



Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Kolozsváriné Nagy Judit

Témavezető: Dr. Schwarczinger Ildikó, PhD

Társtémavezető: Dr. Tóth Magdolna, DSc

MTA ATK
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

1. BEVEZETÉS

Az almatermésűek tűzelhalása a *Rosaceae* családba tartozó számos növényfaj legsúlyosabb baktériumos 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 kórokozó az 1950-es évek közepén jelent meg először Európában, Magyarországon 1995-ben azonosították elsőként egy Nyárlőrinc térségében levő alma ültetvényből (Hevesi 1996).

Jelenleg e betegség elleni hatékony védekezés – az eddigi legeredményesebb védekezési módnak, a virágzaskori 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.

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, Nagy és mtsai. 2012). Az *E. amylovora* baktérium hazánkban karantén kórokozó, ezért szabadföldi kísérletek végzése e kórokozóval nem engedélyezett. A Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet Biotechnológiai osztályának akkreditált *Erwinia*-laboratóriumában végzett *in vitro* kísérleteink 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.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a következő célokat tűztük ki:

- *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 fágtörzssel 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. ANYAG ÉS MÓDSZER

Fágizolátumok, fágtörzsek és tesztbaktériumok

Fágizolátumainkat Magyarország különböző földrajzi területeiről, tűzelhalás tüneteit mutató különböző gazdanövényekről (alma, körte és birs) izoláltuk.

Plakkmorfológiai és molekuláris összehasonlító vizsgálatainkhoz referenciatörzsként 4 fágtörzset (Φ Ea1h, Φ Ea100, Φ Ea104, Φ Ea116) használtunk, amelyeket az Amerikai Egyesült Államokban izoláltak (**Ritchie és Klos 1975, Schnabel és Jones 2001**).

Vizsgálatainkba 27 magyarországi *E. amylovora* izolátumot, 9 egyéb *E. amylovora* törzset és 4 más *Erwinia* fajt (*E. billingiae* Eb661, *E. persicina*, *E. rhapontici* CFBP 3618T, *E. tasmaniensis* Et1/99), továbbá 6 *Pantoea agglomerans* izolátumot és törzset, 3 *Pantoea* fajt, valamint 8 egyéb baktériumfajt, illetve törzset (*Agrobacterium tumefaciens* C58, *Agrobacterium vitis* F2/5, *Escherichia coli* DH5 α , *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* H9, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 19111, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atroseptica* D2) vontunk be.

Fágizolálás és tisztítás

Az izolálást **Crosse és Hingorani (1958)** módosított módszerével végeztük, a fágok felszaporításához hazai *E. amylovora* izolátumokat (Ea12, Ea18, Ea26) használva. A fágok kimutatása, az izolátumok tisztítása és titerének meghatározása az Adams-féle dupla agar réteg és az Adams-féle cseppteszt módosított módszereivel történt (**Adams, 1959**).

A fágizolátumok jellemzése

Plakkmorfológia

Az izolálás során nyert 22 bakteriofág izolátumot a módosított Adams-féle dupla agar réteg módszerrel a tesztbaktériumot (EaCFBP1430 *E. amylovora* törzs) tartalmazó, 1% szacharózzal kiegészített, LBA fedő lemezre szélesztettük. Végül az egy napos, 28°C-on történő inkubációt követően kialakult plakkok mérete és a plakkokat körülvevő sáv szélessége alapján jellemeztük az izolátumokat.

Fágpertikum morfológia

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 megtisztított friss fágizátumokat (19 izolátumot) tartalmazó mintákat negatív festési eljárással, **Gill és mtsai. (2003)** módszere alapján, Morgagni 268D típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) vizsgáltuk.

