

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
Növénykórtani Tanszék



Tudományos diákköri dolgozat

Dísz- és termesztett cseresznye- és meggyfajták fogékonysága
Prunus fajról származó *Erwinia amylovora*
kórokozó baktériumra

Dudás Anita

Növényorvos MSc.

II. évfolyam

Konzulens: Végh Anita egyetemi tanársegéd
Dr. Palkovics László tanszékvezető egyetemi tanár

Budapest, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1 A kórokozó tudományos besorolása	5
2.2 A kórokozó elnevezése	5
2.3 A kórokozó gazdasági jelentősége.....	5
2.4 A kórokozó hazai megjelenése	6
2.5 A betegség lefolyása	7
2.6 A baktérium terjedése	8
2.7 A betegség tünetei.....	9
2.8 A kórokozó gazdanövényköre.....	11
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	14
3.1 A vizsgálat helye, ideje	14
3.2 A vizsgálat anyaga	14
3.2.1 A kórokozó tenyésztése, fenntartása	14
3.2.2 A klasszikus bakteriológiai vizsgálatokhoz használt növények	14
3.2.3 Dísz- és termesztett cseresznye- és meggyfajták	15
3.2.4 Plazmid és baktériumtörzs a klónozáshoz	17
3.2.5 Táptalajok	17
3.2.6 A vizsgálat során alkalmazott Kitek.....	17
3.2.7 Enzimek, vegyszerek	18
3.2.8 Primerek.....	18
3.2.9 PCR készülék	18
3.3 A vizsgálat módszere	18
3.3.1 A betegség tüneteinek megállapítása	18
3.3.2 A kórokozó izolálása táptalajon.....	18
3.3.3 A baktérium szuszpenzió előállítása	19
3.3.4 A kórokozó azonosítása klasszikus módszerekkel.....	19
3.3.4.1 A Gram-féle tulajdonság vizsgálata	19
3.3.4.2 Hiperszenzitív reakció	19
3.3.4.3 Patogenitás vizsgálat	19
3.3.4.4 A biokémiai tulajdonságok vizsgálata.....	20
3.3.5 A kórokozó azonosítása molekuláris módszerrel.....	20
3.3.6 Virágfertőzés és értékelés	23
3.3.7 Termésfertőzés és értékelés	25
4. EREDMÉNYEK.....	28
4.1 A kórokozó azonosítása cseresznyeszilva hajtásról (<i>Prunus cerasifera</i>) klasszikus módszerekkel.....	28
4.1.1 Az <i>E. amylovora</i> okozta tünetek	28
4.1.2 A Gram-féle tulajdonság.....	28
4.1.3 Hiperszenzitív reakció vizsgálata.....	28
4.1.4 Patogenitási teszt.....	29
4.2 Az izolátum tenyészbélyege King-B táptalajon	30
4.3 Az izolátum biokémiai jellemzői.....	30
4.4 Az izolátum molekuláris vizsgálata.....	31
4.5 A dísz- és termesztett cseresznye- és meggyfajták fogékonyságának eredményei	32
5. KÖVETKEZTETÉS	39
6. ÖSSZEFOGLALÁS	42
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	44
8. IRODALOMJEGYZÉK	45
9. MELLÉKLET	50

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A „tűzelhalás” betegség a világ mintegy 40 országában előfordul. A betegséget az *Erwinia amylovora* (Burrill) nevű baktérium okozza. A kórokozó Amerikában őshonos, Európában 1955-ben, Angliában jelent meg, majd fokozatosan terjedt észak-kelet, kelet felé. Magyarországon a kórokozót és tüneteit először 1995 telén észlelték Nyárlőrinc térségében almafákon (Hevesi, 1996). Megjelenése óta évről-évre előfordul, s bizonyos években, a baktérium számára kedvező, meleg, párás vagy nedves időjárás esetén, az okozott kár igen jelentős.

