

**BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
NÖVÉNYKÓRTANI TANSZÉK**

Országos Tudományos Diákköri Dolgozat

A szilva az *Erwinia amylovora* új gazdanövénye Magyarországon

Hajagos Laura

Növényorvos MSc II. évfolyam

Konzulensek:

Végh Anita egyetemi tanársegéd

Dr. Palkovics László tanszékvezető egyetemi tanár



Budapest, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1 A KÓROKOZÓ TUDOMÁNYOS BESOROLÁSA	4
2.2 A TŰZELHALÁS BETEGSÉG EREDETE	4
2.3 A TŰZELHALÁS BETEGSÉG ELTERJEDÉSE	4
2.4 A KÓROKOZÓ GAZDANÖVÉNYEI	6
2.5 A BETEGSÉG TÜNETEI	7
2.6 A TŰZELHALÁSSAL SZEMBENI VÉDEKEZÉS LEHETŐSÉGEI.....	11
2.7 A KÓROKOZÓ AZONOSÍTÁSÁNAK MÓDSZEREI.....	13
2.7.1 A kórokozó izolálása növényből	13
2.7.2 A kórokozó tenyésztésének feltételei	14
2.7.3 A kórokozó morfológiai és tenyészbélyegei	14
2.7.4 A kórokozó biokémiai, fiziológiai tulajdonságai	15
2.7.5 A kórokozó molekuláris azonosítása.....	15
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	18
3.1 A VIZSGÁLAT HELYE.....	18
3.2 A VIZSGÁLAT ANYAGA	18
3.2.1 A vizsgálat során használt növények, izolátumok.....	18
3.2.2 Vektor.....	18
3.2.3 Baktérium törzs a klónozáshoz.....	19
3.2.4 Táptalajok és termesztő közegek.....	19
3.2.5 A vizsgálat során alkalmazott Kit-ek	19
3.2.6 Enzimek.....	19
3.2.7 Primerek	19
3.2.8 PCR készülék	20
3.3 A VIZSGÁLAT MÓDSZERE.....	20
3.3.1 A kártétel megállapítása	20
3.3.2 A kórokozó izolálása táptalajon	20
3.3.3 A baktérium szuszpenzió előállítása	21
3.3.4 Patogenitási teszt.....	21
3.3.5 A kórokozó azonosítása klasszikus módszerekkel	22
3.3.5.1 A Gram-féle tulajdonság vizsgálata.....	22
3.3.5.2 Hiperszenzitív reakció	22
3.3.5.3 A kórokozó morfológiai jellemzőinek megállapítása	22
3.3.5.4 A biokémiai tulajdonságok vizsgálata	22
3.3.6 A kórokozó azonosítása molekuláris módszerekkel.....	23
3.3.6.1 A 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata.....	23
3.3.6.1.1 PCR paraméterei	23
3.3.6.1.2 Gélelektroforézis.....	24
3.3.6.1.3 A PCR-termék tisztítása.....	24
3.3.6.1.4 Ligálás.....	24
3.3.6.1.5 Transzformálás <i>E. coli</i> DH 5 α törzsébe	25
3.3.6.1.6 Minipreparátum készítése	25
3.3.6.1.7 Az inzert ellenőrzése.....	26
3.3.6.1.8 Plazmid tisztítás szekvenáláshoz	26
3.3.6.1.9 A nukleinsav szekvencia meghatározása és analízise.....	26

3.3.6.2	A pEA29 plazmid molekuláris vizsgálata	27
3.3.6.2.1	PCR paraméterei	27
3.3.6.2.2	Gélelektroforézis.....	28
3.3.6.2.3	A PCR-termék tisztítása.....	28
3.3.6.2.4	A szekvencia meghatározása és analízise	28
4.	EREDMÉNYEK	29
4.1	A BETEGSÉG TÜNETEI SZILVAHAJTÁSON.....	29
4.2	A KÓROKOZÓ AZONOSÍTÁSA KLASSZIKUS MÓDSZERREL	29
4.2.1	A Gram-féle tulajdonság	29
4.2.2	Hiperszenzitív reakció vizsgálata	29
4.2.3	A kórokozó morfológiai jellemzői	30
4.2.4	A kórokozó biokémiai jellemzői	33
4.2.5	Patogenitási teszt	35
4.3	A KÓROKOZÓ MOLEKULÁRIS AZONOSÍTÁSA	36
4.3.1	A 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata	36
4.3.1.1	PCR vizsgálat.....	36
4.3.1.2	Minipreparátum	37
4.3.1.3	Tisztított, <i>Eco</i> RI enzimmel emésztett plazmid	37
4.3.1.4	Rokonsági kapcsolatok feltárása.....	37
4.3.2	A pEA29 plazmid molekuláris vizsgálata	38
4.3.2.1	PCR vizsgálat.....	38
5.	KÖVETKEZTETÉSEK	40
6.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	42
7.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	43
8.	IRODALOMJEGYZÉK	44
9.	MELLÉKLET.....	49
10.	ÁBRAJEGYZÉK	50
11.	TÁBLÁZATJEGYZÉK.....	50

1. BEVEZETÉS

Az almatermésű növényfajok súlyos betegségét, az ún. „tűzelhalást” az *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* (1920) nevű baktérium okozza. Az ENSZ FAO Európai és Földközi-tenger melléki országok Növényvédelmi Szervezete (EPPO) ajánlása alapján Európa szerte, így Magyarországon is –mint tagországban- zárlati (karantén) károsító.

Az Amerikai Egyesült Államokban honos, mintegy 200 éve ismert betegség. Az 1950-es évek közepén hurcolták be Európába (Anglia) és a Földközi-tenger medencéjébe (Egyiptom), és mára a régió szinte valamennyi országában elterjedt. Első magyarországi előfordulását 1995 nyarán észlelték egy 43,5 ha-os 6 éves almaültetvényben, Nyárlőrinc község határában **(Hevesi, 1996)**. Megjelenése óta évről-évre előfordul, a baktérium számára kedvező időjárás esetén az okozott kár igen jelentős.

A *Rosaceae* családon belül 40 nemzetségbe tartozó 200 növényfaj tekinthető a baktérium gazdanövényének **(Steiner és Zeller, 1996)**. A gazdanövények közül a *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Malus*, *Pyrus*, *Photinia*, *Pyracantha* és *Sorbus* nemzetséghez tartozó fajok a legfontosabbak kereskedelmi szempontból. Magyarországon nem annyira jelentős mirtuszgalagonya és a japán naspolya is a kórokozó gazdanövénykörébe tartozik. Az Amerikai Egyesült Államokban a tüskétlen szedren **(Evans, 1996)** és málnán is jelezték a kórokozó megjelenését **(Schnabel és Jones, 2001)**. Beszámoltak a japán szilva hajtásfertőzéséről **(Mohan és Thomson, 1996)** valamint Európában, Németország északi részén a szilva és japán rózsa természetes fertőződéséről is **(Vanneste és mtsai, 2002)**. Az USA-ban szilva és kajszi hibridjének hajtásszáradását **(Mohan, 2007)** és Csehországban a kajszi természetes fertőződését is publikálták **(Korba és Sillerova, 2010)**.

Magyarországon az *E. amylovora* *Malus*, *Pyrus*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Pyracantha* és *Sorbus* fajokon terjedt el. Eddig más *Rubus* vagy *Prunus* fajokon történő megjelenésről még nem számoltak be. 2011 nyarán Budaörsön telepített 10-15 éves szilvafa (*Prunus domestica* L. ‘d’Agen’) fiatal hajtásán észleltük a tűzelhalás tüneteit.

Ezért munkánk során célul tűztük ki:

- a kórokozó azonosítását,
- a kórokozó klasszikus és molekuláris biológiai jellemzését,
- a kórokozó rokonsági kapcsolatainak feltárását,
- a mesterséges visszafertőzést,
- más gazdanövényről származó izolátummal való összehasonlítást.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A kórokozó tudományos besorolása

- Törzs: *Proteobacteria*
- Osztály: *Gammaproteobacteria*
- Rend: *Enterobacteriales*
- Család: *Enterobacteriaceae*
- Nemzetség: *Erwinia*
- Faj: *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. (1920)

2.2 A tűzelhalás betegség eredete

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

Az első írásos feljegyzések 1780-ból származnak, amit New York államban egy körteültetvényben észleltek. 1882-ben Burrill publikálta először, *Micrococcus amylovorus* néven, de ő nem izolálta a baktériumot. 1884-ben Joseph C. Arthur végezte el az első izolálást, és kísérletben bizonyította, hogy egy baktérium a betegség közvetlen okozója. Az *Erwinia* nemzetség, illetve *E. amylovora* faj megjelölés, **Winslow és mtsai. (1920)** nevéhez fűződik, ettől kezdődően a kórokozó neve *Erwinia amylovora* (Burrill), amit 1923-tól az Amerikai Bakteriológiai Társaság hivatalosan is elismert (**van der Zwet és Beer, 1995**).

2.3 A tűzelhalás betegség elterjedése

Az *Erwinia amylovora* egyre nagyobb mértékű elterjedéséről a XVIII. század végétől folyamatosan állnak rendelkezésünkre adatok. Az Amerikai Egyesült Államokban az összes államban megjelent. 1870-ben Kanadában számoltak be először a kórokozóról, 1921-ben Mexikóban, majd 1968-

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

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

Angliából és Egyiptomból alig 50 év alatt 39 országban jelent meg a kórokozó. 1966-ban Lengyelországban, Gdansk mellett találták meg almán és körtén **(Sobiczewski, 1996)**. Belgiumban, Franciaországban, Németországban 1971-1980 között jelent meg a tűzelhalás. Németországban először Hamburg környékén találkoztak vele és közel 10 év alatt ért el a fertőzés Bajorországig **(van der Zwet és Beer, 1995)**. Észak-Európában, Norvégiában, Svédországban és Észak-Írországon 1986-ban jelentkezett a tűzelhalás dísznövényeken, galagonyán, tűztövisen és madárbirszen. Csehországban először 1987-ben Prága mellett fedezték fel galagonyán **(van der Zwet és Walter, 1996)**. Olaszországban, Szicíliában 1990-ben, Bolognában 1994-ben találták meg a kórokozót és **Kokosková (1996)** szerint fertőzött import szaporítóanyaggal vagy légáram útján jutott be az országba. Svájcban 1989-ben, Romániában 1992 augusztusában észlelték először, Brália közelében. Az előrehaladott tünetek alapján valószínűsíthető, hogy a fertőzés már legalább 1 évvel korábban jelent meg. Ausztriában 1993-ban számoltak be a betegségről. Spanyolországban 1995-ben bukkant fel a francia határ mellett **(van der Zwet és Walter, 1996)**.

A Balkán-félszigeten észak felé terjedt a tűzelhalás betegség. 1989-ben elérte Macedóniát majd ugyanebben az évben, Szerbiában is megjelent az ország nyugati részén, Šabac városhoz közel. A tűzelhalás első tüneteit körtén és birszen figyelték meg **(Arsenijević és mtsai., 1991)**. 1990-ben súlyos járványt okozott Szerbia egész területén **(Arsenijević és Panić, 1992)**. Dísznövényeken valamivel később jelent meg a kórokozó, *Pyracantha coccinea*-n 1997-ben, míg *Chaenomeles japonica*-n és *Cotoneaster horizontalis*-on 2000-ben **(Gavrilović és Arsenijević, 1998; Balaž és mtsai., 2004)**. Szerbia egész területén folyamatosan terjed a tűzelhalás kórokozója és gazdanövényeinek száma is folyamatosan növekszik **(Balaž és mtsai., 2009)**.

A déli féltekéről csak Új- Zélandról jelentettek fertőzést. **Van der Zwet és Beer** szerint (1995) Észak-Amerikától vagy Európától ilyen messzire csak fertőzött faládákkal vagy fertőzött

szaporítóanyaggal kerülhetett be a kórokozó. A kórokozót a mai napig összesen 46 országban észlelték. Európában az utolsó *Erwinia* mentes ország Szlovénia volt, míg ott is elszórtan egy-egy fertőzési góc jelent meg 2001-ben, majd egy nagyobb járványról számoltak be 2003-ban **(Dreo és mtsai., 2006)**.