PCR vizsgálat

Huszonegy fágizolátumunk PCR vizsgálataiban az EPS depolimeráz, a holin, a lizozim, a termináz, a peptidáz és a Mu-szerű profág proteinekre, a Φ Ea1h, Φ Ea100 és Φ Ea104 amerikai fágtörzsek meghatározott genomi szakaszaira, valamint a Φ Ea1h, illetve a Φ EaH2 ismert genomú hazai fágtörzs kapszid génjeire, az Ea7/74 fágtörzs *amsF* génjére és a Φ EaH2 *amsF* gén-szerű régiójára specifikus indító-szekvenciákat használtunk. A polimeráz láncreakcióhoz az egyes megtisztított fáguszuspenziókból nátrium-azidos (NaN_3) feltárással nyert DNS szolgált templátként.

Szekvencia-analízis

Eddigi vizsgálataink hét hazai fágizolátumunk 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. Az előkészített minták szekvenciáit meghatároztattuk, a kapott nukleotid sorrendeket kiértékeltek, majd összevetettük a nemzetközi adatbázisban található homológ szekvenciákkal.

Gazdakörvizsgálat

Tizenhat hazai fágizolátumunkat vizsgáltuk. Adams-féle módosított csepptesztet alkalmazva állapítottuk meg az adott tesztbaktériumok (10^8 CFU ml⁻¹) fággal (10^6 PFU ml⁻¹) szembeni fogékonyságát. 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.

Fágok és fág kombinációk *Erwinia amylovora* baktériumra gyakorolt hatásának *in vitro* vizsgálata

Fág hatásvizsgálat folyadékkultúrában

Üvegcsővekbe kimért LB tápoldatba 1 ml fáguszuspenziót (10^{10} PFU ml⁻¹), illetve az adott fáguszuspenziók kombinációjának 1:1 arányú keverékét és 1 ml tesztbaktériumot (sztreptomycin-rezisztens *E. amylovora* Ea1/79Sm törzs, 10^5 CFU ml⁻¹) mértünk be, majd 28°C-on 22 órán át rázattuk. A folyékony kultúrák fénytörését 600 nanométeren mértük, majd a kapott OD (optical density) értékek (OD₆₀₀) alapján értékeltük a kísérletet.

Fág hatásvizsgálat alma-és birsvirágon

A folyadékkultúras vizsgálatban leghatékonyabbnak bizonyult fágizolátumokat (H2A, H5K és H7B) és azok hármas kombinációjának (H2A+H5K+H7B) baktériumszám-csökkentő hatását teszteltük különböző tűzelhalás-fogékonyaságú almafajták ('Idared', 'Golden delicious Reinders', 'Gala Schniga', 'Pinova') és egy fogékony birsfajta ('Berecki') virágain. A ballon fenofázisban gyűjtött, egyenként 1%-os szacharóz oldattal feltöltött kis csövekbe helyeztük, majd kb. 12 óra alatt kinyílt virágok bibéjére egy időben pipettával juttattuk ki a fágos kezeléseket során a fágizolátum (10^{12} PFU ml⁻¹) és baktérium-szuspenzió (*E. amylovora* Ea1/79Sm törzs, 5×10^5 CFU ml⁻¹) 1:1 arányú keverékét 20 µl végtérfogatban és 4 napig, 80%-os páratartalom mellett, növénynevelő kamrában inkubáltuk őket. A kezelésenkénti mintaszám 15 (pozitív kontrollnál 20) volt.

Az inkubációt követően a virágokról eltávolítottuk a szirmokat és a virágszárat és bibékkel lefelé, egyenként steril Eppendorf csövekbe helyeztük azokat. Egy ml steril bidesztillált vizet pipettáztunk rájuk, majd 10 perc 22-23°C-on való inkubációt követően centrifugáltuk. A baktérium-visszaizolálási folyamat végén nyert vizes szuszpenziót összekevertük és hígítottuk, majd 50 µl 10000-szeres hígítású vizes baktérium-szuspenziót 500ppm sztreptomycin tartalmú LBA (LBA_{500Sm}) táptalaj felszínére pipettáztunk, majd üvegbottal szélesztettük. Két nap, 28°C-on, sötétben való inkubációt követően a kialakult telepek száma alapján értékeltük az adott kísérletet.

