai (Fotó: Schwarczinger I. és Kolozsváriné N.J.)



18.b ábra Tesztbaktériumot (EaCFBP1430) tartalmazó LBA táptalajon (10 cm átmérőjű Petri csészében) az egyik legnagyobb plakkokat képező hazai H7B (c), izolátum, illetve az amerikai ΦEa100 (d) fág törzs jellemző alaki bélyegei (Fotó: Schwarczinger I. és Kolozsváriné N.J.)

5.2.2 FÁGPARTIKULUM MORFOLÓGIA

A fágizolátumokat morfológiai jellemzőik alapján **Ackermann (2007)** munkája nyomán különböző morfortípus csoportokba soroltuk. A vizsgált izolátumok közül 15 a *Myoviridae* család (A1 morfortípus) tagjaira jellemző ikozaéder alakú fejvel és hosszú, összehúzódó farki résszel rendelkezik, a másik 4 izolátumra kisebb, izometrikus fej és rövid, széles farki rész volt jellemző (**19. ábra**), mely alapján ez utóbbiak a *Podoviridae* családba (C1 morfortípus) lettek besorolva (**6. táblázat**). A magyar fágok közül a legkisebb a H11-es jelzésű fág, ami kisebb a szakirodalomból ismert német és az amerikai fágoknál (**7. táblázat**). A legnagyobb a H4A, amely méreteit tekintve meghaladja az előbb említett külföldi törzseket.



19. ábra A *Myoviridae* családba tartozó fágok (a) és a *Podoviridae* család fágjainak (b) jellemző partikulum felépítése. Az ábrák egy H5A fág (a) és egy H11 fágizolátum (b) TEM képét mutatják (Fotó: Szabó L. és Schwarczinger I.)

6. táblázat Magyar *E. amylovora* fágok TEM vizsgálattal feltárt morfológiai jellemzői. A nanométerben (nm) megadott értékek 50 mérés \pm SD kerekített átlagát mutatják.

Besorolás	Fágizolátum	Fejátmérő (nm)	Farokhossz (nm)	Farokszélesség (nm)
<i>Myoviridae</i> (ikozaéder fej, hosszú, összehúzódó farki rész)	H1A	70 \pm 3	117 \pm 4	15 \pm 2
	H1B	73 \pm 5	94 \pm 17	17 \pm 3
	H2A	69 \pm 7	107 \pm 11	13.7 \pm 1.0
	H2B	57 \pm 7	60 \pm 39	18 \pm 5
	H4A	78 \pm 5	108 \pm 10	17 \pm 2
	H4B	70 \pm 9	98 \pm 18	15 \pm 4
	H5A	72 \pm 3	110 \pm 5	13 \pm 1
	H5B	74 \pm 5	104 \pm 9	14 \pm 3
	H6A	64 \pm 3	90 \pm 8	10 \pm 0.2
	H7A	71 \pm 8	99 \pm 7	17 \pm 3
	H7B	77 \pm 5	108 \pm 6	17 \pm 1
	H8A	75 \pm 3	113 \pm 4	18 \pm 2
	H9A	69 \pm 5	96 \pm 14	17 \pm 3
	H10A	67 \pm 7	103 \pm 18	14 \pm 3
	H12B	72 \pm 4	103 \pm 4	15 \pm 1
<i>Podoviridae</i> (izometrikus fej és rövid, széles farki rész)	H8B	63 \pm 8	8 \pm 4	10 \pm 4
	H9B	61 \pm 7	9 \pm 3	12 \pm 3
	H10B	56 \pm 4	9 \pm 1	11 \pm 2
	H11	55 \pm 2	13 \pm 2	8 \pm 1

7. táblázat Német és amerikai (Müller és mtsai. 2011a), valamint egy kanadai (Lehman és mtsai. 2009) *E. amylovora* fág morfológiai jellemzői nanométerben kifejezett, kerekített \pm SD értékekben megadva. A fent idézett munkákból átvett adatok.

Besorolás	Fágizolátum ^a	Fejátmérő (nm)	Farokhossz (nm)	Farokszélesség (nm)
<i>Myoviridae</i>	ΦEa104 ^A	72 \pm 2	114 \pm 3	18 \pm 2
	ΦEa116 ^A	73 \pm 2	115 \pm 2	20 \pm 1
	ΦEaJ08C ^N	73 \pm 3	116 \pm 5	22 \pm 2
	ΦEa21-4 ^K	60	90	-
<i>Podoviridae</i>	ΦEa1h ^A	60 \pm 2	-	-
	ΦEa100 ^A	61 \pm 2	-	-
	ΦEaJ08T ^N	60 \pm 1	-	-
	ΦEaK08T ^N	60 \pm 3	-	-

^a A: amerikai; N: német; K: kanadai

5.3 AZ IZOLÁLT FÁGOK MOLEKULÁRIS JELLEMZÉSE

5.3.1 PCR VIZSGÁLAT

A PCR vizsgálatok eredményeként (lásd a **M1.a-12.c** mellékleteket) a vizsgált magyar fágokat 4 nagy csoportra osztottuk (**8. táblázat**). A zölddel jelölt csoport tagjai az amerikai Φ Ea116-hoz hasonlóan a termináz, peptidáz, és Mu-szerű profág proteint kódoló génre pozitívak. Ettől a következő három fág, a H5K, a H7B és a H12B csak egy-egy, illetve a H12B két DNS szakasszal tér el. A kék és árnyalataival jelzett fágok közül a H4B, H5A és H5B hasonlít nagyban a Φ Ea104-re, de még a legnagyobb hasonlóságot mutató H5B sem lehet azonos a Φ Ea104-gyel, mivel az erre a fágra tervezett specifikus primerrel a H5B esetében nem kaptunk jelet. A negyedik, piros árnyalatú csoport tagjai csupán egy-egy vizsgált génszakasz tekintetében térnek el a csoportban egymástól; a H9A törzs termináz gén pozitív, a H8B pedig az *E. amylovora* *amsF* génjének meghatározott szekvenciáját tartalmazza. Ezen kívül az összes többi tesztelt primer párra negatívnak bizonyultak.

8. táblázat Fágizolátumok PCR vizsgálatainak eredménye

Fágok																									
Primer pár	ΦEa116	H1A	H1B	H2A	H2B	H10A	H10B	H11	H12A	H5K	H7B	H12B	ΦEa104	H5B	H4B	H5A	H4A	H6B	H9B	H8A	H7A	H8B	H9A	ΦEa1h	ΦEa100
Dpo-1/2c	nv	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	nv	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	nv	nv
Hol-F/R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Lys-F/R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Term-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nv	nv	nv	nv	+	+	+	+	-	+	-	-
Pep-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	nv	nv	nv	+	nv	+	+	+	-	-	-
Mu-F/R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PEa1A /B	nv	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	nv	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	nv
Ea100F/R	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Ea104F/R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nv	nv
1hcapF/R	nv	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	nv
H2capF/R	nv	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nv
EaFF/R	nv	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nv	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	nv
phiEaH2-F/R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Az azonos színek az egy csoportba sorolt fágokat jelölik, a színárnyalatok a főcsoportokon belüli eltérésre utalnak. nv : nem vizsgált; + : pozitív; - : negatív

Az ismert genomú Φ EaH2 magyar fág törzs *amsF*-szerű szakaszára tervezett primerpár nem adott csíkot a vizsgált fágizolátumoknál és törzseknél, ugyanakkor egy kivétellel (H9A)

valamennyi tesztelt hazai fágizolátum pozitívnak bizonyult az *E. amylovora* *amsF* génjének az EaFF/R indító szekvenciák által meghatározott szakaszára.

5.3.2 SZEKVENCIA-ANALÍZIS

Jelenleg, az eddig vizsgált DNS szekvenciák közül, hét *dpo* génre pozitív hazai fágizolátumunk genomjának depolimerázt kódoló szakaszáról és a leghatékonyabb fágizolátumok közül a H2A peptidázt kódoló szakaszáról, valamint a H2A és a H5K Mu-szerű profág proteint és terminázt kódoló régióiról rendelkezünk adatokkal. A fágizolátumok (H4A, H4B, H5A, H5B, H6A, H7A, H9B) depolimeráz génjének bázis sorrendje 98-99%-ban egyezést mutat a ΦEa1h (Müller és mtsai. 2011b) depolimeráz génjének a 43070-43693 szakaszig tartó részének a bázis sorrendjével (lásd az M13. mellékletet). A H2A peptidázt kódoló régiója 99%-ban megegyezik a vB_EamM-M7 *E. amylovora* fág (Born és mtsai. 2011) genomjának a 13694-14194 nukleotid közötti sorrendjével (M14.). A vizsgált fágsekvenciában a 14092 helyen “T” helyett “G” áll a genom nem transzlálódó régiójában. A H2A és a H5K izolátumok terminázt meghatározó szakasza 99%-ban megegyezik a vB_EamM-M7 fágtörzs meghatározott kódoló régiójával (M15-16.). Mu-szerű proteint kódoló szakaszaik szintén a vB_EamM-M7 fág adott DNS szakaszaival [20850-től 21525-ig (H2A), 20853-től 21556-ig (H5K)] mutatnak nagyfokú, 99%-os hasonlóságot; az eltérések fenotipikus változást nem okoznak (M17-18.).

5.4 GAZDAKÖRVIZSGÁLAT

A kísérletek eredményéből (9-11. táblázat) az derült ki, hogy a magyar fágok a vizsgálatban szereplő amerikai fágtörzsekhez képest szélesebb gazdakörrel rendelkeznek. A tesztelt fágok közül 6 magyar (H1B, H2A, H2B, H4A, H7A, H7B) fág bizonyult *Erwinia*-specifikusnak, mivel ezek, az *E. tasmaniensis* kivételével lizálták az összes vizsgált *Erwinia* izolátumot és törzset, míg más tesztelt, az *Erwinia*-val nem közeli rokon patogén baktériumra két kivétellel nem voltak fogékonyak. A H2B és a H7B ugyanis lizálta a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* H9 baktériumtörzset. A gazdakör vizsgálatokat kiterjesztettük az *E. amylovora*-val közeli rokon, de nem patogén baktériumokra is azzal a céllal, hogy a bakteriofágok felszaporításához és a védendő növény felületére való kijuttatáshoz megtaláljuk a legmegfelelőbb organizmust. A kísérletben szereplő, növénykárosító hatással nem rendelkező baktériumok közül a *Pantoea agglomerans* MB96 volt a legfogékonyabb a vizsgált fágokkal szemben: a H4B kivételével valamennyi fág tiszta plakkokat képzett ezen a baktériumtörzsen. Gazdakör vizsgálatuk alapján a hazai fágok közül a H1B, H2A, H2B, H4A, H7A, H7B voltak a

leghatékonyabbak, míg az amerikai fágok közül a ΦEa116-os lizálta a legtöbb tesztelt baktériumtörzset.

A magyar *E. amylovora* izolátumok mindegyike fogékony volt a fágizolátumokkal szemben függetlenül a fágok származásától. A nem Magyarországról származó *E. amylovora* törzsek közül a legfogékonyabbnak az EaDS05 jelzésű német törzs bizonyult. Az egyéb ervinia fajok közül az *E. billingae* Eb661^T volt a legfogékonyabb. Az *E. tasmaniensis* Et1/99 baktériumtörzset csupán az amerikai ΦEa1h fágtörzs lizálta.

9. táblázat Magyarországi *E. amylovora* izolátumok fágizolátumokkal szembeni fogékonysága

<i>E. amylovora</i> (Ea) izolátum	Fágok															
	H1A	H1B	H2A	H2B	H4A	H4B	H5A	H5B	H6A	H7A	H7B	H8A	H9B	H10B	H11	H12B
Ea1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea3	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea4	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea6	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea7	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea8	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea10	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea11	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea12	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea13	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea14	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea15	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea17	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea18	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea19	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea20	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

9. táblázat folytatása

Fágok																				
<i>E. amylovora</i> (Ea) izolátum	H1A	H1B	H2A	H2B	H4A	H4B	H5A	H5B	H6A	H7A	H7B	H8A	H9B	H10B	H11	H12B	ΦEa1h	ΦEa100	ΦEa104	ΦEa116
Ea21	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea22	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea24	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea25	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea26	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea27	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea28	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea29	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea30	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ea31	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

++ : tiszta plakk

10. táblázat Különböző *E. amylovora* törzsek és egyéb *Erwinia* fajok fágizolátumokkal szembeni fogékonysága

Fágok																				
<i>Erwinia</i> törzs	H1A	H1B	H2A	H2B	H4A	H4B	H5A	H5B	H6A	H7A	H7B	H8A	H9B	H10B	H11	H12B	ΦEa1h	ΦEa100	ΦEa104	ΦEa116
Ea1/79del100	-	++	++	++	++	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	++
Ea1/79Sm	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+
EaDS02	-	++	++	++	+	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	++
EaDS05	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+
EaRW	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+
EaOR1/7	-	++	++	++	++	+	-	-	-	++	++	+	++	-	-	-	-	-	+	++
Ea63/05	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+
EaCFBP1430	+	++	++	+	++	+	+	+	+	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+	++
<i>E. billingiae</i> Eb661	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	+
<i>E. persicina</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fágok																
<i>Erwinia</i> törzs	H1A	H1B	H2A	H2B	H4A	H4B	H5A	H5B	H6A	H7A	H7B	H8A	H9B	H10B	H11	H12B
<i>E. rhapontici</i> CFBP 3618T	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>E. tasmaniensis</i> Et1/99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

++ : tiszta plakk; + : homályos plakk; - : nincs plakk

A *Pantoea* fajok szintén fogékonyak voltak a fágok többségére (11. táblázat), kivéve a *Pantoea agglomerans* C9-1, amit a H4B, ΦEa1h, ΦEa100 és a ΦEa116 nem volt képes lizálni. A vizsgált egyéb kórokozó baktériumok közül a *Pantoea citrea* CCM 4319-n és a két *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii* törzsön kívül a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* H9-es törzs volt még fogékony a fágokra. Közülük a legfogékonyabbnak a *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii* DC283 törzs bizonyult.

11. táblázat Különböző tesztbaktériumok fágokkal szembeni fogékonysága

Fágok																
Baktériumtörzsek	H1A	H1B	H2A	H2B	H4A	H4B	H5A	H5B	H6A	H7A	H7B	H8A	H9B	H10B	H11	H12B
<i>Pantoea agglomerans</i> NB2	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	+	+	++	++	+	++
<i>Pantoea agglomerans</i> MB96	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Pantoea agglomerans</i> JCM 1236	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	++
<i>Pantoea agglomerans</i> hu82245	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
<i>Pantoea agglomerans</i> hu82647	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	++	+	+	+	++
<i>Pantoea agglomerans</i> C9-1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++
<i>Pantoea citrea</i> CCM 4319	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	+	++

11. táblázat folytatása

Fágok																				
Baktériumtörzsek	H1A	H1B	H2A	H2B	H4A	H4B	H5A	H5B	H6A	H7A	H7B	H8A	H9B	H10B	H11	H12B	ΦEa1h	ΦEa100	ΦEa104	ΦEa116
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> DC283	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> SW2	-	++	++	++	+	+	-	-	+	++	++	+	++	+	+	+	+	++	++	++
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Agrobacterium vitis</i> F2/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> DH5α	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>zinniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas cichorii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> H9	-	-	-	++	-	-	++	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>Carotovorum</i> 19111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atroseptica</i> D2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

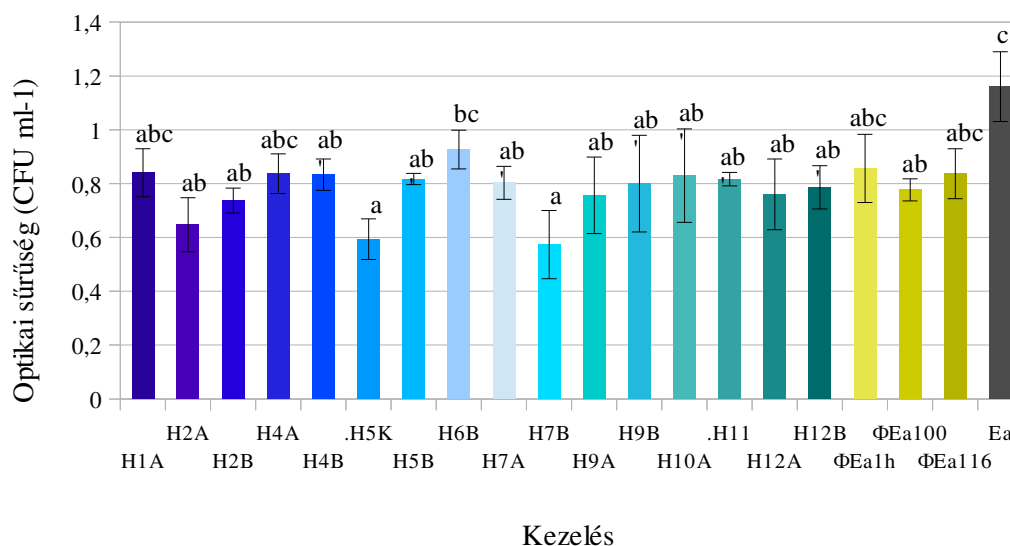
++ : tiszta plakk; + : homályos plakk; - : nincs plakk

5.5 FÁGOK ÉS FÁGKOMBINÁCIÓK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA AZ *ERWINIA AMYLOVORA* BAKTÉRIUMRA

5.5.1 FÁG HATÁSVIZSGÁLAT FOLYADÉKKULTÚRÁBAN

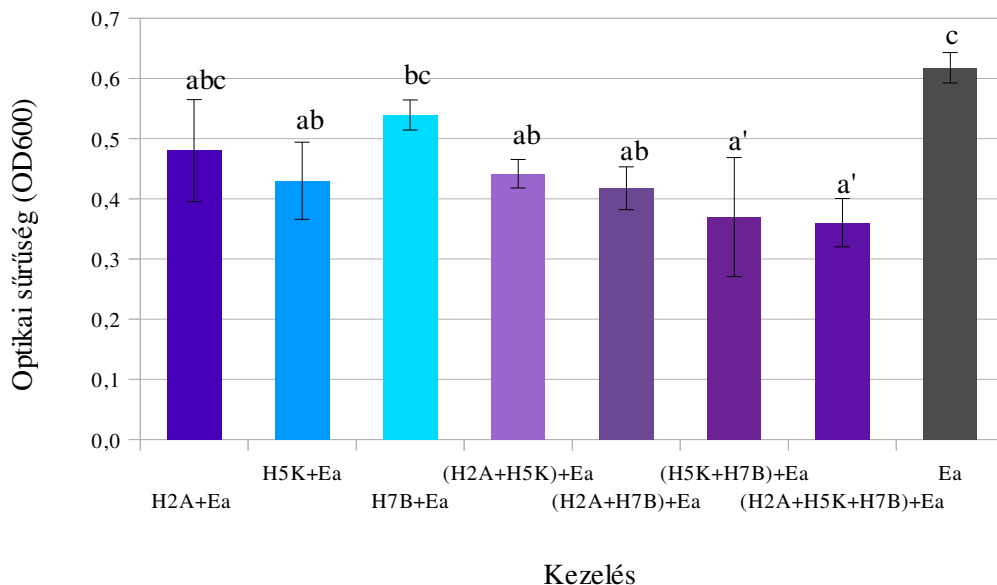
Fágizolátumainknak a tűzelhalás kórokozójának szaporodását gátló hatását először LB tápoldatban vizsgáltuk. A fágoknak a tesztbaktérium szuszpenziójával történő 22 órás együtt rázatását követően a folyékony kultúrák spektrofotométerrel meghatározott fénytörése (OD₆₀₀) alapján értékelve a kísérletet azt tapasztaltuk, hogy a magyar fágizolátumok a H1A, H4A és a H6B kivételével szignifikánsan lecsökkentették a baktérium-koncentrációt a fágmentes, pozitív

kontrollhoz képest. Az amerikai törzsek közül csak a Φ Ea100 hatása tért el szignifikánsan az erviniás kontrollétól. A leghatékonyabbaknak a H2A, a H5K és a H7B fágizolátumok bizonyultak. (20. ábra). A H5K és a H7B szignifikánsan hatékonyabb volt a H6B izolátumhoz viszonyítva is, ugyanakkor a többi esetben az egyes kezelések baktériumszám-csökkentő hatása között nem volt megállapítható szignifikáns különbség.



20. ábra Fágok hatása az *E. amylovora* szaporodására folyadékkultúrában. Az első 16 oszlop a hazai fágizolátumok, a következő 3 az amerikai fág törzsek hatását mutatja be. Az utolsó (Ea) oszlop az erviniás kontroll. Az ábrázolt értékek három ismétlés átlagát és szórását jelölik. A különböző betűk az egyes kezelések közötti szignifikáns különbséget jelentik ($P = 0,01$ szinten, kivéve ab', mely c -től csupán $P = 0,05$ szinten tér el).

Annak tisztázására, hogy a fágizolátumaink önmagukban vagy együttesen alkalmazva fejtenek-e ki nagyobb gátló hatást a baktérium szaporodására, az előző kísérletben leghatékonyabban szereplő három fág törzs (H2A, H5K és H7B) kombinációinak a hatékonyságát is vizsgáltuk. A kezelések közül a legjobb eredményt a fágok hármas kombinációja adta, ez esetben kaptuk a legalacsonyabb ($0,36 \text{ CFU ml}^{-1}$) OD_{600} értéket a kezeletlen kontrollhoz ($0,62 \text{ CFU ml}^{-1}$) képest, mindazonáltal az egyes kezelések között csak a H7B és a H5K+H7B, valamint a H7B és a H2A+H5K+H7B esetén volt szignifikáns a különbség (21. ábra).



21. ábra Fágok és fágkombinációk az *E. amylovora* szaporodására gyakorolt hatásának összehasonlítása folyadékkultúrában. Az első 7 oszlop hazai fágizolátumokat és azok kombinációit jelöli, az utolsó (Ea) az erviniás pozitív kontrollt. Az ábrázolt értékek három ismétlés átlagát és szórását jelölik. A különböző betűk az egyes kezelések közötti szignifikáns különbséget jelentik ($P = 0,05$ szinten, kivéve a', mely c-től $P = 0,01$ szinten tér el).

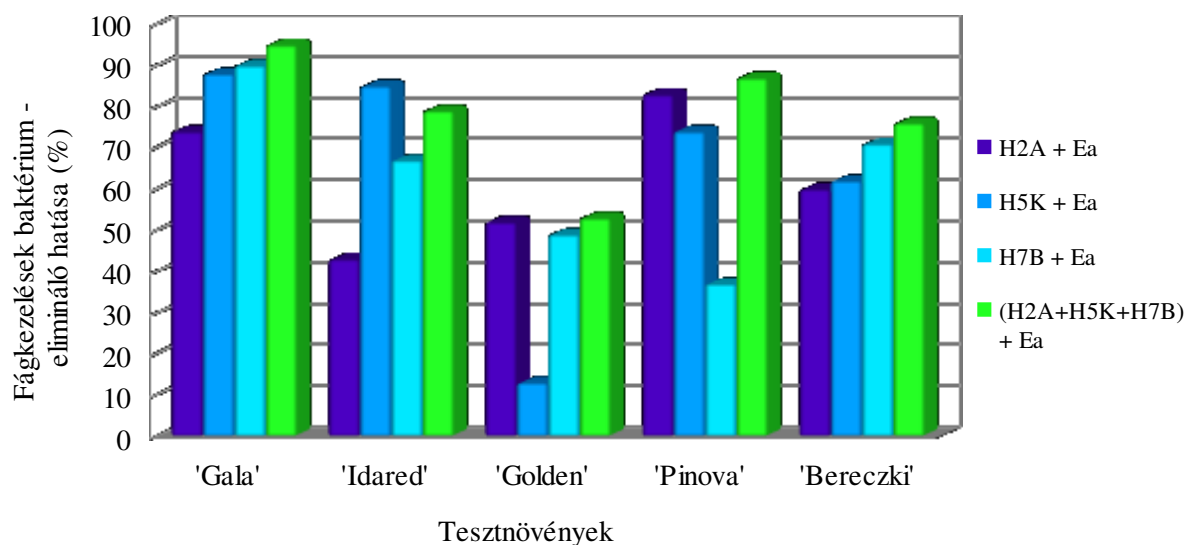
5.5.2 FÁG HATÁSVIZSGÁLAT ALMA-ÉS BIRSVIRÁGON

5.5.2.1 Baktériumsejt-számlálás

A vizsgálat célja annak tisztázása volt, hogy a virágok faggal történő közvetlen kezelése milyen mértékben tudja csökkenteni a virágokról visszaizolált baktériumok számát, illetve, hogy a bakteriofágok hatása függ-e a növény *E. amylovora*-val szembeni fogékonyságától.

A 2011. évi vizsgálatban mind a négy almafajta és a birs esetén a fágos kezelés csökkentette a visszaizolált baktériumok számát (**22. ábra**). A 'Golden delicious Reinders' almafajta virágainak a H5K faggal történő kezelését leszámítva valamennyi tesztnövényen mindegyik fágkezelés szignifikánsan hatékonyabb volt az erviniás kontrollhoz képest. A 'Gala Schniga', a 'Pinova' és a 'Berecki' esetében a fágkombináció eredményezte a legjobb hatást. A fágoktól az *E. amylovora*-val szemben legeredményesebb a 'Gala Schniga' fajtán volt, ahol a kezelés 95%-kal, szignifikánsan csökkentette a virágokról visszaizolált baktériumszámot a kezletlen kontrollhoz viszonyítva. Az 'Idared' fajtán belül a H2A fágkezelés, a 'Pinova' fajtánál a H7B fágkezelés hatása szignifikánsan eltért a többi kezelés hatékonyságától, míg a 'Golden delicious Reinders' esetében a H5K és a H7B tért el egymástól szignifikánsan. A többi esetben az egyes fágkezelések hatékonysága között szignifikáns különbség nem volt megállapítható (**12.**

táblázat). Valamennyi vizes kontroll negatívnak bizonyult, ami alapján természetes *E. amylovora* fertőzés kizárható volt.



22. ábra Fágizolátumok és kombinációjuk *E. amylovora* gátló hatása különböző almafajták ('Gala Schniga', 'Idared', 'Golden delicious Reinders', 'Pinova') és egy birsfajta ('Bereczki') virágain (2011). Az eltérő színnel jelölt oszlopok a négyféle fágkezelésnek a pozitív kontrollhoz viszonyított százalékos hatékonyságát mutatják (mintaszám: 15/kezelés/fajta).

12. táblázat Fágizolátumok és kombinációjuk *E. amylovora* gátló hatása különböző almafajták és egy birsfajta virágain (2011) – statisztikai összefoglaló (MANOVA, F-próba)

Átlagos baktérium kolóniaszám					
Kezelések	Tesztnövény fajták				
	'Gala Schniga'	'Idared'	'Golden delicious Reinders'	'Pinova'	'Bereczki'
H2A+Ea	15 ^a	885 ^b	264 ^a	82 ^a	449 ^a
H5K+Ea	7 ^a	232 ^a	812 ^c	126 ^a	426 ^a
H7B+Ea	6 ^a	484 ^a	473 ^{ab}	305 ^b	329 ^a
(H2A+H5K+H7B)+Ea	3 ^a	328 ^a	434 ^a	61 ^a	267 ^a
H ₂ O+Ea (pozitív kontroll)	58 ^b	1551 ^c	930 ^c	486 ^c	1131 ^b
LSD _{0,05}	14	447	190	147	300
F _{exp. 0.05}	46	26	39	27	24
F _{0.05}	2,5				

Az értékek az 50 µl 10000-szeres hígítású minták szélesztéséből kapott kolóniák számát jelölik 15, az erviniás kontroll esetében 20 minta átlagában. Az értékek feletti kisbetűk a kezelések közötti szignifikáns különbséget jelentik (P= 0,01) szinten.

A fágkezelések tesztnövények közötti hatását összehasonlítva szignifikáns különbségeket tudtunk megállapítani (**13. táblázat**). A H2A fágkezelés hatására minden fajtán szignifikánsan lecsökkent a visszaizolált baktériumok mennyisége az 'Idared' fajtán mértékéhez képest. A H5K

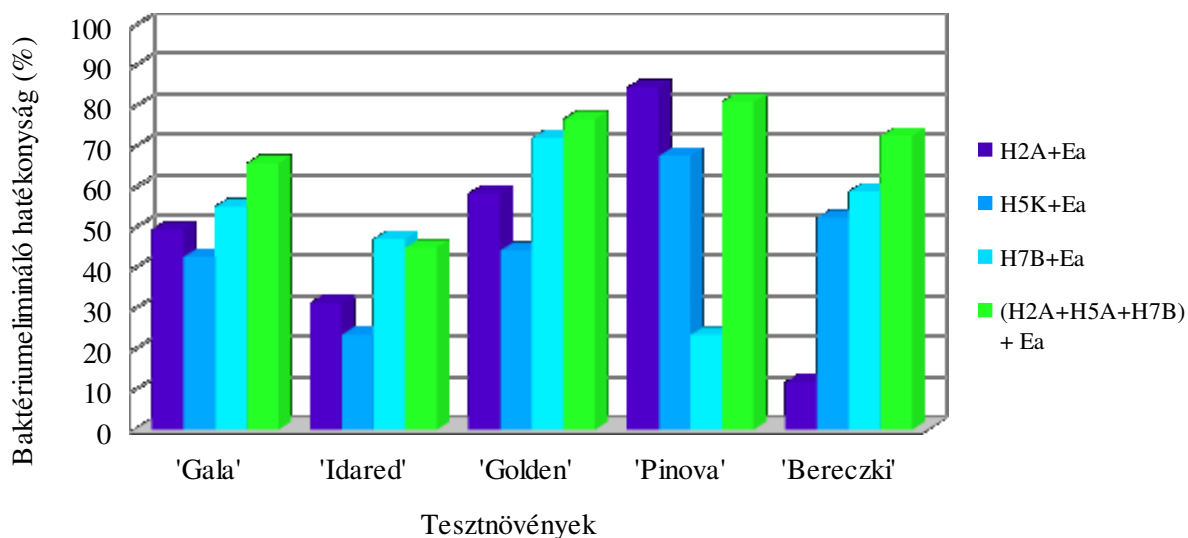
a 'Golden delicious Reinders' virágain volt a legkevésbé hatékony valamennyi fajta párosításában. A H7B fág a 'Gala' fajtán, míg a fágkombináció a 'Gala Schniga' és a 'Pinova' fajtákon bizonyult szignifikánsan hatékonyabbnak a többi fajtához képest.