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

2.4 A kórokozó gazdanövényei

A kórokozó a *Rosaceae* család 40 nemzetségének mintegy 200 növényfaján fordul elő **(Steiner és Zeller, 1996)**. A gazdanövények közül a *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Malus*, *Pyrus*, *Photinia*, *Pyracantha* és *Sorbus* nemzetséghez tartozó fajok a legfontosabbak kereskedelmi szempontból **(1., 2. ábra)**. Feltételezhető, hogy régóta károsít az Amerikában őshonos berkenye, galagonya, vadkörte és vadalma fajokon. Magyarországon jelenleg behozatali tilalom alá eső mirtuszgalahonya (*Stranvaesia davidiana*) és a fagyérzékenysége miatt nem termesztendő japán naspolya (*Eriobotrya japonica*) kevésbé ismert gazdanövényfajok. Az Amerikai Egyesült Államokban a tüskétlen szedren (*Rubus rusticanus* var. *inermis*) **(Evans, 1996)** és málnán (*Rubus idaeus*) is jelezték a kórokozó megjelenését, melyekről izoláltak is *Erwinia amylovora* baktériumtörzseket is **(Schnabel és Jones, 2001)**, melyek viszont az almán és a körtén nem fertőzőképesek **(Sobiczewski és mtsai., 1997)**. A kórokozó *Rosa* fajokon történő károsításáról szóló információk nem minden esetben nyertek megerősítést **(Németh, 1997)**. A tűzelhalás

betegség nem korlátozódik feltétlenül almatermésű növényfajokra, hiszen már beszámoltak a japán szilva (*Prunus salicina*) fiatal hajtásainak természetes fertőződéséről is (**Mohan és Thomson, 1996**). A betegség csak a hajtásokat pusztítja el és az idősebb részekre nem terjed át, valamint a virágok fertőződése sem ismert (**Mohan és Bijman, 1998**). Az USA-ban szilva és kajszi hibridjén (Pluot®) hajtásszáradásról számoltak be (**Mohan, 2007**). Csehországban a kajszi (*P. armeniaca*) (**Korba és Sillerova, 2010**), Németország északi részén az európai szilva (*Prunus domestica*) és a japán rózsza (*Rosa rugosa*) természetes fertőződését is publikálták (**Vanneste és mtsai, 2002**).



1. ábra: A tűzelhalás tünetei körteahajtáson
(Fotó: Hajagos Laura)



2. ábra: A tűzelhalás tünetei tűztövis hajtásán
(Fotó: Végh Anita)

2.5 A betegség tünetei

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

Virágelhalás

A vegetáció során először a virágfertőzés tünetei jelennek meg. Egy különálló virág, virágok vagy egy egész virágbog fertőződhet. A virágok először vizenyősek lesznek, hervadnak, fonnyadnak, elszáradnak, barnulnak, majd végül barnás feketén elhalnak (**3. ábra**). A csészelevél és a virágkocsány is vízzel átitatottnak tűnik. A fertőzött, megbarnult, megfeketedett virágok lehullhatnak, de rendszerint a fán maradnak. Meleg, párás időjárás esetén, a virágkocsányon gyakran nyálkacseppek jelennek meg. Exudátum képződés hiányában egyértelműen csak a virágzás után állapítható meg a virágzat

megbetegedése. A virágfertőzést követően a kocsányon keresztül szisztémikusan fertőződik a fiatal gyümölcs. A virágzaton kiváló nyálkacseppek a hajtásfertőzés forrásai lehetnek. Egyetlen virág fertőződése gyakran a teljes termőág, termőalap pusztulásához vezet.



3. ábra: A tűzelhalás tünetei körte virágokon
(Fotó: Végh Anita)

Hajtás- és levélelhalás

A betegség legjellemzőbb tünete. Vannak évek, amikor csak hajtásfertőzést lehet megfigyelni. Virágzás után, a nedvdús friss hajtások, a vízhajtások és a tősarjak a legérzékenyebbek a fertőzésre. A hajtásfertőzés tünetei hasonlóak a virágfertőzéshez, de sokkal gyorsabb lefolyású. Optimális időjárási feltételek esetén (meleg, párás) a fertőzés 15-30 cm-t is halad a hajtásban, míg extrém esetben akár 50-70 cm-t is elérheti naponta. A hajtások a csúcs felől fertőződnek, eléri a vesszőket, gallyakat is. A hajtásvég pásztorbatszerűen visszagörbül, barnul, végül elhal **(4. ábra)**. Almafa esetében a fertőzött hajtások világosbarnától sötétbarnába, körte esetében sötétbarnából feketébe hajlók. Ha a fertőződés fekélyes sebből vagy a hajtást nevelő gallyból származik, úgy nem figyelhető meg pásztorbatszerű görbület. A kórokozó számára kedvező időjárás esetén baktérium nyálkacseppek jelennek meg a hajtásvégeken, amelyek színe először piszkosfehér, majd a levegőn rövidesen borostyánszínű, később rozsdavörös lesz.

A levél fertőződése a sztomákon keresztül, rovarok által vagy sebzéseken (jégeső, szélverés) át történik. A levél fő- és mellékerei barnásra színeződnek, majd feketén elhalnak **(5. ábra)**. Az elhalt levelek a fertőzött hajtásról nem hullnak le.



4. ábra: A tűzelhalás tünetei körteajtásokon
(Fotó: Végh Anita)



5. ábra: A tűzelhalás tünetei körte leveleken
(Fotó: Végh Anita)

Gyümölcselhalás

Az éretlen gyümölcsök megbetegedése a leggyakoribb. A kifejlődött gyümölcsökön megjelenő tünetek hasonlóak a fiatal gyümölcsökhöz. Az éretlen gyümölcsök belsőleg szisztémikusan fertőződnek. A gyümölcs először szürkészöld, majd vizenyős lesz, később barnulnak, megfeketednek, mumifikálódnak és a fán maradnak vagy lehullnak. Az érett gyümölcsök a bőrszövet lenticelláin, sebzéseken, valamint a fertőzött vesszőkön, gallyakon keresztül a kocsányon át fertőződhetnek. A paraszemölcsökből néha ragadós, sűrű, az opálostól az aranysárgáig változó színű baktériumnyálka tör elő (**6. ábra**).



6. ábra: A tűzelhalás tünetei körte gyümölcsén
(<http://www.apsnet.org/publications/imageresources/Pages/Volume87-10-3.aspx>)

Ág és törzselhalás

A fertőzés a virágok, a hajtások vagy a gyümölcsök felől halad a vesszők, gallyak és idősebb ágakon át a törzs felé. A háncsszövet szivacsos, puha állományú, vizenyős lesz, majd ezüstös barnára színeződik. Az elhalt szövet besüpped, kiszárad, az egészséges és beteg részeket repedés választja el egymástól. A folt alatt a farész rozsdabarna vagy barna színű. A hajtások és ágak teljesen elhalhatnak. Az ágakon és a törzsön jelentkező elhalt foltokon exudátum válhat ki. Ha a rákos seb széléről eltávolítjuk a kérget a fás részekben vörösesbarna jellegzetes csíkozottság figyelhető meg. Az ágakon lévő fertőzött vízhajtások illetve a kisebb elágazások alapi részénél kialakulnak olyan rákos sebek, melyek a kórokozó áttelelését biztosítják (7. ábra).



7. ábra: A tűzelhalás tünetei almafa törzsén
(http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease_descriptions/omblight.html)

Gyökérnyak-és gyökérpusztulás

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

2.6 A tűzelhalással szembeni védekezés lehetőségei

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

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

Legfontosabb és legalapvetőbb követelmény a fertőzésmentes szaporítóanyag előállítása és forgalmazása. A betegség bejelentés köteles, azaz fellépése, vagy annak gyanúja esetén értesíteni kell a területileg illetékes Szakigazgatási Hivatalt és a hatóság zárlati intézkedéseit maradéktalanul be kell tartania mindenkinek **(Németh, 1997)**.

Legrégebbi védekezési mód a fertőzött növényi részek eltávolítása és megsemmisítése. 40-60 centiméterrel a fertőzött rész alatt kell levágni a beteg hajtást. Nagyon fontos az ültetvények rendszeres ellenőrzése is. Az egészségesnek látszó kései vagy másodvirágzásból származó virágok eltávolítása is szükséges, mert ezek megjelenési időszakában a virágfertőzés környezeti feltételei sokkal inkább adottak, mint normál virágzás során. A virágzási időben megjelent fertőzött virágokat is el kell távolítani és meg kell semmisíteni. A fertőzött növényi részek levágásakor használt eszközöket minden beavatkozás után fertőtleníteni, a sebeket pedig kezelni kell. A mentesítő metszésből származó nyesedéket el kell égetni **(van der Zwet és Beer, 1995)**.

A tűzelhalás ellen a rézkészítményeket- hasonlóan más baktériumos betegségekhez- alkalmazzák. Leggyakrabban a rézoxiklorid, rézhidroxid és rézszulfát hatóanyagú szerek kerülnek előtérbe **(Sobiczewski és mtsai., 1997)**. Használatuk során figyelembe kell venni a különböző fajták

rézérzékenységet. Ajánlatos a lombhullás utáni és a rügyfakadás előtti lemosó permetezés mivel inokulum források lehetnek az áttelelő, beteg növényi részek. Ezen rézkészítmények jelentik a legegyszerűbb, legolcsóbb, de egyben a legkevésbé hatásos védekezést a tűzelhalás ellen **(László, 2008)**.

Leghatékonyabb védekezési lehetőségnek a tűzelhalás ellen az antibiotikumok használata volt. Az Amerikai Egyesült Államokban gyakori volt a sztreptomycin virágzáskori alkalmazása, véleményük szerint eredményes védekezés nélküle elképzelhetetlen. Virágfertőzéskor, tapasztalatok szerint, 3-4 kezelés még 30 év után is hatásos, csak 6-nál több kezelés után alakul ki rezisztencia **(Sobiczewski és mtsai., 1997)**. Ugyanakkor az Egyesült Államokban 1972 óta ismernek sztreptomycin rezisztens *Erwinia amylovora* törzseket, melyeket már Új-Zélandon is megtaláltak. Mivel a sztreptomycin a humán gyógyászatban is használatos, ezért az Egészségügyi Világszervezet (WHO) nem ajánlja növényvédelmi célú felhasználásra. Az Európai Unió több országában is betiltották, így Magyarországon is. A kasugamycin hatóanyagú Kasumin 2L Magyarországon 2007. június 30-ig volt alkalmazható, de virágzáskor még eseti engedéllyel használható.

A fozetil- Al hatóanyagú Aliette 80 WG-t is lehet használni, mely a rézkészítményeknél hatásosabb és a sztreptomocinnal esetenként azonos hatékonyságú, melyet a virágzás kezdetétől a virágzás végéig 2-3- szor lehet alkalmazni **(Sobiczewski és mtsai., 1997)**. Hatásmechanizmusa a növényi rezisztencia mesterséges indukálásán alapul **(László, 2008)**.

E. amylovora-ra esetében 20 éve zajlanak kutatások biológiai védekezés kidolgozására antagonista, epifita baktériumok alkalmazásával. Ezek hatása gátló anyagok termelésén és a tápanyagok kórokozó elől történő felélésén alapul, ezért kijuttatásuknak már a kórokozó megjelenése előtt meg kell történnie. Mivel az antagonisták fejlődése telelés függvénye, a védekezés határfoka függ az évjárártól és a földrajzi helytől. Mire a kórokozó odajutna, az antagonista baktériumoknak a sebfelületen és a virágok nektáriumainál kell lennie. Számos kísérletet folytattak *Pseudomonas fluorescens* és *Pantoea agglomerans* (syn. *E. herbicicola*) egyes törzseivel és a *Bacillus subtilis* több törzse is igen ígéretesnek bizonyult, valamint *Photorhabdus* és *Xenorhabdus* fajok antibakteriális hatásáról is beszámoltak. **(Böszörményi és mtsai., 2009)**. A baktérium elleni védekezésben *in vitro* és szabadföldön is a különböző élesztőfajok (*Aureobasidium pullulans*, *Candida sake*, *Metschnikowia pulcherrima*) törzsei is hatásosnak bizonyultak **(Seibold és mtsai., 2006)**. Európa több országában ideiglenes felhasználási engedélyt kapott egy osztrák cég (Bioferm) új biológiai növényvédő szere, a „Blossom Protect”, amely az *Aureobasidium pullulans* élesztőfaj két törzsét tartalmazza. Magyarországon alma, körte, birs, és naspolya kultúrákban engedélyezett **(Baranyi és Valovics, 2011)**.

Hevesi és mtsai. (2006) *in vitro* vizsgálatokban az Origanum-, Mentha-, Thymus-, Tagetes fajokban a carvon, dihidrokarvon, timol és karvakrol vegyületek hatásosságát vizsgálták *E. amylovora* ellen.

Az *E. amylovora*-val szembeni rezisztenciára való nemesítés nagy múltra tekint vissza, ennek ellenére a gyakorlatban termesztett toleráns fajták száma nagyon kevés. A baktérium szinte a fajták mindegyikét képes megfertőzni, egy részüknél azonban a tünetekben, termés kiesében megnyilvánuló jelentős negatív hatás nem érvényesül. Tehát valójában csak toleranciáról beszélhetünk (**Németh, 1997**).

2.7 A kórokozó azonosításának módszerei

A baktériumok azonosítása és jellemzése azok morfológiai (**Crosse és Goodman, 1973; King és mtsai., 1954; Miller és Schroth, 1972**), biokémiai és fiziológiai (**Hugh és Leifson, 1953; Lelliot és mtsai., 1966; Suslow és mtsai., 1982**) tulajdonságaik alapján történik. Ha ezen tulajdonságok mellett a vizsgált baktériumtörzs pontos rokonságára vagyunk kíváncsiak, érdemes a rokonságot genetikai módszerrel vizsgálni. A genom 16S rDNS szakasza a baktériumtörzsek jellemzésére bevált módszer (**Hauben és mtsai., 1998**). A baktériumok molekuláris vizsgálatainál lehetséges a genom egyes részeinek (fragmentumoknak) fizikai méretkülönbségeinek a vizsgálata is, mely elsősorban fajon belüli különbségek kimutatására szolgál. A nukleinsav alapú markerek egy csoportja a genomban lévő szekvencia ismétlődésekre épül (**Kiss, 1999**).