Az 'Idared' fajta 2012-es mintáiban az *E. amylovora* titerét valós idejű PCR alkalmazásával is vizsgáltuk. A viszonyítási alapul szolgáló *E. amylovora* kontroll hígításokat és a kezelt virágokról a visszaizolálási procedúra végén nyert mintákat Na-aziddal feltárva jutottunk DNS templáthoz. A PCR reakcióhoz az *E. amylovora*-ra jellemző pEA29 plazmidra specifikus P29TF (5' CACTGATGGTGCCGTTG 3') és P29TR (5'

CGCCAGGATAGTCGCATA 3') primereket (Salm és Geider 2004) használtuk. A kapott eredményeket összevetettük a baktériumtelep-számlálási adatokkal.

Fág hatásvizsgálat éretlen körteszeleten

A virágkísérletek során is tesztelt fágizolátumok és kombinációjuk baktérium-visszaszorító hatását teszteltük három körtefajta ('Conference', 'Dr. Guyot Gyula', 'Erdei vajkörte') zöld gyümölcszeletein. A 0,5 cm vastagságúra vágott körteszeleteket (6 darab/kezelés), üveg Petri csészékben elhelyezve az adott kezelésnek megfelelő 10 ml fáguszuszpenzióban (10^{12} PFU ml⁻¹), vízben, illetve sztreptomycin oldatban (100 ppm) áztattuk, oldalanként 5-5 percig, majd mesterségesen inokuláltuk a kórokozó baktérium (Ea1/79 vad típusú *E. amylovora* törzs) 10 µl-ét (5×10^5 CFU ml⁻¹) a szeletek közepére pipettázva. A szeleteket 4 napig inkubáltuk a lefedett Petri csészékben, növénynevelő kamrában.

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.

Fág hatásvizsgálat dísznövényeken

A vizsgálatban a H2A, H4A és H5A fágizolátumok, valamint azok hármas kombinációjának (H2A+H4A+H5A) baktérium-visszaszorító hatását teszteltük *E. amylovora*-ra fogékony tűztövis, kerti madárbirs, házi berkenye, és egybibés galagonya teljes virágzásban lemetszett vesszőin. A vízbe helyezett lemetszett vesszőket az egyes fágizolátumokkal külön-külön, illetve ezek kombinációjának vizes szuszpenziójával (10^4 PFU ml⁻¹), majd 20 perc elteltével baktérium-szuszpenzióval (*E. amylovora* Ea1/79Sm, 10^9 CFU ml⁻¹) permeteztük és 4 napig, növénynevelő kamrában inkubáltuk.

A fágkezelések hatása a szerint került értékelésre, hogy 100 véletlenszerűen kiválasztott virágból hány darabnál volt megfigyelhető vacokbarnulás (fertőzés %).

A fágkezelés hatékonyságának potenciális fokozására irányuló vizsgálatok: fágok növénybe jutása, transzlokációja és az *E. amylovora* okozta tünetekre gyakorolt hatása

A fágok transzlokációs képességének alma csíranövényekben történő vizsgálata – előkísérlet

A H5K fágizolátum gyökéren keresztül való felvételét teszteltük steril körülmények között nevelt öt hónapos almamagoncokon. A steril bidesztillált vízbe helyezett (hidroponikus kultúra), illetve a növénynevelő perlites közegben maradt tesztnövényekhez (5 növény/kezelés) a fágos kezeléseknél vizes fáguszuspenziót (10^{13} PFU ml⁻¹) adtunk. Az egyszeri kezelést követően két időpontban vettünk mintát, a növények felső szárrészét és leveleit együttesen feltárva. Számolva azzal, hogy a kijuttatott fáguszuspenzió titere esetleg a közvetlen visszaizolálással kimutatható szint alá süllyed, a kétnapos inkubáció után vett minták 200-200 µl-ét további négy napig, baktériumkultúrával (*E. amylovora* Ea1/79Sm) LB_{500Sm} tápoldatban együtt rázattuk.

A fágok kimutatására az Adams-féle cseppteszt módosított változatát használtuk.