13. táblázat Fágizolátumok és kombinációjuk *E. amylovora* gátló hatása különböző almafajták és egy birsfajta virágain (2011) – a kezelések fajták közötti hatásának összehasonlító statisztikai összefoglalója

Tesztnövény fajták	Kezelések				
	H2A	H5K	H7B	H2A+H5K+H7B	Ea (Ea1/79Sm)
'Gala Schniga'	15 ^a	7 ^a	6 ^a	3 ^a	58 ^a
'Idared'	885 ^c	232 ^{bd}	484 ^b	328 ^b	1551 ^b
'Golden delicious Reinders'	264 ^a	812 ^c	473 ^b	434 ^b	930 ^d
'Pinova'	82 ^a	126 ^{ab}	305 ^b	61 ^a	486 ^c
'Bereczki'	449 ^b	426 ^d	329 ^b	267 ^b	1131 ^{cd}

Az értékek az 50 µl 10000-szeres hígítású minták szélesztéséből kapott kolóniák számát jelölik 15, illetve az erviniás kontroll esetében 20 minta átlagában. A felső indexben szereplő kisbetűk a fajták közötti szignifikáns különbséget jelentik (P= 0,01 szinten, kivéve a', mely b-től (H2A), illetve bd-től (H5K) P= 0,05 szinten tér el).

A 2012. évi alma- és birsvirágokon végzett kísérletben valamennyi fágkezelés hatására lecsökkent a visszaizolált baktériumok száma a kezeletlen kontrollhoz képest (**23. ábra**). A H7B fág, a fágkombináció, valamint a H2A az 'Idared' és a birs kivételével mindegyik tesztnövényen szignifikánsan hatékonyabb volt az erviniás kontrollhoz viszonyítva. A fajták többségében, a 'Gala Schniga', a 'Golden delicious Reinders' és a 'Berecki birs' esetében a fágkombináció eredményezte a legjobb hatást; legeredményesebb a 'Golden delicious Reinders' almafajta virágain volt, ahol 77%-kal lecsökkentette a baktérium-populációt a kezeletlen pozitív kontrollhoz képest. A 'Berecki' birsvirágokon a fágoktól szignifikánsan hatékonyabb volt a H2A fágos kezeléshez képest is. A többi esetben az egyes fágkezelések hatása között nem volt szignifikáns különbség (**14. táblázat**). A vizes kontrollok mind negatívnak bizonyultak.



23. ábra Fágizolátumok és kombinációjuk *E. amylovora* gátló hatása különböző almafajták ('Gala Schniga', 'Idared', 'Golden delicious Reinders', 'Pinova') és egy birsfajta ('Bereczki') virágain (2012). Az eltérő színű oszlopok a négyféle fágkezelésnek a pozitív kontrollhoz viszonyított százalékos hatékonyságát mutatják (mintaszám: 15/kezelés/fajta).

14. táblázat Fágizolátumok és kombinációjuk *E. amylovora* gátló hatása különböző almafajták és egy birsfajta virágain (2012)

Átlagos baktérium kolóniaszám					
Kezelések	Tesztnövény fajták				
	'Gala Schniga'	'Idared'	'Golden delicious Reinders'	'Pinova'	'Bereczki'
H2A+Ea	278 ^a	499 ^{ab}	395 ^a	115 ^{a'}	751 ^{ac}
H5K+Ea	315 ^{ab}	556 ^{ab}	529 ^{ab}	239 ^a	406 ^{abc}
H7B+Ea	247 ^a	384 ^a	265 ^{a'}	567 ^a	350 ^{ab}
(H2A+H5K+H7B)+Ea	188 ^{a'}	400 ^a	221 ^{a'}	140 ^{a'}	233 ^{b''}
H ₂ O+Ea (pozitív kontroll)	550 ^{b'}	840 ^b	949 ^{b'}	741 ^{b'}	851 ^{c''}

Az értékek a virágokról visszaizolált minták (50 µl, 10000-szeres hígítás) szélesztéséből kapott kolóniák 15, az erviniás kontroll esetében 20 minta átlagában vett számát jelölik. A felső indexben szereplő kisbetűk a Tukey-féle post hoc teszt alapján számított, az egyes kezelések fajtán belüli szignifikáns eltéréseit jelölik (P= 0,05 szinten, kivéve a', mely b'-től és b'', mely c''-től P= 0,01 szinten tér el egymástól).

A fágkezelések tesztnövények közötti hatásának tekintetében (**15. táblázat**) elmondható, hogy a H2A fág a 'Gala Schniga' és a 'Pinova' fajtákon szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult, mint a 'Berecki' virágokon. Továbbá a három fág kombinációjának alkalmazása a 'Pinova' virágokon szignifikánsan visszaszorította a baktériumok számát az 'Idared' fajtán mértékhez képest. Azonban a többi fajta között nem volt szignifikáns különbség. A két ismétlés

eredményeiből azonban nem kaptunk egyértelmű választ arra, hogy a kezelések hatékonysága határozottan függ-e a gazdanövény fogékonyságától.

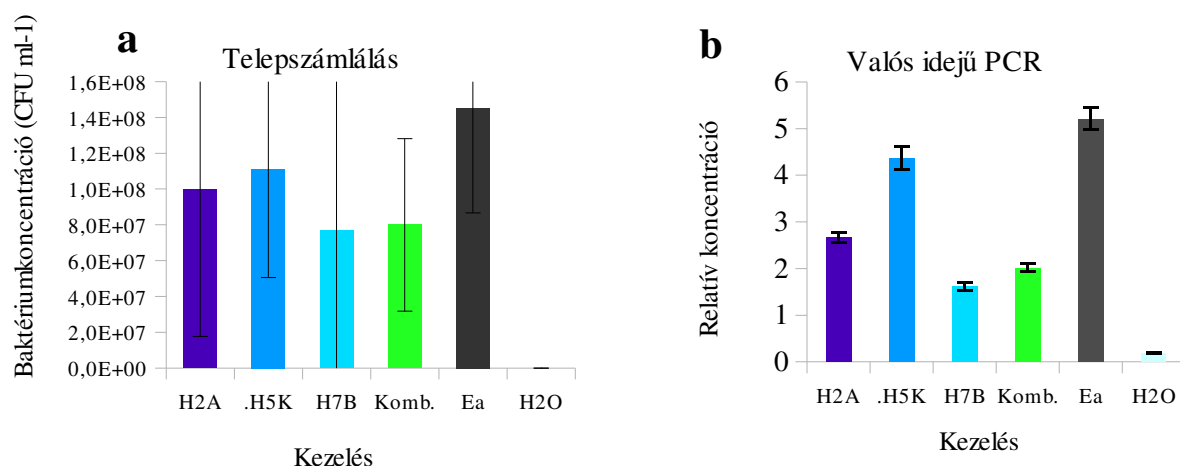
15. táblázat Fágizolátumok és kombinációjuk *E. amylovora* gátló hatása különböző almafajták és egy birsfajta virágain (2012) – a kezelések fajták közötti hatásának összehasonlítása

Tesztnövény fajták	Kezelések				
	H2A+Ea	H5K+Ea	H7B+Ea	(H2A+H5K+H7B)+Ea	H ₂ O+Ea
'Gala Schniga'	278 ^a	315 ^a	247 ^a	188 ^{ab}	550 ^a
'Idared'	499 ^{ab}	556 ^a	384 ^a	400 ^a	840 ^a
'Golden delicious Reinders'	395 ^{ab}	529 ^a	265 ^a	221 ^{ab}	949 ^a
'Pinova'	115 ^a	239 ^a	567 ^a	140 ^b	741 ^a
'Bereczki'	751 ^b	406 ^a	350 ^a	233 ^{ab}	851 ^a

Az értékek a virágokról visszaizolált minták (50 µl, 10000-szeres hígítás) szélesztéséből kapott kolóniaszámát jelölik 15, az erviniás kontroll esetében 20 minta átlagában. Az (a) és (b) betűk a fajták közötti szignifikáns különbséget jelentik (P= 0,01 szinten, kivéve a', mely b'-től P= 0,05 szinten tér el).

5.5.2.2 Valós idejű PCR vizsgálat

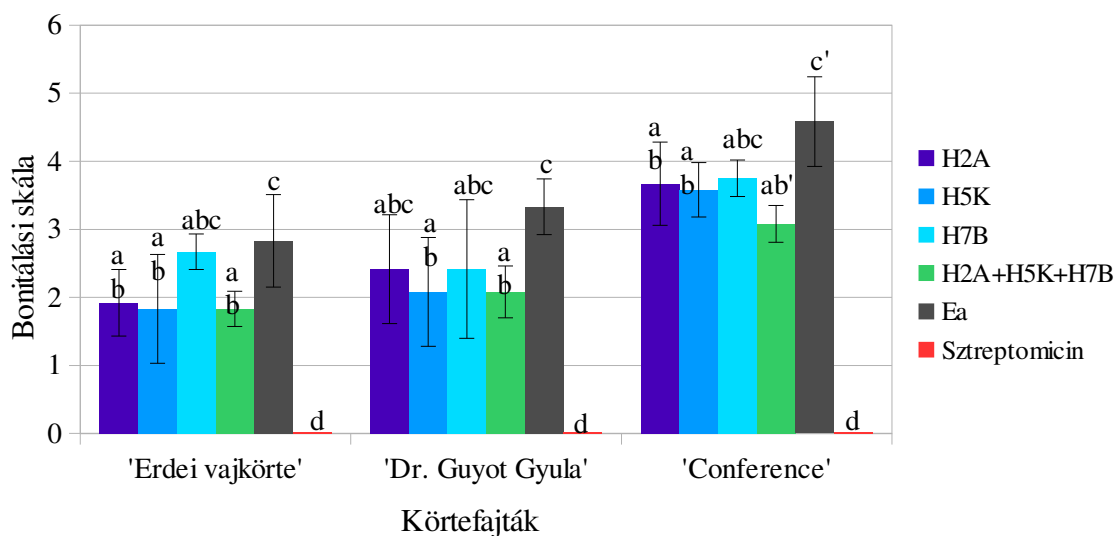
Az 'Idared' fajta virágairól visszaizolált mintákat (2012) valós idejű („real time”) PCR vizsgálatnak alávetve, a kapott ciklusszámokat összevetettük a referencia értékekkel, így következtetni tudtunk a minták sejtszámára, majd a kapott adatokat összehasonlítottuk a szélesztési módszer eredményeivel. A telepszámlálással nyert eredményeink végül a kvantitatív valós idejű PCR technikával is megerősítést nyertek, mivel az egyes mintákban a baktérium mennyisége a telepszámláláshoz hasonló tendenciákat mutatott (**24. ábra**). A pozitív kontrollhoz képest csökkent mennyiségeket igazoltunk a fággal kezelt mintákban, de a H5A esetében ez a csökkenés nem volt szignifikáns (T-próba). A leghatékonyabbnak a H7B törzs bizonyult: harmadára csökkentette a baktériumszámot. A vízzel kezelt negatív kontrollban elhanyagolhatóan kis mennyiségű *E. amylovora* jelenléte a vizsgálati módszer nagyfokú érzékenységéből fakad, nem jelenti azt, hogy valóban jelen volt a baktérium a mintában.



24. ábra Fágizolátumok (H2A, H5K, H7B, 10^{12} PFU ml⁻¹) és hármas 1:1:1 arányú kombinációjuk *E. amylovora* (Ea1/79Sm, 5×10^5 CFU ml⁻¹) gátló hatása 'Idared' almafajtán (2012). A virágokról visszaizolált minták szélesztésből kapott telepszámlálási (a) és a valós idejű PCR vizsgálatból származó adatok (b) összevetése. Az ábrázolt értékek hat kezelés \pm SE átlagát mutatják (mintaszám= kezelésenként 15, az erviniás kontroll esetében 20). A (b) ábrán szemléltetett értékek meghatározása a mellékletekben elhelyezett kalibrációs görbe (M19) alapján történt.

5.5.3 FÁG HATÁSVIZSGÁLAT ÉRETLEN KÖRTESZELETEN

Három körtefajta ('Conference', 'Dr. Guyot Gyula', 'Erdei vajkörte') éretlen gyümölcsszeletein vizsgálva a virágkísérletek során is tesztelt fágizolátumok (H2A, H5K, H7B) és hármas kombinációjuk baktérium-visszaszorító hatását azt tapasztaltuk, hogy általánosságban a fágkombinációkkal történt kezelések mindhárom fajta esetén szignifikánsan csökkentették a tüneteket az erviniás kontrollhoz viszonyítva. A legsúlyosabb tünetek a 'Conference', a legenyhébbek az 'Erdei vajkörte' fajtán voltak megfigyelhetők. A kísérletben (**25. ábra**) a H5K és a fágkombináció szignifikánsan hatékonyabb volt a pozitív kontrollhoz képest mindhárom fajta esetén, de a fágos kezelések nem különböztek szignifikánsan egymástól. A kezelések fajták közötti összefüggéseinek a vizsgálatából az derült ki, hogy a 'Dr. Guyot Gyula' és az 'Erdei vajkörte' szeleteken szignifikánsan mérsékeltebben jelentkeztek az erviniás fertőzés következtében kialakuló tünetek a 'Conference' fajtához képest valamennyi fágos kezelés esetén (**16. táblázat**), és hogy a fágkombináció az 'Erdei vajkörte'-n volt a leghatékonyabb. A fágok baktérium-elimináló hatása azonban messze elmaradt a sztreptomicin-szulfátétól; a sztreptomicinnel kezelt körteszeletek mindegyike tünetmentes maradt.



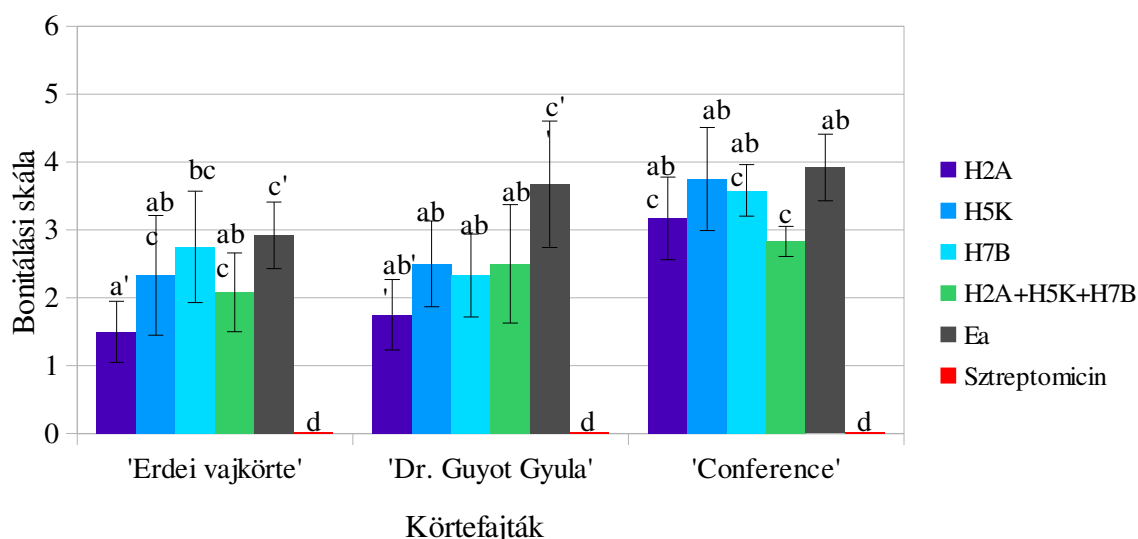
25. ábra Fágizolátumok és kombinációjuk *E. amylovora* (Ea1/79) okozta tünetekre kifejtett hatása különböző körtefajták zöld gyümölcsseletein (I. kísérlet). Az ábrázolt értékek hat kezelés \pm SE átlagát mutatják (6 minta/kezelés). Az oszlopok fölötti különböző betűk a Tukey-féle post hoc teszt alapján számított, az egyes kezelések fajtán belüli szignifikáns különbségeit jelzik ($P = 0,05$ szinten, kivéve ab', mely c'-től $P = 0,01$ szinten tér el).

16. táblázat Fágizolátumok és kombinációjuk *E. amylovora* okozta tünetekre kifejtett hatása különböző körtefajták zöld gyümölcsseletein (I. kísérlet) – a kezelések fajták közötti hatásának összehasonlító statisztikai összefoglalója

Tesztnövény fajták	Kezelések					
	H2A+Ea	H5K+Ea	H7B+Ea	(H2A+H5K+H7B)+Ea	H ₂ O+Ea	Sm +Ea
'Erdei vajkörte'	1,92 ^a	1,83 ^a	2,67 ^a	1,83 ^a	2,83 ^a	0 ^a
'Dr. Guyot Gyula'	2,42 ^{a'}	2,08 ^a	2,42 ^{a''}	2,08 ^a	3,33 ^a	0 ^a
'Conference'	3,67 ^{b'}	3,58 ^b	3,75 ^{b''}	3,08 ^b	4,58 ^b	0 ^a

A számok a bonitálási skálaértékek (6 minta/kezelés) által takart tüneteket jelölik. Az „a” és „b” betűk a fajták közötti szignifikáns különbséget jelentik ($P = 0,01$ szinten, kivéve a', mely b'-től (H2A), illetve a'', mely b''-től (H5K) $P = 0,05$ szinten tér el). Ea: *E. amylovora* (Ea1/79); Sm: sztreptomicin.

A második kísérletben a 'Dr. Guyot Gyula' fajtán valamennyi kezelés szignifikánsan lecsökkentette a tűzelhalás tüneteit a pozitív kontrollhoz képest (**26. ábra**). Ez a hatás az 'Erdei vajkörte' esetében csak a H2A, míg a 'Conference' kezelésekor a H5K és a fágkombináció alkalmazásakor igazolódott. Az egyes fágos kezelések hatékonysága között a H2A fágnek a H7B fágtól való eltérést leszámítva nem volt szignifikáns különbség. A fágos kezelések fajták közötti hatását összehasonlítva megállapítható, hogy a H2A és a H5K fágkezelés hatására szignifikánsan mérséklődtek az erviniás tünetek a 'Dr. Guyot Gyula' és az 'Erdei vajkörte' fajtákon a 'Conference' fajtához képest (**17. táblázat**). A sztreptomicines kezelés ezúttal is szignifikánsan hatékonyabb volt a fágok baktérium-elimináló hatásánál.



26. ábra Fágizolátumok és kombinációjuk *E. amylovora* (Ea1/79) okozta tünetekre kifejtett hatása különböző körtefajták zöld gyümölcsseletein (II. kísérlet). Az ábrázolt értékek hat kezelés \pm SE átlagát mutatják (6 minta/kezelés). Az oszlopok fölötti különböző betűk a Tukey-féle post hoc teszt alapján számított, az egyes kezelések fajtán belüli szignifikáns különbségeit jelzik ($P=0,05$ szinten, kivéve a', mely c'-től, ab'', mely c''-től, illetve valamennyi d-től $P=0,01$ szinten tér el egymástól).

17. táblázat Fágizolátumok és kombinációjuk *E. amylovora* okozta tünetekre kifejtett hatása különböző körtefajták zöld gyümölcsseletein (II. kísérlet) – a kezelések fajták közötti hatásának összehasonlítása

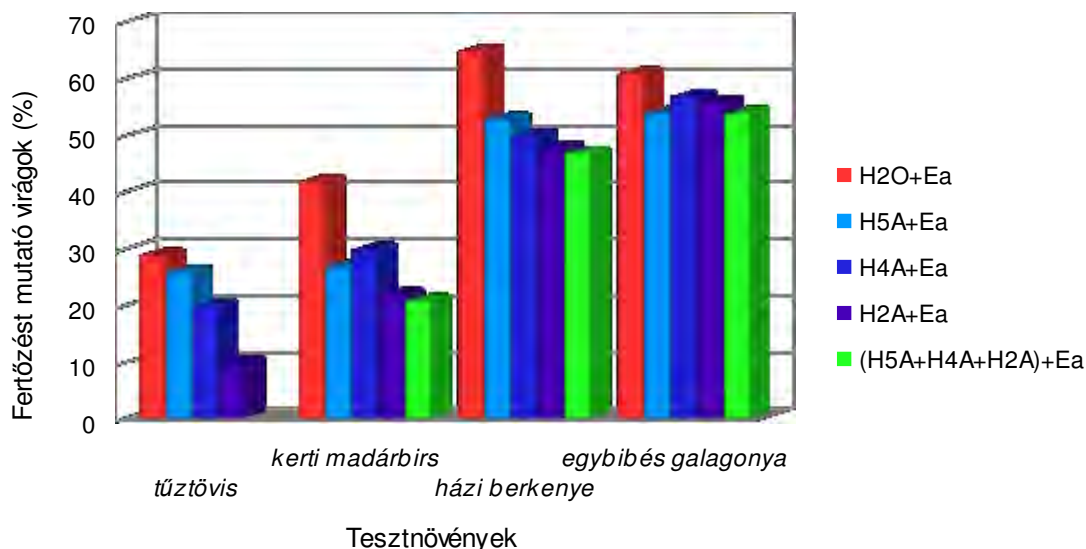
Tesztnövény fajták	Kezelések					
	H2A+Ea	H5K+Ea	H7B+Ea	(H2A+H5K+H7B)+Ea	H ₂ O+Ea	Sm +Ea
'Erdei vajkörte'	1,5 ^{a'}	2,33 ^a	2,75 ^{ab}	2,08 ^a	2,92 ^a	0 ^a
'Dr. Guyot Gyula'	1,75 ^{a'}	2,5 ^a	2,33 ^a	2,5 ^a	3,67 ^a	0 ^a
'Conference'	3,17 ^{b'}	3,75 ^b	3,58 ^b	2,83 ^a	3,92 ^a	0 ^a

A számok a bonitálási skálaértékek (6 minta/kezelés) által takart tüneteket jelölik. A felső indexben szereplő betűk a fajták közötti szignifikáns különbséget jelentik ($P=0,05$ szinten, kivéve a', mely b'-től $P=0,01$ szinten tér el). Ea: *E. amylovora* (Ea1/79); Sm: sztreptomycin.

5.5.4 FÁG HATÁSVIZSGÁLAT DÍSZNÖVÉNYEKEN

A kísérletben négy tűzelhalásra fogékony dísznövényfajon vizsgáltuk különböző fágkezelések baktérium-elimináló hatását (Nagy és mtsai. 2012). Mind a négy fajnál a legeredményesebbnek a H2A+H4A+H5A fágkombináció alkalmazása bizonyult (27. ábra). Az *E. amylovora* inokuláció következményeként kialakuló betegségi tünetek mérséklésében a leghatékonyabb kezelést a tűztövis (*P. angustifolia*) virágokra kijuttatott fágkombináció jelentette, mert abban az esetben a fertőzést követő negyedik napon a fággal kezelt vesszőkön nem volt megfigyelhető elbarnult vacokú virág, míg a kezeletlen kontroll virágok 29%-a súlyos

tüneteket mutatott. Ezzel ellentétben a házi berkenyén (*C. monogyna*) és az egybibés galagonyán (*S. domestica*) a fágoktól nem csökkentette le jelentős mértékben a virágnekrózis mértékét.



27. ábra Fágizolátumok és kombinációjuk hatása az *E. amylovora* baktériumra különböző dísznövényeken. Az egyes oszlopok az adott kezeléseket követően az erviniás inokuláció utáni negyedik napon a vackbarnulás tünetét mutató virágok arányát ábrázolják 100 véletlenszerűen kiválasztott virágból.

5.6 A FÁGKEZELÉS HATÉKONYSÁGÁNAK FOKOZÁSÁRA IRÁNYULÓ VIZSGÁLATOK: FÁGOK NÖVÉNYBE JUTÁSA, TRANSZLOKÁCIÓJA ÉS AZ *E. AMYLOVORA* OKOZTA TÜNETEKRE GYAKOROLT HATÁSA

5.6.1 A FÁGOK TRANSZLOKÁCIÓS KÉPESSÉGÉNEK ALMA CSÍRANÖVÉNYEKBE TÖRTÉNŐ VIZSGÁLATA – ELŐKÍSÉRLET

Előkísérletünk eredménye alapján elmondható, hogy a gyökérszónához kijuttatott vizes fáguszuszpenzióval (H5K) történő egyszeri kezelés után már két nappal fágokat detektáltunk a növények felső szárrészében és leveleiben (**18. táblázat**). A perlites közeg a fágok növénybeni szállítódása szempontjából kedvezőbbnek bizonyult, mint a vizes kultúra. A kétnapos inkubációt követően direkt mintavétellel az egyik perlites közegből származó növényi mintából sikerült fágokat kimutatni. Az úgynevezett felszaporításos módszerrel viszont detektálni tudtuk a fágokat valamennyi perliten elhelyezett növényből és az egyik hidroponikus közegben kezelt növény mintájából is. A perlites kezelés esetén áttetsző összefüggő tar foltokat figyeltünk meg, ami magas fágkoncentrációra utal. A hatnapos inkubáció után mindegyik vizes közegben tartott növényből és az egyik perlites kezelésből származó növényi mintából ki tudtuk mutatni a fágok jelenlétét. Valamennyi vizes kontroll fágmentesnek bizonyult. A visszaizolált fágok által képzett plakkok morfológiája megegyezett az inokulumként használttal.

18. táblázat H5K fágok növénybe jutása és *in planta* transzlokációja vízben (hidropóniás kultúra), illetve perliten tartott alma csíranövények esetén

Mintavétel		Fágok detektálása ^a					
Inkubációs idő (napok)	Mintavételi mód	Hidropóniás kultúra			Perlites közeg		
2	Közvetlen	-	-	-	+	-	-
	Felszaporításos	+	-	-	+	+	+
6	Közvetlen	+	+	+	+	-	-

A fágok kimutatása a gyökérzónához kijuttatott vizes fáguszuszpenzióval (H5K, 10^{13} PFU ml⁻¹) történő egyszeri kezelést követően a növények felső szárrészből és leveleiből közvetlen visszaizolálással (közvetlen mintavételi mód), illetve a kétnapos inkubáció után vett minták 200 µl-ét további négy napig baktériumkultúrával (*E. amylovora* Ea1/79Sm törzs), LB (sztreptomycin 500 ppm) tápoldatban való együttráztatását (felszaporításos mintavételi mód) követően cseppteszttel történt. ^a+: van plakk; -: nincs plakk

5.6.2 FÁGOK SZÁLLÍTÓDÁSA ALMA CSÍRANÖVÉNYEKBEN

A fáguszuszpenziók (H5K, ill. ΦEa104) almamagoncokhoz történő egyszeri kijuttatása után ki tudtuk mutatni a fágok jelenlétét mind a növény föld feletti részeiből (a gyökérzóna kezelését követően), mind pedig a gyökérzetből (a növények alsó-, ill. felső szárrészénk permetezését követően). Mindkét fágizolátum használatakor a kezelés utáni első napon sikerült a legtöbb növényi mintából fágot visszaizolálni (**19. táblázat**). A kijuttatott fáguszuszpenzió sűrűsége azonban jelentős mértékben lecsökkent (10^{13} PFU ml⁻¹-ről $1,0 - 4,0 \times 10^2$ PFU ml⁻¹-re) a közvetlen mintavétellel feltárt, életképes fágot tartamazó minták esetében.

A H5K fágizolátum szuszpenziójával történő kezelést követően a legtöbb mintából egy nap elteltével sikerült fágot kimutatnunk. Közvetlen mintavétellel a növények alsó szárrészből két esetben, míg a gyökérzetből egy esetben voltak fágok kimutathatók a kezelés utáni első napon. A gyökérzetből még a kezelést követően öt nappal is sikerült fágot visszaizolálni. Az úgynevezett felszaporításos módszerrel több mintából, köztük a felső leveles szárrészből is tudtunk fágot detektálni az első, a második és az ötödik mintavételi napokon. Az így felszaporított mintákból szélesztve sok esetben áttetsző, összefüggő tar foltok jelentek meg a baktériumrétegen. A fágok kijuttatását követő hetedik napon már nem volt kimutatható a fágok jelenléte egyik kezelés esetén sem. A vizes kontrollrok fágmentesnek bizonyultak.