2.7.1 A kórokozó izolálása növényből

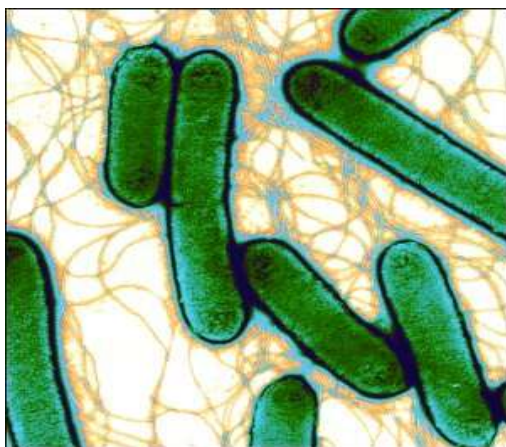
Richter (1998) szerint, az *Erwinia amylovora* laboratóriumi izolálásának legegyszerűbb módszere: 1.) steril körülmények között, kiiztított szikével történő mintavétel, a fertőzött vagy fertőzöttnek vélt növényből, növényi részből, az elhalt és az egészséges szövetek határáról, 2.) desztillált víz hozzáadásával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

2.7.2 A kórokozó tenyésztésének feltételei

A baktérium számára a meleg (22-28 °C), párás, nedves, csapadékos időjárás kedvez **(Hevesi, 1996)**. **Steiner és Zeller (1996)** vizsgálatai szerint széles hőmérsékleti tartományban, 4-26 °C-on, hetekig is képes életben maradni a növény felületén a kórokozó. **Bereswill és mtsai. (1998)** kísérletében 7-7,5 pH érték mellett szaporodik, hőoptimuma 28 °C.

2.7.3 A kórokozó morfológiai és tenyészbélyegei

Az *E. amylovora* Gram-negatív baktérium. Sejtjei 1,0-3,0 µm x 0,5-1,0 µm méretűek, pálcika alakúak **(8. ábra)**. A baktérium peritrich flagellumokkal önálló mozgásra képes. Spórát nem képez **(Lelliott és Dickey, 1984)**.



8. ábra: Az *Erwinia amylovora* baktérium flagellumokkal
(http://www.dirtdoctor.com/organic/garden/view_question/id/2386/)

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

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

2.7.4 A kórokozó biokémiai, fiziológiai tulajdonságai

A baktérium fluoreszkáló pigmentet nem termel, oxidatív, aerob ritkán fakultatív anaerob (**Lelliott és Dickey, 1984**). Az izolátumok jellemzésére a következő biokémiai és fiziológiai tulajdonságok alkalmazhatók: glükóz fermentálás (+), oxidáz jelenléte (+), kataláz jelenléte (-), indol képzés (-), ammóniaképzés (-), nitrát redukció (-), zselatinhidrolízis (+). Hiperszenzitív reakciót ad dohánylevélen és előidézi a burgonya lágyrothadását. Szaporodik és nyálkát képez almaszeleteken (**Hevesi, 1996**).

2.7.5 A kórokozó molekuláris azonosítása

Fenotípusos vizsgálatok mellett, egy egyed, faj vagy fajta genetikai ujjlenyomata, olyan egyedi tulajdonságok összessége, melyek genotípusos megkülönböztetést tesznek lehetővé. Ezek segítségével,

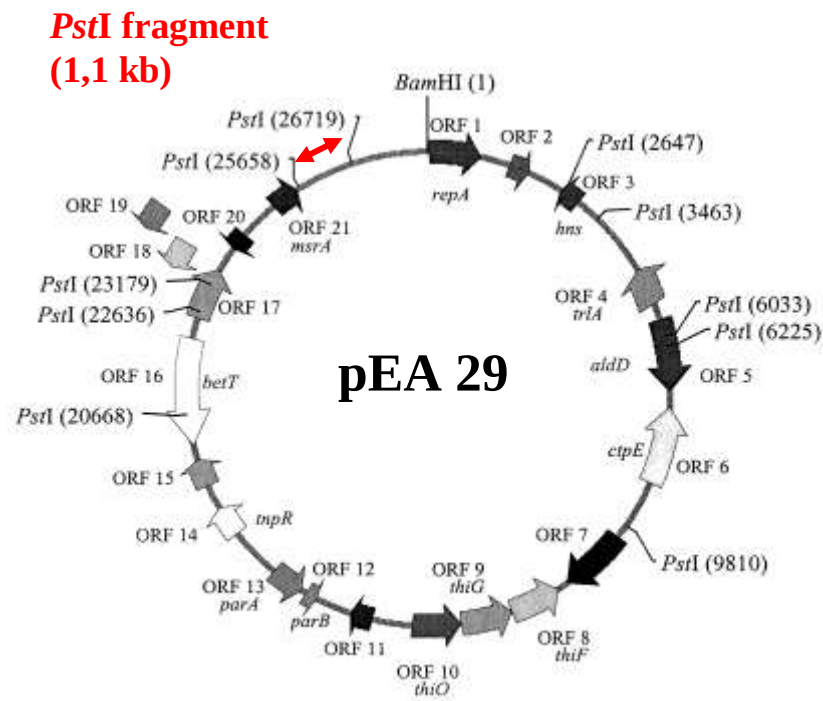
valamint a DNS könnyű szállítása, sokszorosítása, konzerválása révén az összehasonlító vizsgálatok leegyszerűsödtek **(Hajósne Novák, 1999)**. A marker szó jelölő funkciót ellátó egységet jelent, ami a genetikában egy tulajdonság meglétét jelző allél, illetve esetenként a nem kódoló régióban található motívum. A molekuláris genetikai markerek két nagy csoportba oszthatók attól függően, hogy nukleinsav, vagy egyéb (pl.: fehérje) alkotóelemet használunk fel a növény vagy más organizmus jellemzésére.

Mivel a szerológia módszerek szenzitivitása és specificitása nem 100%-os, elterjedően van, mind a humán, mind a növénypatogén baktériumok molekuláris biológiai módszerekkel, pl.: PCR-el (polimeráz láncreakció) való azonosítása. **(Bernet és mtsai., 1989, Mullis és mtsai., 1986)**. A baktériumok esetében, valamilyen genetikai bélyeg kimutatására legelterjedtebb a 16S riboszomális RNS-t (rRNS) kódoló gén bázis-sorrendjének meghatározása szekvencia analízissel. Ezt a módszert ma már széleskörűen használják baktériumok identifikálására és taxonómiai vizsgálatok kivitelezésére **(Choi és mtsai., 1996; Clarridge, 2004)**. A bakteriális eredetű 16S rRNS gén jellegét tekintve nagyon konzervatív, különböző fajok esetében is akár 95-96%-os homológiát mutathat. Tartalmaz azonban általában kilenc „hipervariábilis régiót” mely jelentős eltéréseket mutat különböző baktérium fajok között, ezáltal alkalmas faj szintű identifikációra **(Van de peer és mtsai., 1996)**. Baktériumok esetében egy fajhoz tartozónak nevezzük azokat az egyedeket, melyeknek teljes DNS állományuk egymással 70%-nál nagyobb homológiát mutat. A legtöbb PCR során olyan primereket alkalmaznak, melyek rendkívül specifikusak a vizsgált baktériumra, vagy baktériumok egy kisebb csoportjára. A 16S rRNS gén specifikus primerek a megvizsgált összes baktériumra nézve univerzálisak.

A nukleinsav alapú markerek általában a genom egyes részeinek (fragmentumok) fizikai méretkülönbségei által, vagy bizonyos szekvenciák megléte révén elvégezhető azonosítást, illetve elkülönítést tesznek lehetővé. A nukleotid ismétlődésből álló egységeket SSR-nek (short sequence repeat – rövid szekvencia ismétlődés) **(Jacob és mtsai., 1991)** nevezzük. Ezek az elemek nagy polimorfizmust mutató részek a genomok nem kódoló régióiban, kodominánsan, a Mendeli törvények szerint öröklődnek. Az SSR markerek PCR (polimerase chain reaction – polimeráz láncreakció) **(Mullis és mtsai., 1986)** technikával, kis mennyiségű DNS felhasználásával megsokszorozhatóak. A lókuszok egyedileg definiálhatóak a genomban, a repetitív szekvenciákat határoló konzervatív szakaszokra tervezett primerek révén **(Weber és May, 1989)**.

Az SSR méret szerinti tesztek nagy előrelépést jelentettek a baktériumfajok közötti különbségek kimutatásában. Az SSR adatok sokkal jobban reprodukálhatók, mint más típusba sorolási módszerek. **Ruppitsch és mtsai. (2004)** vizsgálták az *E. amylovora* SSR egységeinek stabilitását

standard laboratóriumi és stressz körülmények között. Végül bebizonyosodott, hogy az SSR egységek megfelelnek a genetikai marker feltételeinek. Az *E. amylovora*-ban megtalálható pEA29 plazmid mérete megközelítőleg 28,2 kb nagyságú. Az SSR, ami jelen esetben 8 nukleotid (ATTACAGA), a pEA29 plazmid 1,1 kb hosszú *Pst*I fragmentjében (9. ábra) 3-15 alkalommal ismétlődik a különböző *E. amylovora* izolátumokban.



9. ábra: A vizsgált *Pst*I fragment elhelyezkedése a pEA29 plazmidban (Gayle és mtsai., 2000)

Ruppitsch és mtsai (2004) által tervezett primerekkel (pEA29A, pEA29B) a pEA29 plazmid *Pst*I fragmentuma PCR technikával felszaporítható és értékelhető a fragmentum hossz polimorfizmus alapján. Ezek alapján teljes biztonsággal elkülöníthetők az egyes izolátumok (**Keck és mtsai, 2002**).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 A vizsgálat helye

A tüneteket mutató szilva hajtást 2011. július végén Budaörsről gyűjtöttük, majd a mintát a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszékére szállítottuk. A kórokozó azonosítását a Növénykórtani Tanszék laboratóriumában végeztük el. A kórokozó riboszómális DNS-ének 16S szakaszát tartalmazó rekombináns plazmidot, és a pEA29-es plazmid *Pst*I fragmentjének nukleinsav szekvenciáját Szegeden a BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetben határoztattuk meg.

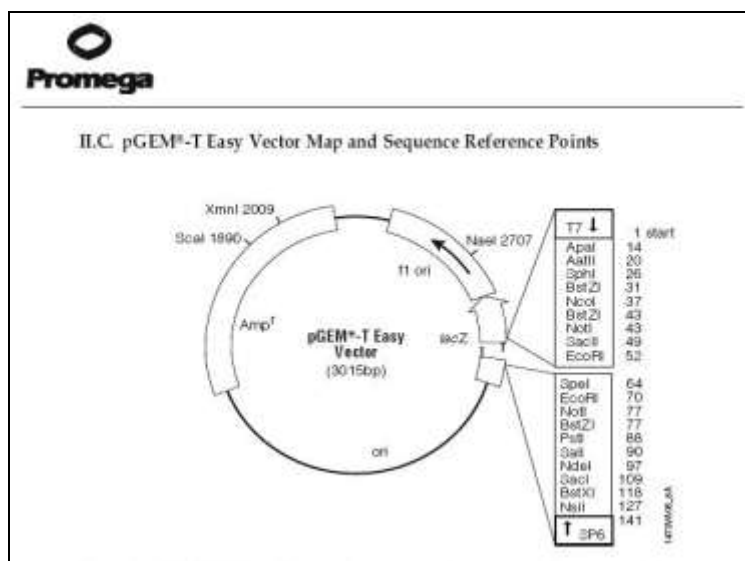
3.2 A vizsgálat anyaga

3.2.1 A vizsgálat során használt növények, izolátumok

A kórokozót szilvafa (*Prunus domestica* L. 'd'Agen') fiatal fertőzött hajtásáról izoláltuk (Ea-PlumBo1). A kórokozó patogenitásának teszteléséhez és a Koch-posztulátumok vizsgálatához fiatal szilvahajtásokat (Besztercei fajta), szilvaterméseket (Ringlő típusú) és éretlen körtét ('Eldorado' fajta); a hiperszenzitív reakció vizsgálatához egészséges dohánynövényt (*Nicotiana tabacum* L. cv. *xanthi*) használtunk. A kolóniatípus, az API50CH kit valamint a pEA29 plazmid vizsgálatok összehasonlításhoz az *E. amylovora* első hazai izolátumát (Ea1) használtuk, amely almáról származott (Hevesi, 1996).

3.2.2 Vektor

A tisztított PCR terméket a pGEM-T Easy plazmidba (Promega) ligáltuk (10. ábra).



10. ábra: A pGEM-T Easy Vektor

3.2.3 Baktérium törzs a klónozáshoz

A PCR termék klónozásához az *Escherichia coli* baktérium DH 5 α törzsét használtuk.

3.2.4 Táptalajok és termesztő közegek

A kórokozót King-B (**King és mtsai., 1954**) (20 g pepton, 10 g glycerol, 1,5 g K₂HPO₄, 1,5 g MgSO₄ X 7 H₂O, 15 g agar, 1 l végtérfogatban; pH: 7,2) táptalajon, 26 °C - on tenyésztettük.