Fágok szállítódása alma csíranövényekben

A fáguszuspenziókat (ΦEa104 és H5K, 10^{13} PFU ml⁻¹) kétféle módon juttattuk ki a tesztnövényekhez (17-18 hetes almamagoncok): a perlit felszínére pipetázva (10 ml/növény), illetve a növény föld feletti részére permetezve (500 µl/növény). A kezelésenkénti 15 növényből 3-3 szolgált mintául, 1, 2, 3, 5 és 7 nappal a kezelést követően. 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 gyökérszete lett feltárva SM pufferben (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) steril mozsárban elhomogenizálva az egyes mintákat.

A fágok kimutatása az Adams-féle cseppteszt módosított változatával történt közvetlenül a mintavétel után, illetve további két napon át tartó fág-felszaporítási eljárást követően. Továbbá a szélesztéssel plakkot adó pozitív mintákban a fágok jelenlétét PCR módszerrel is vizsgáltuk. A H5K fágizolátum kimutatására egy, a termináz génre specifikus indító-szekvenciapárt, míg a ΦEa104 fág törzs esetében egy specifikus, általunk tervezett primerpárt használtunk.

A fágok hatása az E. amylovora okozta tünetekre - alma csíranövények gyökérszónájához, illetve föld feletti részeire juttatva ki a fágokat

A transzlokációs kísérlethez hasonló kétféle módon juttattuk ki a fágokat húsz hetes, perlitben nevelt almanövényekhez. Másnap a negatív kontrollok kivételével mesterségesen megfertőztük a magoncokat: a 2-3. legfiatalabb levél hónaljába baktérium-szuszpenziót (Ea1/79Sm *E. amylovora* törzs, 10 µl, 5×10^5 CFU ml⁻¹) pipettáztunk, majd steril injekciós tűvel a baktériumcseppen keresztül megszűrtük a növény szövetét. Fágizolátumként (ΦEa104 és H5K,) három növény vett részt egy-egy kezelésben mindkét (10^3 , illetve 10^{13} PFU ml⁻¹) alkalmazott fáguszuszpenzió-koncentráció esetén. A kialakult betegségi tünetek mértékét a fertőzést követő 5. és 13. napon, 0-5-ig terjedő bonitálási skála alapján értékeltük, ahol az egyes értékek a következőket jelentették: (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.

A fágok hatása az E. amylovora okozta tünetekre - a fágokat alma csíranövények sziklelevelébe injektálva

A fágok vizes szuszpenzióját (ΦEa104 és H5K, 10^{13} PFU ml⁻¹) nyolc hetes alma csíranövények egyik sziklelevelébe injektáltuk. Közvetlenül ez után (a negatív kontrollok kivételével) megfertőztük a növényeket 10 µl baktérium szuszpenziót (Ea1/79Sm *E. amylovora* törzs, 10^6 CFU ml⁻¹) cseppentve a fágok oldatával teljesen átitatott sziklevek színére, majd a cseppen keresztül ismét megszűrtük a növény szövetét. Egy öt napos inkubáció után a szikleveleken kialakult tűzelhalás tünetek mértékét megfigyeltük és 0-5-ig terjedő bonitálási skála alapján értékeltük: (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.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Fágizolálás

Összesen 22 fágizolátummal rendelkezünk, melyek közül eddig 16 izolátum lett széleskörűen is megvizsgálva.

A fágizolátumok jellemzése

Plakkmorfológia

A fágizolátumok által tesztbaktériumon képzett tarfoltok morfológiája a fágok egyik jellemzője, melyet - többek között - **Gill és mtsai. (2003)** is részletesen vizsgáltak. Izolátumaink eltérő méretű, 0,5 – 7,1 mm átmérőjű plakkokat formáltak a tesztbaktériumot tartalmazó lágyagar rétegen és a tarfoltokat övező sáv - megléte esetén - 0,1-5,0 mm közötti átmérőjű volt a különböző fágizolátumoknál. A legkisebb plakkokat a H10A (0,5 – 0,6 mm) képezi, míg a tarfoltokat övező sávval együtt a H5K plakkjai a legkisebbek, s e tekintetben kevéssel maradnak el a Φ Ea116-os amerikai fágtól. Az egyik legnagyobb tarfoltja a H7B jelzésű fágnek van, melynek plakkja körül szélesebb sáv húzódik, mint a vizsgálatunkban szereplő legnagyobb plakkot adó amerikai Φ Ea100 törzs esetében, ami a H7B nagyobb lítikus enzimaktivitását jelzi.