A baktérium a *Rosaceae* család mintegy 40 nemzetségébe tartozó 200 növényfajt képes megfertőzni, főként az almatermésűeket, számos dísznövényt és vadon élő növényfajt (van der Zwet és Keil, 1979). A kórokozó megjelenését egyre több új gazdanövényről publikálták az elmúlt években. Az Amerikai Egyesült Államokban a tuskétlen szedren (Evans, 1996) és málnán is jelezték a kórokozó megjelenését (Schnabel és Jones, 2001). Hazánkban nem annyira jelentős korallberkenye és a japán naspolya is a kórokozó gazdanövénykörébe tartozik (Németh, 1997). A tűzelhalás betegség nem feltétlenül almatermésű növényfajokra korlátozódik, hiszen már beszámoltak japán szilva (Mohan és Thomson, 1996), valamint Európában, Németország északi részén az európai szilva (Vanneste és mtsai., 2002) természetes fertőződéséről is. A kórokozó csak a hajtásokat pusztítja el és az idősebb részekre nem terjed át. Az USA-ban szilva és kajszifajhibridjén hajtásszáradásról (Mohan, 2007), és Csehországban a kajszifaj természetes fertőződéséről jelentek meg publikációk (Korba és Sillerova, 2010).

Eddig a kórokozó csonthéjasokon való hazai előfordulását csak szilván jelezték (Végh és mtsai., 2012). Magyarországon a baktérium főként a *Malus*, *Pyrus*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Pyracantha* és *Sorbus* fajokon terjedt el. Nem zárható ki az a feltételezés, hogy a jövőben hazánkban is potenciális gazdanövényei lesznek más *Prunus* fajok a baktériumnak és járványszerű fellépésére is számíthatunk. Ezért 2011 nyarán *Prunus cerasifera* növényfajról származó, a tűzelhalás jellegzetes tüneteit mutató hajtásokat gyűjtöttünk, hogy bizonyítsuk, a kórokozó képes megfertőzni más csonthéjas növényeket is.

Egy fajta fő értékmérő tulajdonságai közé tartozik a betegségekkel szembeni ellenállóság. Magyarországon a tűzelhalást okozó *Erwinia amylovora* baktérium ellen engedélyezett növényvédő szerek száma drasztikusan lecsökkent, így a kórokozóval szembeni rezisztencia még fontosabb szemponttá vált a fajtaválasztás során. A fogékonyság meghatározásakor figyelembe kell vennünk a látható tünetek kialakulásának mértékét és gyorsaságát, illetve a fertőzés hatására a növényi szövetekben lejátszódó változásokat.

A munkánk során tehát célul tűztük ki:

- a begyűjtött, a tűzelhalás jellegzetes tüneteit mutató *Prunus cerasifera* növényfaj hajtásairól a baktérium azonosítását,
- a kórokozó klasszikus és molekuláris biológiai jellemzését,
- a virágok és éretlen termések mesterséges fertőzése során megállapítani a dísz- és termesztett cseresznye- és meggyfajták fogékonyságát,
- valamint, hogy az egyes növényi szervek ellenállósága/fogékonysága között található-e szignifikáns különbség egy adott fajtán belül.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A kórokozó tudományos besorolása

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

2.2 A kórokozó elnevezése

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

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

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

2.3 A kórokozó gazdasági jelentősége

Az *Erwinia amylovora* a világon szinte mindenhol igen nagy károkat okozott a gyümölcstermesztésben, és napjainkban is az egyik legveszélyesebb kórokozó. 1902-ben a kaliforniai Fresno megyében 125 ezer ha, míg Kings megyében 44 ezer ha körteültetvényt kellett megsemmisíteni a fertőzés következtében. Az Amerikai Egyesült Államok körtetermesztése 14%-kal csökkent 1936-ban, mely 4 millió dollár veszteséget okozott. Ez a szám 1951 és 1960 között 1,5 millió dollárra csökkent, míg az almatermesztésben elérte a 2,5 millió dollár veszteséget is. Egyes amerikai almaültetvényekben a 'Gala' fajták fertőzöttsége 30-60%-os volt (van der Zwet és Keil, 1979). 1976-ban Kaliforniában a betegség okozta kár körtéből 4,7 millió dollár, majd 1991-ben Michigan állam délnyugati részén 3,8 millió dollár volt (van der Zwet és Beer, 1995).