A tenyészbélyegek meghatározáshoz King-B táptalajt, EMB (Eosine Methylene Blue agar: 10 g zselatin, 5 g laktóz, 5 g szacharóz, 2 g dikálium-foszfát, 0,4 g eosin Y, 0,065 g metilénkék, 13,5 g agar 1 l desztillált vízben oldva; pH: 7,2), kristályviola-agart (Crosse-Goodman táptalaj: 160 g szacharóz, 12 g nutrient agar (BBL), 0.8 ml kristály viola (0,1% -os oldata abszolút alkoholban) és 20 ml 0,1% -os cikloheximid 380 ml desztillált vízben oldva), Miller-Schroth (összetétel: http://wiki.bugwood.org/Miller-Schroth_medium) és Kado-Heskett (8 g agar, 8 g kazein hidrolizát, 0,0358 g MgSO₄, 2 g K₂PO₄, 10 g szacharóz, 4 g élesztőkivonat) táptalajt használtunk, ahol az inkubációs hőmérséklet 26 °C volt.

A transzformálás során steril 2TY (4 g tripton, 2,5 g élesztőkivonat, 1,25 g NaCl, 250 ml végtérfogatban) és steril ampicillines LB táptalajt (2,5 g tripton, 1,25 g élesztőkivonat, 2,5 g NaCl 250 ml végtérfogatban + 500 μ l ampicillin), a Minipreparátum készítéséhez steril ampicillines LB szilárd és folyékony táptalajt használtunk (**Sambrook és mtsai., 1989**).

3.2.5 A vizsgálat során alkalmazott Kit-ek

A kórokozó biokémiai tulajdonságainak vizsgálata során a Biomérieux által gyártott API20E és API50CH gyorstesztet használtuk. A PCR termék tisztítását High Pure PCR Product Purification Kit-tel (Roche) végeztük. A szekvencia meghatározáshoz Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit-tel (Bio-Rad) tisztítottuk a rekombináns plazmidot.

3.2.6 Enzimek

A felhasznált enzimeket a Fermentas cégtől vásároltuk.

3.2.7 Primerek

A PCR során univerzális primereket használtuk.

A 16S rDNS szakaszhoz a következő primereket használtuk:

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

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

A pEA29 plazmidhoz használt primerek a következők:

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

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

3.2.8 PCR készülék

A polimeráz láncreakciót Applied Biosystems GeneAmp 9700 típusú PCR készülékében végeztük.

3.3 A vizsgálat módszere

3.3.1 A kártétel megállapítása

A tüzelhalásra jellemző tünetet a szilvafán észleltük. A fiatal hajtáson pásztorbatszerű görbület volt megfigyelhető. A hajtás megfeketedett, elhalt.

3.3.2 A kórokozó izolálása táptalajon

A fertőzött szilvahajtást alkohollal fertőtlenítettük, majd steril körülmények között a hajtásról, az egészséges és az elhalt növényi rész határáról mintát vettünk. A növényi szövetet steril desztillált vízzel homogenizáltuk, majd az elegyet steril King-B agar táptalajon szélesztettük, és a Petri-csészéket 26 °C -on inkubáltuk 1-2 napon át.

A különálló kolóniákat leoltottunk steril táptalajra, 26 °C -on inkubáltuk, majd a lemezeket 4 °C -on hűtőben tároltuk.

A kórokozót a további vizsgálatokhoz -20 °C -on lefagyasztva glicerinenben tároltuk. Megőrzésük, fenntartásuk pedig -70 °C -on fagyasztó csőben történik. A közeg összetétele: 3 g Beef extract, 5 g pepton, 20 g glycerol, 1 liter desztillált víz.

3.3.3 A baktérium szuszpenzió előállítása

Az inokuláláshoz szükséges baktérium szuszpenziót a kórokozó 1 napos (26 °C) tenyészetéből nyertük. A spektrofotométert a vizsgálatok előtt desztillált vízzel kalibráltuk. Kémcsőbe steril desztillált vizet töltöttünk, majd ebbe helyeztük a 24 órás, friss, tiszta tenyészetből származó baktériumot. A szuszpenziót homogenizáltuk, majd spektrofotométerrel 5×10^8 sejt/ml töménységűre állítottuk be.

3.3.4 Patogenitási teszt

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

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

A patogenitás vizsgálatban használt szilva-, körtegyümölcsök és a szilvahajtások felületét alkohollal fertőtlenítettük.

Gyenge, fiatal, friss szilvahajtásokat fertőztünk. A fertőzéskor a hajtások 20-25 cm hosszúságúak voltak, melyek nem fásodtak. Hat hajtást fertőztünk, a baktérium szuszpenziót (5×10^8 sejt/ml) a hajtás csúcsától számolt 2. teljesen kifejlődött levél hónaljába juttattuk be injekciós tűvel. Ezután párás körülmények között (70-80 % relatív páratartalom) fólia alatt a laboratóriumban 25-27 °C -on tároltuk, így biztosítva a kedvező körülményeket a betegség kialakulásához. A kontroll növényt desztillált vízbe mártott steril tűvel szűrtük meg és azonos körülmények között, elkülönítve tartottuk. A gyümölcsök (fogyasztásra alkalmas állapotú szilva és éretlen 'Eldorado' körtefajta) fertőzése steril körülmények között történt. A tesztelésnél a természetes fertőződés mechanizmusát szúrással imitáltuk.

A termést 3-6 helyen szűrtük meg baktérium szuszpenzióba (5×10^8 sejt/ml) mártott lándzsatűvel. A kontrollt steril desztillált vízbe mártott tűvel kezeltük. A fertőzött gyümölcsöket 5 napig 25-27 °C -on inkubáltuk, 70-80 % -os páratartalmat biztosítva. A fertőzöttség mértékét 5 fertőzési fokozatba, fertőzési index **(Horsfall és Barratt, 1945)** soroltuk a fertőzött folt átmérője (mm) szerint: 0- tünetmentes gyümölcs, 1- kissé fogékony (1-5 mm), 2- közepesen fogékony (6-10 mm), 3- fogékony (10-20 mm), 4- erősen fogékony (>20 mm).

3.3.5 A kórokozó azonosítása klasszikus módszerekkel

3.3.5.1 A Gram-féle tulajdonság vizsgálata

A baktérium 24 órás, friss, tiszta tenyészetéből a Petri-csészéről steril fogpiszkáló segítségével egy-két kolóniát veszünk, és steril tárgylemezre helyezzük. Majd hozzáadjuk a 3 % -os kálium-hidroxidot és homogenizáljuk.

3.3.5.2 Hiperszenzitív reakció

A baktérium szuszpenziót (5×10^8 sejt/ml) a dohánylevél (*Nicotiana tabacum* L. cv. *xanthi*) szövetébe juttattuk injekciós tűvel. Majd 24-48 óra elteltével figyeltük az elváltozást.

3.3.5.3 A kórokozó morfológiai jellemzőinek megállapítása

A tenyészbélyegeket általános és szelektív táptalajokon (King-B táptalaj, EMB agar, kristályviola-agar (Crosse-Goodman), Miller-Schroth és Kado-Heskett táptalaj) határoztuk meg 24-48 h (26 °C) inkubációt követően. A kolóniatípusokat az irodalomban leírtak szerint, mint például: alak, méret, szín, felület, fényesség, állag alapján értékeltük.

3.3.5.4 A biokémiai tulajdonságok vizsgálata

A vizsgálatokat a gyártó utasításait követve végeztük el. Az API20E és az API50CH tesztcsíkokat 24-48 órán át 36 °C -on inkubáltuk.

Az API20E a baktériumfajok meghatározására szolgál. Értékelése során az eredményeket a gyártó által rendelkezésünkre bocsátott pozitív és negatív minta-tesztcsíkok alapján értékeltük **(11. ábra)**.

pozitív teszt



negatív teszt

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

Az API50CH a baktériumok biokémiai jellemzésére szolgál. API50CH kit módszer színváltozás megfigyelésén alapszik: ha az adott baktérium hasznosítja az adott szénhidrátot, akkor az eredeti piros színű oldat sárgára változik. Ezek az eredmények egy biokémiai profilt képeznek.

Az oxidáz-tesztet külön végeztük el a gyártó utasításai alapján. Az oxidáz-teszt lényege egy baktériumok által termelt intracelluláris oxidáz-enzim kimutatása. Légköri oxigén és citokróom C jelenlétében az enzim oxidálja a P-aminodimetilalanin-oxalát reagenst, melynek során egy bíbor színű vegyület, indofenol képződik 30 másodpercen belül.

3.3.6 A kórokozó azonosítása molekuláris módszerekkel

3.3.6.1 A 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata

3.3.6.1.1 PCR paraméterei

A PCR -hez használt indító szekvenciák:

1389r (reverse)

63f (forward)

A PCR elegy összetétele 50 µl végtérfogatra:

2 µl baktérium szuszpenzió (10^7 sejt/ml)

35,5 µl steril H₂O
1 µl primer 63f (20 pmol/µl)
1 µl primer 1389r (20 pmol/µl)
3 µl MgCl₂ (25 mM)
5 µl 10x Taq puffer (+ KCl – MgCl₂)
0,5 µl Taq polimeráz enzim (5 u/µl)
2 µl 5 mM dNTPs

A reakció paraméterei:

1. 94 °C -on 3 perc kezdő denaturálás (1 alkalommal)
2. 94 °C -on 15 másodperc denaturálás (a két komplementer DNS szál szétválása)
3. 55 °C -on 0,5 perc anellálás (a primerként szolgáló oligonukleotid kapcsolódása)
4. 72 °C -on 1,5 perc elongáció (láncosszabbítás)
5. 94 °C -on 0,5 perc denaturálás

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

3.3.6.1.2 Gélelektroforézis

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

3.3.6.1.3 A PCR-termék tisztítása

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

3.3.6.1.4 Ligálás

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

A ligáláshoz a következőket mértük össze 10 µl végtérfogatra:

5 µl steril H₂O

1 µl plazmid (pGEM-T Easy)

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

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

2 µl inzert (tisztított PCR termék)

Ezt 6 órán át szobahőmérsékleten ligáltuk.

3.3.6.1.5 Transzformálás *E. coli* DH 5α törzsébe

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

3.3.6.1.6 Minipreparátum készítése

Hat egyedi fehér kolóniából 2–2 ml folyadékkultúrába (ampicillines LB) inokuláltunk, és 37 °C -on éjszaka rázattuk. A baktériumkultúrát 3 percig centrifugáltuk. A felülúszót leöntöttük, és a pellethez hozzáadtunk 200 µl „A” oldatot (15 mM TRIS HCl pH: 8, 10 mM EDTA, 50 mM glükóz), Vortex segítségével összekevertük, majd öt percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Aztán hozzámértünk 400 µl „B” oldatot (0,2 M NaOH, 1 % SDS), összeforgattuk, majd 300 µl „C” oldatot (60 ml 5 M Na-acetát, 11,5 ml ecetsav, 28,5 ml steril H₂O) és ezzel is összeforgattuk, öt percre jégre helyeztük, azután öt percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A felülúszót új Eppendorf csőbe töltöttük, így öt percig centrifugáltuk, majd a felülúszót ismét új Eppendorf csőbe töltöttük, és hozzáadtunk 600 µl izopropanolt, ezzel összeforgattuk, és öt percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten. Elöntöttük a felülúszót, lecsöpögtettük, és a pellethez hozzáadtunk 200 µl „D” oldatot (0,1 M Na-acetát pH: 7, 0,05 M TRIS HCl pH: 8), ezt hagytuk szobahőmérsékleten állni 10 percig, majd Vortex

segítségével kevertük, végül 400 µl etanollal öt percig centrifugáltuk, a felülúszót elöntöttük, és a pelletet beszárítottuk 30 perc alatt. Utolsó lépésként a pelletet visszaoldottuk 100 µl RNase TE-ben (1 ml 10x TE, 9 ml steril H₂O, 10 µl RNase (10 mg/ml)) **(Maniatis és mtsai., 1989).**

3.3.6.1.7 Az inzert ellenőrzése

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

Az emésztéshez az alábbiakat mértük össze, egyenként 10µl végtérfogatra:

2 µl plazmid (0,5 µg)

1 µl 10x *EcoRI* puffer

0,2 µl *EcoRI* enzim (10 u/µl)

6,8 µl H₂O

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

A mintákat 1 % -os agaróz gélben megfuttattuk, és ellenőriztük, a megfelelő hosszúságú inzert kivágódását.

3.3.6.1.8 Plazmid tisztítás szekvenáláshoz

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

3.3.6.1.9 A nukleinsav szekvencia meghatározása és analízise

Szekvencia meghatározásra a tisztított rekombináns plazmidot M13 reverse és M13 forward primerekkel szekvenáltattuk Szegeden, a BayGen Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetben, ahol a szekvencia meghatározást GeneAmp PCR System 9700-as szekvenátorral végezték.

A szekvenciák összehasonlításához az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázist használtuk fel. A filogenetikai törzsfa elkészítéséhez és a szekvenciák összehasonlításához a CLC szekvencia analízáló programcsomagot használtunk

Az adatbankból a következő hivatkozási számokon található *E. amylovora* izolátumok 16S rDNS szekvenciáit hasonlítottuk össze az általunk meghatározott *E. amylovora* izolátumával: af289542, af141892, aj46201, am980507, ay456710, fn434113, fn666575, fj594363, aj010485, x83265, fj611856, nr041970, ab546196, z96088, fj594366.