Fágpartikulum morfológia

Az általunk Magyarországról izolált *E. amylovora* fágokat a *Caudiovirales* renden belül a C1, illetve A1 morfotípusoknak megfelelően a *Podoviridae*, illetőleg a *Myoviridae* családokba soroltuk (**Ackermann 2007**). A magyar fágok közül a legkisebb a H11-es jelzésű fág, ami kisebb a szakirodalomból ismert német és az amerikai fágoknál. A legnagyobb a H4A, amely méreteit tekintve meghaladja az előbb említett külföldi törzseket. 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. Hazai izolátumaink eltérnek a *Siphoviridae* családba tartozó, irodalomból ismert két magyar fágtörzstől [Φ EaH1 (**Meczker és mtsai. 2014**), Φ EaH2 (**Dömötör és mtsai. 2012**)].

PCR vizsgálat

A PCR reakciók eredményei alapján a vizsgált magyar fágokat 4 nagy csoportra osztottuk és megállapítottuk, hogy azok nem azonosak a vizsgálatokba bevont 4 amerikai *E. amylovora* fággal. Az ismert genomú Φ EaH2 magyar fágtörzs *amsF*-szerű szakaszára tervezett, illetve kapszid proteint kódoló génjére specifikus primerpárokkal nem kaptunk PCR terméket a saját izolátumainknál.

Szekvencia-analízis

A fágizolátumok (H4A, H4B, H5A, H5B, H6A, H7A, H9B) depolimeráz génjének bázis sorrendje 98-99%-ban egyezést mutat a Φ Ea1h (Müller és mtsai. 2011b) depolimeráz génjének meghatározott részének a bázis sorrendjével. 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.

Gazdakörvizsgálat

Tesztelt fágizolátumaink a vizsgálatban szereplő amerikai fágtörzsekhez képest szélesebb gazdakörrel rendelkeznek. Izolátumaink közül a H1B, H2A, H2B, H4A, H7A és H7B jelzésűek lizálták a legtöbb tesztelt baktérium-izolátumot, illetve törzset, míg az amerikai fágok közül a Φ Ea116-os volt a leghatékonyabb. Ugyanakkor a hazai *E. amylovora* izolátumok mindegyike fogékony volt a fágizolátumokkal szemben függetlenül azok származásától. 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.

Fágok és fág kombinációk *Erwinia amylovora* baktériumra gyakorolt hatásának *in vitro* vizsgálata

Fág hatásvizsgálat folyadékkultúrában

A fág és a kórokozó szuszpenzióját tartalmazó tápoldatban az inkubációs idő végére lecsökkent optikai sűrűség értékeket mértünk, hasonlóan Schnabel és Jones (2001) kísérletéhez. A tesztelt 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 ΦEa100 hatása tért el szignifikánsan az erviniás kontrollétól. Ismerve azt, hogy a fágok kombinációban alkalmazva hatékonyabbak lehetnek, mint önállóan (**Schnabel és mtsai. 1999**), a három legeredményesebb fágizolátumot különböző kombinációkban is tesztelve a H2A+H5K+H7B fágkocktél bizonyult a legjobbnak, ez esetben kaptuk a legalacsonyabb OD₆₀₀ értéket a kezeletlen kontrollhoz képest, mindazonáltal az egyes kezelések között csak két esetben volt szignifikáns a különbség.

Fág hatásvizsgálat alma-és birsvirágon

Az *E. amylovora* szaporodását folyadékultúrában 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. A telepszámlálással nyert eredményeink ('Idared' fajta, 2012) kvantitatív PCR technikával is megerősítést nyertek.

Fág hatásvizsgálat éretlen körteszeleten

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. 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. Azonban a körteszeletekre alkalmazott kezelések kevésbé voltak hatásosak, mint a virágokon; hasonlóan **Müller és mtsai. (2011a)** megfigyeléseihez.