19. táblázat Fágizolátumok (H5K, ill. ΦEa104) detektálása különböző növényi részekből alma csíranövényeken

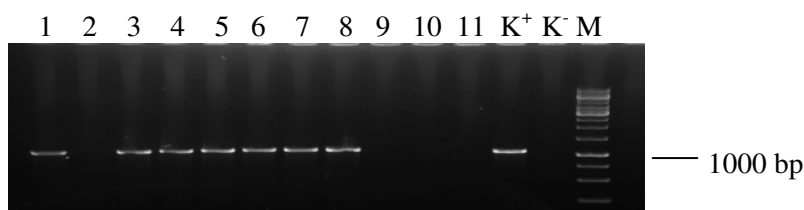
Kezelés	Mintavétel	Inkubációs idő (napok)	Mintavételi mód	Fágok detektálása ^a															
				Alsó szárrészből					Felső szárrészből és levelekből					Gyökérből					
				I.					II.					I.					
H ₂ O	1		Közvetlen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5K	1		Közvetlen	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
			Felszaporításos	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
	2		Közvetlen	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			Felszaporításos	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3		Közvetlen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Felszaporításos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5		Közvetlen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
			Felszaporításos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
ΦEa104	1		Közvetlen	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
			Felszaporításos	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
	2		Közvetlen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Felszaporításos	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3		Közvetlen	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Felszaporításos	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5		Közvetlen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Felszaporításos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7		Közvetlen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Felszaporításos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fágszuszenziók (H5K, ill. ΦEa104, 10¹³ PFU ml⁻¹) almamagoncokhoz történő egyszeri kijuttatását követően a gyökérszóna kezelése (10 ml fágszuszenzió/növény) esetén mintavételkor külön a növények alsó, sziklevél alatti, illetve a felső, leveles szárrésze, míg a föld feletti részekre való kipermetezést (500 µl fágszuszenzió/növény) követően a növények gyökérzete lett feltárva. A minták (3 növény/kezelés a fágkijuttatást követő 1., 2., 3., 5. és 7. napon) vizsgálata az Adams-féle cseppteszt módosított változatával történt közvetlenül a mintavétel után (közvetlen), illetve további két napon át tartó fág-szaporítással (felszaporításos). ^a I.: első kísérlet; II.: második kísérlet; +: van plakk; -: nincs plakk

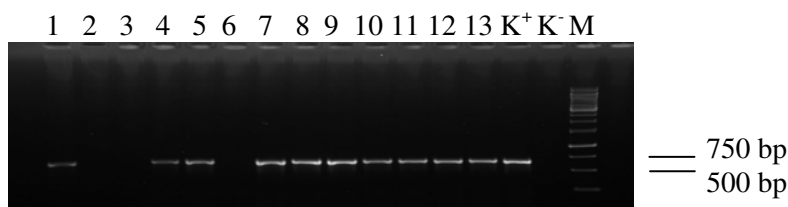
A Φ Ea104 fáguszuspenziónak a gyökérszónához, illetve a szár és levelek felületére való kijuttatását követően közvetlen mintavétellel az alsó szárrészből, a leveles felső szárrészből és a gyökérszónából egyaránt kimutatható volt a fágok jelenléte egy nappal a kezelés után (**19. táblázat**). Az alsó szárrészből a harmadik mintavételi napon is sikerült közvetlenül fágot visszaizolálni. A felszaporításos módszerrel a növények alsó, valamint a leveles felső szárrészből tudunk fágot kimutatni az első három mintavételi időpontban. A gyökérszónából csak egy nappal a permetezést követően sikerült fágot detektálnunk. Fágok a kezelést követő ötödik és hetedik napon már nem voltak kimutathatók.

PCR vizsgálat

PCR-es fág kimutatáshoz a Φ Ea104 fág esetén a génbanki adatok alapján általunk tervezett Ea104F/R primerpárt, a magyar H5K esetén a korábbi kísérleteinkben használt, termináz génre specifikus primereket használtuk. A felszaporításos módszerrel vizsgált, szélesztéskor plakktól adó pozitív mintákban a fágok *in planta* jelenlétét PCR módszerrel is sikerült igazolnunk: a H5K fág esetében 11 mintából 7 mintában (**28. ábra**), a Φ Ea104 fágnál 13 mintából 10 mintában (**29. ábra**).



28. ábra A H5K fágizolátummal kezelt csíranövényekből a felszaporításos mintavétel során szélesztéssel pozitívnak bizonyult minták Term-F/R indító szenvenciapárral kapott PCR termékének (1079 bp) gélelektroforézis képe. A minták balról jobbra: I/1. 1a (Első kísérlet/1. nap, első növény, alsó szárrész), I/1. 2a, I/1. 3a, I/1. 3f (felső szárrész), I/1. 2gy (gyökér), I/1. 3gy, I/2. (második nap) 3a, I/2. 2f, II/1. 2a, II/5. 2f, II/5. 3gy, H5K (K⁺), víz (K⁻), GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

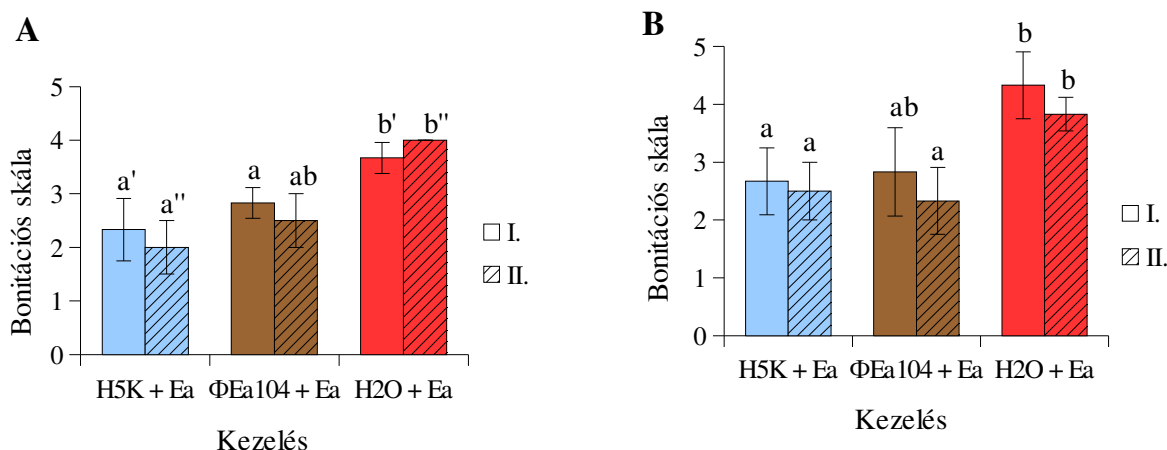


29. ábra A Φ Ea104 fággal kezelt csíranövényekből a felszaporításos mintavétel során szélesztéssel pozitívnak bizonyult minták Ea104F/R primerpárral kapott PCR termékének (665 bp) gélképét. A minták balról jobbra: I/1. 2a (Első kísérlet/1. nap, második növény, alsó szárrész), I/1. 2f (felső szárrész), I/1. 3a, I/1. 3f, I/1. 1gy (gyökér), I/1. 2gy, I/1. 3gy, I/2. (második nap) 2a, I/2. 2f, I/2. 3f, II/1. 2f, II/1. 3gy, II/3. 1a, Φ Ea104 (K⁺), víz (K⁻), GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

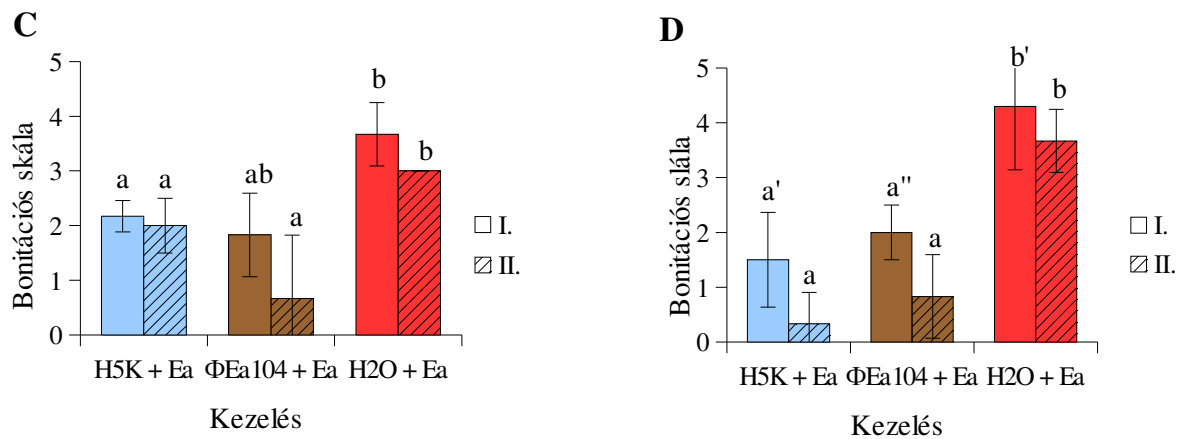
5.6.3 A FÁGOK HATÁSA AZ *E. AMYLOVORA* OKOZTA TŰNETEKRE

5.6.3.1 Alma csíranövények gyökérzónájához, illetve a növény föld feletti részeire juttatva ki a fágokat

A fágkezelés hatására mindkét kijuttatási mód esetén szignifikánsan lecsökkent az *E. amylovora* baktérium szuszpenziójával végzett inokuláció következményeként kialakuló tűzelhalás tünetek mértéke a kezeletlen kontrollhoz képest (**30-31. ábra**). A két koncentráció hatását összevetve a második kísérletben a ΦEa104 fág 10^{13} PFU ml^{-1} koncentrációban szignifikánsan mérsékelte a tüneteket a csíranövényeknek mind a gyökérzónája felé, mind pedig a lombzatára történő alkalmazása esetén. A második kísérletben az a kezelés, melynek során a H5K fágok vizes szuszpenzióját 10^{13} PFU ml^{-1} koncentrációban juttattuk a teszt növények szárára és leveleire szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult az *E. amylovora* okozta tünetek mérséklésében ahhoz képest, amikor az alacsonyabb koncentrációban permetezzük a fágokat a növényre. Azonban a második kísérlet során mindkét fág törzs kijuttatási módjai között egyik alkalmazott koncentrációban sem volt kimutatható szignifikáns különbség, noha a H5K fág 10^{13} PFU ml^{-1} koncentrációban hatékonyabb volt a lombzatra való kijuttatáskor, mint a gyökérzet felé történő alkalmazás esetén. Az ismételések (I. és II. kísérlet) nem különböztek egymástól szignifikánsan. A kijuttatott fágok hatását a kezeléseket követő 13. napon már nem lehetett értékelni, mivel addigra a csíranövények zöme kiterjedt nekrotikus tüneteit mutatta.



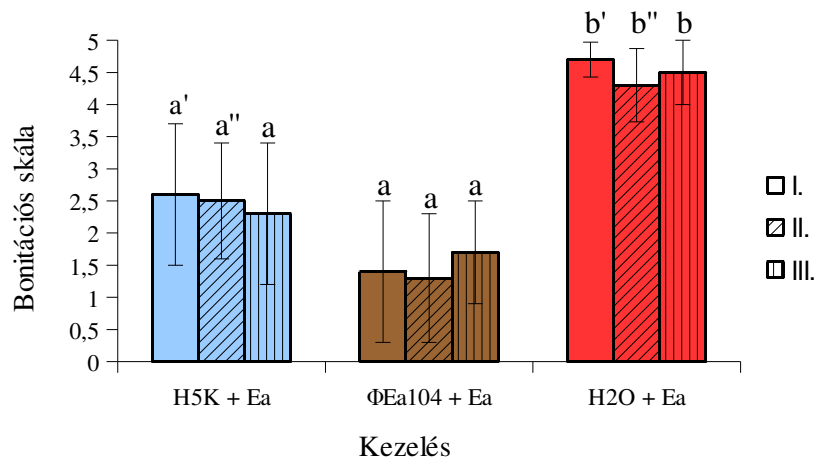
30. ábra Alma csíranövények gyökérzónájához (A), illetve levélzetére és szárára (B) az *E. amylovora* (Ea1/79Sm , 5×10^5 CFU ml^{-1}) baktérium-szuszenziójával történő inokulációt egy nappal megelőzően kijuttatott fágok (H5K, ill. ΦEa104 , 10^3 PFU ml^{-1}) hatása a kialakuló tűzelhalásos tünetekre a baktériumfertőzés utáni 5. napon. Az értékek két, egymástól külön ábrázolt független kísérlet (I., II.) \pm SE átlagát mutatják (3 minta/kísérlet) egy tünetmentes állapottól (0) a széles körű nekrotizisig (5) terjedő bonitációs skála mentén. Az oszlopok fölötti kis betűk a Tukey-féle post hoc teszt alapján számított, az egyes kezelések közötti szignifikáns különbségeket jelzik [$P = 0,01$ szinten, kivéve a', mely b'-től, illetve a'', mely b''-től csupán $P = 0,05$ szinten tér el egymástól (A)].



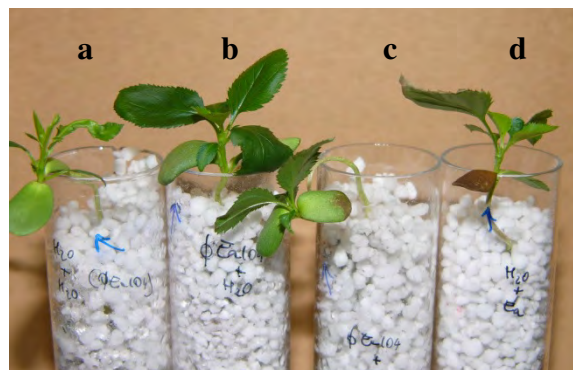
31. ábra Alma csíranövények gyökérzónájához (C), illetve levélzetére és szárára (D) az *E. amylovora* (Ea1/79Sm, 5×10^5 CFU ml⁻¹) baktérium-szuszenzióval történő inokulációt egy nappal megelőzően kijuttatott fáguszuszenziók (H5K, ill. ΦEa104 10^{13} PFU ml⁻¹) hatása a tűzelhalásos tünetekre a baktériumfertőzést követő 5. napon. Az értékek két, külön ábrázolt független kísérlet (I., II.) \pm SE átlagát mutatják (3 minta/kísérlet) egy tünetmentestől (0) a széles körű nekrosis állapotáig terjedő bonitációs skála függvényében. Az oszlopok fölötti különböző betűk a Tukey-féle post hoc teszt alapján számított, az egyes kezelések közötti szignifikáns különbségeket jelzik [$P = 0,01$ szinten, kivéve a' és a'', melyek b'-től csupán $P = 0,05$ szinten különböznek (D)].

5.6.3.2 A fágokat alma csíranövények sziklelevelébe injektálva

Ebben a kísérletben oly módon vizsgáltuk a fágok *E. amylovora* okozta tünetek visszaszorításában jelentkező hatását, hogy a fáguszuszenziókat (H5K, illetve ΦEa104) alma csíranövények egyik sziklelevelébe juttattuk, majd közvetlenül utána baktérium-szuszenziót cseppentve a fággal átitatott sziklelevélre inokuláltuk a tesztnövényt. A fágkezeléseket követően a mesterséges fertőzés által előidézett tünetek mértékében, melyet egy előre felállított bonitálási skála alapján értékeltünk, szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a kezeletlen, pozitív kontrollhoz viszonyítva (**32-33. ábra**). Az öt napos inkubációs időszak alatt kialakult tünetek mértéke a H5K fágkezelés hatására az egymástól szignifikánsan nem különböző három ismétlés átlagában 45%-kal, míg a ΦEa104 alkalmazása esetén 67%-kal mérséklődött. A két fág hatása között nem volt szignifikáns különbség.



32. ábra Alma csíranövények egyik sziklelevelébe injektált fágok (H5K, illetve Φ Ea104, 10^{13} PFU ml⁻¹) hatása a fágkezelést azonnal követő *E. amylovora* inokuláció (Ea1/79Sm, 10^6 CFU ml⁻¹) következtében megjelenő betegségtünetek mértékére az erviniás kontrollhoz (H₂O+Ea) képest a fertőzés utáni ötödik napon. Az “ép, zöld sziklelevél” (0) és a “mindkét sziklelevél barna” (5) állapotok közötti értékek három, egymástól külön ábrázolt független kísérlet (I., II., III.) \pm SE átlagát mutatják (mintaszám= 5/kísérlet). A különböző betűk a Tukey-féle post hoc teszt alapján számított, az egyes kezelések közötti szignifikáns különbségeket jelzik (P= 0,01 szinten, kivéve a', mely b'-től és a'', mely b''-től csupán P= 0,05 szinten különbözik).



33. ábra Közvetlenül alma csíranövény sziklelevelébe irányuló fágkezelés (Φ Ea104, 10^{13} PFU ml⁻¹) hatása az *E. amylovora* (Ea1/79Sm, 10^6 CFU ml⁻¹) okozta tünetek mértékére öt nappal a kezelés után. (a) H₂O+H₂O; (b) fág+H₂O; (c) fág+Ea; (d) H₂O+Ea.

5.7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Elsőként izoláltunk és jellemeztünk Magyarországon *Myoviridae*, illetve *Podoviridae* családba tartozó *E. amyovora*-specifikus bakteriofágokat.
- Elsőként írtuk le *Myoviridae*, illetve *Podoviridae* családba tartozó hét magyar *E. amylovora* fágizolátum dpo génjének, továbbá egy izolátum peptidázt és két fág Muzerű profág proteint, illetve terminázt kódoló régiójának szekvenciáját. E DNS szakaszok nagyfokú homológiát mutattak más *E. amylovora* fágok ugyanezen DNS szakaszaival, génbanki adatok alapján.
- Új adatokat szolgáltatunk általunk izolált és szelektált bakteriofágok és azok kombinációinak *E. amylovora* baktérium szaporodását gátló hatásáról, *in vitro* körülmények között alma- és birsvirágon, éretlen körteszeleten, valamint dísznövényeken.
- Perlites közeg alkalmazásával és a bakteriofágok sziklevélbe injektálásával új módszert dolgoztunk ki annak vizsgálatára, hogy a növények képesek-e gyökéren vagy levélen keresztül felvenni a bakteriofágokat, illetve hogy a növénybe juttatott fágok milyen hatással vannak az *E. amylovora* okozta tünetekre.
- Elsőként mutattuk ki, hogy az *E. amylovora* fágok képesek *in vitro* alma csíranövények gyökerén keresztül felszívódni.

6 AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA, KÖVETKEZTETÉSEK

Az általunk Magyarországról izolált *E. amylovora* fágokat a *Caudiovirales* renden belül a C1, illetve A1 morfortípusoknak megfelelően a *Podoviridae*, illetőleg a *Myoviridae* családokba soroltuk (Ackermann 2007). A hazai izolátumok fejátmérője megfelel az irodalmi adatoknak (Richie és Klos 1979, Müller és mtsai. 2011a); a *Podoviridae* családba sorolt izolátumok 60 nm, míg a *Myoviridae* izolátumok 70 nm körüli fejátmérővel jellemezhetők. A nagyobb méretbeli eltérést ez utóbbi családba tartozó izolátumoknál tapasztaltuk, de ez nem meglepő, mert például a ΦEa21-4 fág (Lehman és mtsai. 2009) az ismert amerikai fágtörzsekhez képest szintén kisebb méretű fejrészrel rendelkezik.

A fágizolátumok által tesztbaktériumon képzett tarfoltok morfológiája a fágok egyik jellemzője, melyet - többek között - Gill és mtsai. (2003) is részletesen vizsgáltak. Hazai fágizolátumaink igen eltérő, 0,5 – 7,1 mm mérettartományon belüli átmérőjű plakkokat adtak a tesztbaktériumot tartalmazó fedőagar rétegen, és a tarfoltokat övező sáv - megléte esetén - 0,1-5,0 mm közötti átmérőjű volt a különböző fágizolátumoknál. A ΦEa1h mérete megegyezett a Richie és Klos (1979) által leírtakkal. Az amerikai bakteriofágok közül a ΦEa100-as törzs képezte a legnagyobb átmérőjű és sávval övezett plakkokat, melyhez képest az egyik legnagyobb méretű plakkot képző magyar fágizolátum (H7B) szélesebb plakk-sávot ad, mely a fág erőteljesebb lizálóképességére utal.

Molekuláris vizsgálatainkban az alkalmazott indító szekvenciákkal végzett PCR reakciók eredménye alapján megállapítható, hogy fágizolátumaink különböznek a tesztelt amerikai fágtörzsektől. Izolátumainkban az EPS depolimeráz, holin, lizozim, termináz, peptidáz, Mu-szerű profág protein, valamint a kapszid enzimeket kódoló gének bázissorrendjét vizsgáltuk, azért, mert ezek esetében bizonyított a fágokban betöltött szerepük (Kim és Geider 2000, Lehman és mtsai. 2009, Müller 2011a) és ismert mely DNS szakaszok kódolják szintézisüket. Mivel a fágok hatékonysági vizsgálataiban a H2A és a H5K bizonyultak az egyik legjobbaknak, és mert ezek szekvenciái még nem ismertek, olyan genetikai markereket kerestünk, amelyekkel a fágok később jellemezhetők vagy esetleg azonosíthatók lesznek. A részleges szekvencia-analízis fényt derített arra, hogy a H2A és a H5K genomjában egyaránt fellelhető az úgynevezett nagy termináz alegységet, valamint a Mu-szerű profág proteint kódoló génszakasz, melyek nagyfokú hasonlóságot mutatnak a vB_EamM-M7 *E. amylovora* fággal (Born és mtsai. 2011). Mivel a H2A izolátum peptidázt kódoló régiója is 99%-ban ezzel a fágtörzsszel egyezik, a további vizsgálatainkat a vB_EamM-M7 fágra is tervezzük kiterjeszteni.

Tekintettel arra, hogy a Φ EaH2 törzs (GenBank-i leltári szám: JX316028) jelentősen eltér az eddig ismert *E. amylovora* fágoktól és egyúttal egy hazai fágizolátum, fontosnak tartottuk, hogy genomját a saját, magyarországi fágizolátumainkkal összehasonlítsuk, különös tekintettel egy meghatározott DNS szakaszra, amely a **Dömötör és mtsai. (2012)** által izolált fágban benne van, és ami nagyfokú homológiát mutat az *E. amylovora* baktérium virulenciájában jelentős szerepet játszó amilovorán bioszintéziséhez szükséges fehérjét kódoló *amsF* génnel. A szerzők e gén jelenléte miatt megfontolandónak tartják az általuk izolált törzs biológiai védekezésben való alkalmazását. A Φ EaH2 fág erre a DNS szakaszára tervezett primer párra (ϕ iEaH2-F/R) valamennyi tesztelt fágizolátumunk negatív lett, azonban a baktérium *amsF* génjére specifikus primerekre (EaFF/R) a H9A kivételével mindegyik fág pozitívnak bizonyult. Ugyanakkor a negatív kontrollként használt minta, a Φ Ea1h is gyengén pozitív lett, ezért felmerült a kontamináció lehetősége. A baktérium-szennyeződés kizárása érdekében tervezzük, hogy az eredeti vad fág törzseket amilovorant nem termelő baktériumtörzsben szaporítjuk fel, majd ezt követően ellenőrizzük e DNS szakasz jelenlétét és szekvenciáját. Vizsgálataink ideje alatt a nemzetközi gén adatbázisokból hozzáférhetővé váltak egy újabb magyar *E. amylovora* fág (Φ EaH1) teljes genomjának szekvencia adatai is (NC_023610 **Meczker és mtsai. 2014**), így további vizsgálatainkba ezt a fágtörzset is tervezzük bevonni.

A PCR vizsgálatok eredményei és a tesztelt fágok plakkmorfológiája közötti összefüggések tekintetében elmondható, hogy a PCR eredmények alapján legegységesebb, zölddel jelölt csoport tagjai (H1A, H1B, H2A, H2B, H10A, H10B, H11, H12A) *dpo*-negatívak és az irodalomból ismert amerikai Φ Ea116-hoz hasonlóan zömmel kicsi plakkot képeznek, melyeket nem, vagy csak egy nagyon keskeny sáv övez. Ez a tendencia figyelhető meg a más csoportokba tartozó, de ugyancsak depolimerázt nem kódoló genomú H5K, valamint a H8A és a H9A izolátumok esetében. Érdekes ugyanakkor, hogy a szintén *dpo*-negatívnak bizonyult H8B nagy plakkkal jellemezhető. A *dpo*-pozitív izolátumok közül kerülnek ki a gazdabaktériumgyepen legnagyobb tarfoltot képező, egy csoportba sorolt H6B és H9B fágizolátumok.

Hazai fágizolátumaink különböző *E. amylovora* izolátumokra, *Erwinia*, *Pantoea* és más baktériumfajokra gyakorolt hatását tesztelve azt találtuk, hogy a magyar fágok a vizsgálatban szereplő amerikai fágtörzsekhez képest szélesebb gazdakörrel rendelkeznek. Hasonló vizsgálatokat **Gill és mtsai. (2003)**, valamint **Müller és mtsai. (2011a)** is végeztek, akik szintén jelentős különbségeket tapasztaltak az egyes *E. amylovora* fágok gazdakörét tekintve. Kísérleteinkben a tesztelt izolátumok közül hat (H1B, H2A, H2B, H4A, H7A, H7B) bizonyult kifejezetten *Erwinia*-specifikusnak, mivel ezek, az *E. tasmaniensis* kivételével lizálták az összes többi vizsgált *Erwinia* izolátumot és törzset, ugyanakkor a H2B és a H7B kivételével, melyek lizálták a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* H9-es törzset is, nem lizáltak más, az *Erwinia*-val

nem közeli rokon patogén baktériumot. Eredményeink részben megegyeznek a **Müller és mtsai. (2011a)** által közöltekkel. Az egyes tesztbaktériumoknak a gazdakörvizsgálatok részeként feltárt eltérő fágérzékenysége lehetőséget teremt a fágok szaporodását biztosító, s ezáltal az adott növényvédelmi célú fágkezelések hatékonyságát potenciálisan növelő, nem patogén baktériumtörzsek kiválasztásához. Esetünkben a *Pantoea agglomerans* MB96 volt a legfogékonyabb a vizsgált fágokkal szemben; a H4B kivételével valamennyi fág tiszta plakkokat képzett rajta, ugyanakkor az antagonista *E. billingae* Eb661 törzs is perspektivikus lehet e szempontból. Jellemzően ugyanazon baktériumok eltérő mértékben lehetnek fogékonyak az egyes fágokra; **Müller és mtsai. (2011a)** által tesztelt németországi fágizolátumok például csak gyengén lizálták az *E. billingae* Eb661 baktériumtörzset, mely így nem szolgálna hatékonyan azok felszaporítását. Különböző *E. amylovora* izolátumok néhány általunk izolált fággal szembeni fogékonyaságáról már korábban **Végh (2012)**, valamint **Végh és mtsai. (2012c)** is beszámoltak.

Az *E. amylovora* fágok tüzelhalással szemben kifejtett hatását először folyadékkultúrában teszteltük. A fág és a kórokozó szuszpenzióját tartalmazó tápoldatban az inkubációs idő végére lecsökkent optikai sűrűség értékeket mértünk, hasonlóan **Schnabel és Jones (2001)** kísérletéhez. Ismerve azt, hogy a fágok kombinációban alkalmazva hatékonyabbak lehetnek, mint önállóan (**Schnabel és mtsai. 1999, Svircev és mtsai. 2010**), a három legeredményesebb fágizolátumot különböző kombinációkban is tesztelve a H2A+H5K+H7B fágoktól bizonyult a legjobbnak. Az *E. amylovora* szaporodását folyadékkultúrában legjobban gátló izolátumokat és hármas kombinációjukat alma- és birsvirágokon *in vitro* tesztelve azt tapasztaltuk, hogy mindegyik vizsgált almafajta és a birs esetén a fágos kezelések visszaszorították az *E. amylovora* szaporodását. Az egyik legeredményesebb kezelést a fágkombináció adta, mely szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult a mérsékelt rezisztens 'Pinova' fajtán a fogékonyak számító 'Idared' fajtához képest. **Müller és mtsai. (2011a)** ezzel ellentétben azt figyelték meg, hogy a kombinációban adott fágkezelések nem voltak szignifikánsan hatékonyabbak annál, mint amikor az adott fágot önmagában juttatták ki alma virágokra, illetve körteszeletekre. Körte fajták éretlen gyümölcszeletein vizsgálva a virágkísérletek során is tesztelt fágizolátumok és hármas kombinációjuk baktérium-visszaszorító hatását megállapíthattuk, hogy a fágkezelések mérsékelték a tüneteket a pozitív kontrollhoz képest és hatásuk, a legtöbb esetben a 'Dr. Guyot Gyula' fajtán volt szignifikáns. Azonban a körteszeletekre alkalmazott kezelések kevésbé voltak hatásosak, mint a virágokon; hasonlóan **Müller és mtsai. (2011a)** megfigyeléseéhez.

A H2A, H4A és H5A fágizolátumok és azok kombinációját dísznövényeken tesztelve a virágfertőzöttség mértéke alapján a tűztövis és a kerti madárbirs virágai mérsékelten rezisztenseknek bizonyultak az *E. amylovora*-ra a házi berkenye és az egybibés galagonya virágaihoz képest, továbbá az is megfigyelhető volt, hogy ezeknél, a kísérletünkben kevésbé fogékonyan szereplő növényfajoknál voltak hatékonyabbak a fágkezelések. Érdekes, ugyanakkor nem meglepő ez az eredmény, mert habár a *Cotoneaster* fajok tűzelhalásra fogékonyként szerepelnek az irodalomban - az adatok főként hajtásfertőzöttségre vonatkoznak (**Lecomte és Cadic 1993**) - és náluk kevésbé fogékonynak tekintik a *Pyracantha* nemzetséget, a *Crataegus*-ok változó fogékonyságáról számoltak be (**Lespinasse és Aldwinckle 2000**).