3.3.6.2 A pEA29 plazmid molekuláris vizsgálata

3.3.6.2.1 PCR paraméterei

A PCR-hez használt indító szekvenciák:

pEA29A (reverse)

pEA29B (forward)

A PCR elegy összetétele 50 µl végtérfogatra:

35,5 µl steril H₂O

2 µl baktérium szuszpenzió (10⁷ sejt/ml)

5 µl 10x *Taq* puffer

3 µl MgCl₂ (20 mM)

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

1 µl primer pEA29A (20 pmol/µl)

1 µl primer pEA29B (20 pmol/µl)

0,5 µl *Taq* polimeráz enzim (5 u/µl)

A reakció paraméterei:

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

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

3.3.6.2.2 Gélelektroforézis

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

3.3.6.2.3 A PCR-termék tisztítása

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

3.3.6.2.4 A szekvencia meghatározása és analízise

A tisztított PCR termékeket Szegedre, a BayGen Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetbe küldtünk, ahol a szekvencia meghatározást GeneAmp PCR System 9700-as szekvenátorral végezték. A szekvenciák összeillesztéséhez a CLC SEQUENCE Viewer 6.5.1. szekvencia analízáló programcsomagot használtuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A betegség tünetei szilvahajtáson

A tünetek a friss szilvahajtáson jelentkeztek. A tünetek tipikusan *E. amylovora* jelenlétére utaltak: pásztorbatszerű görbület, a hajtás megbarnult, majd elhalt (**12. ábra**).



12. ábra: *E. amylovora* tünetei szilvahajtáson
(Fotó: Némethy Zsuzsanna)

4.2 A kórokozó azonosítása klasszikus módszerrel

4.2.1 A Gram-féle tulajdonság

A 3 % -os kálium-hidroxid feloldotta a baktérium sejtfalát, így az általunk izolált baktérium Gram-negatív.

4.2.2 Hiperszenzitív reakció vizsgálata

A kórokozó 5×10^8 sejt/ml töménységű szuszpenziójával inokulált dohány növények levelein 24-48 óra elteltével kialakult a hiperszenzitív reakciót jelző gyors szöveti nekrózis (**13. ábra**).



13. ábra: Szilváról származó Ea izolátum hiperszenzitív reakciója dohánynövény levelén
(Fotó: Hajagos Laura)

4.2.3 A kórokozó morfológiai jellemzői

A kórokozó tenyésztése általános King-B táptalajon folyós, tejszerű, mukoid, krémszínű. Ezen táptalajon egységes kolóniákat képez, mely alapján elkülönítése más fajoktól nem lehetséges. King-B táptalajon könnyen tenyészthető, fenntartható, mert gyorsan fejlődik (**14. ábra**).



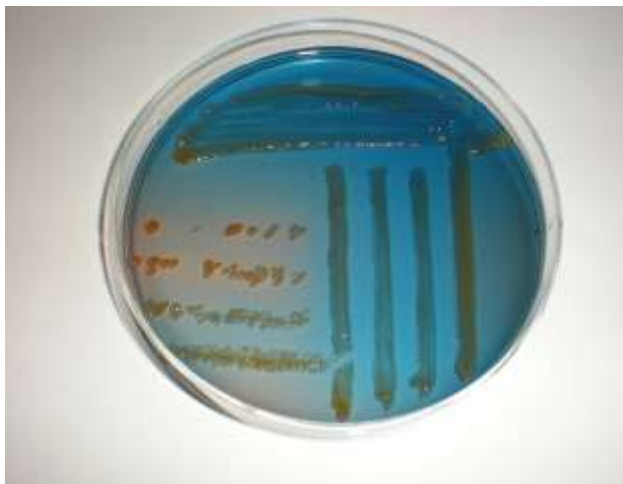
14. ábra: Szilváról származó Ea izolátum 2 napos tenyésztete King-B táptalajon
(Fotó: Végh Anita)

Miller-Schroth (MS) táptalajon minden *Erwinia* faj képes növekedni. Az *E. amylovora* tenyésztete narancssárga színű, áttetsző udvarral. A tenyészet folyós állagú, a kolóniák felülete sima, ép szélű (**15. ábra**).



15. ábra: Szilváról származó Ea izolátum 2 napos tenyésztése Miller-Schroth táptalajon
(Fotó: Hajagos Laura)

A Kado-Heskett táptalaj kimondottan *Erwinia* fajokra szelektív. A táptalajon piros-narancssárga színű kolóniákat képez, melynek intenzitása függ a fajtól. A reakcióidő 48 h, majd a kolóniák színe egységesen narancssárga színűvé válik. A kolónia szintén folyós állagú, felülete sima, ép szélű (**16. ábra**).



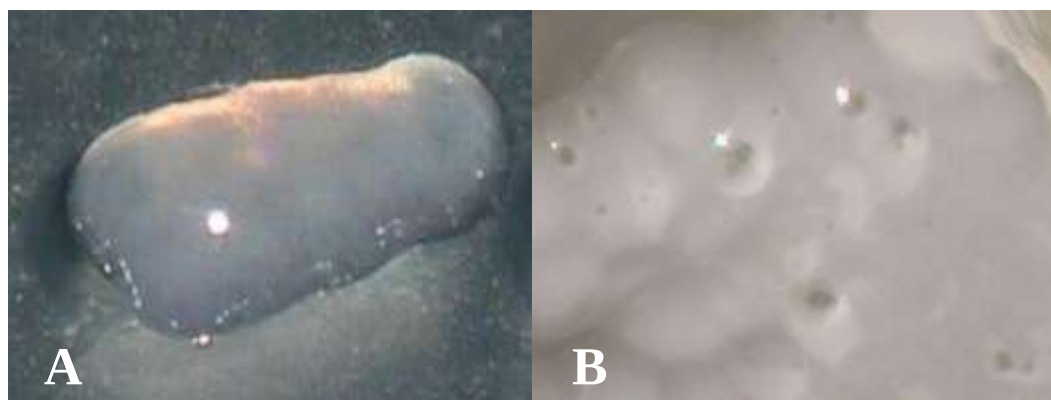
16. ábra: Szilváról származó Ea izolátum 2 napos tenyésztése Kado-Heskett táptalajon
(Fotó: Hajagos Laura)

A Crosse-Goodman (CG) táptalaj kifejezetten *E amylovora*-ra szelektív. A kórokozó tenyésztése kiemelkedő, ép szélű (**17. ábra**).



17. ábra: Szilváról származó Ea izolátum 2 napos tenyésztete Crosse-Goodman táptalajon
(Fotó: Hajagos Laura)

Növekedése során a kolóniák felületén jellegzetes kráterek alakulnak ki. Mivel ez a táptalaj a kórokozóra szelektív, ezért a szilva mintáról származó izolátumot összehasonlítottuk az Ea1 izolátummal, mely almáról származott. A szilva izolátum kolóniáin nem figyelhetők meg kráterek, míg az Ea1 izolátum kráterekkel rendelkezik **(18. ábra)**. Eredményeink alapján elmondható, hogy a két különböző gazdanövényről származó izolátum eltérő morfológiai eredményt ad a CG táptalajon.



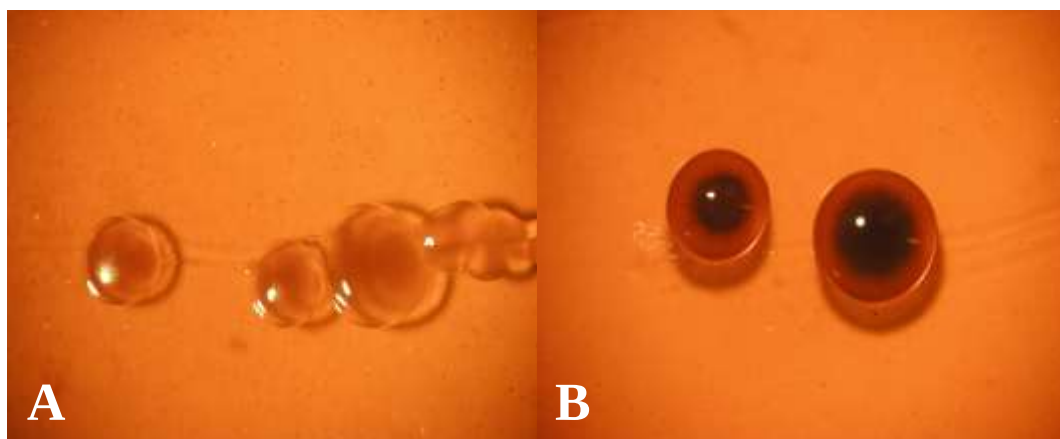
18. ábra: Szilváról (A) és almáról (B) származó Ea izolátumok tenyésztetei Cross-Goodman táptalajon
(Fotó: Végh Anita)

Az Eosin Methylene Blue (EMB) agar táptalajon a baktérium tenyésztete kiemelkedő, sima felületű, ép szélű **(19. ábra)**.



19. ábra: Szilváról származó Ea izolátum tenyésztete EMB táptalajon
(Fotó: Hajagos Laura)

A laktózt, szacharózt bontó és nem bontó baktériumok között tesz különbséget. Ezeket bontó baktériumok világos, áttetsző szélű, fekete közepű kolóniát képeznek, míg a laktózt, szacharózt nem bontóak színtelenek (**20. ábra**). A kolóniák alapján elmondható, hogy a szilváról származó izolátum erőteljesen bontja a laktózt, szacharózt, míg az Ea1 nem.



20. ábra: Szilváról (A) és almáról (B) származó Ea izolátumok kolóniái EMB táptalajon
(Fotó: Végh Anita)

4.2.4 A kórokozó biokémiai jellemzői

Az API20E kit alapján az általunk vizsgált baktérium izolátum pozitív reakciókat adott a β -galaktozidáz, citrát hasznosításra, acetoin termelésre valamint glükóz, mannit, szorbit, szacharóz, melibióz, arabinóz vizsgálatokban (**21. ábra, 1. táblázat**). Az oxidáz-teszt során az izolátum pozitív reakciót adott. Az általunk vizsgált baktérium nagy valószínűséggel, az *Enterobacteriaceae* családba tartozik.



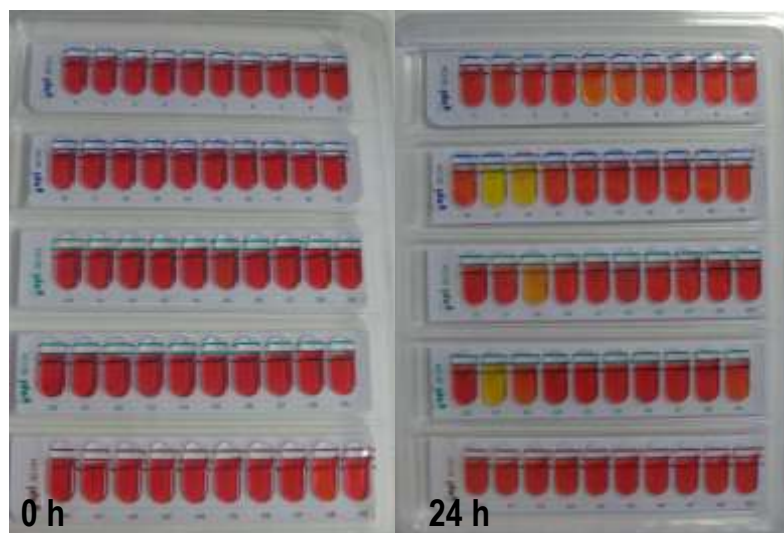
+ - - - + - - - - + - + + - + - + + - +

21. ábra: Az API20E 24 órás teszt eredménye szilváról származó Ea izolátum esetében (Fotó: Hajagos Laura)

1. táblázat: Az API20E 24 órás teszt eredménye szilváról származó Ea izolátum esetében

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

Az API50CH kit az adott kórokozóra vonatkozó biokémiai jellemzőket határozza meg. Az API50CH kit jellegzetessége, hogyha az adott baktérium az adott szénhidrátot hasznosítja, akkor egy színreakció megy vége: az eredeti piros színű oldat sárgára változik át (**22. ábra**). A kit a baktériumok 49 féle szénhidrát hasznosítását vizsgálja. Ebben a kísérletben összehasonlítottuk a szilváról származó izolátumot az Ea1 izolátummal. Mindkét izolátum 48 óra elteltével hasznosította a glicerolt, L-arabinózt, ribózt, D-xilózt, galaktózt, glükózt, fruktózt, mannózt, inozitot, mannitot, szorbitot, N-acetil-glükozamint, cellobiózt, keményítőt, trechalózt, raffinózt és gentiobiózt. Azonban különbségeket találtunk az izolátumok között, mert a szilváról származó izolátum nem hasznosította az amygdalint, arbutint és a D-fukózt. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a két különböző gazdanövényről származó izolátum között eltérések vannak a biokémiai vizsgálatok alapján.



22. ábra: Szilváról származó Ea izolátum szénhidrát hasznosítása különböző időpontban (0- kontroll, 1-49 különböző szénhidrátok; szénhidrát hasznosítás színreakciót eredményez)

4.2.5 Patogenitási teszt

Kísérletünkben visszafertőztünk fiatal szilvahajtásokat, illetve gyümölcsöket (szilva, körte). A baktérium szuszpenzióval inokulált tesztnövények különböző mértékben fertőződtek. Megállapítottuk, hogy a szilvahajtások 5 nap elteltével intenzíven reagáltak a fertőzésre. A mesterséges visszafertőzés sikeres volt (**23. ábra**).