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

Magyarországon a kórokozó megjelenésének évében 42 hektár almaültetvényt kellett megsemmisíteni Nyárlőrincen, a birsfák pedig teljesen kipusztultak Békés megyében. A fertőzés Békés, Bács-Kiskun és Csongrád megyékben volt a legnagyobb. 1996-ban Zala, Szabolcs-Szatmár-Bereg és a nyírségi területek még mentesek voltak a kórokozótól, ám évről-évre jelentős mértékben terjedt a tűzelhalás kórokozója, így 1999-ben már csak Vas és Nógrád megye volt fertőzésmentes (Bubán és mtsai., 1999).

2.4 A kórokozó hazai megjelenése

Az 1980-as évek közepétől a betegség fokozatosan tört előre a Balkán-félszigeten, megjelent Csehországban, Jugoszláviában és Romániában, így joggal tartottak a baktérium hazai fellépésétől is. Magyarországon 1995. őszén fedezték fel először a tűzelhalás tüneteit egy Nyárlőrinc közelében fekvő almaültetvényben. A baktériumot Hevesi Mária azonosította *Erwinia amylovora*-ként (Hevesi, 1996). 1997-ben már Zala és Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében is beszámoltak a kórokozóról, illetve további megyékben is észlelték a betegséget, ám ez idő tájt még nem okozott komoly károkat (Németh, 1997). A fertőzés mértéke Békés, Bács-Kiskun, Csongrád megyékben volt a legnagyobb, de Baranyában is beszámoltak a betegségről. A hazai megjelenés után két évvel mindössze Vas és Nógrád megye volt mentes a tűzelhalás kórokozójától (Németh, 1999). 2000-ben, mely egy járványos év volt, megközelítőleg 3 780 ha alma, körte- és birsültetvény fertőződött meg (Pálfi és mtsai., 2000). Az elkövetkezendő években Szabolcs-Szatmár-Bereg és Borsod-Abaúj-

Zemplén megyében is megnövekedett a fertőzött területek száma (Merő, 2004; Csete és mtsai., 2004). A következő évek időjárási viszonyai nem kedveztek a kórokozónak, ám a 2007-es évben több megyében is, mint például Fejér megyében, további súlyos fertőzéseket jelentettek (Dénes, 2007). Napjainkban már szinte az egész ország területén megtalálható a kórokozó.

2.5 A betegség lefolyása

A baktérium a rákos sebeken vagy a rügypikkelyek alatt telel. Ám a rákos sebek közül csak ott található fertőzőképes inokulum, ahol a fertőzött és ép szöveteket egy éles vonal határolja. Ha ez a vonal elmosódott, ott a sebek inaktívak (Miller, 1929).

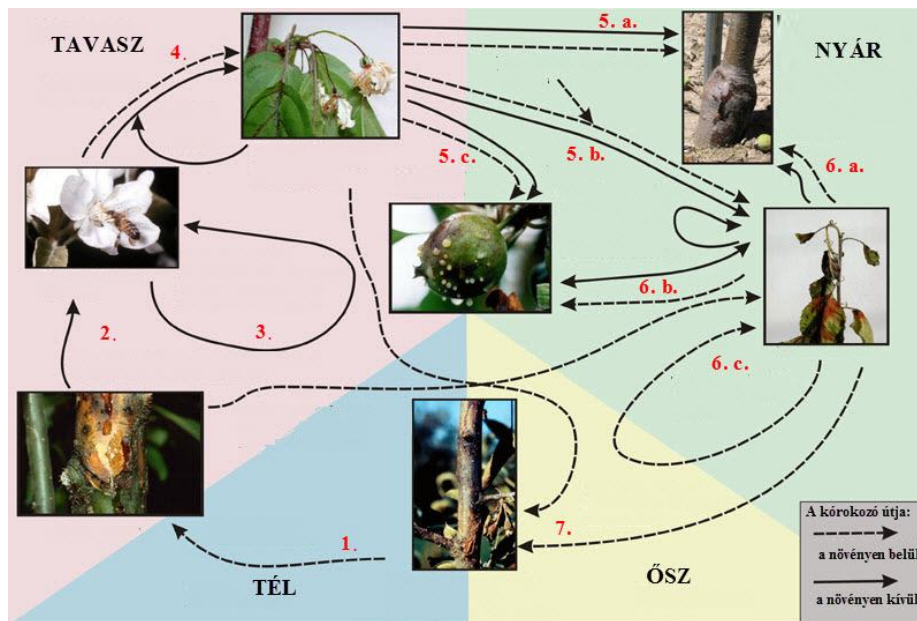
Tavasszal a növények nedvkeringésének megindulásakor a sebekből baktériumnyálka tör elő. Az elsődleges fertőzés a virágokat támadja meg, és a fertőzésveszély a teljes virágzás alatt fennáll. A kórokozó a virág természetes nyílásain keresztül hatol be a fás részekbe (Bagi és Bognár, 2011).