Noha az alma- és birsvirágokon, körtegyümölcs-szeleteken, valamint a fenti dísznövények virágain végzett kísérletek eredményei alapján nem vonható le egyértelmű következtetés a tekintetben, hogy az egyes növényfajoknak, illetve fajtáknak az *E. amylovora* okozta fertőzésre való eltérő fogékonysága és a fágkezelések hatékonysága között szoros összefüggés áll fenn, mégis valószínűsíthető, hogy az ellenállóbbnak tekintett fajok, fajták esetében hatékonyabban működnek az alkalmazott fágok. Ezt támasztják alá **Schwarczinger és mtsai. (2011)** eredményei, akik magyar *E. amylovora* fágizolátumok baktérium-elimináló hatását eltérő fogékonyságú almafajták virágain vizsgálva azt tapasztalták, hogy az általuk tesztelt fágizolátumok igen hatékonyan gátolták az *E. amylovora* szaporodását alma virágokon, különösen a tűzelhalásra rezisztens 'Freedom' fajta (**G. Tóth 1997**) esetében. Ugyanakkor elképzelhető, hogy **Schwarczinger és mtsai. (2011)** azért kaptak ilyen eredményt, mert a fágos kezelést és a baktériummal történő mesterséges inokulációt nem egyidőben végezték - ahogy azt mi tettük - hanem külön-külön, vagyis a baktérium-szuszpenzió bibére cseppentését megelőzte a virágok fággal történő permetezése. Későbbi eredményeinkből feltételezhető, hogy ez a kezelési mód kedvezőbb a fág számára, mert a fágnek van ideje „felszívódni” és a növény belsejébe jutni, így ott is ki tudja fejteni baktériumölő hatását. A fajták fogékonyságának megítélése mindazonáltal nem egyszerű, mert ismeretes, hogy egy adott fajta egyes vizsgált növényi részei (hajtás, virág, gyümölcs) eltérő fogékonyságot mutathatnak (**Honty 2011, Paulin és mtsai. 1990**), sőt ugyanaz a vizsgált szerv is képes a különböző években eltérő módon reagálni az *E. amylovora* okozta fertőzésre (**Honty 2011**). **Honty (2011)** eredményei alapján például a 'Conference' és a 'Dr. Guyot Gyula' éretlen gyümölcsseit a nagyon fogékony, virágait az igen erősen fogékony kategóriákba sorolta, míg az 'Erdei vajkörte', éretlen gyümölcsseinek relatív tűzelhalás fogékonysága alapján nagyon fogékonynak, ellenben virágfertőzésre mérsékelten rezisztensnek bizonyult.

A fágkezelés hatékonyságának potenciális növelése céljából úgynevezett transzlokációs kísérletekkel tisztázni kívántuk, hogy alma növények gyökérzónájához, illetve a föld feletti

növényi részeire kijuttatott *E. amylovora*-specifikus bakteriofágok képesek-e a növénybe jutni, majd ott szisztemikusan elterjedni, valamint, hogy az *in planta* transzlokálódott fágok milyen hatást gyakorolnak egy *E. amylovora* infekcióra. Alma csíranövényeken végzett kísérleteinkben kimutattuk, hogy mindkét általunk tesztelt *E. amylovora*-specifikus fág (H5K és ΦEa104) az adott körülmények között képes volt penetrálódni és a növény távolabbi részeibe elszállítódni, ahogy az más bakteriofág-növény kapcsolat esetében már korábban igazolást nyert (**Rao és Srivastava 1973, Ward és Mahler 1982, Iriarte és mtsai. 2012**). Tudomásunk szerint jelen munkánkkal elsőként számolunk be *E. amylovora*-specifikus fágok gyökéren keresztül való növénybe jutásáról, valamint az így transzlokálódott fágoknak a kórokozó okozta tünetek mérséklésében játszott szerepéről, mely hatást almafák lombzatára kijuttatott *E. amylovora* fágok esetében **Dömötör és mtsai. (2012)** is kimutatták. Kísérleteinkkel feltártuk továbbá, hogy a H5K fágok életképességüket a gazdabaktérium jelenléte nélkül öt napig is meg tudták őrizni a növényben. Ez megfelel annak, ami *Ralstonia solanacearum* (ΦRS5) fágok vonatkozásában ismert (**Iriarte és mtsai. 2012**), nevezetesen, hogy ezek a fágok a gazdabaktériumuk nélkül legalább 3-5 napig életképesek maradtak paradicsom növények szárában és levelében. Ugyanakkor a fágok akár hosszabb ideig is fennmaradhatnak a növényben, tekintetbe véve, hogy bizonyos *Xanthomonas*-specifikus fágok a kijuttatásukat követően 7-15 napig életképesek maradtak a tesztnövényekben (**Iriarte és mtsai. 2012**), míg *Agrobacterium tumefaciens* PB2-A fágok 14 napig megőrizték életképességüket paradicsom növények gyökerében és szárában (**Boyd és mtsai. 1971**). A fágok *in planta* szállítódásának vizsgálatában mindkét általunk használt fág kimutatható volt az alma növények felső, leveles részéből és a gyökérzetből is és a legtöbb esetben a kezelést követő első napon detektáltunk fágokat az adott növényi mintákból. Ennek a kísérletnek az alapján elmondható, hogy az amerikai származású ΦEa104 gyorsabban és biztosabban szállítható a növényben, mint a magyar H5K fágizolátum, viszont a két kezelési mód hatékonysága nem volt összemérhető, mivel a különböző fágok esetén eltérő eredményt kaptunk. Ugyanakkor megállapíthattuk, hogy a transzlokálódott fágok titere gyorsan csökkent; a kezelést követő hetedik napon vett minták egyikéből sem tudtunk már fágokat kimutatni. Ismeretes, hogy a fágok növény általi felvétele és szállítódása nagymértékben függ többek között a termesztő közeg abszorpciós képességétől (**Oron és mtsai. 1995**) és az adott növény meghatározott sajátosságaitól, úgymint a korától, kondíciójától vagy potenciális védekezési mechanizmusaitól (**Ward és Mahler 1982, Iriarte és mtsai. 2012**). Ismert továbbá, hogy a fitopatogén vírusok növényen belüli mozgásának mértéke függ a virális fehérjéknek a növényi citoszkeletonnal, valamint a különböző típusú plazmodezmákkal kialakított kölcsönhatásaitól és a vírusok különböző növényi sejtekben mutatott szaporodási (replikációs) képességétől is (**Astier és mtsai. 2007**). Ez utóbbi szerzők azt is állítják, hogy a különböző típusú növényi

szövetek sejtjei között helyet foglaló plamodezmák is gátolhatják a növényi vírusok mozgását. Mindezek arra a feltételezésre adnak okot, hogy hasonló jelenségek akadályozhatják a bakteriofágok, azaz a baktériumok vírusainak *in planta* terjedését. Ugyanakkor nem zárhatjuk ki a fágok növénybe jutását és rövid távú transzlokációját, mert azokban a növényi részekben, ahová a fágkezelést alkalmaztuk nem vizsgáltuk a fágok jelenlétét. Ezt abból a célból tettük, hogy elkerüljük azokat a téves eredményeket, melyek a fágok kijuttatási helyénél a növény felszínén maradó fágok detektálásából származhattak volna. Noha **Rao és Srivastava (1973)** kimutatták, hogy *Xanthomonas oryzae* XOP₁₀ fágok képesek rizs palánták gyökerén át a növénybe hatolni függetlenül attól, hogy a gyökérzet ép, vagy sérült volt a fágkezelést megelőzően, elképzelhető, hogy intakt gyökéren keresztül kisebb mértékű a fágok penetrációja. Ezt a feltételezést támasztja alá **Ward és Mahler (1982)** kutatásainak eredménye, mely arról számolt be, hogy az *E. coli* f2 fág (**Loeb és Zinder 1961**) növény általi felvételének mértéke hidropóniás kultúrában nevelt kukorica és bab palánták visszavágott gyökerén keresztül lényegesen nagyobb volt ahhoz képest, amit sértetlen gyökerű növények esetében tapasztaltak a növények szárából, illetve leveléből visszaizolált életképes fágok mennyiségének meghatározása alapján. Ezek azonban eltérnek **Iriarte és mtsai. (2012)** eredményeitől, akik paradicsompalánták felső szárrészébe és ottani leveleibe transzlokálódott *Xanthomonas*-specifikus fágok szintjének gyorsabb csökkenését figyelték meg abban az esetben, amikor a gyökeret előzőleg megsértették. A különböző fágkezelések tűzelhalás tüneteire gyakorolt hatásának tekintetében a szimptómák szignifikáns csökkenését tapasztaltuk a kezeletlen kontrollokhoz képest akár a gyökérzethez vagy a levélzetre jutattuk ki a fágokat, akár az alma csíranövények sziklelevelét injektáltuk vagy a virágzó tűztövis vesszőket kezeltük a fágokkal az *E. amylovora* inokulációt megelőzően. Azonban a H5K izolátum és a ΦEa104 fágtörzs hatékonysága között nem találtunk szignifikáns eltérést. Mindazonáltal eredményeink összhangban állnak azzal, amiről **Kovács és mtsai. (2012)** számoltak be; a szerzők szabadföldi kísérleteikben kimutatták, hogy egy specifikus fágkombináció almafákra permetezve jelentős mértékben lecsökkentette a természetes *E. amylovora* fertőzés következtében megjelenő, tűzelhalás tüneteit mutató növényi részek számát.

A fágok transzlokációjának vizsgálatokhoz használt módszerünk újszerűsége abban rejlik, hogy a többi, irodalomból ismert módszerrel ellentétben - ahol termőföldet (**Iriarte és mtsai. 2012**), vagy vizet (**Ward és Mahler 1982**) használtak - mi perlitet alkalmaztunk ültetési közegként, illetve, hogy tudomásunk szerint először vizsgáltuk fágok hatását baktériumok okozta tünetekre úgy, hogy a fágokat a sziklelevelbe injektáltuk a mesterséges inokulációt megelőzően. A szakirodalomból ismert hasonló vizsgálatokban a fágot, vagy a gyökéren keresztül (**Iriarte és mtsai. 2012**), vagy a növényre permetezve (**Kovács és mtsai. 2012**) juttatták a növénybe. A szakirodalomból és korábbi előkísérleteinkből is ismert a fágok abszorpciója a talajkolloidokhoz

(**Oron és mtsai. 1995**), ezzel szemben a perlitnél a talajban nevelt növényekhez hasonló mértékű fágkoncentráció csökkenést nem tapasztaltunk. Az injektálás előnye a permetezéssel vagy a beöntözéssel szemben az, hogy ezáltal adott mennyiségű fág hatását tudjuk direkt módon vizsgálni a növényben anélkül, hogy a kezelés során jelentős fágkoncentráció csökkenéssel kéne számolnunk. Továbbá ennek köszönhetően steril körülmények között, más mikroorganizmusok „fág-szállítóként” való kizárásával tudjuk e folyamatokat megfigyelni.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

Az almatermésűek tűzelhalása a *Rosaceae* családba tartozó növények egy részének régtől ismert egyik legjelentősebb bakteriális eredetű betegsége. Kórokozója az *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* (1920) növénypatogén baktérium, mely a számára optimális időjárási feltételek esetén nagymértékű gazdasági károkat képes előidézni alma-, körte- és birsültetvényekben, valamint fogékony dísznövényeken. Az Amerikai Egyesült Államokban honos, hazánkban karantén kórokozó az 1950-es évek közepén jelent meg először Európában, Magyarországon 1995-ben azonosították elsőként egy Nyárlőrinc térségében levő alma ültetvényből.

Jelenleg e betegség elleni védekezés – az eddigi legeredményesebb védekezési módnak, a virágzáskori sztreptomycin antibiotikummal végzett kezelésnek a betiltása óta - nem megoldott. A tiltó rendelkezés azonban, mely több ország mellett hazánkban is érvényben van, számos alternatív védekezési stratégia kutatásához vezetett, melyek egyike a bakteriofágok használatára épül.

Munkánk során célul tűztük ki *E. amylovora*-specifikus bakteriofágok magyarországi gyűjtését, az izolátumok jellemzését, a kórokozó elleni leghatékonyabb fágizolátumoknak a baktérium szaporodására gyakorolt gátló hatásának *in vitro* vizsgálatát, továbbá ezen fágok növénybe jutásának és a növényen belüli szállítódásának tisztázását és a növénybe juttatott fágok *E. amylovora* fertőzésre gyakorolt hatásának vizsgálatát a betegség elleni biológiai védekezésben való felhasználásuk lehetősége céljából.

Elsőként izoláltunk Magyarországról *Myoviridae*, illetve *Podoviridae* családba tartozó *E. amylovora* bakteriofágokat. Az általunk izolált fágokat több szempontból is jellemeztük és vizsgálatainkhoz a szakirodalomból már jól ismert, széleskörűen jellemzett, az Amerikai Egyesült Államok területéről származó *E. amylovora* fágtörzseket használtunk referenciatörzsként. A fágizolátumok közül 22-t jellemeztünk az Adams-féle dupla agar módszerrel plakk morfológiájuk, 19 izolátumot transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálattal partikulum morfológiájuk, 21-et PCR technikával, 9 izolátumot részleges szekvencia-analízissel és 16 fágizolátumot gazdakörük alapján.

Izolátumaink eltérő méretű, 0,5 – 7,1 mm átmérőjű plakkokat formáltak a tesztbaktériumot tartalmazó lágyagar rétegen. Közülük az egyik legnagyobb tarfoltja a H7B jelzésű fágnak van, melynek plakkja körül szélesebb sáv húzódik, mint a vizsgálatunkban szereplő legnagyobb plakkot adó amerikai ΦEa100 törzs esetében, ami a H7B nagyobb lítikus enzimaktivitását jelzi. Fágizolátumaink többsége (15) az elektronmikroszkópos vizsgálat eredménye alapján ikozaéder

alakú fejjel és hosszú, összehúzódó farki résszel rendelkezik (*Myoviridae*), míg kisebb hányadára (4) kisebb, izometrikus fej és rövid, széles farki rész jellemző (*Podoviridae*). Hazai izolátumaink eltérnek a *Siphoviridae* családba tartozó, irodalomból ismert két másik magyar fág törzstől (Φ EaH1, Φ EaH2).

PCR vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy magyar fágizolátumaink, melyeket négy nagyobb csoportba soroltunk, nem azonosak a vizsgálatokba bevont 4 amerikai *E. amylovora* fággal.

Meghatározott fágizolátumaink részleges szekvencia-analízise alapján megállapítottuk, hogy a H4A, H4B, H5A, H5B, H6A, H7A és H9B jelzésű fágok depolimeráz génjének bázissorrendje 98-99%-ban megegyezik a Φ Ea1h amerikai fág törzs depolimeráz génje megfelelő szakaszának bázissorrendjével. A H2A fág peptidázt, valamint a H2A és a H5K fág Mu-szerű proteint, illetve terminázt kódoló régiói pedig a vB_EamM-M7 fág adott DNS szakaszaival mutatnak nagyfokú, 99%-os hasonlóságot.

Az általunk izolált fágok gazdakörvizsgálata fényt derített arra, hogy a kísérletben szereplő amerikai fág törzsekhez képest szélesebb gazdakörrel rendelkeznek. Izolátumaink közül a H1B, H2A, H2B, H4A, H7A és H7B jelzésűek lizálták a legtöbb tesztelt baktérium-izolátumot, illetve törzset, ugyanakkor a hazai *E. amylovora* izolátumok mindegyike fogékony volt a fágizolátumokkal szemben függetlenül azok származásától.

Hazai fágizolátumaink hatékonyságát először folyadékkultúrában teszteltük, majd a leghatékonyabbnak bizonyult H2A, H5K és H7B fágoknak és azok kombinációinak az *E. amylovora* baktérium szaporodását gátló hatását vizsgáltuk *in vitro* körülmények között, eltérő fogékonyságú termesztett alma- és birsvirágokon, éretlen körtegyümölcs szeleteken. A H2A, H4A és H5A fágizolátumok és azok kombinációja pedig dísznövényeken lett tesztelve.

Alma- és birsvirágokon végzett kísérleteinkben, mindkét ismétlésben valamennyi vizsgált almafajta ('Gala', 'Golden delicious Reinders', 'Idared', 'Pinova') és a birs ('Berecki') esetén a fággal végzett kezelések csökkentették a visszaizolált baktériumok számát. Az első kísérletben a 'Golden delicious Reinders' virágainak a H5K fággal történő kezelését kivéve valamennyi tesztnövényen mindegyik fágkezelés szignifikánsan hatékonyabb volt az erviniás kontrollhoz képest. A 'Gala Schniga', a 'Pinova' és a 'Berecki' fajták esetében a legjobb hatást nyújtó fágkombináció a 'Gala Schniga' és a 'Pinova' fajtákon a többi fajtához képest is szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult. A második ismétlésben a H2A, a H7B fág és a fágkombináció az 'Idared' és a birs kivételével mindegyik tesztnövényen szignifikánsan hatékonyabb volt az erviniás kontrollhoz viszonyítva. A fágkombináció legeredményesebb a 'Golden delicious Reinders' almafajta virágain volt, míg a fajták közötti hatékonyságát tekintve a 'Pinova' virágokon szignifikánsan visszaszorította a baktériumok számát az 'Idared' fajtán mértékhez

képest. Eredményeinkből kitűnik, hogy mindkét évben az egyik leghatékonyabb kezelést a fágkombináció jelentette, mely szignifikánsan eredményesebb volt a mérsékelt rezisztens 'Pinova' fajtán a fogékonyak számító 'Idared' fajtához képest. A telepszámlálással nyert eredményeink ('Idared' fajta, 2012) kvantitatív PCR technikával is megerősítést nyertek.

Körtefajták zöld gyümölcszeletein vizsgálva a virágkísérletek során is tesztelt fágizolátumok és hármas kombinációjuk baktérium-visszaszorító hatását megállapítottuk, hogy a fágok csökkentették a tüneteket a pozitív kontrollhoz képest. Az első kísérletben a H5K és a fágkombináció szignifikánsan hatékonyabb volt az erviniás kontrollhoz képest mindhárom fajta esetén. A kezelések fajták közötti összefüggéseinek a vizsgálatából az derült ki, hogy a 'Dr. Guyot Gyula' és az 'Erdei vajkörte' szeleteken szignifikánsan mérsékeltebben jelentkeztek az erviniás fertőzés következtében kialakuló tünetek a 'Conference' fajtához képest valamennyi fágos kezelés esetén. A kísérlet ismétlésében a 'Dr. Guyot Gyula' fajtán valamennyi kezelés szignifikánsan lecsökkentette a tűzelhalás tüneteit a pozitív kontrollhoz képest. Ez a hatás az 'Erdei vajkörte' esetében csak a H2A, míg a 'Conference' fajtánál a H5K és a fágkombináció alkalmazásakor igazolódott. A fágos kezelések fajták közötti hatását összehasonlítva megállapítást nyert, hogy a H2A és a H5K fágkezelés hatására szignifikánsan lecsökkentek az erviniás tünetek a 'Dr. Guyot Gyula' és az 'Erdei vajkörte' fajtákon a 'Conference' fajtához képest. Az egyes fágos kezelések hatékonysága között a H2A fágok a H7B fágtól való eltérését kivéve nem volt szignifikáns különbség. A fágok baktérium-elimináló hatása ellenben messze elmaradt a sztreptomycin-szulfátétól valamennyi kísérletben. Az eredmények alapján az adott fágkezelések hatékonyabbnak bizonyultak az 'Erdei vajkörte' és a 'Dr. Guyot Gyula' fajtán a 'Conference' fajtához képest.

Tűzelhalásra fogékony négy dísznövényfaj virágain vizsgálva a H2A, a H4A és a H5A fágizolátum hatását a fágoktól alkalmazása bizonyult a legeredményesebbnek. Az *E. amylovora* inokuláció következményeként kialakuló szimptomák mérséklésében a leghatékonyabb kezelést a tűztövis virágokra kijuttatott fágkombináció jelentette, míg a berkenyén és a galagonyán a fágoktól nem csökkentette le jelentős mértékben a virágnekrózis mértékét.

A tűzelhalás elleni bakteriofág-alapú biológiai védekezési mód hatékonyságának potenciális fokozása céljából vizsgáltuk fágok növénybe jutását és a növényen belüli szállítódását steril körülmények között. Vizsgálatainkhoz egy amerikai fágtörzset (Φ Ea104) és egy általunk izolált magyar fágizolátumot (H5K) használtunk. Megállapítottuk, hogy (1) a H5K fágjai képesek voltak a gyökérzeten át az alma csírnánövények felső részébe szállítódni, továbbá életképességüket a gazdabaktérium jelenléte nélkül hat napig is megőrizni, ugyanakkor titerük jelentősen lecsökkent. (2) A H5K és a Φ Ea104 esetében egyaránt, a gyökérzónához történő kijuttatásuk után a növény föld feletti részeiből, a szárra és a levélzetre való kipermetezésüket

követően pedig a gyökérzetből úgyszintén sikerült detektálni a fágokat, legtöbbször a kezelést követő első mintavételi napon, de hét nappal a kezelés után már egyik mintából sem. A két fág közötti eltérés abban nyilvánult meg, hogy az amerikai fágot több esetben lehetett kimutatni, ugyanakkor rövidebb ideig volt detektálható, mint a H5K izolátum. A fágoknak (H5K és Φ Ea104) az *E. amylovora* mesterséges fertőzés következtében kialakuló tünetekre gyakorolt hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy (3) alma csíranövények gyökérzónájához, illetve a növény föld feletti részeire juttatva ki a fágokat a fágkezelés hatására mindkét kijuttatási mód esetén szignifikánsan lecsökkent a tűzelhalás tünetek mértéke a kezeletlen kontrollhoz képest. (4) A fágokat alma csíranövények egyik sziklelevelébe juttatva, majd közvetlenül utána inokulálva a tesztnövényt, az így elvégzett fágkezeléseket követően a baktérium által előidézett tünetek mértéke szignifikánsan lecsökkent a kezeletlen kontrollhoz képest. A két fág hatékonysága között azonban egyik kísérletnél sem volt szignifikáns a különbség. Megállapítottuk tehát, hogy az általunk vizsgált *E. amylovora*-specifikus fágok bizonyos körülmények között képesek a tesztnövények gyökerén és lombzatán keresztül a növénybe hatolni, majd a növényben szétterjedve csökkenteni a fitopatogén baktérium által okozott tünetek mértékét.

Az általunk izolált új fágok, illetve azok kombinációi, valamint e fágok *in planta* transzlokációs képességére vonatkozó új ismeretek reményeink szerint teret nyitnak azoknak a további vizsgálatoknak, amelyek elősegíthetik a bakteriofágok hatékonyabb felhasználását a tűzelhalás elleni védekezésben.

8 SUMMARY

Fire blight of pome fruits is one of the most important and longest-known bacterial disease of plants in the rose family (*Rosaceae*). It is caused by the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* which is able to induce huge economic losses in apple-, pear- and quince orchards under weather conditions optimal for its growth. The pathogen, being native to North America and regarded as a quarantine organism in Hungary, first appeared in Europe in the 1950s. In Hungary it was first found in a Nyárlőrinc apple orchard in 1995.

Currently, the control of this disease is questionable since the most effective means of protection, the timed application of the antibiotic sztreptomycin to open blossoms is not allowed. However, this injunction ruling in many countries including Hungary led to the research of numerous alternative control strategies one of which is based on the application of bacteriophages. We aimed (1) to collect and isolate *E. amylovora*-specific phages from Hungary, (2) to characterize them, and (3) to study *in vitro* the impeding effect of the most effective phage isolates on growth of *E. amylovora*. Furthermore, our intention was to (4) clarify the uptake and delivery of these phages in plants, and to investigate the effect of phages introduced into the plant on the infection of *E. amylovora* to survey the possibility of their use in biological control against the disease.

We have isolated *E. amylovora*-specific bacteriophages belonging to the *Myoviridae* and *Podoviridae* families from Hungary for the first time. We have characterized these phage isolates in several aspects using well-known, extensively featured *E. amylovora*-specific phage strains originating from North America as reference. Out of our phage isolates we have characterized 22 by their plaque morphology with the Adams's double layer method, 19 isolates by their particle morphology with transmission electron microscopy, 21 by PCR, 9 isolates by partial sequence analysis and 16 phage isolates based on their host range.

Our isolates formed different size plaques varying between 0.5 – 7.1 mm in diameter on the soft agar layer containing test bacteria. One of the largest plaques are produced by the phage H7B, the plaques of which are surrounded by a wider halo as compared to the phage strain Φ Ea100 that forms the largest plaques among the tested American strains. This indicates the higher lytic activity of H7B.

Based on the results of transmission electron microscopy most of our phage isolates (15) have an icosahedral head capsule and a long, contractile tail (*Myoviridae*), while only a few isolates (4) feature a smaller isometric head and a short, broad tail (*Podoviridae*). Our isolates

differ from the two Hungarian phage strains (Φ EaH1, Φ EaH2) known from the literature, which belong to the *Siphoviridae*.

Based on PCR tests we have found that our Hungarian phage isolates can be classified into 4 larger groups. Furthermore, these isolates are not identical to the tested four American *E. amylovora*-specific phages.

Partially sequencing some of our phage isolates (H4A, H4B, H5A, H5B, H6A, H7A, H9B) we have determined that the nucleotide sequences of their depolymerase gene match the appropriate section of those of the American phage strain Φ Ea1h in 98-99%. The regions coding for peptidase in the genome of H2A, and for terminase and Mu-like prophage protein of H2A and H5K display a high, 99% similarity with the corresponding DNA sequences of the vB_EamM-M7 phage strain.

Host range studies revealed that our Hungarian phage isolates possess a broader host range compared to the tested American phage strains. Out of our isolates H1B, H2A, H2B, H4A, H7A and H7B lysed the highest number of tested bacterial isolates and strains, while all of the domestic *E. amylovora* isolates were sensitive to the phage isolates irrespectively of their origin.

We have tested the effectiveness of our Hungarian phage isolates first in liquid bacterial culture, then we have studied *in vitro* the impeding effect of the most effective H2A, H5K and H7B phages and their combinations on the growth of *E. amylovora* on apple and quince blossoms and on immature pear slices that display different sensitivity to fire blight. Phage isolates H2A, H4A, H5A and their combination were tested on ornamental plants.

In the experiments carried out on apple and quince blossoms phage treatments confined the growth of *E. amylovora* in case of all apple ('Gala', 'Golden delicious Reinders', 'Idared', 'Pinova') and quince ('Berecki') varieties in both replicates. In the first experiment all phage treatments were significantly more effective than the *E. amylovora* control on all of the test plants except the treatment of 'Golden delicious Reinders' flowers with the phage H5K. In case of 'Gala Schniga', 'Pinova' and 'Berecki' the phage combination provided the best protection effect and proved to be significantly more effective on flowers of 'Gala Schniga' and 'Pinova' compared to the other varieties. In the second experiment H2A, H7B and the phage combination were significantly more efficient than the positive control on all test plants except 'Idared' and 'Berecki'. The phage combination was most effective on flowers of the apple variety 'Golden delicious Reinders', while regarding its effectiveness displayed on other varieties it has been able to confine the number of bacteria significantly on 'Pinova' flowers compared to those assayed on the variety 'Idared'. It seems from our results that in both years the combination of phages implied one of the most effective treatments; it was significantly more efficient on the moderately resistant variety 'Pinova' than on the susceptible 'Idared'. Results gained from colony

number assessment of reisolated bacteria (from samples of 'Idared', 2012) were confirmed by quantitative PCR as well.

Studying the antibacterial effects of phage isolates and their triple combination tested in the blossom assay on green pear fruit slices of three pear varieties we have found that the phages decreased fire blight symptoms compared to the positive control. During the first experiment application of the H5K isolate and the phage combination were significantly more efficient than the *E. amylovora* control in cases in all varieties. Assessing the correlation between the treatments and the plant varieties it was revealed that symptoms developed due to *E. amylovora* infection appeared less radically on fruit slices of 'Dr. Guyot Gyula' and 'Erdei vajkörte' than on 'Conference' in case of all phage treatments. In the repetition of the experiment all phage treatments applied on the variety 'Dr. Guyot Gyula' decreased fire blight symptoms significantly compared to the positive control. This effect could be verified only for H2A application in case of 'Erdei vajkörte' and for treatments of H5K and the phage combination in case of the variety 'Conference'. Comparing the effect of phage treatments between the varieties it was found that, as an effect of application of H2A and H5K phage isolates, fire blight symptoms got significantly reduced on the varieties of 'Dr. Guyot Gyula' and 'Erdei vajkörte' as compared to 'Conference'. No significant differences have been found among the effectiveness of each phage treatment except the distinction of phage H2A from H7B. However, the bacteria-eliminating effect of phages lagged behind from that of streptomycin-sulfate in all experiments. Based on the results the given phage treatments have proved to be more efficient on the pear variety 'Erdei vajkörte' and 'Dr. Guyot Gyula' as compared to 'Conference'.

Studying the effect of phage isolates H2A, H4A and H5A on blossoms of four ornamental plants susceptible to fire blight, their triple combination has proved to be the most successful. The treatment most effective in reducing symptoms developed due to *E. amylovora* inoculation was the application of the phage cocktail to the flowers of firethorn, while on sorb-apple and hawthorn the phage combination did not reduce the extent of flower necrosis appreciably.