23. ábra: Szilváról származó Ea izolátummal mesterségesen visszafertőzött szilvahajtások (Fotó: Végh Anita)

A szilvatermés esetén a betegségre jellemző tünet nem alakult ki. A körte mesterséges fertőzése viszont pozitív eredményt adott, melynek mértékére a gyümölcsön kialakult tünet méretéből következtettünk. A fogékony körtén az inokuláció helyén diffúz, határozott szélű, besüppedő

konzisztenciájú nekrotikus folt jelent meg. A fertőzési index alapján a szilva izolátummal fertőzött 'Eldorado' körtefajta közepesen fogékonyak tekinthető (24. ábra).



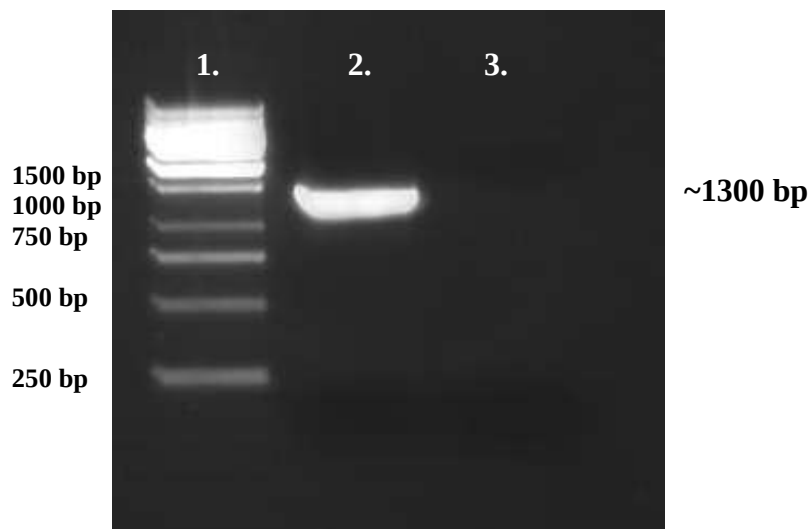
24. ábra: Ea szilva izolátummal inokulált termékek (A- szilva, B-'Eldorado' körtefajta)
(Fotó: Hajagos Laura)

4.3 A kórokozó molekuláris azonosítása

4.3.1 A 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata

4.3.1.1 PCR vizsgálat

A reakció eredményeként kb.1300 bp hosszúságú PCR-termék keletkezett (25. ábra).



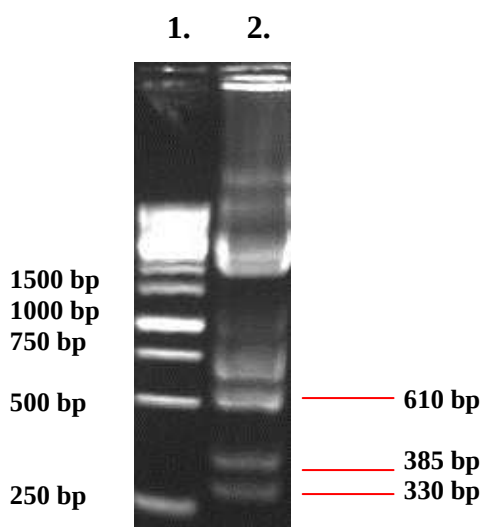
25. ábra: Szilva Ea izolátum PCR analízise
Jelmagyarázat: 1.- 1 kb méretmarker, 2.- PCR termék, 3. negatív kontroll

4.3.1.2 Minipreparátum

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

4.3.1.3 Tisztított, *EcoRI* enzimmel emésztett plazmid

Az *EcoRI* enzimmel emésztett rekombináns plazmidból különböző hosszúságú részlegesen emésztett, ill. egy 610 bp, egy 385 bp és egy 330 bp hosszúságú teljesen emésztett inzertek vágódtak ki (**26. ábra**). A szekvencia analízis megerősítette két *EcoRI* restrikciós enzim hasítóhely jelenlétét a bakteriális szekvencia részben.



26. ábra: Szilva Ea izolátum hasított plazmidja

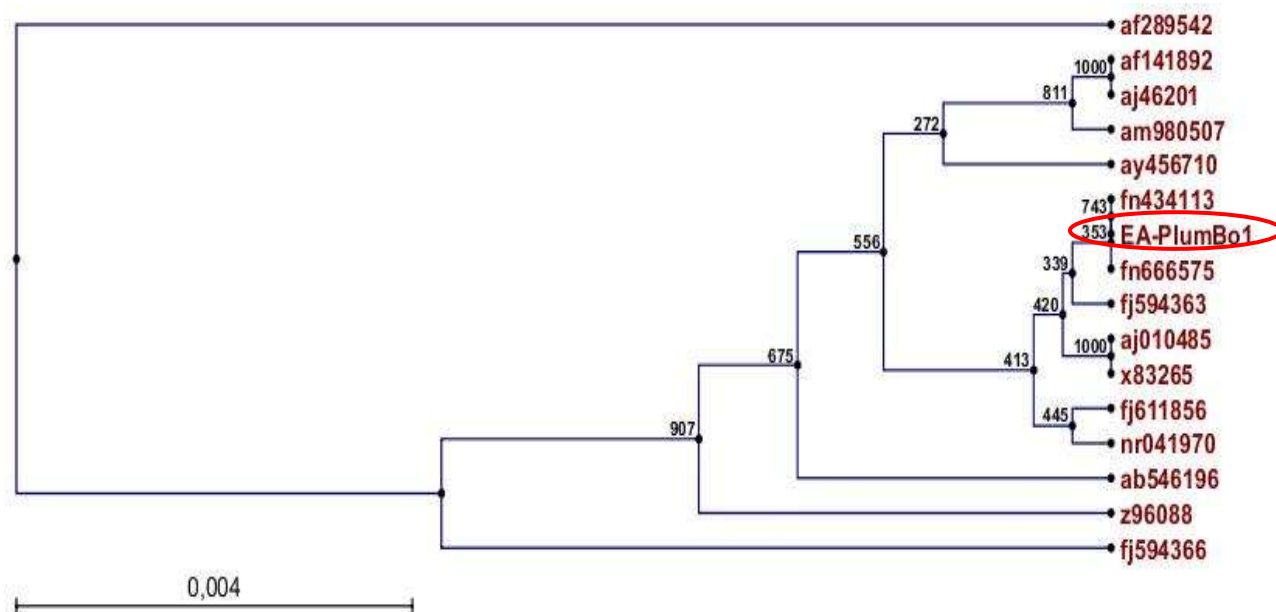
Jelmagyarázat: 1. – 1 kb méretmarker, 2. – *EcoRI* enzimmel vágott rekombináns plazmid, a specifikus hasítási termékeket jelöltük, méretük feltüntetésével, a többi részleges emésztett hasítási termék

4.3.1.4 Rokonsági kapcsolatok feltárása

A magyar izolátum (Ea-PlumBo1) részlegesen meghatározott 16S rDNS nukleotid szekvenciáját (1323 bázis) elküldtük a nemzetközi adatbankba, amely az HE610678 hivatkozási számon található (**1. sz. melléklet**).

A nemzetközi adatbázisban található szekvenciákkal összehasonlítottuk a szilváról származó izolátum szekvenciáját. Az összehasonlítás alapján a vizsgált szakaszon 100 % homológiát mutatott a szilva izolátum két másik izolátummal, az fn434113 hivatkozási számon található német izolátummal,

illetve az fn666575 számú angol izolátummal. Míg a többi vizsgált izolátumokkal a szilva izolátum 98-99 %-os homológiát adott, melyek különböző gazdanövényekről, körtéről, japán körtéről valamint *Rubus* fajokról származtak. Az adatok alapján elkészítettük a filogenetika törzsfát (27. ábra). A filogenetikai fán megfigyelhető, hogy a szilva izolátum a legtávolabbi rokonságban az af289542 azonosítási számú kanadai izolátummal van.



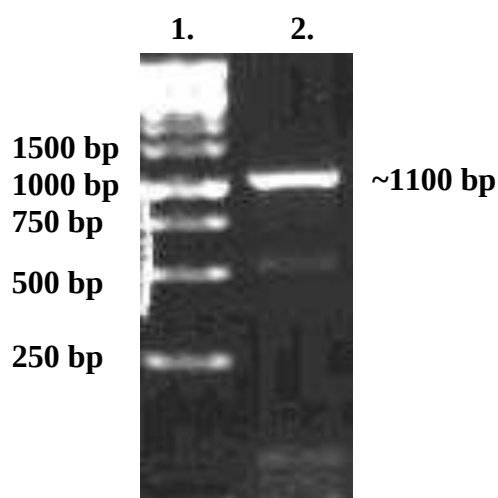
27. ábra: *E. amylovora* izolátumok filogenetikai törzsfája, adatbanki hivatkozási számmal, EA-PlumBo1 a saját izolátumunk

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

4.3.2 A pEA29 plazmid molekuláris vizsgálata

4.3.2.1 PCR vizsgálat

Munkánk során a szilváról származó *E. amylovora* izolátumot vizsgáltunk SSR molekuláris vizsgálat alapján. A PCR során az *E. amylovora* pEA29 plazmid ismétlődő régiójára specifikus pEA29A és pEA29B primerekkel megközelítőleg 1100 bázispár (bp) hosszú szakaszát sikerült felszaporítanunk (28. ábra). A PCR-termék nukleotid szekvenciáját meghatároztuk. A szekvenciákban megtaláltuk a pEA29 plazmid ismétlődő régióját (29. ábra), az SSR-eket (short sequence repeat – rövid szekvencia ismétlődés), mely a hazai szilváról származó *E. amylovora* izolátum esetében 8 ismétlődést jelent.



28. ábra: Az *E. amylovora* (szilva) izolátum PCR termékének gélelektroforézis fotója
Jelmagyarázat: 1. – méretmarker, 2. – PCR termék



29. ábra: Szilváról származó *E. amylovora* pEA 29-es plazmid *Pst*I fragmentum ismétlődő régiója
(Lila színnel jelöltük az ismétlődő szekvenciát tartalmazó szakaszt.)

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A tűzelhalás kórokozóját, az *E. amylovora*-t 2011 nyarán, Budaörsről származó szilva (*Prunus domestica* L. 'd'Agén') hajtásáról azonosítottuk. Eddig a tűzelhalás szilván történő természetes fertőződéséről az irodalmak alapján csak az USA-ban (**Mohan és Thomson, 1996; Mohan és Bijman, 1998; Mohan, 2007**) és Németországban (**Vanneste és mtsai, 2002**) számoltak be. A kórokozó Magyarországi megjelenéséről a hazai irodalomban még nincsenek adatok.

Van der Zwet és Keil (1979) leírásai alapján a tűzelhalás tipikus tünetei a hajtásvégen pásztorbatszerűen visszagörbülnek, barnulnak, végül elhalnak, mely az általunk vizsgált szilva hajtás tüneteivel megegyeztek.

A baktérium **Lelliott és Dickey (1984)** szerint Gram-negatív, pálcika alakú. Megfigyeléseik megegyeznek az általunk izolált baktérium tulajdonságaival.

Hevesi (1996) szerint a kórokozó a dohánynövényen hiperszenzitív reakciót vált ki, ez azonos a mi megfigyeléseinkkel. Az inokulált dohányleveleken 24-48 óra elteltével erőteljes szöveti nekrosis jelentkezett. **Bereswill (1998)** kísérletei alapján a baktérium fejlődésének a 26 °C kedvez, de **Steiner és Zeller (1996)** szerint 4–26 °C -ig jól fejlődik. A kórokozó megfigyeléseink alapján jól tenyésztethető 24-26 °C -on.

Bereswill és mtsai (1998) alapján a King-B, Miller-Schroth, Kado-Heskett, Crosse-Goodman táptalajok alkalmasak az *E. amylovora* tenyésztésére és más fajoktól való megkülönböztetésre, illetve fajok közötti különbségek kimutatására. Eredményeink is ezt támasztották alá: a kórokozó tenyésztete King-B táptalajon folyós, tejszerű, mukoid, krémszínű, mely táptalajon egységes kolóniákat képez; Miller-Schroth (MS) táptalajon minden *Erwinia* faj képes növekedni, tenyésztetük narancssárga színű, áttetsző udvarral; Kado-Heskett táptalaj kimondottan *Erwinia* fajokra szelektív, melyen piros-narancssárga színű kolóniákat képez; míg Crosse-Goodman táptalaj kifejezetten *E. amylovora*-ra szelektív, ahol növekedésük során a kolóniák felületén jellegzetes kráterek alakulnak ki. **Holt-Harris és Teaque (1916)** leírása szerint az Eosin Methylene Blue agar táptalajon a baktérium tenyésztete kiemelkedő, sima felületű, ép szélű, mely a laktózt, szacharózt bontó és nem bontó baktériumok között tesz különbséget. Ezeket bontó baktériumok világos, áttetsző szélű, fekete közepű kolóniát képeznek, míg a laktózt, szacharózt nem bontóak színtelenek. Eredményeink a szilváról származó és az Ea1 izolátumok összehasonlító vizsgálata alátámasztja ezt a megállapítást.