Ilyen természetes nyílások a nektárium sztomái, a bibe, a csészelevelek légrései, vagy akár a felnyílt portokok. A legsérülékenyebb rész a nektárium felszíne, emellett a nektár tökéletes táptalaj, ahol a baktérium felszaporodhat. Virágzáskor a bibén megtelepedő kórokozó már egy kevés nedvesség hatására is lejut a nektárium alsó részébe, ahol bekövetkezik a fertőzés. Emiatt a csapadékos időjárás virágzáskor nagyban növeli a tűzelhalás betegség fellépését (Thomson, 1986).

Ha a virágzás során kedvezőtlenek a környezeti feltételek, a kórokozó nem képes bejutni a virágokon keresztül a gazdanövénybe, ám később a hajtásokon át tud fertőzni.

A vegetációs időben felléphet szekunder fertőzés, mely súlyosabb károkat okoz a fákban. Ebben az esetben a primer fertőzéstől a kórokozó a hajtásokat, leveleket és másodvirágzatokat támadja meg (Németh, 1997). Ez részben a csapadékosabb időjárásnak és ezt követően az intenzív hajtásnövekedésnek, részben pedig a nagy számban megjelenő levéltetű populációknak köszönhető (Bubán, 1999).

A fertőzési ciklust az 1. ábra illusztrálja.



1. ábra: *Erwinia amylovora* fertőzési ciklusa (Thomson, 2000)
http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease_descriptions/fire_blight_disease_cycle.htm

1. Télen a kórokozó áttelel a sebekben
2. Tavasszal aktív rákos sebekből az inokulumok kiszabadulnak és eső vagy rovarok által a virágokra jutnak
3. A baktérium a bibén felszaporodik és tovább fertőz eső, méhek vagy más viráglátogató rovarok által
4. A baktérium bejut a nektáriumba és közvetlenül fertőzi a virágokat
5. Nyáron a virágokon keresztül a baktérium további növényi részeket fertőz:
 - a. behatol a fás részekbe
 - b. a fiatal hajtásokat
 - c. az éretlen terméseket
6. A fertőzött hajtásokból a kórokozó
 - a. bejut az alanyba
 - b. további hajtásokat fertőz meg
 - c. szél, rovarok, eső vagy nyári viharok segítségével az éretlen termésre jut
7. Ősz folyamán a kórokozó a hajtásokból behúzóódik a fás részekbe és újabb rákos sebek keletkeznek, melyeken képes áttelelni

2.6 A baktérium terjedése

A baktérium terjesztésében legfontosabb szerepe a víznek van. A meleg, csapadékos időjárás kedvez a kórokozónak, ilyenkor fennáll a járványveszély lehetősége is. Az ültetvényekben célszerű kerülni az esőztető öntözést, helyette érdemesebb a csepegtetési módszert választani, ezzel elkerülve a felesleges vízborítottságot. A megszáradt baktériumnyálka (exudátum) széllel is képes igen nagy távolságra eljutni. Ezáltal okoz másodlagos fertőzéseket más növények hajtásain, levelein és másodvirágzatain (Németh, 1997; Glits és Folk, 2000).