Fág hatásvizsgálat dísznövényeken

Tűzelhalásra fogékony négy dísznövényfaj virágain tesztelve a H2A, a H4A és a H5A fágizolátum és kombinációjuk hatását a fágkocktél 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 fágkocktél nem csökkentette le jelentős mértékben a virágnekrózis mértékét.

A fágkezelés hatékonyságának potenciális fokozására irányuló *in vitro* vizsgálatok: fágok növénybe jutása, transzlokációja és az *E. amylovora* okozta tünetekre gyakorolt hatása

A fágok transzlokációs képességének alma csíranövényekben történő vizsgálata – előkísérlet

A gyökérszónához kijuttatott vizes fáguszuspenzióval (H5K) történő egyszeri kezelés után már két nappal fágokat detektáltunk a növények felső szárrészében és leveleiben. 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 perlitben 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 kezeléssel származó növényi mintából ki tudtuk mutatni a fágok jelenlétét. Valamennyi vizes kontroll fágmentesnek bizonyult.

Fágok szállítódása alma csíranövényekben

A fáguszuspenziók (H5K, illetve Φ Ea104) almamagoncokhoz történő egyszeri kijuttatása után ki tudtuk mutatni a fágok jelenlétét mind a növény föld feletti részeiből (a gyökérszóna kezelését követően), mind pedig a gyökérszónából (a növények alsó-, ill. felső szárrészének permetezését követően). Az, hogy mindkét általunk tesztelt *E. amylovora*-specifikus fág az adott körülmények között képes volt penetrálódni és a teszt növény távolabbi részeibe elszállítódni, más bakteriofág-növény kapcsolat esetében már korábban igazolást nyert (**Rao és Srivastava 1973, Ward és Mahler 1982, Iriarte és mtsai. 2012**). Mindkét fágizolátum használatakor a kezelés utáni első napon sikerült a legtöbb növényi mintából fágot visszaizolálni. A kijuttatott fáguszuspenzió sűrűsége azonban jelentős mértékben lecsökkent a közvetlen mintavétellel feltárt, életképes fágot tartalmazó minták esetében. A felszaporításos módszerrel vizsgált, szélesztéskor plakkot adó pozitív mintákban a fágok *in planta* jelenlétét PCR módszerrel is sikerült igazolnunk: a H5K fág esetében 11 mintából 7 mintában, a Φ Ea104 fágnál 13 mintából 10 mintában.

A fágok hatása az E. amylovora okozta tünetekre - alma csíranövények gyökérszónájához, illetve 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 tüzelhalás tünetek mértéke a kezeletlen kontrollhoz képest. A két koncentráció hatását összevetve a második kísérletben a $\Phi\text{Ea}104$ fág, 10^{13} PFU ml⁻¹ koncentrációban szignifikánsan mérsékelte a tüneteket a csíranövényeknek mind a gyökérszónája felé, mind pedig a lombozatára történő alkalmazása esetén. A második kísérletben az a kezelés, melynek során a H5K fágok vizes szuszpenzióját 10^{13} PFU ml⁻¹ koncentrációban juttattuk a tesztnövények száraira és leveleire szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult az *E. amylovora* okozta tünetek mérséklésében ahhoz képest, amikor az alacsonyabb koncentrációban permeteztük a fágokat a növényre. Azonban a második kísérlet során mindkét fágtörzs kijuttatási módjai között egyik alkalmazott koncentrációban sem volt kimutatható szignifikáns különbség, noha a H5K fág 10^{13} PFU ml⁻¹ koncentrációban hatékonyabb volt a lombozatra való kijuttatáskor, mint a gyökérszóna felé történő alkalmazás esetén. Az ismétlések (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 többségén kiterjedt nekrozis volt megfigyelhető.