A kórokozó biokémiai vizsgálata során megállapítottuk, hogy az API20E kit alkalmas az azonosítására, és az API50CH kit pedig a kórokozó biokémiai tulajdonságainak jellemzésére. Az

API20E eredményei alapján az általunk vizsgált baktérium izolátum pozitív reakciókat adott a β -galaktozidáz, citrát hasznosításra, acetoin termelésre valamint glükóz, mannit, szorbit, szacharóz, melibióz, arabinóz vizsgálatokban és oxidáz-teszt során az izolátum pozitív reakciót adott, mely eredmények részben egybevágóak **Hevesi (1996)** megállapításaival. Az API50CH kit kísérletben összehasonlítottuk a szilváról származó izolátumot az Ea1 izolátummal. Mindkét izolátum 48 óra elteltével hasznosította a glicerolt, L-arabinózt, ribózt, D-xilózt, galaktózt, glükózt, fruktózt, mannózt, inozitolt, mannitolt, szorbitolt, N-acetil-glükozamint, cellobiózt, keményítőt, trechalózt, raffinózt és gentiobiózt. Azonban különbségeket találtunk az izolátumok között, mert a szilváról származó izolátum nem hasznosította az amygdalint, arbutint és a D-fukózt, tehát a két különböző gazdanövényről származó izolátum között eltérések vannak a biokémiai vizsgálatok alapján.

A molekuláris vizsgálatok során vizsgáltuk a 16S riboszómális RNS-t kódoló gén bázis-sorrendjét valamint az *E. amylovora* -ban megtalálható pEA29 plazmid nukleinsav szekvenciáját. A 16 S RNS gén vizsgálat során PCR technika segítségével egy 1300 bázispár (bp) hosszúságú PCR termék keletkezett, mely szekvenciáját meghatároztattuk. Az összehasonlítás alapján a vizsgált szakaszon 100 % homológiát mutatott a szilva izolátum a német (fn434113) és az angol (fn666575) izolátumokkal, míg a többi izolátummal 98-99 %-os. Az *E. amylovora* pEA29 plazmid ismétlődő régiójára specifikus pEA29A és pEA29B primerekkel megközelítőleg a PCR során 1100 bp hosszú szakaszt sikerült felszaporítanunk. A PCR termék nukleotid szekvenciáját meghatároztuk. A szekvenciákban megtaláltuk a pEA29 plazmid ismétlődő régióját, az SSR -eket, mely a hazai szilváról származó *E. amylovora* (Ea-PlumBo1) izolátum esetében 8 ismétlődést jelent. **Keck és mtsai (2002)** egy osztrák-magyar kooperáció keretén belül elvégezték több magyarországi és ausztriai *E. amylovora* izolátumok összehasonlító molekuláris vizsgálatát a pEA29 plazmid *Pst*I fragmentjének ismétlődő régiójára. Eredményeik alapján elmondható, hogy az osztrák izolátumok domináns populációjában (94%) ez a szakasz (ATTACAGA) 10-14-szer ismétlődik, míg a magyar izolátumok esetében az izolátumok domináns populációja (75 %) a 4-szer ismétlődő szekvencia csoportba tartozott. A magyar izolátumok alma, körte, birs és galagonya növényekről származtak. Vizsgálatuk során meghatározták az Ea1 -es izolátumot is, melynek SSR száma kilenc. Eredményeinket összevetve itt is tapasztalható az Ea1 és a szilváról származó izolátumok eltérése. **Ruppitsch és mtsai (2004)** kísérletei alapján megállapítható, hogy a különböző gazdanövényekről (alma, körte, tűztövis) származó izolátumok eltérő SSR-eket (3-14 SSR) tartalmaznak.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám során feladatomban volt az országban új gazdanövényen, szilván (*Prunus domestica* L. ‘d’Agen’) megjelent *E. amylovora* baktérium meghatározása, jellemzése klasszikus és molekuláris biológiai módszerekkel, rokonsági kapcsolatainak feltárása, mesterséges visszafertőzés szilvahajtáson és terméseken (szilva, körte) és más gazdanövényről származó izolátummal való összehasonlítása.

A kórokozó Budaörsön, 10-15 év körüli szilvafa fiatal hajtásán jelent meg. A fertőzött hajtásból a baktériumot a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában izoláltuk, majd azonosítottuk. A klasszikus jellemzés során megállapítottuk, hogy a baktérium Gram-negatív, tenyésztése a különböző táptalajok esetében megegyezik az irodalomban leírtakkal, valamint a Crosse-Goodman és az Eosine Methylen Blue agaron különbséget találtunk a szilváról és az almáról (Ea1) származó izolátum esetében. Dohánynövényen hiperszenzitív reakciót vált ki. Biokémiai tulajdonságaiban az API20E esetében megegyezik az *E. amylovora* tulajdonságaival. A szilva API50CH eredményét összehasonlítottuk az Ea1 izolátumával. A 49 féle szénhidrát hasznosítás során különbségeket fedeztünk fel a különböző gazdanövényről származó izolátumok között.

Az izolátum 16S riboszomális RNS-t kódoló DNS szakaszának nukleotid sorrendjét is meghatároztuk. Megállapítottuk, hogy a betegség kórokozója az *E. amylovora*. A magyar izolátum (Ea-PlumBo1) legközelebbi rokonságban egy német és egy angol izolátummal áll, mely az NCBI adatbázisban a HE610678 nyilvántartási számon található. Meghatároztuk a szilváról származó izolátum pEA29 plazmid *Pst*I fragmentjének ismétlődő nukleotid szekvenciáját, mely nyolc ismétlődést jelent.

A patogenitási teszt alapján mesterségesen visszafertőztünk fiatal szilvahajtásokat, melyek erősen fertőződtek. Megállapítottuk, hogy a kórokozó nem fertőzi a szilva gyümölcsöt, valamint az ‘Eldorado’ körtefajta közepesen fogékony a szilváról származó *E. amylovora* izolátumra.

Eredményeinket összegezve, elmondhatjuk, hogy mind klasszikus, mind molekuláris vizsgálatok alapján a tűzelhalás kórokozóját az *E. amylovora*-t izoláltuk szilvahajtásról, melynek természetes fertőződéséről eddig csak az USA-ban és Németország északi részén számoltak be. Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy különböző gazdanövényekről származó izolátumok morfológiai, biokémiai és genetikai tulajdonságok alapján eltérnek. A tűzelhalás megjelenése szilván a hazai gyümölcsstermesztés szempontjából jelentős gazdasági károkat okozhat, ez arra hívja fel a figyelmet, hogy a *Prunus* fajok is fogékonyak lehetnek a tűzelhalás betegségre, elősegítve ezzel a kórokozó fennmaradását és továbbterjedését új gazdanövényekre.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani konzulens tanárainnak, Végh Anitának és Dr. Palkovics Lászlónak, akik mindvégig bíztattak, munkámat irányították, támogatták és nyomon követték, minden kérdésemre készségesen válaszoltak és a fényképek elkészítése során is sok segítséget nyújtottak.

Köszönettel tartozom Dr. Hevesi Máriának az Ea1 izolátumért, Pájtli Évának és Dr. Némethy Zsuzsannának szíves segítségükért.

Köszönöm családom és barátaim türelmét és támogatását, valamint hálával tartozom Grüner Gabriellának a FAO-VM ösztöndíj elnyerésében nyújtott segítségéért, melynek keretein belül részt vehetek a Növényorvos MSc képzésben.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. **Agrios N. G.** 1997. Plant Patology (4th Edition). 413. - Academic press, USA.
2. **Arsenijević, M., Panić M., Antonijević, D.** 1991. Fire blight of pomaceous trees in Yugoslavia. In: Plant Protection. 42 évf. 196 sz. p. 87-97.
3. **Arsenijević, M., Panić M.** 1992: First appearance of fire blight, caused by *Erwinia amylovora*, on quince and pear in Serbia. In: Plant Disease. 76 évf. p. 1283.
4. **Balaž, J.** 1999. Status of *Erwinia amylovora* in Yugoslavia: Distribution, identification and control. In: Acta Horticulturae. 489 sz. p. 99-103.
5. **Balaž, J., Knežević, T., Smiljanić, A., Stojšin, V.** 2004. *Chaenomeles japonica* i *Cotoneaster horizontalis* novi domaćini *Erwinia amylovora* u Srbiji. In: Zastita bilja. 55 évf. 1-4 sz. p. 87-96.
6. **Balaž, J., Keserović, Z., Aćimović, S., Nikolić, Z., Mažić, J.** 2009. *Erwinia amylovora* u Vojvodini i postupci za stavljanje pod kontrolu. In: Biljni lekar. Külön kiadás. p. 46-56.
7. **Baranyi, T., Valovics A.** 2011. Engedélyezett biológiai készítmények kertészeti kultúrákban. In: Mezőhír. 11-12 sz. p. 96-97.
8. **Bereswill, S., Jock, S., Belleman, P., and Geider, K.** 1998. Identification of *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containig copper sulfate and by capsule stainig with lecitin. In: Plant Dis. 82 évf. 2 sz. p. 158-164.
9. **Bernet, C., Garret, M., de Barbeyrac, B., Bebear, C., and Bonnet, J.** 1989. Detection of *M. pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. In: J. Clin. Microbiol., 27 évf. 11 sz. p. 2492-2496.
10. **Bonn, W.G., van der Zwet, T.** 2000. Distribution and Economic Importance of Fire Blight. In: Vanneste, J. L (szerk.), Fire blight: The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. Wallingford, United Kingdom. CABI Publishing (CAB International). p. 37-45.
11. **Böszörményi, É., Érsek, T., Fodor, A., Földes, L. Sz., Hevesi, M., Hogan, J. S., Katona, Z., Klein, M. G., Kormány, A., Pekár, Sz., Szentirmai, A., Sztaricskai, F., Taylor, R., A. J.** 2009. Isolation and activity of *Xenorhabdus* antimicrobial compounds against the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Phytophthora nicotianae*. In: Journal of Applied Microbiology. 107 évf. 3 sz. p. 746-759.
12. **Choi, S.T., H. K. Ahn, Y. D. Chang,** 1996. Effect of crude extracts and chopped shoot application of *Allium* spp. on rice growth. In: Kor. J. Crop. Sci. 41 évf. p. 625-633.

13. **Clarridge J. E.** 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. In: Clin. Microbiol. Rev. 17 évf. 4 sz. p. 840-862.
14. **Crosse, J. E., Goodman, R. N.** 1973. A selective medium for and a definitive colony characteristic of *Erwinia amylovora*. In: Phytopathology. 63 évf. 11 sz. p. 1425-1426.
15. **Csete S., Garai A., Zsolnai G.** 2004. Helyzetkép a tűzelhalásról 2004 tavaszán Borsod-Abaúj-Zemplén megyében. In: Gyakorlati Agrofórum. 15 évf. 3 sz. p. 68-69.
16. **Demir, G., Gündogdu, M.** 1993. Fireblight of pomefruit trees in Turkey: distribution of the disease, chemical control of blossom infection and susceptibility of some cultivars. In: Acta Horticulturae. 338 sz. p. 67-74.
17. **Dénes Z.** 2007. Újra itt a tűzelhalás. <http://mno.hu/portal/415108>, 2007. június 9.
18. **Dreo, T., Zupancic, M., Demsar, T., Ravnikar, M.** 2006. First outbreak of fire blight in Slovenia. In: Acta Horticulturae. 704 sz. p. 37-41.
19. **Evans I. R.** 1996. Fire blight of raspberries in Alberta. In: Acta Horticulturae. 411 sz. p. 69-72.
20. **Gayle, C., McGhee, Alan L. J.** 2000. Complete Nucleotide Sequence of Ubiquitous Plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* Strain Ea88: Gene Organization and Intraspecies Variation. In: Applied and Environmental Microbiology. 66 évf. 11 sz. p. 4897-4907.
21. **Gavrilović, V., Arsenijević, M.** 1998. Vatretni trn - novi domaćini bakterije *Erwinia amylovora* za našu zemlju. In: Biljni lekar. 26 évf. 1 sz. p. 52-55.
22. **Hajósné dr. Novák M.** 1999. Genetikai variabilitás a növénynemesítésben. Mezőgazda Kiadó. Budapest. p. 39-61.
23. **Hauben, L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. és Swings, J.** 1998. Phylogenetic Position of Phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*; In: Syst. Appl. Microbiol. 21 évf. 3 sz. p. 384-397.
24. **Hevesi M.** 1996. Az *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al. hazai megjelenése almán. In: Növényvédelem. 32 évf. 5 sz. p. 225-228.
25. **Holt-Harris, J. E., O. Teague.** 1916. A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosa* from stools. In: J. Infect. Dis. 18 évf. p. 596-601.
26. **Horsfall, J. G. and Barrett, R. W.** 1945. An improved grading system for measuring plant disease. In: Phytopathology. 35 évf. p. 655.
27. **Hugh, R., Leifson, E.** 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. In: Journal of Bacteriology. 66 évf. 1sz. p. 24-26.