Emmet és Baker (1971) kísérletei bebizonyították, hogy a kórokozó képes rovarok segítségével terjedni, illetve megfigyelték, hogy a nagyobb testű állatok, mint például a méhek, több inokulumot tudnak szállítani testükön, ezáltal a fertőzés hatékonyabb lesz. Körtén megfigyelt vektorok: háziméh (*Apis mellifera*), poloskaszagú almadarázs (*Hoplocampa testudinea*), fénybogarak (*Meligethes* spp.). Almán megfigyelt vektorok: közönséges herelégység (*Eristalis tenax*), poloskaszagú almadarázs (*Hoplocampa testudinea*), döglegyek (*Lucilia* spp.). Bár a kórokozó természetes nyílásokon keresztül is fertőz, mégis veszélyesebbnek tartják a rovarvektorok, jég, homok és szél által okozott sebeken történő bejutást (Németh, 1997).

Feltételezik, hogy a madarak is szerepet játszanak a baktérium terjesztésében (van der Zwet és Keil, 1979). Főleg a gyümölcsfogyasztó poszták és seregélyek jelentenek veszélyt. Vizsgálatokkal igazolták, hogy e madarak ürülékében a kórokozó akár egy hétig is életképes tud maradni (Németh, 1997).

Igen fontos vektor még az ember is, hiszen a fertőzött szaporítóanyagokkal, a mechanikai eszközök nem megfelelő tisztántartásával és a munkások figyelmetlenségéből adódóan a ruhájukra tapadt inokulumok szállításával mind-mind hozzájárulnak a kórokozó terjesztéséhez. Bár a termékek fertőződésével kevés szakirodalom foglalkozik, az áruszállítás során szintén fontos terjesztési tényezővé válik, hisz a gyümölcsökön megtelepedő baktériumnyálka további fertőzéseket idézhet elő. Feltételezik, hogy az Egyesült Államokból Nagy Britanniába is ily módon került be a kórokozó (Németh, 1997).

2.7 A betegség tünetei

A baktérium minden növényi részt képes megtámadni. A fertőzés gyors lefolyású rákosodást és elhalást okoz. Angol elnevezése is innen ered: fireblight (= tűzelhalás). A növényeken perzselés jelentkezik, súlyosabb esetben a teljes fa kiszáradhat (Hevesi, 1996).

A vegetáció során először a virágok fertőződnek meg. A csészeleveleken és virág kocsányán vizenyős foltok keletkeznek, később megbarnulnak, és ha az időjárás a baktériumnak kedvező (meleg és csapadékos), megjelenik a felszínen a baktériumnyálka. Ez a nyálka a későbbiekben potenciális fertőzési forrás lesz. A virágrészekről a kórokozó a hajtásokba jut, melyek hervadnak, majd el is száradnak, pásztorbatszerűen meggömbölyülhetnek (2. ábra). A levél fő- és mellékerei barnásra színeződnek, majd feketén elhalnak. Az elhalt levelek a fertőzött hajtásról, ágakról nem hullnak le (3. ábra).



2. ábra: A tűzelhalás tünetei körteajtásokon (pásztorbócsa görbület)
(Fotó: Végh, 2010)



3. ábra: A tűzelhalás tünetei díszalma fán
(Fotó: Végh, 2010)

A vesszők, gallyak és az idősebb ágakon át a törzs is fertőződik. 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. A fás részeken rákos sebek alakulnak ki. Ezekben a rákos elhalásokban a kórokozó képes fennmaradni, és a következő évben fertőzési forrás lesz (Horváth és mtsai., 1997). A baktérium okozta foltokon megtelepedhetnek másodlagos kórokozók, például *Nectria* fajok, melyek a növények további gyengülését segítik elő (Németh, 1997). Nem csak a föld feletti részeket fertőzi a baktérium, hanem a fás részeken keresztül képes a gyökereket és a gyökérnyaki részt is. A fertőzött gyökerek kérge felreped, szintén rákos sebek alakulnak ki és a farész vöröses-barnásan elszíneződik, mely akár a növény pusztulásához is vezethet (van der Zwet és Keil, 1979).