In order to improve the potential efficacy of phage-based biological control against fire blight we have investigated the uptake and *in planta* delivery of phages under steril circumstances. For these studies an American phage strain (Φ Ea104) and one of our own Hungarian isolates (H5K) were used. We found that (1) H5K phages were capable to translocate through the roots to the upper plant parts of apple seedlings and they could maintain their viability even for six days without the presence of the host bacterium. At the same time, their titer considerably decreased. (2) Both phages were detectable in plant parts above ground level following their application to the roots as well as in roots after spraying them onto the stem and leaves. Phages were detected in distal plant parts on the first sampling day in most of the

samples, but we could not demonstrate the *in planta* presence of phages on the seventh day following phage applications in any of the samples. The difference between the two phages was manifested in the observation that the American phage strain was detectable in a higher number of samples, but for a shorter period of time as compared to the phage isolate H5K. Investigating the effectiveness of phages on symptoms developed due to an artificial inoculation with *E. amylovora* we have found that (3) applying phages either to the roots or to the aerial plant parts of apple seedlings the degree of symptoms caused by *E. amylovora* infection was significantly attenuated as compared to the untreated control. (4) After injecting their suspensions into one of the cotyledons of apple seedlings followed by immediate bacterial inoculation the degree of fire blight symptoms significantly decreased compared to the untreated control. However there were no significant differences between the effectiveness of the two phages in any of these experiments. Thus, we have shown that our tested bacteriophages specific to *E. amylovora* can penetrate test plants through their roots and aerial plant parts under certain conditions then translocate in plants to exhibit a decrease in severity of symptoms caused by this phytopathogenic bacterium.

Our phage isolates and their combinations as well as the new information on the *in planta* translocation ability of these phages could serve as a basis for further research promoting a more efficient application of bacteriophages for the control of fire blight.

9 IRODALOMJEGYZÉK

- Abedon, S.T.** (2014): Phage therapy: Eco-physiological pharmacology. *Scientifica* Article ID 581639, 29 pages.
- Abedon, S.T., Kuhl, S.J., Blasdel, B.G., Kutter, E.M.** (2011): Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 1: 66-85.
- Ackermann, H.W., DuBow, M.S.** (1987): *Viruses of Prokaryotes (vol. I): General properties of bacteriophages*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Ackermann, H.W.** (1998): Tailed bacteriophages: the *Caudiovirales*. *Adv Virus Res* 51: 135-201.
- Ackermann, H.W.** (2007): 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* 152: 227–243.
- Adams, M.H.** (1959): *Bacteriophages*. Interscience Publishers, New York, USA.
- Al-Arabi, F.K.** (2002): *Novel antagonistic bacteria as prospective agents for the biocontrol of some plant bacterial diseases*. Doktori (PhD) értekezés. Szent István Egyetem, Budapest, Magyarország.
- Aldwinckle, H.S., Borejsza-Wysocka, E.E., Malnoy, M., Brown, S.K., Norelli, J.L., Beer, S.V., Meng, X., He, S.Y., Jin, Q.-L.** (2003): Development of fire blight resistant apple cultivars by genetic engineering. *Acta Horti* 622: 105-111.
- Aldwinckle, H., Malnoy, M.** (2009): Plant regeneration and transformation in the *Rosaceae*. *Transgenic Plant Journal* 3: 1-39.
- Alexandrova, M., Bazzi, C., Lameri, P.** (2002): *Bacillus subtilis* strain BS-F3: colonization of pear organs and its action as a biocontrol agent. *Acta Horti* 590: 291-297.
- Assadian, N.W., Di Giovanni, G.D., Enciso, J., Iglesias, J., Lindemann, W.** (2005): The transport of waterborne solutes and bacteriophage in soil subirrigated with wastewater blend. *Agr Ecosyst Environ* 111: 279-291.
- Astier, S., Albouy, J., Maury, Y., Robaglia, C., Lecoq, H.** (2007): *Principles of Plant Virology: Genome, Pathogenicity, Virus Ecology*. Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Baker, K.F.** (1971): Fire blight of pome fruits: the genesis of the concept that bacteria can be pathogenic to plants. *Hilgardia* 40: 603-633.

- Balogh, B., Canteros, B.I., Stall, R.E., Jones, J.B.** (2008): Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. *Plant Dis* 92: 1048-1052.
- Balogh, B., Iriarte, F.B., Obradovic, A., Momol, T.M., Jones, J.B.** (2007): Phages don't have it easy. *Phytopathology* 97: S141.
- Balogh, B., Jones, J.B., Iriarte, F.B., Momol, T.M.** (2010): Phage therapy for plant disease control. *Curr Pharm Biotechnol* 11: 48-57.
- Balogh, B., Jones, J.B., Momol, T.M., Olson, S.M., Obradovic, A., Jackson, L.E.** (2003): Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Dis* 87: 949-954.
- Barry, M.A., Dower, W.J., Johnston, S.A.** (1996): Toward cell-targeting gene therapy vectors: selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. *Nat Med* 2(3): 299-305.
- Basim, H., Yeğen, O., Zeller, W.** (2000): Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria. *Z Pflanzenk Pflanzen* 279: 279–284.
- Baysal, Ö., Laux, P., Zeller, W.** (2002): Further studies on the induced resistance (IR) effect of plant extract from *Hedera helix* against fire blight (*Erwinia amylovora*). *Acta Hort* 590: 273–277.
- Bellemann, P., Bereswill, S., Berger, S., Geider, K.** (1994): Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. *Int J Biol Macromol* 16: 290–296.
- Bellemann, P., Geider, K.** (1992): Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *J Gen Microbiol* 138: 931-940.
- Bennett, R.A., Billing, E.** (1978): Capsulation and virulence in *Erwinia amylovora*. *Ann Appl Biol* 89: 41-45.
- Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W., Geider, K.** (1992): Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by PCR-analysis. *Appl Environ Microbiol* 58: 3522-3526.
- Bernhard, F., Coplin, D.L., Geider, K.** (1993): A gene cluster for amylovoran synthesis in *Erwinia amylovora*: characterization and relationship to *cps* genes in *Erwinia stewartii*. *Mol Gen Gen* 239: 158-168.

- Billing, E.** (1960): An association between capsulation and phage sensitivity in *Erwinia amylovora*. *Nature* 186: 819-820.
- Billing, E.** (1980a): Fireblight in Kent, England in relation to weather (1955-1976). *Ann Appl Biol* 95: 341-364.
- Billing, E.** (1980b): Fireblight (*Erwinia amylovora*) and weather: a comparison of warning systems. *Ann Appl Biol* 95: 365-377.
- Billing, E.** (1984): Principles and applications of fire blight risk assessment systems. *Acta Horti* 151: 15-22.
- Billing, E.** (1996): BIS 95, An improved approach to fire blight risk assessment. *Acta Horti* 411: 121-126.
- Billing, E.** (2000): Fire blight risk assessment system and models. In: Vanneste, J.L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 293-318.
- Billing, E., Baker, L.A.E., Crosse, J.E., Garrett, C.M.E.** (1961): Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* *J Appl Bacteriol* 24: 195-211.
- Black, L.W.** (1995): DNA packaging and cutting by phage terminases: control in phage T4 by a synaptic mechanism. *Bioessays* 17: 1025-30.
- Bläsi, U., Young, R.** (1996): Two beginnings for a single purpose: the dual-start holins in the regulation of phage lysis. *Mol Microbiol* 21: 675-682.
- Bonn, W.G.** (1999): Opening address. *Acta Horti* 489: 27-28.
- 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, Wallingford, UK, 37-53.
- Borejsza-Wysocka, E.E., Malnoy, M., Aldwinckle, H.S., Meng, X., Bonasera, J.M., Nissinen, R.M., Kim, J.F., Beer, S.V.** (2006): The fire blight resistance of apple clones in which DspE-interacting proteins are silenced. *Acta Horti* 704: 509-514.
- Born, Y., Fieseler, L., Marazzi, J., Lurz, R., Duffy, B., Loessner, M.J.** (2011): Novel virulent and broad-host-range *Erwinia amylovora* bacteriophages reveal a high degree of mosaicism and a relationship to enterobacteriaceae phages. *Appl Environ Microbiol* 77 (17): 5945-5954.

- Boulé, J., Sholberg, P.L., Lehman, S.M., O’Gorman, D.T., Svircev, A.M.** (2011): Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada. *Can J Plant Pathol* 33: 308-317.
- Boyd, R.J., Hildebrandt, A.C., Allen, O.N.** (1971): Retardation of crown gall enlargement after bacteriophage treatment. *Plant Dis Rep* 55: 145-148.
- Böszörményi, E., Érsek, T., Fodor, A., Fodor, A.M., Földes, L.Sz., Hevesi, M., Hogan, J.S., Katona, Z., Klein, M.G., Kormány, A., Pekár, S., Szentirmai, A., Sztaricskai, F., Taylor, R.A.J.** (2009): Isolation and activity of *Xenorhabdus* antimicrobial compounds against the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Phytophthora nicotianae*. *J Appl Microbiol* 107: 746–759.
- Brenner, D.J.** (1984): Family I. *Enterobacteriaceae*. In: Krieg, N.R.A., Holt, J.G. (eds.) *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology* 1. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, 408-420.
- Broggini, G.A.L., Wöhner, T., Fahrenttrapp, J., Kost, T.D., Flachowsky, H., Peil, A., Hanke, M.-V., Richter, K., Patocchi, A., Gessler, C.** (2014): Engineering fire blight resistance into the apple cultivar ‘Gala’ using the *FB_MR5* CC-NBS-LRR resistance gene of *Malus x robusta* 5. *Plant Biotechnol J* 12: 728–733.
- Brusina, E.B., Drozdova, O.M., Kutikhin, A.G.** (2013): A new method of bacteriophage-based disinfection in healthcare settings. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 2 (Suppl 1): O20.
- Bubán, T., Dorgai, L** (2003): Az *Erwinia amylovora* fertőzési veszélyt előrejelző egyszerű módszerek összehasonlítása. *Fruitinfo-Alma* 12: 4-5.
- Bubán, T., Lakatos, T., Tóth, T., Dorgai, L., Hudák, I., Hevesi, M., Stockwell, V.O.** (2007): Különböző antagonista baktériumok hatékonysága az *Erwinia amylovora*val szemben. *Növényvédelem* 43: 531-538.
- Bubán, T., Orosz-Kovács, Zs., Farkas, Á.** (2003a): The nectary as the primary site of infection by *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.*: a mini review. *Plant Syst Evol* 238: 183-194.
- Bubán T., Orosz-Kovács, Zs., Farkas, Á.** (2003b): Az *Erwinia amylovora* fertőzés elsődleges helye a virágok nektáriumában. *Kertgazdaság* 1: 10-16.
- Bugert, P., Geider, K.** (1995): Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Mol Microbiol* 15: 917-933.
- 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.

- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T.** (2009): The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622.
- Campbell, J.A.** (1920): The orchard: the outbreak of fire blight. *New Zeal J Agr* 20: 181-182.
- Carlsson, A., Nyström, T., de Cock, H., Bennich, H.** (1998): Attacin - an insect immune protein - binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. *Microbiology* 144: 2179-2189.
- Cheng, H., Shen, N., Pei, J., Grishin, N.V.** (2004): Double-stranded DNA bacteriophage prohead protease is homologous to herpesvirus protease. *Protein Sci* 13: 2260–2269.
- 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.
- Chiou, C.-S., Jones, A.L.** (1991): The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 81: 710-714.
- Christensen, B., Fink, J., Merrifield, R., Mauzerall, D.** (1988): Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *P Natl Acad Sci USA* 85: 5072-76.
- Civerolo, E.L.** (1972): Interaction between bacteria and bacteriophage on plant surfaces and in plant tissues. In: Maas Geesteranus, H.P. (ed.) *Proc Centre Agric Publ Doc*. Wageningen, Netherlands, 25-37.
- Civerolo, E.L., Kiel, H.L.** (1969): Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology* 59: 1966-1967.
- Clark, J.R., March, J.B** (2004): Bacterial viruses as human vaccines? *Expert Rev Vaccines* 3(4): 463-476.
- Coplin, D.L., Majerczak, D.R., Zhang, Y., Kim, W.-S., Jock, S., Geider, K.** (2002): Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. *Plant Dis* 86: 304-311.
- Coplin, D.L., Rowan, R.G., Chisholm, D.A., Whitmoyer, R.E.** (1981): Characterization of plasmids in *Erwinia stewartii*. *Appl Environ Microbiol* 42: 599-604.
- Coxe, W** (1817): Pears. In: Coxe, W (ed.) *Cultivation of fruit trees*. Philadelphia, 175-176.

- Coyier, D.L., Covey, R.P.** (1975): Tolerance of *Erwinia amylovora* to streptomycin sulfate in Oregon and Washington. *Plant Dis Rep* 59: 849–852.
- Crosse, J.E., Hingorani, M.K.** (1958): A method for isolating *Pseudomonas mors-prunorum* phages from the soil. *Nature* 181: 60-61.
- Csete, S., Garai, A., Zsolnai, G.** (2004): Helyzetkép a tűzelhalásról 2004 tavaszán Borsod-Abaúj-Zemplén megyében. *Gyakorlati Agrofórum* 15: 68-69.
- de León-Door, A.P, Romo Chacón, A., Acosta Muñiz, C.** (2013): Detection of streptomycin resistance in *Erwinia amylovora* strains isolated from apple orchards in Chihuahua, Mexico. *Eur J Plant Pathol* 137: 223–229.
- Denning, W.** (1794): On the decay of apple trees. *New York society for the promotion of agricultural arts and manufacturers transaction* 2: 219-222.
- d'Herelle, F.** (1917): Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Acad Sci* 165: 373–375.
- Dömötör, D., Becságh, P., Rákhely, G., Schneider, Gy., Kovács, T.** (2012): Complete genomic sequence of *Erwinia amylovora* Phage PhiEaH2. *J Virol* 86: 10899.
- Dreo, T., Zupancic, M., Demsar, T., Ravnihar, M.** (2006): First outbreak of fire blight in Slovenia. *Acta Horti* 704: 37-41.
- Duffy, B., Walsh, F., Pelludat, C., Holliger, E., Oulevet, C., Widmer, F.** (2011): Environmental monitoring of antibiotic resistance and impact of streptomycin use on orchard bacterial communities. *Acta Horti* 896: 483–488.
- El-Goorani, M.A., El-Kasheir, H.M., Shoeib, A.A., Hassanein, F.M.** (1989): Distribution of streptomycin resistant strains of *Erwinia amylovora* in Egypt during 1988. *J Phytopathol* 127: 69-74.
- El-Helaly, A.F., Abo-El-Dahab, M.K., El-Goorani, M.A.** (1964): The occurrence of fire blight disease of pear in Egypt. *Phytopathol Mediterr* 3: 156-163.
- Erskine, J.M.** (1973): Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in the epidemiology of fire blight. *Can J Microbiol* 19: 837-845.
- 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 11th International workshop on Fire Blight*, 12-17 August, Portland, Oregon, 2007. Abstracts: 79.
- Evans, I.R.** (1996): Fire blight of raspberries in Alberta. *Acta Horti* 411: 69-72.

- 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. *Appl Environ Microbiol* 54: 2798-2802.
- Flaherty, J.E., Harbaugh, B.K., Jones, J.B., Somodi, G.C., Jackson, L.E.** (2001): H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. *Hortic Sci* 98-100.
- Flaherty, J.E., Jones, J.B., Harbaugh, B.K., Somodi, G.C., Jackson, L.E.** (2000): Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. *Hortic Sci* 35: 882-884.
- Frampton, R.A., Pitman, A.R., Fineran, P.C.** (2012): Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *Int J Microbiol* Article ID 326452, 11.
- Fujiwara, A., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Makoto Fujie, M., Yamada, T.** (2011): Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 77: 4155-4162.
- Fülep, I.** (2014): A tűzelhalásról az elmúlt évek tapasztalatainak a tükrében. *Agrofórum extra* 53: 54-56.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, Ch., Izard, D., Kersters, K., De ley, J.** (1989): Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. Nov. *Int J Syst Bacteriol* 39: 337-345.
- Geider, K.** (2000): Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan. In: Vanneste, J.L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent*, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 117-140.
- Geier, G., Geider, K.** (1993): Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Pathol* 42: 387-404.
- Gill, J., Abedon, S.T.** (2003): Bacteriophage Ecology and Plants. *APSnet Features, Online*. <https://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/BacteriophageEcology.aspx>, 17.
- Gill, J.J., Svircev, A.M., Smith, R., Castle, A.J.** (2003): Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* 69: 2133-2138.
- Glits, M.** (1993): Almatermésűek betegségei. In: Glits, M., Folk, Gy. (eds.) *Kertészeti növénykórtan*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, Magyarország, 157-188.

- Goodridge, L.D., Bisha, B.** (2011): Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage* 1: 130–137.
- G. Tóth, M.** (1997): Almagyümölcsűek. In: G. Tóth, M. (ed.) *Gyümölcsészet*. Primom, Debrecen, Magyarország, 29-110.
- Guttman, B., Raya, R., Kutter, E.** (2005): Basic phage biology. In: Kutter, E., Sulakvelidze, A. (eds.) *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 29–66.
- Hamilton, R.H., Fall, M.Z.** (1971): The loss of tumor initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Experientia* 27: 229-230.
- Hanahan, D.** (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover, D.M. (ed.) *DNA Cloning: A Practical Approach*. Vol. 1. IRL Press, McLean, Virginia, 109.
- Hanke, V., Geider, K., Richter, K.** (2003): Transgenic apple plants expressing viral EPS depolymerase: Evaluation of resistance to the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora*. In: Kluwer, V.I.K. (ed.) *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*. Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 153-157.
- Hao, M.V., Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Kosako, Y., Komagata, K.** (1990). *Erwinia persicinus*, a new species isolated from plants. *Int J Syst Bacteriol* 40: 379-383.
- Haq, I.U., Chaudhry, W.N., Akhtar, M.N., Andleeb, S., Qadri, I.** (2012): Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Viol. J* 9: 9.
- Hartung, J.S., Fulbright, D.W., Klos, E.J.** (1988): Cloning of a bacteriophage polysaccharide depolymerase gene and its expression in *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 1: 87-93.
- Hauben, L., Moore, E.R.B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J.** (1998): Phylogenetic position of phytopathogens within *Enterobacteriaceae*. *Syst Appl Microbiol* 21: 384–397.
- Heimann, M.F., Worf, G.L.** (1985). Fire blight of raspberry caused by *Erwinia amylovora* in Wisconsin. *Plant Dis* 69: 360.
- Helms, K., Wardlaw, I.F.** (1976): Movement of viruses in plants: long distance movement of tobacco mosaic virus in *Nicotiana glutinosa*. In: Wardlaw, I.F., Passioura, J.B. (eds.) *Transport and transfer processes in plants*. New York Academic Press, USA, 283-293.
- Hevesi, M.** (1996): Az *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* hazai megjelenése almán. *Növényvédelem* 32 (5): 225-228.

- Hevesi, M., Al-Arabi, K.F.** (1999): Isolation of epiphytic bacterium antagonistic to *Erwinia amylovora*. *Acta Hort* 489: 619–622.
- Hevesi, M., Bója, N., Bánátfy, R., Babulka, P., Tóth, M.** (2006a): *In vitro* inhibition of growth of *Erwinia amylovora* by plant oils. *Mitt Biol Bundesanst Land - Forstwirtschaft* 408: 262-264.
- Hevesi, M., Hudák, I., Dorgai, L., Szentkirályi, A., Bubán, T.** (2006b): *Pantoea agglomerans* HIP32: a new bacterial antagonist to *Erwinia amylovora*. *Phytopathol Pol* 39: 79-85.
- 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.
- Hildebrand, E.M.** (1937): *The blossom-blight phase of fire blight and methods of control*. Cornell University Agriculture Experiment Station Memoires 207. Ithaka, New York, USA, 40.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T.** (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland, USA.
- Honty, K.** (2011): *Körtefajták tűzelhalással szembeni ellenállósága és a betegség folyamatának jellemzése néhány biokémiai paraméter vizsgálatával*. Doktori (PhD) értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem, Budapest, Magyarország.
- 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*. *Int J Hort Science* 10: 41-45.
- Hultmark, D., Engström, Å., Andersson, K., Steiner, H., Bennich, H., Boman, H.G.** (1983): Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* 2: 571-576.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H.G.** (1980): Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* 106: 7-16.
- Hyman, P., Abedon, S.T.** (2010): Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol* 70: 217-248.
- Iriarte, F.B., Balogh, B., Momol, T.M., Smith, L.M., Wilson, M., Jones, J.B.** (2007): Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Appl Environ Microb* 73: 1704-1711.
- Iriarte, F.B., Obradovic, A., Wernsing, M.H., Jackson, L.E., Balogh, B., Hong, J.A., Momol, T.M., Jones, J.B., Vallad, G.E.** (2012): Soil-based systemic delivery and phyllosphere

in vivo propagation of bacteriophages: Two possible strategies for improving bacteriophage persistence for plant disease control. *Bacteriophage* 2: 215-224.

Jackson, L.E. (1989): Bacteriophage prevention and control of harmful plant bacteria. US 4828999.

Jackson, L.E., Spendlove, R.S. (2007): Method of treating food products. EP 1845784 A2.

Jelkmann, W., Lindner, A. (2008): Studies on antagonistic yeast species against *Erwinia amylovora* in co-culture and on apple blossoms. *Acta Horti* 793: 403-408.

Johnson, K.B., Stockwell, V.O. (2000): Biological control of fire blight. In: Vanneste, J.L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 319-337.

Johnson, K.B., Stockwell, V.O., McLaughlin, M.J., Sugar, D., Loper, J.E., Roberts, R.G. (1993): Effect of bacterial antagonists on establishment of honey bee-dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control. *Phytopathology* 83: 995-1002.

Johnson, R.P., Gyles, C.L., Huff, W.E., Ojha, S., Huff, G.R., Rath, N.C., Donoghue, A.M. (2008): Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. *Animal Health Research Reviews* 9: 201-215.

Jones, A.L., Schnabel, E.L. (2000): The development of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste, J.L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 235-251.

Jones, J.B., Jackson, L.E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F.B., Momol, T.M. (2007): Bacteriophages for plant disease control. *Annu Rev Phytopathol* 45: 245-262.

Kageyama, B., Nakae, M., Yagi, S., Sonoyama, T. (1992): *Pantoea punctata* sp. nov., *Pantoea citrea* sp. nov., and *Pantoea terrea* sp. nov. isolated from fruit and soil samples. *Int J Syst Bacteriol* 42: 203-210.

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 Horti* 338: 311-316.

Keck, M., Hevesi, M., Ruppitsch, W., Ströger, A., Richter, S. (2002): Spread of fire blight in Austria and Hungary-variability of *Erwinia amylovora* strains. *Plant Prot Sci* 38: 49-55.

Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M., Schleifer, K.-H. (1996): Recent change in the classification of the pseudomonads: an overview. *Syst Appl Microbiol* 19: 465-477.

- Kim, W.S., Geider, K.** (2000): Characterization of a viral EPS-depolymerase, a potential tool for control of fire blight. *Phytopathology* 90: 1263-1268.
- Kim, W.S., Salm, H., Geider, K.** (2004): Expression of bacteriophage Φ Ea1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*. *Microbiol* 150: 2707-2714.
- Király, I., Tóth, M.** (2009): Újra termesztésbe vonható régi magyar almafajták. *Agrofórum extra* 28: 28-29.
- Kleitman, F., Shtienberg, D., Blachinsky, D., Oppenheim, D., Zilberstaine, M., Dror, O., Manulis, S.** (2005): *Erwinia amylovora* populations resistant to oxolinic acid in Israel: prevalence, persistence and fitness. *Plant Pathol* 54: 108-115.
- Klement, Z.** (1959): Some new specific bacteriophages for plant pathogenic *Xanthomonas* spp. *Nature* 184: 1248-1249.
- Klement, Z.** (1963): Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas*. *Nature* 199: 299-300.
- Klement, Z.** (1965): Baktériumos növénybetegségek. *Erwinia amylovora*. In: Ubrizsy, G. (ed.) *Növénykórtan I.* Akadémiai Kiadó, Budapest, Magyarország, 481-482.
- Klement, Z., Király, Z.** (1957): Hyperparasitic chain of a fungus, a bacterium and its phage on wheat. *Nature* 179: 157-158.
- Klement, Z., Lovas, B.** (1957): The new bacteriophages for *Corynebacterium flaccumfaciens* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* pathogens of bean. *Nature* 180: 41-42.
- Klement, Z., Lovas, B.** (1959): Isolation and characterization of a bacteriophage for *Corynebacterium flaccumfaciens*. *Phytopathology* 49: 107-112.
- Klement, Z., Lovas, B.** (1960): Biological and morphological characterization of the phage for *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. *Phytopath Z* 37: 321-329.
- Ko, K., Norelli, J.L., Reynoird, J., Aldwinckle, H.S., Brown, S.** (2002): T4 lysozyme and attacin genes enhance resistance of transgenic 'Galaxy' apple against *Erwinia amylovora* (Burr.). *J Am Soc Hort Sci* 127: 515-519.
- Ko, K., Norelli, J.L., Reynoird, J.-P., Borejsza-Wysocka, E., Brown, S.K., Aldwinckle, H.S.** (2000): Effect of untranslated leader sequence of AMV RNA 4 and signal peptide of pathogenesis-related protein 1b on attacin gene expression, and resistance to fire blight in transgenic apple. *Biotechnol Lett* 22: 373-381.

- Koch, G., Dreyer, W.J.** (1958): Characterization of an enzyme of phage T2 as a lysozyme. *Virology* 6: 291-293.
- Koch, A., Kogel, K.H.** (2014): New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnol J* 1–11.
- Kokoskova, B., Pouvova, D., Pavela, R.** (2011): Effectiveness of plant essential oils against *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and associated saprophytic bacteria on/in host plants. *J Plant Pathol* 93: 133-139.
- Korba, J., Sillerova, S.** (2010): First occurrence of fire blight infection on apricot (*Prunus armeniaca*) in Czech Republic. *Abstracts of 12th International Workshop on Fire Blight*. 16-20 August 2010, Warsaw, Poland. Abstracts: 107.
- Kovács, T., Gáll, J., Kovács, Á.L., Schneider, Gy., Rákhely, G.** (2012): Development and application of phage therapy based pesticides: practical experiences. *The Hungarian Society for Microbiology's Congress of the year 2012*. 24-26 October 2012, Keszthely, Hungary.
- Kovács, T., Várnai, N.Á., Dömötör, D., Rákhely, G., Schneider, Gy.** (2013): Phage therapy base pesticides: practical experiences. *2nd Biotechnology World Congress*. 18-21 February 2013, Dubai, UAE.
- Kozloff, L.M., Schnell, R.C.** (1983): Protection of plants against frost injury using ice nucleation-inhibiting species-specific bacteriophages. US 4375734 A.
- Kube, M., Migdoll, A.M, Gehring, I., Heitmann, K., Mayer, Y., Kuhl, H., Knaust, F., Geider, K., Reinhardt, R.** (2010): Genome comparison of the epiphytic bacteria *Erwinia billingiae* and *E. tasmaniensis* with the pear pathogen *E. pyrifoliae*. *BMC Genomics* 11: 393.
- Kunz, S., Eitzen-Ritter von, M., Schmitt, A., Haug, P.** (2004): Feuerbrandbekämpfung im ökologischen Obstbau. *Ökoobstbau* 4: 2–7.
- Kunz, S., Schmitt, A., Haug, P.** (2011): Development of strategies for fire blight control in organic fruit growing. *Acta Hort* 896: 431-436.
- Kutateladze, M., Revaz, A.** (2010): Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol* 28: 591-595.
- Kutter, E.** (2009): Bacteriophage therapy: Past and present. In: Schaechter, M. (ed.) *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, Oxford, UK, 258-266.
- Kutter, E., Sulakvelidze, A.** (2005): *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

- Laux, P., Wesche, J., Zeller, W.** (2003): Field experiments on biological control of fire blight by bacterial antagonists. *J Plant Dis Plant Prot* 110: 401–407.
- Lang, J.M., Gent, D.H., Schwartz, H.F.** (2007): Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. *Plant Dis* 91: 871-878.
- László, Gy.** (2008): Az almatermésűek tűzelhalása (*Erwinia amylovora*) elleni új védekezési lehetőség Magyarországon. *Növényvédelem* 44: 147-149.
- Lecomte, P., Cadic, A.** (1993): Further results on shoot susceptibility of *Cotoneaster* to fire blight. *Acta Hort* 338: 407-412.
- Lederberg, J., Lederberg, E.M., Zinder, N.D., Lively, E.R.** (1951): Recombination analysis of bacterial heredity. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 16: 413–443.
- Lehman, S.M.** (2007): *Development of a bacteriophage-based biopesticide for fire blight*. Doktori (PhD) értekezés. Ontario, Brock University, USA.
- Lehman, S.M., Kropinski, A.M., Castle, A.J., Svircev, A.M.** (2009): Complete genome of the broad-host-range *Erwinia amylovora* phage Ea21-4 and its relationship to *Salmonella* phage Felix O1. *Appl Environ Microb* 75: 2139–2147.
- Lelliott, R.A.** (1959): Fire blight of pears in England. *Agriculture (London)* 65: 564-568.
- Lespinasse, Y., Aldwinckle, H.S.** (2000): Breeding for resistance to fire blight. In: Vanneste, J.L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 253-292.
- 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: 841-848.
- Liu, Q., Ingersoll, J., Owens, L., Salih, S., Meng, R., Hammerschlag, F.** (2001): Respons of transgenic Royal Gala apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots carrying a modified cecropin MB39 gene, to *Erwinia amylovora*. *Plant Cell Rep* 20: 306-312.
- Llop, P., Cabrefiga, J., Smits, T.H.M., Dreo, T., Barbé, S., Pulawska, J., Bultreys, A., Blom, J., Duffy, B., Montesinos, E., López, M.M.** (2011): *Erwinia amylovora* novel plasmid pEI70: complete sequence, biogeography, and role in aggressiveness in the fire blight phytopathogen. *PLoS One* 6: e28651.
- Llop, P., Donat, V., Rodríguez, M., Cabrefiga, J., Ruz, L., Palomo, J.L., Montesinos, E., López, M.M.** (2006): Anindigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopathology* 96: 900-907.