A fágok hatása az E. amylovora okozta tünetekre - a fágokat alma csíranövények sziklelevelébe injektálva

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. 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 $\Phi\text{Ea}104$ alkalmazása esetén 67%-kal mérséklődött. A két fág hatása között nem volt szignifikáns különbség.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Elsőként izoláltunk és jellemeztünk Magyarországon *Myoviridae*, illetve *Podoviridae* családba tartozó *E. amylovora*-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.

IDÉZETT IRODALMAK

- 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.
- 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.
- Crosse, J.E., Hingorani, M.K.** (1958): A method for isolating *Pseudomonas mors-prunorum* phages from the soil. *Nature* 181: 60-61.
- Dömötör, D., Becságh, P., Rákhely, G., Schneider, Gy., Kovács, T.** (2012): Complete genomic sequence of *Erwinia amylovora* Phage PhiEaH2. *J Virol* 86: 10899.
- Gill, J.J., Svircev, A.M., Smith, R., Castle, A.J.** (2003): Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol* 69: 2133-2138.
- Hevesi, M.** (1996): Az *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow *et al.* hazai megjelenése almán. *Növényvédelem* 32 (5): 225-228.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ritchie, D.E., Klos, E.J.** (1979): Some properties of *Erwinia amylovora* bacteriophages. *Phytopathology* 69: 1078-1083.
- 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.

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.

Ward, R.L., Mahler, R.J. (1982): Uptake of bacteriophage f2 through plant roots. *Appl Environ Microbiol* 43: 1098-1103.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Impakt faktoros folyóiratcikk

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. (IF= 0.633)

Hazai, angol nyelvű konferencia kiadvány (extended abstract)

Kolozsváriné Nagy, J., Schwarczinger, I. (2013): Uptake and translocation of a Hungarian *Erwinia amylovora* bacteriophage isolate through roots - significance in biological control of fire blight. *Pannonian Plant Biotechnology Conference for PhD Students in Plant Biology in Connection to the EPSO Fascination of Plants Day*, Keszthely, Hungary, 15 May 2013, Our future book of abstracts: 54-55.

Magyar nyelvű konferencia kiadvány (full paper)

Kolozsváriné Nagy, J., Schwarczinger, I. (2013): *Erwinia amylovora*-specifikus bakteriofágok növényen belüli szállítódása. *Acta Agraria Debreceniensis különszám, Agrártudományi Közlemények* 53: 22-25.

Magyar nyelvű konferencia kiadvány (abstract)

Kolozsváriné Nagy, J., Schwarczinger, I. (2014): Fágok *in planta* transzportjának és hatásának vizsgálata az almatermésűek tűzelhalása ellen tűztövisen. *60. Növényvédelmi Tudományos Napok*, Budapest, 2014. február 18-19. Összefoglaló: 105.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ NEM, VAGY NEM KÖZVETLENÜL KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Impakt faktoros folyóiratcikk

Kolozsvári Nagy, J., Sule, S., Sampaio, J.P. (2005): Apple tissue culture contamination by *Rhodotorula* spp.: identification and prevention. *In Vitro Cell Dev-Pl* 41: 520-524. (IF= 1.162)

Nem impakt faktoros folyóiratcikk

Kolozsváriné Nagy, J., Süle, S. (2005): Vermikulit hatása *in vitro* alma hajtások gyökeresedésére. *Kertgazdaság* 1: 53-56.

Nagy, J., Loomans, A. (2001): A nem őshonos molytetű parazitoidok bevezetésének ökológiai kockázata: Az *Encarsia formosa* Gahan (*Hymenoptera: Aphelinidae*) elterjedése, megtelepedése és áttelelő képessége. *Növényvédelem* 37: 283-290.

Nemzetközi konferencia kiadvány (full paper)

Kolozsvári Nagy, J., Sule, S. (2006): Optimization of rooting of *in vitro* propagated *Malus × domestica* 'Pinova'. *Acta Horti* 725: 431-434.

Magyar nyelvű konferencia kiadvány (abstract)

Nagy, J. (2001): A nem őshonos molytetű parazitoidok bevezetésének ökológiai kockázata: Az *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae) elterjedése, megtelepedése és áttelelő képessége. 47. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2001. február 27-28.