28. **Ishimaru, C., Klos, E.J.**, 1984. New Medium for Detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. In: Phytopathology. 74 évf. 11 sz. p. 1342-1345.
29. **Jacob, H. J., Lindpaintner, K., Lincoln, S. E., Kusumi, K., Bunker, R. K., Mao, Yi-Pei., Ganten, D., Dzau, V. J., Lander, E. S.** 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypersensitive rat. In: Cell. 167 évf. p. 213-224.
30. **Kado, C. I., Heskett, M. G.** 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. In: Phytopathology. 60 évf. p. 969-976.
31. **Keck, M., Hevesi M., Ruppitsch, W, Stöger, A., Richter, S.** 2002. Spread of fire blight in Austria and Hungary-variability of *Erwinia amylovora* strains. In: Plant Protect. Sci. 38 évf. 1sz. p. 49-55.
32. **King, E. O., Ward, M. K., Raney D, E.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. In: J. Lab. & Clin. Med. 44 évf. 2 sz. p. 301-307.
33. **Kiss Gy. B.** 1999. A növényi molekuláris DNS szerveződése. p. 11-36. In: Balázs, E., Dudits, D. (szerk). Molekuláris növénybiológia. Szemelvények. Akadémiai Kiadó. Budapest.
34. **Koch, R.** 1876. Untersuchungen Über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten. Leipzig: F.C.W. Vogel. p. 8-62.
35. **Kokosková, B.** 1996. Uncinnost antagonistických bakterií a chemikálií proti bakteriím *Erwinia amylovora* v podmínkách in vitro. In: Ochrana Rotlin. 29 évf. 1 sz. p. 31-39.
36. **Korba, J., Sillerova, S.** 2010. First occurrence of fire blight infection on apricot (*Prunus armeniaca*) in Czech Republic. 12th International Workshop on Fire Blight. 16-20 August, 2010. Warsaw. Abstracts: 107.
37. **László, Gy.** 2008. Az almatermésűek tűzelhalása (*Erwinia amylovora*) elleni új védekezési lehetőség Magyarországon. In: Növényvédelem. 44 évf. 3 sz. p. 147-149.
38. **Lelliot, R. A., Billing, E., Hayward, A. C.** 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. In: Journal of Applied Bacteriology. 29 évf. 3 sz. p. 470-489.
39. **Lelliot, R. A., Dickey R. S.** 1984. Genius VII. *Erwinia amylovora* Winslow et al. In: (Krieg, N. R. szerk.) Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. The Williams and Wilkins, Baltimore. 1 évf. p. 169-471.
40. **Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E. F.** 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual (3rd volume). Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
41. **Mérő F.** 2004. Helyzetkép a tűzelhalásról 2004 tavaszán Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében. In: Gyakorlati Agroforum, 15 évf. 3. sz. p. 70-71.

42. **Miller, T. D., Schroth, M. N.**, 1972. Monitoring the Epiphytic Population of *Erwinia amylovora* on Pear with a Selective Medium. In: Phytopathology. 62 évf. p. 1175-1182.
43. **Mohan S. K.** 2007. Natural infection of shoot blight in Pluot® caused by *Erwinia amylovora*. In: 11th International workshop on Fire Blight. Portland, Oregon. 12-17 August, 2007, Abstracts: 64.
44. **Mohan, S. K., Bijman, V. P.** 1998. Susceptibility of *Prunus* species to *Erwinia amylovora*. In: 8th Int. Workshop on Fire Blight, Abstracts: 27.
45. **Mohan, S., K., Thomson, S. V.** 1996. An outbreak of fire blight in plums. In: Acta Horticulturae. 411 sz. p. 73-76.
46. **Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.** 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. In: Cold. Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51. évf. 1 sz. p. 263-273.
47. **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. Budapest. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft.
48. **Németh J.** 1999. Occurrence and spread of fire blight (*Erwinia amylovora*) in Hungary (1996-1998). Management of the disease. In: Acta Horticulturae. 489 sz. p. 177-185.
49. **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 XXI. p. 12-17.
50. **Richter K.** 1998. Detection of *Erwinia amylovora* cells in apple shoots. In: 8th International Workshop on Fire Blight. Book of Abstracts: 104.
51. **Ruppitsch, W., Stöger, R. A., Keck, M.** 2004. Stability of short sequence repeats and their application for the characterization of *Erwinia amylovora* strains. In: FEMS Microbiology Letters. Vienna. 234 évf. 1 sz. p. 1-8.
52. **Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
53. **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*. In: Applied and Environmental Microbiology. 67 évf. 1 sz. p. 59-64.
54. **Seibold, A., Giesen, N., Jelkmann, W.** 2006. Antagonistic activity of different yeast spp. against *Erwinia amylovora*. In: 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases. 408 sz. p. 254-257.

55. **Shabi, E., Zutra, D.** 1987. Outbreaks of fire blight in Israel in 1985 and 1986. In: *Acta Horticulturae*. 217 sz. p. 23-31.
56. **Sobiczewski, P., Suski, W.Z.** 1988. Fire blight in Poland. In: *EPPO Bulletin*. 18 évf. 3 sz. p. 375-379
57. **Sobiczewski, P., Deckers, T., Pulawska, J.** 1997. Fire blight (*Erwinia amylovora*). p. 43-84. In: *Some Aspects of Epidemiology and Control*. Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland.
58. **Steiner P., Zeller W.** 1996. A tűzelhalás Magyarországon. Jelentés a Magyar Köztársaság Földművelésügyi Minisztériuma számára.
59. **Suslow, T.W., Schroth, M.N., Isaka, M.** 1982. Application of Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Without Staining. In: *Phytopathology*. 72 évf. 7 sz. p. 917-918.
60. **van de Peer, Y., S.A. Rensing, U.-G. Maier, R. De Wachter.** 1996. Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies chlorarachniophyte endosymbionts as remnants of green algae. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 évf. p. 7732-7736.
61. **van der Zwet, T., Beer S.V.** 1995. Fire Blight- Its Nature, Prevention and Control. *USDA Agriculture Information Bulletin*. 631 sz. p. 91.
62. **van der Zwet, T., Keil, H.M.** 1979. Fire Blight – A bacterial disease of *Rosaceous* plants. In: *Agriculture Handbook 510*. US Department of Agriculture, Washington, DC. p. 200.
63. **van der Zwet, T., Walter J.** 1996. Presence of *Erwinia amylovora* in apparently healthy nursery propagating material. In: *Acta Horticulturae*. 411 sz. p. 127-130.
64. **Vanneste, J.L., Eden-Green.** 2000. Migration of *Erwinia amylovora* in Host Plant Tissues. In: *Vanneste, J.L. (szerk.) Fire blight: The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*. p.73.-84.
65. **Vanneste, J.L., Lex, S., Vermeulen, M. and Berger, F.** 2002. Isolation of *Erwinia amylovora* from blighted plums (*Prunus domestica*) and potato roses (*Rosa rugosa*). In: *Acta Hort.* 590 sz. p. 89-94.
66. **Weber, J.L., May, P.E.** 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. In: *Am. J. Hum. Genet.* 44 évf. 3 sz. p. 388-396.
67. **Winslow, C.E.A., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, Jr.C., Rogers, L.A., Smith, G.H.** 1920. The families and genera of the bacteria. Final report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. In: *Journal of Bacteriology*. 5 évf. 3 sz. p. 191-229.

9. MELLÉKLET

1. sz. melléklet

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

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

FH Key Location/Qualifiers
FT source 1..1323
FT /organism="Erwinia amylovora"
FT /isolate="EA-PlumBo1"
FT /mol_type="genomic DNA"
FT /country="Hungary:Budaors"
FT /isolation_source="Prunus domestica"
FT /clone="2A2.5"
FT /PCR_primers="fwd_name: 63f, fwd_seq:
FT caggcctaacacatgcaagtc, rev_name: 1389r, rev_seq:
FT acgggcggtgtgtacaag"
FT /db_xref="taxon:552"
FT rRNA <1..>1323
FT /gene="16S rRNA"
FT /product="16S ribosomal RNA"

SQ Sequence 1323 BP; 329 A; 309 C; 431 G; 254 T; 0 other;
gaacggtagc acagagagct tgctcttggg tgacgagtgg cggacgggtg agtaatgtct 60
gggaaactgc ccgatggagg gggataacta ctggaaacgg tagctaatac cgcataacgt 120
ctacggacca aagtggggga ccttcgggcc tcacaccatc ggatgtgccc agatgggatt 180
agctggtagg tggggtaacg gctcacctag gcgacgatcc ctactgtggtc tgagaggatg 240
accagccaca ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat 300
attgcacaat gggcgcaagc ctgatgcagc catgccgcgt gtatgaagaa ggccttcggg 360
ttgtaaagta ctttcagcgg ggaggaaggg gaagaggtta ataacctttt ccattgacgt 420
taccgcgaga agaagcaccg gctaactccg tgccagcagc cgcggtaata cggagggtgc 480
aagcgtaaat cggaattact gggcgtaaa ggcacgcagg cggctctgtca agtcggatgt 540
gaaatccccg ggcttaacct gggaactgca ttcgaaaactg gcaggctaga gtctcgtaga 600
ggggggtaga attccagggt tagcgggtgaa atgcgtagag atctggagga ataccggtgg 660
cgaaggcggc cccctggagc aagactgacg ctgaggtgag aaagcgtggg gagcaaacag 720
gattagatac cctggttagc cacgccgtaa acgatgtcga cttggaggct gttcccctga 780
ggagtggcct ccggagctaa cgcgttaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaagggt 840
aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcgttgg agcatgtggt ttaattcgat 900
gcaacgcgaa gaaccttacc tggccttgac atccacgga ttctgcagag atgcggaagt 960
gccttcggga accgtgagac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt tgtgaaatgt 1020
tgggttaagt cccgcaacga ggcgaaccct tatcctttgt tgccagcgat tcggtcggga 1080
actcaaagga gactgccggt gataaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcatcat 1140
ggcccttacg gccagggtca cacacgtgct acaatggcgc atacaaagag aagcgacctc 1200
gcgagagcaa gcggacctca taaagtgcgt cgtagtccgg atcggagtct gcaactcgac 1260
tccgtgaagt cggaatcgct agtaatcgta gatcagaatg ctacggtgaa tacgttcccc 1320
ggc 1323

//

10. ÁBRAJEGYZÉK

| | |
|---|----|
| 1. ábra: A tűzelhalás tünetei körtehajtáson | 7 |
| 2. ábra: A tűzelhalás tünetei tűztövis hajtásán | 7 |
| 3. ábra: A tűzelhalás tünetei körte virágokon | 8 |
| 4. ábra: A tűzelhalás tünetei körtehajtásokon | 9 |
| 5. ábra: A tűzelhalás tünetei körte leveleken | 9 |
| 6. ábra: A tűzelhalás tünetei körte gyümölcsén | 9 |
| 7. ábra: A tűzelhalás tünetei almafa törzsén | 10 |
| 10. ábra: A pGEM-T Easy Vektor | 18 |
| 11. ábra: API20E pozitív és negatív teszt (Biomérieux, France)..... | 23 |
| 12. ábra: <i>E. amylovora</i> tünetei szilvahajtáson | 29 |
| 13. ábra: Szilváról származó Ea izolátum hiperszenzitív reakciója dohánynövény levelén | 30 |
| 14. ábra: Szilváról származó Ea izolátum 2 napos tenyésztete King-B táptalajon..... | 30 |
| 15. ábra: Szilváról származó Ea izolátum 2 napos tenyésztete Miller-Schroth táptalajon | 31 |
| 16. ábra: Szilváról származó Ea izolátum 2 napos tenyésztete Kado-Heskett táptalajon..... | 31 |
| 17. ábra: Szilváról származó Ea izolátum 2 napos tenyésztete Crosse-Goodman táptalajon..... | 32 |
| 18. ábra: Szilváról (A) és almáról (B) származó Ea izolátumok tenyésztetei Cross-Goodman táptalajon..... | 32 |
| 19. ábra: Szilváról származó Ea izolátum tenyésztete EMB táptalajon..... | 33 |
| 20. ábra: Szilváról (A) és almáról (B) származó Ea izolátumok kolóniái EMB táptalajon..... | 33 |
| 21. ábra: Az API20E 24 órás teszt eredménye szilváról származó Ea izolátum esetében | 34 |
| 22. ábra: Szilváról származó Ea izolátum szénhidrát hasznosítása különböző időpontban | 35 |
| 23. ábra: Szilváról származó Ea izolátummal mesterségesen visszafertőzött szilvahajtások..... | 35 |
| 24. ábra: Ea szilva izolátummal inokulált termések (A- szilva, B-'Eldorado' körtefajta) | 36 |
| 25. ábra: Szilva Ea izolátum PCR analízise..... | 36 |
| 26. ábra: Szilva Ea izolátum hasított plazmidja..... | 37 |
| 27. ábra: <i>E. amylovora</i> izolátumok filogenetikai törzsfája, adatbanki hivatkozási számmal, EA-PlumBo1 a saját izolátumunk | 38 |
| 28. ábra: Az <i>E. amylovora</i> (szilva) izolátum PCR termékének gélelektroforézis fotója..... | 39 |
| 29. ábra: Szilváról származó <i>E. amylovora</i> pEA 29-es plazmid <i>Pst</i> I fragmentum ismétlődő régiója..... | 39 |

11. TÁBLÁZATJEGYZÉK

| | |
|--|----|
| 1. táblázat: Az API20E 24 órás teszt eredménye szilváról származó Ea izolátum esetében | 34 |
|--|----|