- Loeb, T., Zinder, N.D.** (1961): A bacteriophage containing RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 47: 282–289.
- Mallmann, W.L., Hemstreet, C.** (1924): Isolation of an inhibitory substance from plants. *J Agr Res* 28: 599-602.
- Malnoy, M., Faize, M, Venisse, J.S., Geider, K., Chevreau, E.** (2005): Expression of viral EPS-depolymerase reduces fire blight susceptibility in transgenic pear. *Plant Cell Rep* 23: 632-638.
- Malnoy, M., Jin, Q., Borejsza-Wysocka, E.E., He, S.Y., Aldwinckle, H.S.** (2007): Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Mol Plant Microbe In* 17: 1568-1580.
- Maniloff, J., Ackermann, H-W.** (1998): Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the other *Caudovirales*. *Arch Virol* 143: 2051-2063.
- Manulis, S., Zutra, D., Ga'ash, D., Kleitman, F., Dror, O., Elisha, S., David, I., Rav-David, D., Zilberstain, M., Herzog, Z., Shabi, E.** (1996): Streptomycin resistance of *Erwinia amylovora* in Israel and occurrence of blossom blight in the autumn. *Phytoparasitica* 24: 161.
- Marroni, I.V., Germani, J.C.** (2014): New technique to create a suspension containing bacteriophages and how it can be used to control cabbage leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Agricultural Sciences* 5: 286-297.
- Martin, C.** (1988): The Application of bacteriophage tracer techniques in South West water. *Water Environ J* 2: 638–642.
- Mazur, B., Paciorkiewicz, W.** (1973): Dissemination of enteroviruses in the human environment I. Presence of poliovirus in various parts of vegetable plants grown on infected soil. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia* 25: 93-98.
- Mc Grath, S., van Sinderen, D.** (2007): Bacteriophage: genetics and molecular biology. Caister Academic Press, Norfolk, England.
- McKenna, F., El-Tarabily, K.A., Hardy, G.E.S.T., Dell, B.** (2001): Novel *in vivo* use of a polyvalent *Streptomyces* phage to disinfest *Streptomyces scabies*-infected seed potatoes. *Plant Pathol* 50: 666-675.
- McNeil, D.L., Romero, S., Kandula, J., Stark, C., Stewart, A., Larsen, S.** (2001): Bacteriophages: a potential biocontrol agent against walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*). *N Z Plant Protect-Se* 54: 220-224.

- Meczker, K., Domotor, D., Vass, J., Rakhely, G., Schneider, G., Kovacs, T.** (2014): The genome of the *Erwinia amylovora* phage PhiEaH1 reveals greater diversity and broadens the applicability of phages for the treatment of fire blight. *FEMS Microbiol Lett* 350: 25-27.
- Mergaert, J., Hauben, L., Cnockaert, M.C., Swings, J.** (1999): Reclassification of non-pigmented *Erwinia herbicola* strains from trees as *Erwinia billingiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49: 377-383.
- Mérő, F.** (2004): Helyzetkép a tűzelhalásról 2004 tavaszán Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében. *Gyakorlati Agrofórum* 15: 70-71.
- Milch, H.** (2000): Bakteriofágterápia és profilaxis – Régebbi remények újraéléde. *Lege Artis Medicinae* 10: 660-665.
- Milch, H., Pászti, J.** (2008): Fágtípusmeghatározástól a molekuláris epidemiológiáig: kutatási eredmények a gyakorlati tevékenységben. *Egészségtudomány* 52: 28-44.
- Miller, T.D., Schroth, M.N.** (1972): Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. *Phytopathology* 62: 1175-1182.
- Mohan, S.K.** (2007): Natural infection of shoot blight in Pluot® caused by *Erwinia amylovora*. *Abstracts of 11th International Workshop on Fire Blight*. 12-17 August 2007, Portland, Oregon, USA. Abstracts: 64.
- Mohan, S.K., Thomson, S.V.** (1996): An outbreak of fire blight in plums. *Acta Hort* 411: 73-76.
- Molineux, I.J.** (2006): Fifty-three years since Hershey and Chase; much ado about pressure but which pressure is it? *Virology* 344: 221-229.
- Moller, W.J., Schroth, M.N., Thomson, S.V.** (1981): The scenario of fire blight and streptomycin resistance. *Plant Dis* 65: 563-568.
- Momol, T.M., Aldwinckle, H.S.** (2000): Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste, J.L. (ed.) *Fire blight. The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 55-72.
- Mosch, J., Klingauf, F., Zeller, W.** (1989): On the effect of plant extracts against fireblight (*Erwinia amylovora*). *Acta Hort* 273: 355-361.
- Mosch, J., Zeller, W., Prokop, A.** (2000): Versuche zur Feuerbrandbekämpfung (*Erwinia amylovora*) durch induzierte Resistenz im Gewächshaus und Freiland. *Mitt Biol Bundesanst Land Forstwirtsch Berl-Dahlem* 376: 407.

- Munsch, P., Olivier, J.M.** (1995): Biocontrol of bacterial blotch of the cultivated mushroom with lytic phages: some practical consideration. In: Elliott, T.J. (ed.) *Science and cultivation of edible fungi*. Balkema, Rotterdam, The Netherlands, 595-602.
- Murphy, W.H., Syverton, J.T.** (1958): Absorption and translocation of mammalian viruses by plants. II. Recovery and distribution of viruses in plants. *Virology* 6: 623.
- Müller, I., Kube, M., Reinhardt, R., Jelkmann, W., Geider, K.** (2011b): Complete genome sequences of three *Erwinia amylovora* phages isolated in North America and a bacteriophage induced from an *Erwinia tasmaniensis* strain. *J Bacteriol* 193: 795-796.
- Müller, I., Lurz, R., Kube, M., Quedenau, C., Jelkmann, W., Geider, K.** (2011a): Molecular and physiological properties of bacteriophages from North America and Germany affecting the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microb Biotechnol* 4: 735-745.
- Nagy, J.K., Király, L., Schwarczinger, I.** (2012): Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Cent Eur J Biol* 1: 1-12.
- 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, Budapest, Magyarország, 1-32.
- Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S.** (2000): Transgenic varieties and rootstocks resistant to fire blight. In: Vanneste, J.L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 275-292.
- Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S., Destéfano-Beltrán, L., Jaynes, J.M.** (1994): Transgenic 'Malling 26' apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica* 77: 123-128.
- Norelli, J.L., Mills, J.Z., Momol, M.T., Aldwinckle, H.S.** (1999): Effect of cecropin-like transgenes on fire blight resistance of apple. *Acta Hort* 489: 273-278.
- Ocskó, Z., Erdős, Gy., Molnár, J.** (2014): *Növényvédő szerek, termelésnövelő anyagok I.* Reálszisztéma Dabasi Nyomda, Dabas, Magyarország.
- OEPP/EPPO** (1983): Data sheets on quarantine organisms No. 52., *Erwinia amylovora*. *OEPP/EPPO Bulletin* 13: 1-6.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., Horinouchi, S.** (2008): Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* 190: 4050-4060.

- Okabe, N., Goto, M.** (1963): Bacteriophages of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 1: 397-418.
- Oron, G., Goemans, M., Manor, Y., Feyen, J.** (1995): Poliovirus distribution in the soil-plant system under reuse of secondary wastewater. *Water Res.* 29: 1069-1078.
- Paulin, J.P.** (2000): *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. In: Vanneste, J.L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent*, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 87-115.
- Paulin, J.P., Keck, M., Chartier, R., Zislavsky, W.** (1990): Versuche zur Beurteilung der Feuerbrandanfälligkeit von Kernobstsorten nach Infektion unreifer Früchte. *Pflanzenschutzberichte* 51: 91-98.
- 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.
- Psallidas, P.G., Tsiantos, J.** (2000): Chemical control of fire blight. In: Vanneste, J.L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent*, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 199-234.
- Pusey, P.L., Stockwell, V.O., Mazzola, M.** (2009): Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 99: 571-581.
- Putnoky, P., Hoffmann, Gy.** (2007): *Bevezetés a genetikába. Baktérium és fággenetika I.* <http://ttk.pte.hu/biologia/genetika/atg/chap10/ch10a.htm>.
- Rao, Y.P., Srivastava, D.N.** (1973): Application of phages in investigation of epidemiology of bacterial blight disease of rice. In: Raychandhari, S.P. (ed.) *Proceedings of the Indian National Science Academy: Epidemiology, forecasting and control of plant diseases*. 37: 314-321.
- Ravensdale, M., Blom, T.J., Gracia-Garza, J.A., Svircev, A.M., Smith, R.J.** (2007): Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Can J Plant Pathol* 29: 121-130.
- Reynold, J.P., Mourgues, F., Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S., Brisset, M.N., Chevreau, E.** (1999): First evidence for differences in fire blight resistance among transgenic pear clones expressing attacin gene. *Plant Sci* 149: 23-31.
- Rezzonico, F., Smits, T.H.M., Montesinos, E., Frey, J.E., Duffy, B.** (2009a): Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains to address biosafety and taxonomic issues. *BMC Microbiol* 9: 204.

- Rezzonico, F., Stockwell, V.O., Duffy, B.** (2009b): Plant agricultural streptomycin formulations do not carry antibiotic resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3173-3177.
- Ritchie, D.E., Klos, E.J.** (1977): Isolation of *Erwinia amylovora* bacteriophage from aerial parts of apple trees. *Phytopathology* 67: 101–104.
- Ritchie, D.E., Klos, E.J.** (1979): Some properties of *Erwinia amylovora* bacteriophages. *Phytopathology* 69: 1078-1083.
- Roach, D.R., Castle, A.J., Svircev, A.M., Tumini, F.A.** (2008): Phage-based biopesticides characterization of phage resistance and host range for sustainability. *Acta Hort* 793: 397-401.
- Roach, D.R., Sjaarda, D., Castle, A.J., Svircev, A.M.** (2011): Bacteriophages as biopesticides: role of bacterial exopolysaccharides. *Acta Hort* 896: 449-455.
- Rosen, H.R.** (1938): Life span and morphology of fire blight bacteria as influenced by relative humidity, temperature and nutrition. *J Agric Res* 56: 239-258.
- Rosen, H.R., Groves, A.B.** (1928): Studies on fire blight: host range. *J Agric Res* 37: 493-505.
- Roemmelt, S., Plagge, J., Treutter, D., Zeller, W.** (1999): Fire blight control in apple using products based on mineral powders. *Acta Hort* 489: 623-624.
- 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. *Phytopathol Mediterr* 32: 206–210.
- Salm, H., Geider, K.** (2004): Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant Pathol* 53: 602–610.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W.** (2001): *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition*. American Phytopathological Society Press, St Paul, USA.
- Schatz, A., Bugie, E., Waksman, S.A.** (1944): Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *P Soc Exp Biol Med* 55: 66-69.
- 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 Hort* 489: 649–654.
- 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*. *Appl Environ Microbiol* 67: 59-64.

- Schwarczinger, I., Tóth, M., Hevesi, M.** (2011): Control of fire blight by bacteriophages on apple flowers. *Acta Horti* 896: 457-462.
- Schwarczinger, I., Vajna, L., Süle, S.** (2008): First report of bacterial leaf and flower spot of *Zinnia elegans* caused by *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* in Hungary. *Plant Pathol* 57: 367.
- Scortichini, M., Rossi, M.P.** (1989): *In vitro* activity of some essential oils towards *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow *et al.* *Acta Phytopathol Entomol Hung* 4: 423-431.
- Seemüller, E., Arnold, M.** (1978): Pathogenicity, syringomycin production and other characteristics of pseudomonad strains isolated from deciduous fruit trees. *Proc 4th Int Conf Plant Pathogenic Bacteria*. Angers, Franciaország, 703-710.
- Seibold, A., Viehrig, M., Jelkmann, W.** (2006): Yeasts as antagonists against *Erwinia amylovora*. *Acta Horti* 704: 367-370.
- Seveno, N.A., Kallifidas, D., Smalla, K., van Elsas, J.D., Collard, J.-M., Karagouni, A.D., Wellington, E.M.H.** (2002): Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. *Rev Med Microbiol* 13: 15-27.
- Severin, V., Constantinescu, F., Jianu, F.** (1999): Appearance, expansion and chemical control of fire blight (*Erwinia amylovora*) in Romania. *Acta Horti* 489: 79-84.
- Shaffer, W.H., Goodman, R.N.** (1985): Appearance of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* in Missouri apple orchards. *Phytopathology* 75: 1281.
- Singh, A., Arutyunov, D., Szymanski, C.M., Evoy, S.** (2012): Bacteriophage based probes for pathogen detection. *Analyst* 137: 3405-3421.
- Smith, G.P.** (1985): Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317.
- Smith, T.J.** (1993): A predictive model for forecasting fire blight of pear and apple in Washington State. *Acta Horti* 338: 153-157.
- 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.
- Staphorst, J.L., van Zyl, F.G.H., Strijdom, B.W., Groenewold, Z.E.** (1985): Agrocin-producing pathogenic and nonpathogenic biotype 3 strains of *Agrobacterium tumefaciens* active against biotype 3 pathogens. *Curr Microbiol* 12: 45-52.

- Starr, M.P., Cardona, C., Folsom, D.** (1951): Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopathology* 41: 915-919.
- Steinberger, E.M., Beer, S.V.** (1988): Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 1: 135-144.
- Steiner, P.W.** (1990): Predicting apple blossom infection by *Erwinia amylovora* using the MARYBLYT model. *Acta Hort* 273: 139–146.
- Steiner, P.W.** (2000): Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight. In: Vanneste, J.L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 339-358.
- Stockwell, V.O., Duffy, B.** (2012): Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev Sci Tech Oie* 31: 199-210.
- Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Sugar, D., Loper, J.E.** (2002): Antibiosis contributes to biological control of fire blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards. *Phytopathology* 92: 1202-1209.
- Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Sugar, D., Loper, J.E.** (2010): Control of fire blight by *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Pantoea vagans* C9-1 applied as single strains and mixed inocula. *Phytopathology* 100: 1330-1339.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J.G.** (2001): Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Ch* 14: 649–659.
- Summers, W.C.** (1999): Bacteriophage discovered. In: Summers, W.C. (ed.) *Felix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology*. Yale University Press, USA, 47-59.
- Summers, W.C.** (2001): Bacteriophage therapy. *Ann Rev Microbiol* 55: 437-451.
- Summers, W.C.** (2005): Bacteriophage research: Early history. In: Kutter, E., Sulakvelidze, A. (eds.) *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, 5–27.
- Sundin, G.W., Werner, N.A., Yoder, K.S., Aldwinckle, H.S.** (2009): Field evaluation of biological control of fire blight in the eastern United States. *Plant Dis* 93: 986-994.
- Süle, S., Kiss, E., Kim, W.S., Geider, K.** (2002): Transformation of SR1 tobacco and JTE-H apple rootstock with the EPS-depolymerase gene from *Erwinia amylovora* phage. *Acta Hort* 590: 407-409.
- Svircev, A.M., Castle, A.J., Lehman, S.M.** (2010): Bacteriophages for control of phytopathogens in food production system. In: Sabour, P.M., Griffith, M.W. (eds.)

Bacteriophages in the Control of Food- And Waterborne Pathogens. ASM Press, Washington DC, USA, 79-103.

Svircev, A.M., Lehman, S.M., Kim, W.S., Barszcz, E., Schneider, K.E., Castle, A.J. (2006): Control of the fire blight pathogen with bacteriophages. In: Zeller, W., Ullrich, C. (eds.) *Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases*. Arno Brynda, Berlin, Germany, 259-261.

Sykes, I.K., Lanning, S., Williams, S.T. (1981): The effect of pH on soil actinophage. *J Gen Microbiol* 122: 271-280.

Takács, F. (2013): Az *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.* elleni küzdelem helyzete és lehetőségei Magyarországon. *Növényvédő Mérnöki és Nővényorvosi Kamara, VII. Nővényorvosi Nap* 114-115.

Tanaka, H., Negishi, H., Maeda, H. (1990): Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 56: 243-246.

Taylor, A.L. (1963): Bacteriophage-induced mutation in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 50: 1043-1051.

Tharaud, M., Laurent, J., Faize, M., Paulin, J.-P. (1997): Fire blight protection with avirulent mutants of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* 143: 625–632.

Tharaud, M., Menggad, M., Paulin, J.-P., Laurent, J. (1994): Virulence, growth, and surface characteristics of *Erwinia amylovora* mutants with altered pathogenicity. *Microbiology* 140: 659-669.

Thomson, S.V. (1986): The role of stigma in fire blight infections. *Phytopathology* 76: 476–482.

Thomson, S.V. (2000): Epidemiology of fire blight In: Vanneste, J.L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 9-35.

Thomson, S.V., Gouk, S.C., Vanneste, J.L., Hale, C.N., Clark, R.G. (1993): The presence of streptomycin resistant strains of *Erwinia amylovora* in New-Zealand. *Acta Hort* 338: 223-230.

Tóth, M. (2005): Six promising selections from the Hungarian apple breeding program for multiple resistance. *Int J Hort Science* 11: 23-28.

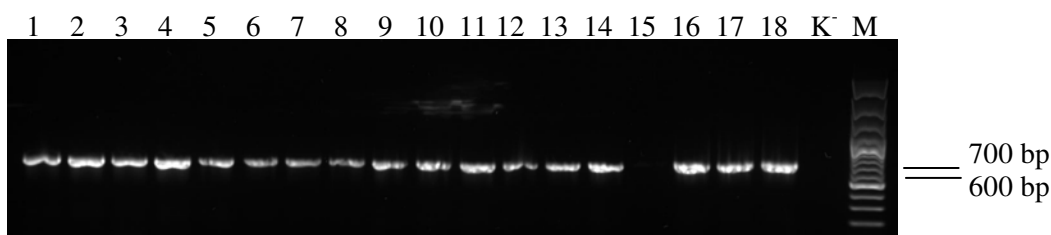
Tóth, M., Ficzek, G., Király, I., Kovács, Sz., Hevesi, M., Halász, J., Szani, Zs. (2012): ‘Artemisz’, ‘Cordelia’, ‘Hesztia’, and ‘Rosmerta’: New Hungarian multiresistant apple cultivars. *HortScience* 47: 1795-1800.

- Tóth, M., Hevesi, M., Honty, K., Kása, K.** (2005): A Kárpátalján fellelhető alma genotípusok (régi és helyi fajták) tűzelhalással szembeni ellenállósága növényházi vizsgálatok alapján. *Növényvédelem* 41: 341-348.
- Trevisan, V.** (1889): *Bacilli endofitobii destruenti. His I Generi e le Specie delle Batteriaceae*, Milano, 19.
- Twort, F.W.** (1915): An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* 186: 1241-1243.
- Uyeda, E.** (1903): The causal bacterium of apple blight. *Dai-Nippon No-Kaiho* 260, 1-3.
- van der Zwet, T.** (2006): Present worldwide distribution of fire blight and closely related diseases. *Acta Horti* 704: 35–36.
- 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, USA, 1-200.
- Vanneste, J.L.** (1995): *Erwinia amylovora*. In: Singh, U.S., Singh, R.P., Hohmoto, K. (eds.) *Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases I. Prokaryotes*. Pergamon Press, Oxford, London, UK, 21-41.
- Vanneste, J.L.** (2006): Biological control of fire blight: an overview of the work carried out in New Zealand. *Proceedings of the 1st International symposium on biological control of bacteria plant disease* 408: 224-227.
- Vanneste, J.L.** (2011): Biological control agents of fire blight: successes and challenges. *Acta Horti* 896: 409-416.
- 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, Wallingford, UK, 73-85.
- 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 Horti* 590: 89-94.
- Végh, A.** (2012): *Az almafélék tűzelhalását okozó Erwinia amylovora hazai izolátumainak biológiai változatossága*. Doktori (PhD) értekezés. Budapesti Corvinus Egyetem, Budapest, Magyarország.
- Végh, A., Hevesi, M., Pájtli, É., Petrik, K., Palkovics, L.** (2014): Hazai *Erwinia amylovora* izolátumok összehasonlítása molekuláris vizsgálat alapján. *60. Növényvédelmi Tudományos Napok*. 2014. február 18-19., Budapest, Magyarország. Absztrakt: 108.

- Végh, A., Horváth, B., Hevesi, M., Schwarczinger, I., Palkovics, L.** (2012c): Bakteriofágok hatásának vizsgálata *Erwinia amylovora* izolátumokra. *Növényvédelem* 48: 559-567.
- Végh, A., Némethy, Zs., Hajagos, L., Palkovics, L.** (2012a): First report of *Erwinia amylovora* causing fire blight on plum (*Prunus domestica* L.) in Hungary. *Plant Dis* 96: 5, 759.
- Végh, A., Némethy, Zs., Hajagos, L., Palkovics, L.** (2012b): Új gazdanövényen (*Prunus domestica* L. 'D' Agen') jelent meg az *Erwinia amylovora* Magyarországon. *Növényvédelem* 48: 378-382.
- Végh, A., Palkovics, L.** (2013): First occurrence of fire blight on apricot (*Prunus armeniaca*) in Hungary. *Not Bot Horti Agrobo* 41: 440-443.
- Ward, R.L., Mahler, R.J.** (1982): Uptake of bacteriophage f2 through plant roots. *Appl Environ Microbiol* 43: 1098-1103.
- Wilson, M., Epton, H.A.S., Sigeo, D.C.** (1992): Interactions between *Erwinia herbicola* and *E. amylovora* on the stigma of hawthorn blossoms. *Phytopathology* 82: 914-918.
- Winslow, C.E.A., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, Jr. C., Rogers, L.A., Xue, M.Q., Black, L.W.** (1920): Role of the major capsid protein of phage T4 in DNA packaging from structure-function and site-directed mutagenesis studies. *J Struct Biol* 104: 75-83.
- Xue, M.Q., Black, L.W.** (1990): Role of the major capsid protein of phage T4 in DNA packaging from structure-function and site-directed mutagenesis studies. *J Struct Biol* 104: 75-83.
- Yashiro, E., McManus, P.S.** (2012): Effect of streptomycin treatment on bacterial community structure in the apple phyllosphere. *PLoS One* 7: e37131.
- Zeller, W.** (2006): Status of biocontrol methods against fire blight. *Phytopathol Pol* 39: 71-78.

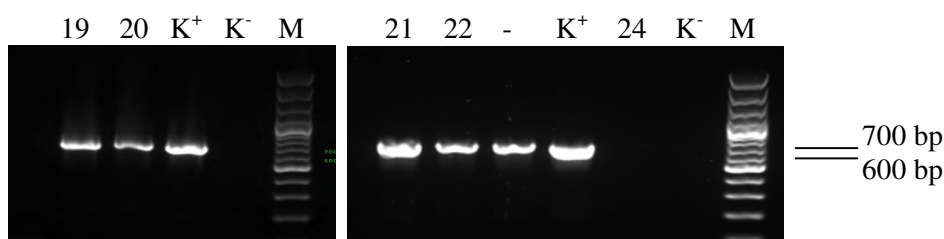
10 MELLÉKLETEK

M1.a Az EaFF/R primerpárral kapott PCR termékek (677 bp) gélelektroforézis fotója



A minták balról jobbra: H1A, H1B, H2A, H2B, H4A, H4B, H5K, H5A, H5B, H6B, H7B, H7A, H8A, H8B, H9A, H9B, H10A, H10B, víz (K⁻), GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M1.b Az EaFF/R primerpárral kapott PCR termékek (677 bp) gélfotója (folyt.)



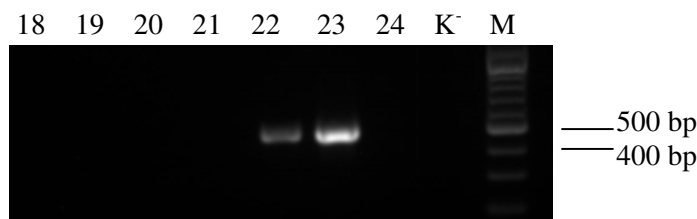
A minták balról jobbra: H11, H12A, Ea1/79Sm (K⁺), víz (K⁻), 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M), H12B, ΦEa1h, a dolgozatban nem szereplő minta (-), Ea1/79Sm (K⁺), víz, templát víz (K⁻), 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M2.a Az 1hcapF/R primerpárral kapott PCR termékek (474 bp) gélelektroforézis fotója



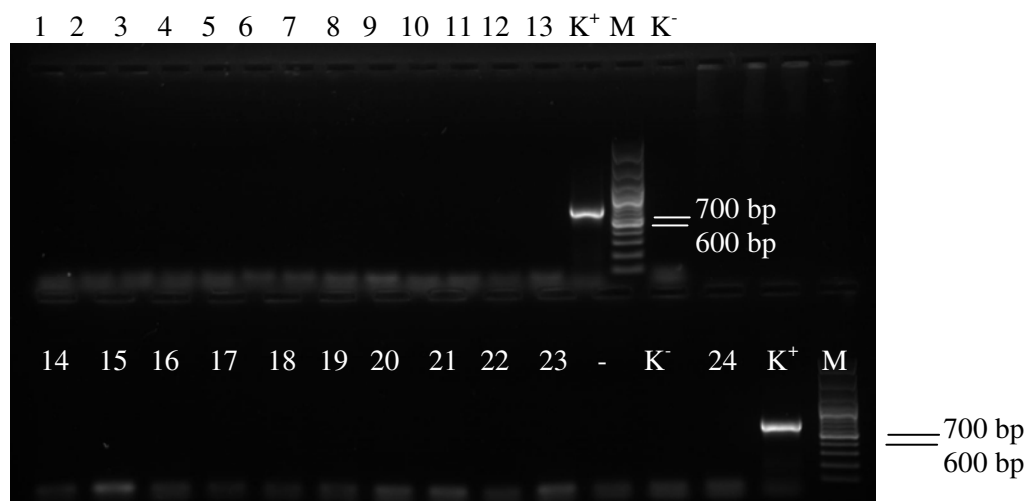
A minták balról jobbra: H1A, H1B, H2A, H2B, H4A, H4B, H5K, H5A, H5B, H6B, H7B, H7A, H8A, H8B, H9A, H9B, H10A, ΦEa1h (K⁺), víz (K⁻), GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M2.b Az 1hcapF/R primerpárral kapott PCR termékek (474 bp) gélelektroforézis fotója (folyt.)



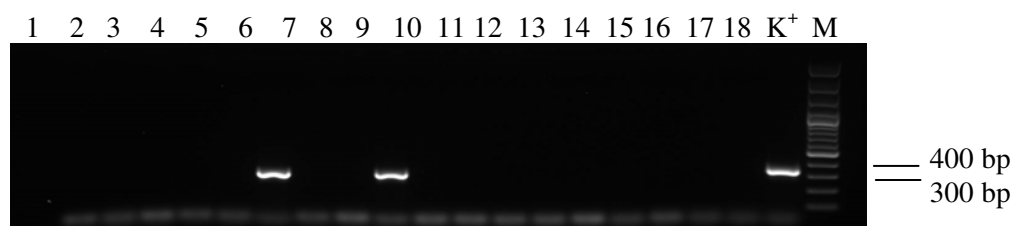
A minták balról jobbra: H10B, H11, H12A, H12B, ΦEa1h, ΦEa104, víz, templát víz (K⁻), GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M3. Az Ea104F/R primerpárral kapott PCR termékek (665 bp) gélfotója



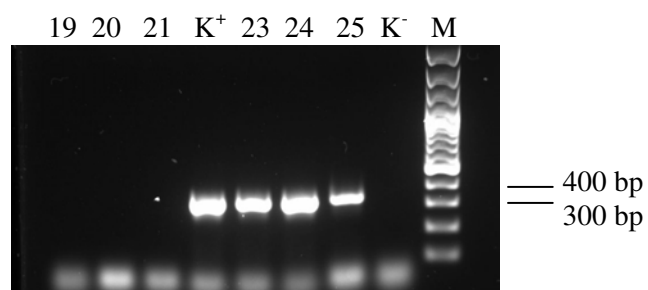
A minták balról jobbra (1. sor): H1A, H1B, H2A, H2B, H4A, H4B, H5K, H5A, H5B, H6B, H7B, H7A, H8A, Φ Ea104 (K⁺), GeneRuler™ 100 bp DNS Ladder Plus (Thermo Scientific) (M), víz (K⁻). A második sorban a minták balról jobbra: H8B, H9A, H9B, H10A, H10B, H11, H12A, H12B, Φ Ea1h, Φ Ea100, a dolgozatban nem szereplő Ea törzs (-), víz (K⁻), Φ Ea116, Φ Ea104 (K⁺), GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M4.a Az Ea100F/R primerpárral kapott PCR termékek (344 bp) gélfotója



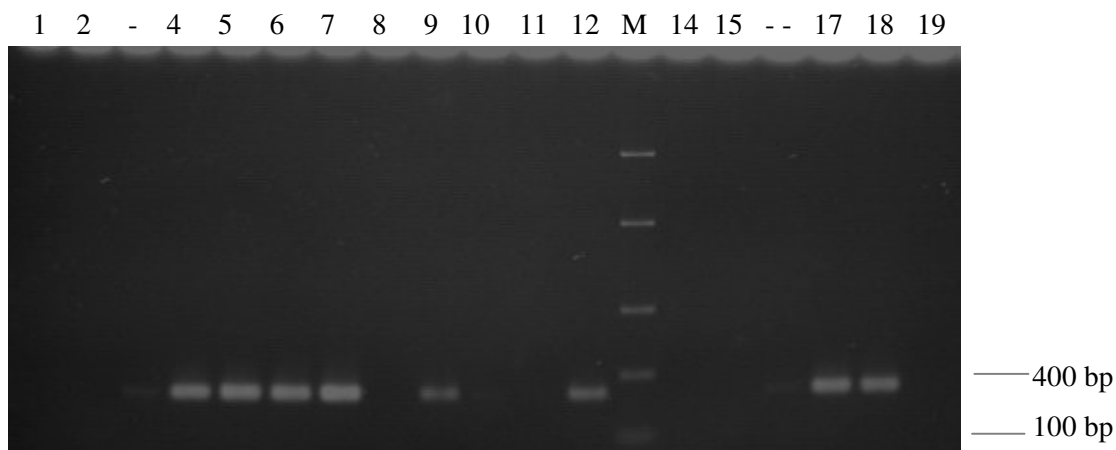
A minták balról jobbra: H1A, H1B, H2A, H2B, H4A, H4B, H5K, H5A, H5B, H6B, H7B, H7A, H8A, H8B, H9A, H9B, H10A, H10B, Φ Ea1h (K⁺), GeneRuler™ 100 bp DNS Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M4.b Az Ea100F/R primerpárral kapott PCR termékek (344 bp) gélfotója (folyt.)



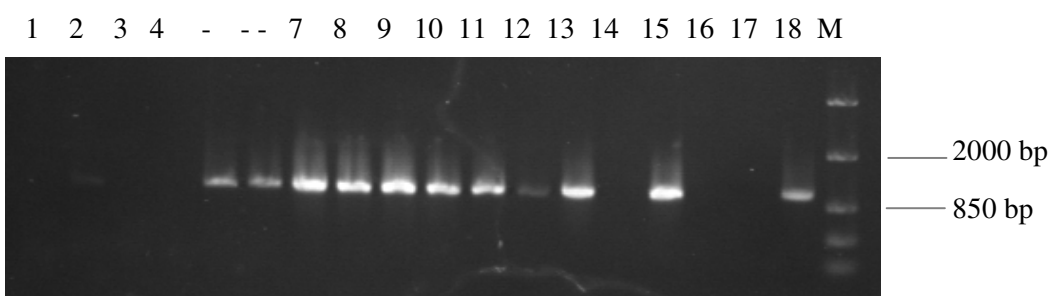
A minták balról jobbra: H11, H12A, H12B, Φ Ea100 (K⁺), Φ Ea104, Φ Ea104, Φ Ea116, víz (K⁻), GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M5. A PEa1A/B primerpárral kapott PCR termékek (304 bp) gélfotója



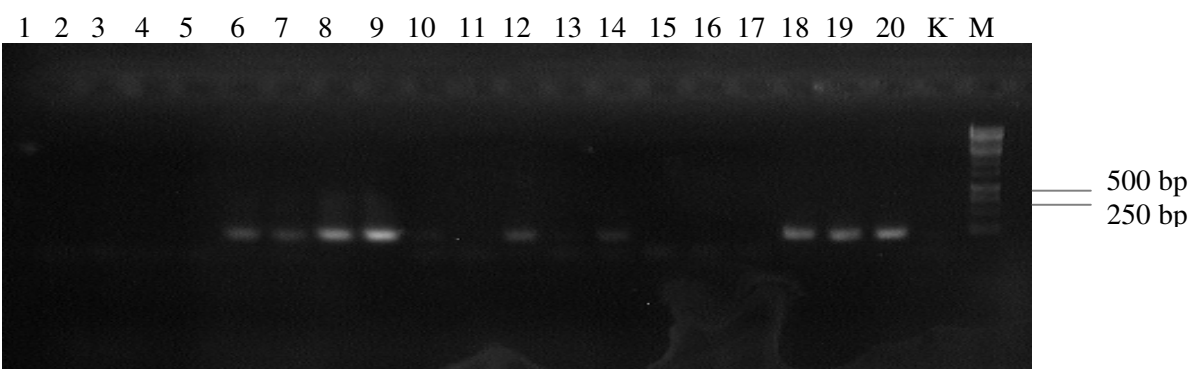
A minták balról jobbra: H1B, H2B, a dolgozatban nem szereplő minta (-), H4B, H5B, H7A, H6B, H8A, H9B, H10B, H11, H12B, FastRuler™ Middle Range DNA Ladder (Thermo Scientific) (M), H1A, H2A, a dolgozatban nem szereplő minta (--), H4A, H5A, H7B.

M6. Magyar fágizolátumok Dpo-1/2c primerpárral kapott PCR termékeinek (1006 bp) gélfotója



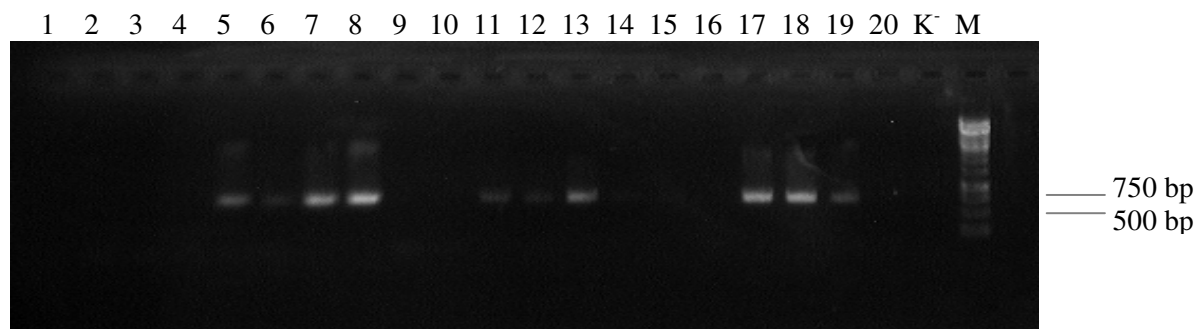
A minták balról jobbra: H1A, H1B, H2A, H2B, a dolgozatban nem szereplő minták (-) és (- -), H4A, H4B, H5A, H5B, H7A, H7B, H6B, H8A, H9B, H10B, H11, H12B, FastRuler™ Middle Range DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

M7. Magyar fágizolátumok Hol-F/R primerpárral kapott PCR termékeinek (361 bp) gélfotója



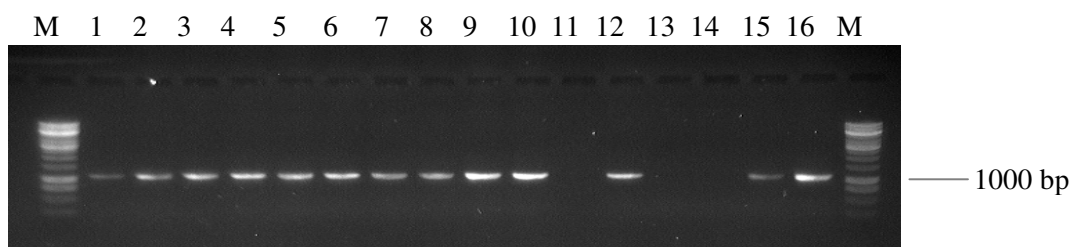
A minták balról jobbra: H1A, H1B, H2A, H2B, H4A, H4B, H5A, H5B, H7A, H7B, H6B, H8A, H9B, H10B, H11, H12B, ΦEa1h, ΦEa100, ΦEa104, ΦEa116, víz (K), GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M8. Magyar fágizolátumok Lys-F/R primerpárral kapott PCR termékeinek (537 bp) gélfotója



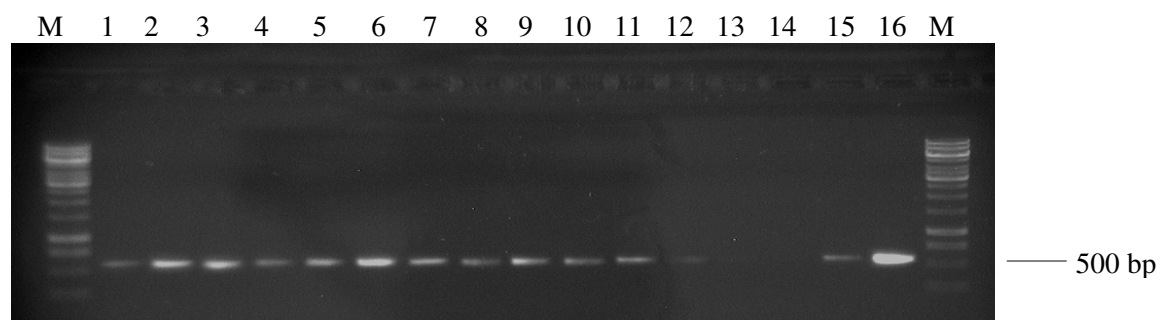
A minták balról jobbra: H1A, H1B, H2A, H2B, H4A, H4B, H5A, H5B, H7A, H7B, H6B, H8A, H9B, H10B, H11, H12B, ΦEa1h, ΦEa100, ΦEa104, ΦEa116, víz (K⁻), GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M9. Magyar fágizolátumok Term-F/R primerekkel kapott PCR termékeinek (1079 bp) gélfotója



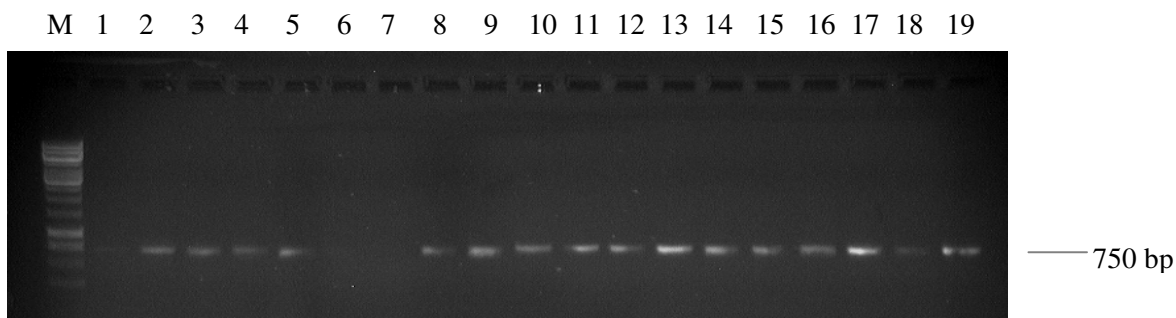
A minták balról jobbra: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M), H1A, H1B, H2A, H2B, H7A, H7B, H6B, H8A, H9B, H10B, H11, H12B, ΦEa1h, ΦEa100, ΦEa104, ΦEa116, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M10. Magyar fágizolátumok Pep-F/R primerekkel kapott PCR termékeinek (500 bp) gélfotója



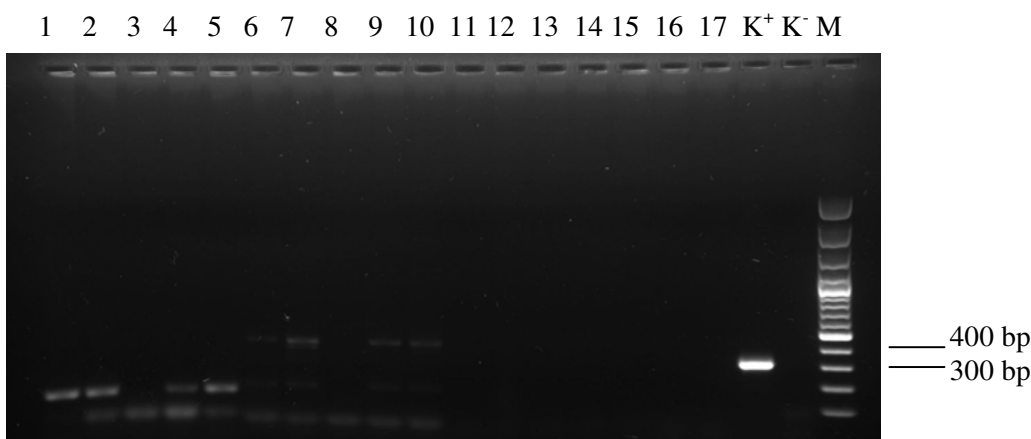
A minták balról jobbra: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M), H1A, H1B, H2A, H2B, H4A, H7A, H7B, H8A, H9B, H10B, H11, H12B, ΦEa1h, ΦEa100, ΦEa104, ΦEa116, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M11. Magyar fágizolátumok Mu-F/R primerpárral kapott PCR termékeinek (614 bp) gélfotója



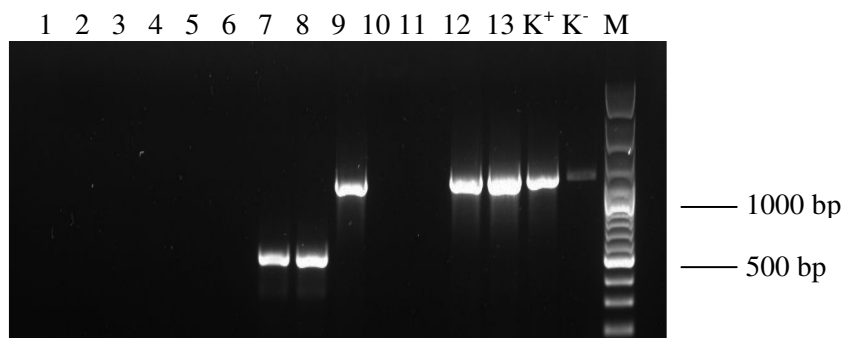
A minták balról jobbra: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M), H1A, H1B, H2A, H2B, H4A, H4B, H5A, H5B, H7A, H7B, H8A, H9B, H10B, H11, H12B, ΦEa1h, ΦEa100, ΦEa104, ΦEa116.

M12.a Magyar fágizolátumok [H5K (1), H8B (2), H9A (3), H10A (4), H12A (5)] PEa1A/B (P) (304 bp), Dpo-1/2c (D) (1006 bp), Hol-F/R (H) (361 bp) és Lys-F/R (L) (537 bp) primer párokkal végzett PCR eredménye



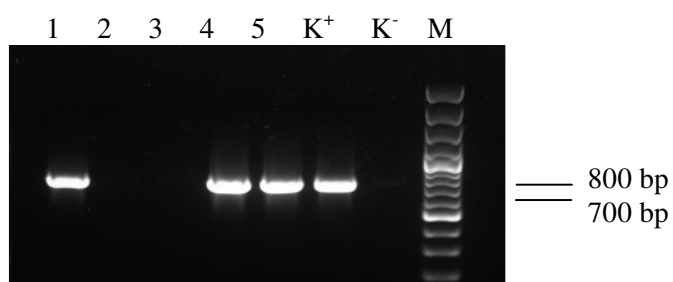
A minták balról jobbra: P1, P2, P3, P4, P5, D1, D2, D3, D4, D5, H1, H2, H3, H4, H5, L1, L2, ΦEa1h (PEa1A/B) (K⁺), víz (K⁻), GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M12.b Magyar fágizolátumok [H5K (1), H8B (2), H9A (3), H10A (4), H12A (5)] Lys-F/R (L) (537 bp), Pep-F/R (500 bp) és Term-F/R (1079 bp) primer párokkal végzett PCR eredménye (folyt.)



A minták balról jobbra: L3, L4, L5, Pe1, Pe2, Pe3, Pe4, Pe5, T1, T2, T3, T4, T5, ΦEa116 (Term-F/R) (K⁺), víz (K⁻), GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M12.c Magyar fágizolátumok [H5K (1), H8B (2), H9A (3), H10A (4), H12A (5)] Mu-F/R (614 bp), primer párokkal végzett PCR eredménye



A minták balról jobbra: M1, M2, M3, M4, M5, Φ Ea116 (Mu-F/R) (K⁺), víz (K⁻), GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) (M).

M13. A H4A, H4B, H5A, H5B, H6A, H7A, H9B fágizolátumok Dpo-1/2c primerpárral felszaporított szakaszának szekvencia-analízise

10 Jun 2008

Alignment Results

Alignment: Global DNA alignment against reference molecule

Parameters: Scoring matrix: Linear (Mismatch 2, OpenGap 4, ExtGap 1)

Reference molecule: 50 B07 AG Geid_Ealh_12_ju.seq, Region 1-618

Number of sequences to align: 9

Settings: Similarity significance value cutoff: >= 60%

Summary of Percent Matches:

Reference:	50 B07 AG Geid Ealh 12 ju.seq	1 -	618	(618 bps)	--
Sequence 2:	52 D07 AG Geid 100 12 ju.seq	1 -	618	(618 bps)	99%
Sequence 3:	71 G09 AG Geid 4A 12 ju.seq	1 -	621	(621 bps)	99%
Sequence 4:	72 H09 AG Geid 4B 12 ju.seq	1 -	621	(621 bps)	99%
Sequence 5:	74 B10 AG Geid 5A 12 ju.seq	1 -	624	(624 bps)	98%
Sequence 6:	75 C10 AG Geid 5B 12 ju.seq	1 -	622	(622 bps)	98%
Sequence 7:	76 D10 AG Geid 6 12 ju.seq	1 -	622	(622 bps)	99%
Sequence 8:	77 E10 AG Geid 7A 12 ju.seq	1 -	622	(622 bps)	98%
Sequence 9:	78_F10_AG Geid_9_12_ju.seq	1 -	622	(622 bps)	98%

```

50 B07 AG Ge 1 --CTAGG--T-CTTTGAGGG-G--GCGGCA-GTTCGCTTATGACCCTAATGACACAACCA
52 D07 AG Ge 1 --.....T.....
71 G09 AG Ge 1 G-.C.....T.....
72 H09 AG Ge 1 CG.C.....T.....
74 B10 AG Ge 1 GG..NA.GC.....T.....A.....
75 C10 AG Ge 1 G-.N...G-.....A...-TG.....A.....
76 D10 AG Ge 1 GG.....T.....T.....
77 E10 AG Ge 1 GG...NT--C-TN...A...-TG.....A.....
78_F10_AG Ge 1 GG.N..NC-.....N...T.....A.....

```

```

50 B07 AG Ge 52 CCGCTGATGATGGCGGGTTTACCATTGTCCTGCTACTGGCAAGAGATTTAAGCGTGCAG
52 D07 AG Ge 53 .....
71 G09 AG Ge 55 .....
72 H09 AG Ge 55 .....
74 B10 AG Ge 58 .....
75 C10 AG Ge 57 .....
76 D10 AG Ge 56 .....
77 E10 AG Ge 57 .....
78_F10_AG Ge 57 .....

```

```

50 B07 AG Ge 112 ACCCCATCGACACCCTGGATATTACTCACTTCGGTGGCTACTGCAATGGGATTGCTGATG
52 D07 AG Ge 113 .....
71 G09 AG Ge 115 .....
72 H09 AG Ge 115 .....
74 B10 AG Ge 118 .....
75 C10 AG Ge 117 .....
76 D10 AG Ge 116 .....
77 E10 AG Ge 117 .....
78_F10_AG Ge 117 .....

```

```

50 B07 AG Ge 172 ATATGTTTGCAGTAGTTCGTATGCGTGCATGGGCAGCTACCATTAATGCAACGTTTAACC
52 D07 AG Ge 173 .....
71 G09 AG Ge 175 .....
72 H09 AG Ge 175 .....
74 B10 AG Ge 178 .....
75 C10 AG Ge 177 .....
76 D10 AG Ge 176 .....
77 E10 AG Ge 177 .....
78_F10_AG Ge 177 .....

```

```

50 B07 AG Ge 232 CAGGTGTGCGTATTCCATCTGGTATTACTACGCTGAGCGCTTATGACTTTGGTAGCAGTG
52 D07 AG Ge 233 .....
71 G09 AG Ge 235 .....
72 H09 AG Ge 235 .....
74 B10 AG Ge 238 .....
75 C10 AG Ge 237 .....
76 D10 AG Ge 236 .....
77 E10 AG Ge 237 .....
78_F10_AG Ge 237 .....

```

M13 folytatása

50 B07 AG Ge	292	AGCTTCCATCGTTTAAAGATTTCGTGGGCCTGAAGTTGCCTATGGACGCATCCCCGCTGCAC
52 D07 AG Ge	293
71 G09 AG Ge	295
72 H09 AG Ge	295
74 B10 AG Ge	298
75 C10 AG Ge	297
76 D10 AG Ge	296
77 E10 AG Ge	297
78_F10_AG Ge	297
50 B07 AG Ge	352	AGATTCAACCGTTCGACCTGTCTTACACTGGGTATCTTATCAAGGTGAAGGCACGCCGTA
52 D07 AG Ge	353
71 G09 AG Ge	355
72 H09 AG Ge	355
74 B10 AG Ge	358
75 C10 AG Ge	357
76 D10 AG Ge	356
77 E10 AG Ge	357
78_F10_AG Ge	357
50 B07 AG Ge	412	TGGAAGTATCTAACCTGATGCTGAGTGGTGTGGTAGTCAGTGTGGTTCTTGGAGAACA
52 D07 AG Ge	413
71 G09 AG Ge	415
72 H09 AG Ge	415
74 B10 AG Ge	418
75 C10 AG Ge	417
76 D10 AG Ge	416
77 E10 AG Ge	417
78_F10_AG Ge	417
50 B07 AG Ge	472	CTGTGACCCGTGGTGACTATTGCCGCATTTCATGGTATACAGGCACGTAACCTGACTGGTC
52 D07 AG Ge	473
71 G09 AG Ge	475
72 H09 AG Ge	475
74 B10 AG Ge	478
75 C10 AG Ge	477
76 D10 AG Ge	476
77 E10 AG Ge	477
78_F10_AG Ge	477
50 B07 AG Ge	532	GTGCATTCCATGTGTACGATACCATCGATACCGCTGTGACCCAGTGTTACTCAACCAGTG
52 D07 AG Ge	533
71 G09 AG Ge	535
72 H09 AG Ge	535
74 B10 AG Ge	538
75 C10 AG Ge	537
76 D10 AG Ge	536
77 E10 AG Ge	537
78_F10_AG Ge	537
50 B07 AG Ge	592	GCAAGGCTTCGTTCTTCCCGTACTGAA
52 D07 AG Ge	593
71 G09 AG Ge	595
72 H09 AG Ge	595
74 B10 AG Ge	598
75 C10 AG Ge	597
76 D10 AG Ge	596
77 E10 AG Ge	597
78_F10_AG Ge	597	.N.....

M14. A H2A Pep-F/R primerekkel kapott DNS szakaszának szekvencia-analízise

A H2A peptidáz kódoló régiójának nukleotid sorrendje

GGGGCGCTCTCTCATCGTATGTCTGGCATTGATGCAATGTGTACTGGTGGTCTGTCATCTTATCAGGGA
TTGACCAGAGCATTGATGAAGCTGTTGCTGACGCATCAGTTGAAAAGATTGTTCTGATGATTGATTCA
GGTGGTGGTGAAGCTGCTGGTTGTTTCGAACTTGCAAGACACATGAAAGAACACTCTAACGGTAAACC
CGTTATCGCTTATGTGCGATGAAAGAGCCTGTTACGCCGCTTATGCGCTGGCTTGTGCTGCAAGTGAAAT
CTATGCCTCTCCAAATGCTGATGTAGGCTCAATTGGTGTGATTGTTATCCATCAAGAGTTCTCTAAAGC
AATGGAGAAAGCGGGAATCCAAACCAACATCATCAAAGCTGGTGAAGTTAAAGGGATGGGAAACCCG
TATGAACCACTTTCTGACCAAGCTAAAGACTTGATTTCAGAAGTCGGTCGATAATTCTTACACATCTTTT
GTCAACCTTGTATCAAGTTCT

Szekvencia összehasonlítás

Erwinia phage vB_EamM-M7, complete genome

Sequence ID: gblHQ728263.1|Length: 84694Number of Matches: 1

Range 1: 13694 to 14194GenBankGraphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
899	0.0	500/501(99%)	0/501(0%)	Plus/Plus
bits(996)				

Query	1	GGGGCGCTCTCTCATCGTATGTCTGGCATTGATGCAATGTGTACTGGTGGTCTGTCATCT	60
Sbjct	13694	GGGGCGCTCTCTCATCGTATGTCTGGCATTGATGCAATGTGTACTGGTGGTCTGTCATCT	13753
Query	61	TATCAGGGATTGACCAGAGCATTGATGAAGCTGTTGCTGACGCATCAGTTGAAAAGATT	120
Sbjct	1375	TATCAGGGATTGACCAGAGCATTGATGAAGCTGTTGCTGACGCATCAGTTGAAAAGATT	13813
Query	121	GTTCTGATGATTGATTTCAGGTGGTGGTGAAGCTGCTGGTTGTTTCGAACTTGCAAGACAC	180
Sbjct	13814	GTTCTGATGATTGATTTCAGGTGGTGGTGAAGCTGCTGGTTGTTTCGAACTTGCAAGACAC	13873
Query	181	ATGAAAGAACACTCTAACGGTAAACCCGTTATCGCTTATGTGCGATGAAAGAGCCTGTTCA	240
Sbjct	13874	ATGAAAGAACACTCTAACGGTAAACCCGTTATCGCTTATGTGCGATGAAAGAGCCTGTTCA	13933
Query	241	GCCGCTTATGCGCTGGCTTGTGCTGCAAGTGAAATCTATGCCTCTCCAAATGCTGATGTA	300
Sbjct	13934	GCCGCTTATGCGCTGGCTTGTGCTGCAAGTGAAATCTATGCCTCTCCAAATGCTGATGTA	13993
Query	301	GGCTCAATTGGTGTGATTGTTATCCATCAAGAGTTCTCTAAAGCAATGGAGAAAGCGGGA	360
Sbjct	13994	GGCTCAATTGGTGTGATTGTTATCCATCAAGAGTTCTCTAAAGCAATGGAGAAAGCGGGA	14053
Query	361	ATCCAAACCAACATCATCAAAGCTGGTGAAGTTAAAGGATGGGAAACCCGTATGAACCA	420
Sbjct	14054	ATCCAAACCAACATCATCAAAGCTGGTGAAGTTAAAGGATGGGAAACCCGTATGAACCA	14113
Query	421	CTTTCTGACCAAGCTAAAGACTTGATTTCAGAAGTCGGTCGATAATTCTTACACATCTTTT	480
Sbjct	14114	CTTTCTGACCAAGCTAAAGACTTGATTTCAGAAGTCGGTCGATAATTCTTACACATCTTTT	14173
Query	481	GTCAACCTTGTATCAAGTTCT	501
Sbjct	14174	GTCAACCTTGTATCAAGTTCT	14194

M15. A H2A fágizolátum Term-F/R primerpárral felszaporított DNS szakaszának szekvencia-analízise

A H2A terminált kódoló szakaszának konszenzus nukleotid sorrendje

ACCTTACCGAAGTTAAACAGCAGCGTCTGAGGGACGTACAGGCCGTTTTAGCGGGTACTATCAAACCTT
GAGCCAGCAGTTGTAAAACCTTCTCGCCAAGTATGGAAAGCCAGTTGAAAAACTGCTTCCAAGTCAAAT
CTTGACATTGAGAAAGTATACGCTTGAAGAGGTTGAACTTCTCATGAGGCTGTTGACAAATAAGAAGT
TTATTGCCCCACAGCCCGGCTCTCAAGAGGCATTGCTGAACACCACAACAGACATCACACTCTATGGT
GGTGC GGCTGGTTCCGGTAAGACGTTGCTATCCTGATGGATGCCCTTCAGCATAAAGATGACCCTGA
TTACTACGCTGTATTCTTCCGTAAAAACACCACACAGTTATCAGGTGGTCTTTGGCCTGCCGCTAAAAA
ATTGTATGGCATGTTTCGGGGGAGTTCCACATGAACAGAAGATGGTGATTCAATTCCCTTCTGGCGCAT
CAATCAAGTTCTCTTACATGGAACCTGGAAAAACACGCAGAAGCCCATCAGGGTATCGAATACTCAGCA
ATTTATTGGGATGAGTTTACTCACTTCTCACAGAGTCAGGTTGATTACCTGATGACTCGTATGCGTTCT
GGTGCAGATGGTGACTCGTACATGAAATGTTTCGATGAACCCCGAAAGAGACCACTTCGTATATGCTTG
GGTAGAGCCATTCTTGATGAAGAGGGTTATCCTAATAATGAACTTTGTGGTAAGACTCGCTGGTTTGT
TATTCAGGAAGGTGTCATGTATTCTGATTGGGACAGAGATGTTATTCTTCGTCAATTCCCATTAGAAAT
TCCACAGACATATACCTTTATTTCTGGTACAATTGATGATAATCCAATTCTGGACTTTATCGAACCGAA
ATATCGTGTTAGACTTGAAAACAATACACCTATCAACGTTGCAAGACTTCGTTATGGTAAGTGGAAAG
CAAGGGCTGAAGGTTCAAGCT

Szekvencia összehasonlítás

Erwinia phage vB_EamM-M7, complete genome

Sequence ID: gb|HQ728263.1|Length: 84694Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 9589 to 10566GenBankGraphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1759 bits(1950)	0.0	977/978(99%)	0/978(0%)	Plus/Plus	
Query 1	ACCTTACCGAAGTTAAACAGCAGCGTCTGAGGGACGTACAGGCCGTTTTAGCGGGTACTA	60			
Sbjct 9589	ACCTTACCGAAGTTAAACAGCAGCGTCTGAGGGACGTACAGGCCGTTTTAGCGGGTACTA	9648			
Query 61	TCAAACCTTGAGCCAGCAGTTGTAAAACCTTCTCGCCAAGTATGGAAAGCCAGTTGAAAAAC	120			
Sbjct 9649	TCAAACCTTGAGCCAGCAGTTGTAAAACCTTCTCGCCAAGTATGGAAAGCCAGTTGAAAAAC	9708			
Query 121	TGCTTCCAAGTCAAATCTTGACATTGAGAAAGTATACGCTTGAAGAGGTTGAACTTCTCA	180			
Sbjct 9709	TGCTTCCAAGTCAAATCTTGACATTGAGAAAGTATACGCTTGAAGAGGTTGAACTTCTCA	9768			
Query 181	TGAGGCTGTTGACAAATAAGAAGTTTATTGCCCCACAGCCCGGCTCTCAAGAGGCATTGC	240			
Sbjct 9769	TGAGGCTGTTGACAAATAAGAAGTTTATTGCCCCACAGCCCGGCTCTCAAGAGGCATTGC	9828			
Query 241	TGAACACCACAACTGACATCACACTCTATGGTGGTGCGGCTGGTTCCGGTAAGACGTTG	300			
Sbjct 9829	TGAACACCACAACTGACATCACACTCTATGGTGGTGCGGCTGGTTCCGGTAAGACGTTG	9888			
Query 301	CTATCCTGATGGATGCCCTTCAGCATAAAGATGACCCTGATTACTACGCTGTATTCTTCC	360			
Sbjct 9889	CTATCCTGATGGATGCCCTTCAGCATAAAGATGACCCTGATTACTACGCTGTATTCTTCC	9948			
Query 361	GTAAAAACACCACACAGTTATCAGGTGGTCTTTGGCCTGCCGCTAAAAAATTGTATGGCA	420			

Sbjct 9949 GTAAAAACACCACACAGTTATCAGGTGGTCTTTGGCCTGCCGCTAAAAAATTGTATGGCA 10008

Query 421 TGTTCGGGGGAGTTCCACATGAACAGAAGATGGTGATTCAATTCCCTTCTGGCGCATCAA 480
 |||
 Sbjct10009 TGTTCGGGGGAGTTCCACATGAACAGAAGATGGTGATTCAATTCCCTTCTGGCGCATCAA 10068

Query 481 TCAAGTTCTCTTACATGGAAGTGGAAAAACACGCAGAAGCCCATCAGGGTATCGAATACT 540
 |||
 Sbjct10069 TCAAGTTCTCTTACATGGAAGTGGAAAAACACGCAGAAGCCCATCAGGGTATCGAATACT 10128

Query 541 CAGCAATTTATTGGGATGAGTTTACTCACTTCTCACAGAGTCAGGTTGATTACCTGATGA 600
 |||
 Sbjct10129 CAGCAATTTATTGGGATGAGTTTACTCACTTCTCACAGAGTCAGGTTGATTACCTGATGA 10188

Query 601 CTCGTATGCGTTCTGGTGCAGATGGTGACTCGTACATGAAATGTTTCGATGAACCCCGAAA 660
 |||
 Sbjct10189 CTCGTATGCGTTCTGGTGCAGATGGTGACTCGTACATGAAATGTTTCGATGAACCCCGAAA 10248

Query 661 GAGACCACTTCGTATATGCTTGGGTAGAGCCATTCCTTGATGAAGAGGGTTATCCTAATA 720
 |||
 Sbjct10249 GAGACCACTTCGTATATGCTTGGGTAGAGCCATTCCTTGATGAAGAGGGTTATCCTAATA 10308

Query 721 ATGAACTTTGTGGTAAGACTCGCTGGTTTGTATTTCAGGAAGGTGTCATGTATTCTGATT 780
 |||
 Sbjct10309 ATGAACTTTGTGGTAAGACTCGCTGGTTTGTATTTCAGGAAGGTGTCATGTATTCTGATT 10368

Query 781 GGGACAGAGATGTTATTCTTCGTCGAATTCATTCAGAAATTCACAGACATATACCTTTA 840
 |||
 Sbjct10369 GGGACAGAGATGTTATTCTTCGTCGAATTCATTCAGAAATTCACAGACATATACCTTTA 10428

Query 841 TTTCTGGTACAATTGATGATAATCCAATTCTGGACTTTATCGAACCGAAATATCGTGGTA 900
 |||
 Sbjct10429 TTTCTGGTACAATTGATGATAATCCAATTCTGGACTTTATCGAACCGAAATATCGTGGTA 10488

Query 901 GACTTGAAAAACAATACACCTATCAACGTTGCAAGACTTCGTTATGGTAAGTGGAAAGCAA 960
 |||
 Sbjct10489 GACTTGAAAAACAATACACCTATCAACGTTGCAAGACTTCGTTATGGTAAGTGGAAAGCAA 10548

Query 961 GGGCTGAAGGTTCAAGCT 978
 |||
 Sbjct10549 GGGCTGAAGGTTCAAGCT 10566

terminase large subunit (9585..11189)

/note="gp016"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="terminase large subunit"
 /protein_id="AEJ81275.1"
 /db_xref="GI:339507712"

/translation="MNLTEVKQQRRLRDVQAVLAGTIKLEPAVVKLLAKYGKPVKLLPSQILTLRKYLEEVELL
 MRLLTNNKFIAPQPGSQEALLNTTDDITLYGGAAGSGKTVAILMDALQHKDDPDYYAVFFRKNTTQLSGG
 LWPAACKLYGMFGGVPHEQKMVIQFPGASIKFSYMELEKHAEEAHQGIEYSAIYWDEFTHFSQSQVDYLM
 TRMRSGADGDSYMKCSMNPERDHFVYAWVEPFLDEEGYPNNELCGKTRWFWIQEGVMYSDWDRDVILR
 QFPLEIPQTYTFISGTIDNPILDFIEPKYRGRLENNTPINVARLRYGNWKARAEGSSYFDRRWQCIVDSVDE
 PASRVRAWDLAATLPSELNPDWDWTAGVKMSKGQKTGFYIEHVKRFRDRPAGVEEGIQETAKADTSKVE
 IFIPQDPGAAGKSYASGLIRKLALAGFRARARTTNKDKVTRFAPFSAVAESGHVKVVRGDWNDAYFTELE
 GFTGDGKRKDDQVDATSDAFQSLNSRGVLKVPSPMDNSLDMRLRDNPFAGIKTI"

M16. A H5K fágizolátum Term-F/R primerpárral felszaporított DNS szakaszának szekvencia-analízise

A H5K terminázt kódoló szakaszának nukleotid sorrendje

```
AGCAGCGTCTGAGGGACGTACAGGCCGTTTTAGCGGGTACTATCAAACCTTGAGCCAGCAGTTGTAAAA
CTTCTCGCCAAGTATGGAAAGCCAGTTGAAAAACTGCTTCCAAGTCAAATCTTGACATTGAGAAAGTA
TACGCTTGAAGAGGTTGAACTTCTCATGAGGCTGTTGACAAATAAGAAGTTTATTGCCCCACAGCCCG
GCTCTCAAGAGGCATTGCTGAACACCACAACCTGACATCACACTCTATGGTGGTGCGGCTGGTTCCGGT
AAGACGGTTGCTATCCTGATGGATGCCCTTCAGCATAAAGATGACCCTGATTACTACGCTGTATTCTTC
CGTAAAAACACCACACAGTTATCAGGTGGTCTTTGGCCTGCCGCTAAAAAATTGTATGGCATGTTCCG
GGGAGTTCCACATGAACAGAAGATGGTGATTCAATTCCTTCTGGCGCATCAATCAAGTTCTCTTACAT
GGAAGTGGAAAAACACGCAGAAGCCCATCAGGGTATCGAATACTCAGCAATTTATTGGGATGAGTTT
ACTCACTTCTCACAGAGTCAGGTTGATTACCTGATGACTCGTATGCGTTCTGGTGCAGATGGTGACTCG
TACATGAAATGTTTCGATGAACCCCGAAAGAGACCACTTCGTATATGCTTGGGTAGAGCCATTCCTTGA
TGAAGAGGGTTATCCTAATAATGAACCTTTGTGGTAAGACTCGCTGGTTTGTATTTCAGGAAGGTGTCAT
GTATTCTGATTGGGACAGAGATGTTATTCTTCGTCAATTCCCATAGAAATTCCACAGACATATACCTT
TATTTCTGGTACAATTGATGATAATCCAATTCTGGACTTTATCGAACCGAAATATCGTGGTAGACTTGA
AAACAATACACCTATCAACGTTGCAAGACTTCGTTATGGTAACTGGAAAGCAAGGGCTGAAGGTTCAA
GCTATTTTGATAGAAGATGGTGATTCCCA
```

Szekvencia összehasonlítás

Erwinia phage vB_EamM-M7, complete genome

Sequence ID: gb|HQ728263.1|Length: 84694Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 9607 to 10585GenBankGraphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1761 bits(1952)	0.0	978/979(99%)	0/979(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGCAGCGTCTGAGGGACGTACAGGCCGTTTTAGCGGGTACTATCAAACCTTGAGCCAGCAG	60		
Sbjct 9607	AGCAGCGTCTGAGGGACGTACAGGCCGTTTTAGCGGGTACTATCAAACCTTGAGCCAGCAG	9666		
Query 61	TTGTAAAACTTCTCGCCAAGTATGGAAAGCCAGTTGAAAAACTGCTTCCAAGTCAAATCT	120		
Sbjct 9667	TTGTAAAACTTCTCGCCAAGTATGGAAAGCCAGTTGAAAAACTGCTTCCAAGTCAAATCT	9726		
Query 121	TGACATTGAGAAAGTATACGCTTGAAGAGGTTGAACTTCTCATGAGGCTGTTGACAAATA	180		
Sbjct 9727	TGACATTGAGAAAGTATACGCTTGAAGAGGTTGAACTTCTCATGAGGCTGTTGACAAATA	9786		
Query 181	AGAAGTTTATTGCCCCACAGCCCGGCTCTCAAGAGGCATTGCTGAACACCACAACCTGACA	240		
Sbjct 9787	AGAAGTTTATTGCCCCACAGCCCGGCTCTCAAGAGGCATTGCTGAACACCACAACCTGACA	9846		
Query 241	TCACACTCTATGGTGGTGCGGCTGGTTCCGGTAAGACGGTTGCTATCCTGATGGATGCCC	300		
Sbjct 9847	TCACACTCTATGGTGGTGCGGCTGGTTCCGGTAAGACGGTTGCTATCCTGATGGATGCCC	9906		
Query 301	TTCAGCATAAAGATGACCCTGATTACTACGCTGTATTCTTCCGTAAAAACACCACACAGT	360		
Sbjct 9907	TTCAGCATAAAGATGACCCTGATTACTACGCTGTATTCTTCCGTAAAAACACCACACAGT	9966		
Query 361	TATCAGGTGGTCTTTGGCCTGCCGCTAAAAAATTGTATGGCATGTTTCGGGGGAGTTCAC	420		

Sbjct 9967 TATCAGGTGGTCTTTGGCCTGCCGCTAAAAAATTGTATGGCATGTTTCGGGGGAGTTCAC 0026

Query 421 ATGAACAGAAGATGGTGATTCAATTCCTTCTGGCGCATCAATCAAGTTCTCTTACATGG 480
 |||

Sbjct 10027 ATGAACAGAAGATGGTGATTCAATTCCTTCTGGCGCATCAATCAAGTTCTCTTACATGG 0086

Query 481 AACTGGAAAAACACGCAGAAGCCCATCAGGGTATCGAATACTCAGCAATTTATTGGGATG 540
 |||

Sbjct 10087 AACTGGAAAAACACGCAGAAGCCCATCAGGGTATCGAATACTCAGCAATTTATTGGGATG 0146

Query 541 AGTTTACTCACTTCTCACAGAGTCAGGTTGATTACCTGATGACTCGTATGCGTTCTGGTG 600
 |||

Sbjct 10147 AGTTTACTCACTTCTCACAGAGTCAGGTTGATTACCTGATGACTCGTATGCGTTCTGGTG 0206

Query 601 CAGATGGTGACTCGTACATGAAATGTTTCGATGAACCCGAAAGAGACCAC'TTCGTATATG 660
 |||

Sbjct 10207 CAGATGGTGACTCGTACATGAAATGTTTCGATGAACCCGAAAGAGACCAC'TTCGTATATG 0266

Query 661 CTTGGGTAGAGCCATTCCCTTGATGAAGAGGGTTATCCTAATAATGAAC'TTGTTGGTAAGA 720
 |||

Sbjct 10267 CTTGGGTAGAGCCATTCCCTTGATGAAGAGGGTTATCCTAATAATGAAC'TTGTTGGTAAGA 0326

Query 721 CTCGCTGGTTTGTATTTCAGGAAGGTGTCATGTATTCTGATTGGGACAGAGATGTTATTC 780
 |||

Sbjct 10327 CTCGCTGGTTTGTATTTCAGGAAGGTGTCATGTATTCTGATTGGGACAGAGATGTTATTC 0386

Query 781 TTCGTCAATTCCCATTAGAAATTCACAGACATATACCTTTATTTCTGGTACAATTGATG 840
 |||

Sbjct 10387 TTCGTCAATTCCCATTAGAAATTCACAGACATATACCTTTATTTCTGGTACAATTGATG 0446

Query 841 ATAATCCAATTCTGGACTTTATCGAACCAGAAATATCGTGGTAGACTTGAAAACAATACAC 900
 |||

Sbjct 10447 ATAATCCAATTCTGGACTTTATCGAACCAGAAATATCGTGGTAGACTTGAAAACAATACAC10506

Query 901 CTATCAACGTTGCAAGACTTCGTTATGGTAACTGGAAAGCAAGGGCTGAAGGTTCAAGCT 960
 |||

Sbjct 10507 CTATCAACGTTGCAAGACTTCGTTATGGTAACTGGAAAGCAAGGGCTGAAGGTTCAAGCT10566

Query 961 ATTTTGATAGAAGATGGTG 979
 |||

Sbjct 10567 ATTTTGATAGAAGATGGTG 10585

terminase large subunit (9585..11189)

/note="gp016"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="terminase large subunit"
 /protein_id="AEJ81275.1"
 /db_xref="GI:339507712"

/translation="MNLTEVKQQRLRDVQAVLAGTIKLEPAVVKLLAKYGKPVKLLPSQILTRKYTLEEVELL
 MRLLTNKKFIAPQPGSQEALLNTTDDITLYGGAAGSGKTVAILMDALQHKDDPDYYAVFFRKNTTQLSGG
 LWPAACKLYGMFGGVPHEQKMVIQFPGASIKFSYMELEKHAEAHQGIEYSAIYWDEFTHFSQSQVDYLM
 TRMRSGADGDSYMKCSMNPERDHFVYAWVEPFLDEEGYPNNELCGKTRWFWVIQEGVMYSWDWRDVLIR
 QFPLEIPQTYTFISGTIDNPIIDFIEPKYRGRLENNTPINVARLRYGNWKARAEGSSYFDRRWQCIVDSVDE
 PASRVRAWDLAATLPSELNPDWDTAGVKMSKGQKTGFYIEHVKRFRDRPAGVEEGIQETAKADTSKVE
 IFIPQDPGAAGKSYASGLIRKLALAGFRARARTTNKDKVTRFAPFSAVAESGHVKVVRGDWNDAYFTELE
 GFTGDGKRKDDQVDATSDAFQSLNSRGLVKVPSMDNSLDMRLRDNPFAGIKTI"

M17. A H2A fágizolátum Mu-F/R primerpárral felszaporított DNS szakaszának szekvencia-analízise

A H2A Mu-szerű profág proteint kódoló régiójának nukleotid sorrendje

TTGAGCTAGGTTTCATGAGAAGGTCATCAAAGGTTTACAAAGGGTTGAAAAGACTGCTATGGCAGCAG
CAACCCGAATTGAAAACCGCCTCAACAAAGCCGTATCAATCGACGGGAACAAGTCTAAAGCTGGTTTC
GATAAGATTGTACGAAACGCTCAAACCGCTGCTAACAGTGTTAACAGGGCTTTCTCCAAGAGTATGGA
TTTTGGGAATGCTGGTAAGGCTTCCGTGAAGGGCGTAGAAACGGCTGCAAGAGCCTCTGCAAAGCGTA
TTAAGAAAGAGATGCAGGATGCCTTTAACGTTTCGTGGTAATGGGCGTGAGGCGGTTCTGGAGGCTCT
GGAGGGGGTAGACCTCCGAGAGGTGGTAGCGGTAGTGGTGGAGGTTCTTCTAACTCTGCTGCACGTTC
AATTGAAAGAACCTACTCAAACAACCTACTATTCTGGTCTGACACGTAACTGGAAAGTATGGGTGTTC
GTGGTCAGGGTCTTGCTGGTAAGTTTCGTTTCAGACATTACAGGTCTTCGTGATGAAGCACTGAAAAAC
CCTGCAACGAACTTAGCAAACATAACATGCAAGTCAAGGCATCTATCGACGCTATGAAGCGTTGGAT
TTCTGCTGAGAATGCTGAGGCTAAGGCTCGTCGTGAACAGACATGGCTTCTGGGACAGAG

Szekvencia összehasonlítás

Erwinia phage vB_EamM-M7, complete genome
669/673(99%)

Query 1	TTGAGCTAGGTTTC	ATGAGAAGGTCATCAAAGGTTTACAAAGGGTTGAAAAGACTGCTA	59
Sbjct 20894	TTGAGCTAGGTTTCAATGAGAAGGTCATCAAAGGTTTACAAAGGGTTGAAAAGACTGCTA		20953
Query 60	TGGCAGCAGCAACCCGAATTGAAAACCGCCTCAACAAAGCCGTATCAATCGACGGGAACA		119
Sbjct 20954	TGGCAGCAGCAACCCGAATTGAAAACCGCCTCAACAAAGCCGTATCAATCGACGGGAACA		21013
Query 120	AGTCTAAAGCTGGTTTCGATAAGATTGTACGAAACGCTCAAACCGCTGCTAACAGTGTTA		179
Sbjct 21014	AGTCTAAAGCTGGTTTCGATAAGATTGTACGAAACGCTCAAACCGCTGCTAACAGTGTTA		21073
Query 180	ACAGGGCTTTCTCCAAGAGTATGGATTTTGGGAATGCTGGTAAGGCTTCCGTGAAGGGCG		239
Sbjct 21074	ACAGGGCTTTCTCCAAGAGTATGGATTTTGGGAATGCTGGTAAGGCTTCCGTGAAGGGCG		21133
Query 240	TAGAAACGGCTGCAAGAGCCTCTGCAAAGCGTATTAAGAAAGAGATGCAGGATGCCTTTA		299
Sbjct 21134	TAGAAACGGCTGCAAGAGCCTCTGCAAAGCGTATTAAGAAAGAGATGCAGGATGCCTTTA		21193
Query 300	ACGTTTCGTGGTAATGGGCGTGAGGCGGTTCTGGAGGCTCTGGAGGGGTAGACCTCCGA		359
Sbjct 21194	ACGTTTCGTGGTAATGGGCGTGAGGCGGTTCTGGAGGCTCTGGAGGGGTAGACCTCCGA		21253
Query 360	GAGGTGGTAGCGGTAGTGGTGGAGGTTCTTCTAACTCTGCTGCACGTTCAATTGAAAGAA		419
Sbjct 21254	GAGGTGGTAGCGGTAGTGGTGGAGGTTCTTCTAACTCTGCTGCACGTTCAATTGAAAGAA		21313
Query 420	CCTACTCAAACAACCTACTATTCTGGTCTGACACGTAACTGGAAAGTATGGGTGTTTCGTG		479
Sbjct 21314	CCTACTCAAACAACCTACTATTCTGGTCTGACACGTAACTGGAAAGTATGGGTGTTTCGTG		21373
Query 480	GTCAGGGTCTTGCTGGTAAGTTTCGTTTCAGACATTACAGGTCTTCGTGATGAAGCACTGA		539
Sbjct 21374	GTCAGGGTCTTGCTGGTAAGTTTCGTTTCAGACATTACAGGTCTTCGTGATGAAGCACTGA		21433
Query 540	AAAACCTGCAACGAACTTAGCAAACATAACATGCAAGTCAAGGCATCTATCGACGCTA		599
Sbjct 21434	AAAACCTGCAACGAACTTAGCAAACATAACATGCAAGTCAAGGCATCTATCGACGCTA		21493

```

Query 600      TGAAGCGTTGGATTTCTGCTGAGAATGCTGAGGCTAAGGCTCGTCGTGAACAGACATGGC 659
                |||
Sbjct 21494    TGAAGCGTTGGATTTCTGCTGAGAATGCTGAGGCTAAGGCTCGTCGTGAACAGACATGGC21553

Query 660      TTCTGGGACAGAG 672
                |||
Sbjct 21554    TTCTGGGACAGAG 21565

```

M18. A H5K fágizolátum Mu-F/R primerpárral felszaporított DNS szakaszának szekvencia-analízise

A H5K Mu-szerű profág proteint kódoló régiójának nukleotid sorrendje

```

GTTTCATGAGAAGGTCATCAAAGGTTTACAAAGGGTTGAAAAGACTGCTATGGCAGCAGCAACCCGA
ATTGAAAACCGCCTCAACAAAGCCGTATCAATCGACGGGAACAAGTCTAAAGCTGGTTTCGATAAGAT
TGTACGAAACGCTCAAACCGCTGCTAACAGTGTTAACAGGGCTTTCTCCAAGAGTATGGATTTTGGGA
ATGCTGGTAAGGCTTCCGTGAAGGGCGTAGAAACGGCTGCAAGAGCCTCTGCAAAGCGTATTAAGAA
AGAGATGCAGGATGCCTTTAACGTTTCGTGGTAATGGGCGTGAGGCGGTTCTGGAGGCTCTGGAGGG
GGTAGACCTCCGAGAGGTGGTAGCGGTAGTGGTGGAGGTTCTTCTAACTCTGCTGCACGTTCAATTGA
AAGAACCTACTCAAACAACCTACTATTCTGGTCTGACACGTAAACTGGAAGTATGGGTGTTCTGGTGC
AGGGTCTTGCTGGTAAGTTTCGTTTCAGACATTACAGGTCTTCGTGATGAAGCACTGAAAAACCTGCA
ACGAAGTCTAGCAAACTATAACATGCAAGTCAAGGCATCTATCGACGCTATGAAGCGTTGGATTTCTGC
TGAGAATGCTGAGGCTAAGGCTCGTCGTGAACAGACATGGCTTCTGGGACAGAGA

```

Szekvencia összehasonlítás

Erwinia phage vB_EamM-M7, complete genome

Sequence ID: gb|HQ728263.1|Length: 84694Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 20853 to 21556GenBankGraphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1247 bits(1382)	0.0	699/704(99%)	0/704(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAGGTAGTGAATGGCTAAATACACAGTTGATGAATTCGTAATTGAGCTAGGGTTTCATGA 60			
Sbjct 20853	GAGGTAGTGAATGGCTAAATACACAGTTGATGAATTCGTAATTGAGCTAGGTTTCAATGA20912			
Query 61	GAAGGTCATCAAAGGTTTACAAAGGGTTGAAAAGACTGCTATGGCAGCAGCAACCCGAAT 120			
Sbjct 20913	GAAGGTCATCAAAGGTTTACAAAGGGTTGAAAAGACTGCTATGGCAGCAGCAACCCGAAT20972			
Query 121	TGAAAACCGCCTCAACAAAGCCGTATCAATCGACGGGAACAAGTCTAAAGCTGGTTTCGA 180			
Sbjct 20973	TGAAAACCGCCTCAACAAAGCCGTATCAATCGACGGGAACAAGTCTAAAGCTGGTTTCGA21032			
Query 181	TAAGATTGTACGAAACGCTCAAACCGCTGCTAACAGTGTTAACAGGGCTTTCTCCAAGAG 240			
Sbjct 21033	TAAGATTGTACGAAACGCTCAAACCGCTGCTAACAGTGTTAACAGGGCTTTCTCCAAGAG21092			
Query 241	TATGGATTTTGGGAATGCTGGTAAGGCTTCCGTGAAGGGCGTAGAAACGGCTGCAAGAGC 300			
Sbjct 21093	TATGGATTTTGGGAATGCTGGTAAGGCTTCCGTGAAGGGCGTAGAAACGGCTGCAAGAGC21152			

Query 301 CTCTGCAAAGCGTATTAAGAAAAGAGATGCAGGATGCCTTTAACGTTTCGTGGTAATGGGCG 360
 |||||
 Sbjct 21153 CTCTGCAAAGCGTATTAAGAAAAGAGATGCAGGATGCCTTTAACGTTTCGTGGTAATGGGCG21212

Query 361 TGGAGGCGGTTCTGGAGGCTCTGGAGGGGGTAGACCTCCGAGAGGTGGTAGCGGTAGTGG 420
 |||||
 Sbjct 21213 TGGAGGCGGTTCTGGAGGCTCTGGAGGGGGTAGACCTCCGAGAGGTGGTAGCGGTAGTGG21272

Query 421 TGGAGGTTCTTCTAACTCTGCTGCACGTTCAATTGAAAGAACCTACTCAAACAACACTACTA 480
 |||||
 Sbjct 21273 TGGAGGTTCTTCTAACTCTGCTGCACGTTCAATTGAAAGAACCTACTCAAACAACACTACTA21332

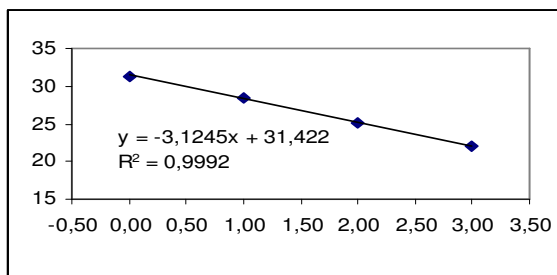
Query 481 TTCTGGTCTGACACGTAAACTGGAAAGTATGGGTGTTTCGTGGTCAGGGTCTTGCTGGTAA 540
 |||||
 Sbjct 21333 TTCTGGTCTGACACGTAAACTGGAAAGTATGGGTGTTTCGTGGTCAGGGTCTTGCTGGTAA21392

Query 541 GTTTCGTTTCAGACATTACAGGTCTTCGTGATGAAGCACTGAAAAACCCTGCAACGAACCTT 600
 |||||
 Sbjct 21393 GTTTCGTTTCAGATATTACAGGTCTTCGTGATGAAGCACTGAAAAACCCTGCAACGAACCTT21452

Query 601 AGCAAACCTATAACATGCAAGTCAAGGCATCTATCGACGCTATGAAGCGTTGGATTTCTGC 660
 |||||
 Sbjct 21453 AGCAAACCTATAACATGCAAGTCAAGGCATCTATCGACGCTATGAAGCGTTGGATTTCTGC21512

Query 661 TGAGAAATGCTGAGGCTAAGGCTCGTCGTGAACAGACATGGCTTC 704
 |||||
 Sbjct 21513 TGAGAAATGCTGAGGCTAAGGCTCGTCGTGAACAGACATGGCTTC 21556

M19. Az 'Idared' fajtán végzett (2012) virágkísérletek valós idejű („real-time”) PCR vizsgálata során alkalmazott kalibrációs görbe és a hozzátartozó adatok.



	átlag	szórás	átlag	szórás
H2A+Ea	30,09	1,16	2,67	0,10
H5K+Ea	29,42	1,60	4,36	0,24
H7B+Ea	30,76	1,63	1,62	0,09
Kombináció	30,47	1,27	2,01	0,08
Ea	29,18	1,35	5,21	0,24
H2O	33,65	2,30	0,19	0,01

hígítás: 10x

0	konc	log(konc)	cp
1/7 -2	1000,00	3,00	22,07
1/7 -3	100,00	2,00	25,06
1/7 -4	10,00	1,00	28,45
1/7 -5	1,00	0,00	31,36

$$y = ax + b$$

$$a: -3,12$$

$$b: 31,42$$

11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék ezúton is köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Schwarczinger Ildikónak, akinek kutatási témájához csatlakozhattam. Hálásan köszönöm a sok szakmai és baráti segítségét, mely nélkül nem készülhetett volna el ez a munka. Korábbi témavezetőmnek és osztályvezetőnknek, Dr. Süle Sándornak is hálával tartozom azért, mert munkatársnak és egyben PhD hallgatónak fogadott és mindvégig támogatott. Hálás köszönettel tartozom Dr. Hevesi Marikának, korábbi társtémavezetőmnek, akihez bármikor fordulhattam szakmai segítségéért. Köszönet illeti Dr. Tóth Magdolnát, aki a kezdetektől támogatta a kutatómunka és a dolgozat elkészültét. Dolgozatom nem jöhetett volna létre Dr. Király Lóránt szakmai és emberi támogatása nélkül. Köszönöm Pázmándi Ildikónak, Szani Zsoltnak és Novák Edinának a kísérleti anyagok egy-egy részének begyűjtését. Köszönettel tartozom többek között Klaus Geider professzor úrnak és Dr. Bozsó Zoltánnak az egyes baktériumtörzsek biztosításában, Dr. Oros Gyulának és Dr. Pogány Miklósnak az adatok statisztikai értékelésében nyújtott segítségükért. Őszinte hálával tartozom Dr. Fodor Józsefnek és Köblös Gabriellának a molekuláris munkákban nyújtott szíves segítségükért valamint Dr. Mergenthaler Emesének és Rohm Csillának a folyamatos támogatásukért. Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak, az intézet vezetőségének és minden kedves kollégámnak, akik biztattak és segítségüket nyújtották ahhoz, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

A vizsgálatok a 75280 számú PD OTKA pályázat támogatásával készültek.