A fejlődő gyümölcsök szisztemikusan fertőződnek, vizenyős állagúak lesznek, majd később megfeketednek, nem hullnak le, hanem mumifikálódva a fákon maradnak. A termések felületén

pedig megjelenhet a baktériumnyálka (4. ábra) (Németh, 1997). A kórokozóval fertőzött gyümölcsök előbb érnek, és a rossz minőségű termések eladhatatlanok lesznek, meg kell semmisíteni azokat (Hevesi és mtsai., 2006).



4. ábra: A tűzelhalás tünetei almatermésen baktérium nyálkacseppekkel
(Fotó: Alan L. Jones)
(<http://www.plantwise.org/Uploads/CompendiaImages/Normal/erwiam14.jpg>)

2.8 A kórokozó gazdanövényköre

A gazdanövények természetes fertőződése

A kórokozó kertészeti szempontból igen fontos gyümölcsfákat támad meg a *Rosaceae* családon belül, főként a *Maloidae* alcsaládban okoz jelentős veszteségeket (Palacio-Bielsa és mtsai., 2012). Főbb gazdanövényei az alma (*Malus domestica*), körte (*Pyrus communis.*), birs (*Cydonia oblonga*). A kórokozóra legfogékonyabb faj a birs (Bubán és mtsai., 1999). Az igen fogékony gazdanövények körébe tartozik például a hólyagos levelű madárbirs (*Cotoneaster bullatus*), fűzlevelű madárbirs (*Cotoneaster salicifolius*), hibrid madárbirs (*Cotoneaster waterei*), korallberkenye (*Stranvaesia davidiana*) (Németh, 1997). Emellett megannyi értékes díszfát és cserjét is megtámad: megtalálható japánbirs (*Chaenomeles japonica*), madárbirs (*Cotoneaster* spp.), naspolyán (*Mespilus germanica*), tűztövis (*Pyracantha coccinea*), rózsán (*Rosa* spp.), berkenyén (*Sorbus* spp.) és gyöngyvesszőn (*Spirea* spp.), illetve számos dísz alma- és körtefán is (Bubán és mtsai., 1999) (5. ábra).

A dísznövények közül a korallberkenye (*Stranvaesia davidiana*) kevésbé ismert gazdanövény, mely hazánkban behozatali tilalom alatt áll. Szintén kevésbé ismert a japán naspolya (*Eriobotrya japonica*), melyet fagyérzékenysége miatt Magyarországon nem termesztnek (Németh, 1997).



5. ábra: A tűzelhalás tünetei tűztővis hajtásán
(Fotó: Végh, 2010)

1993-ban az USA-beli Oregon államban azonosították a baktériumot egy három éves japánszilva (*Prunus salicina*) ültetvényben. A természetes fertőződés főként a szilva 'Fortune' és 'Fiar' fajtákon jelentkezett. Ezen kívül még tüneteket figyeltek meg 'Black Amber' és 'Simka' fajtákon is. A tűzelhalás tünetei megegyeztek az almatermésűeken okozott szimptomákkal. A leveleken és az ágakon nekrotikus foltok jelentkeztek, később pedig a fás részeken kialakultak a rákos sebek. A laboratóriumi vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy az *Erwinia amylovora* fertőzte a növényeket (Mohan és Thomson, 1996).

1951-ben Starr és munkatársai figyelték meg a tüneteket málnán (*Rubus ideaus*), 2002-ben pedig európai szilváról (*Prunus domestica*) írták le a kórokozót Németországban (Vanneste és mtsai., 2002). 2011-ben hazánkban is észlelték fiatal szilvafa hajtásán a tűzelhalásos tüneteket (barnuló-elfeketedő, begömbölyt hajtások). A laboratóriumi vizsgálatok egyértelműen igazolták, hogy a tüneteket okozó kórokozó szintén az *Erwinia amylovora* (Végh és mtsai., 2012) (6. ábra).



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

Elsőként Bulgáriában izolálták az *Erwinia amylovora*-t fekete berkenyéről (*Aronia melanocarpa*) és szamócáról (*Fragaria ananassa*). Mindkét növényen jelentkeztek a tűzelhalás már említett tünetei (Atanosova és mtsai., 2005).

Csehországban, 2007 júniusában első alkalommal diagnosztizálták fiatal kajszi fákról (*Prunus armeniaca* cult. 'Veharda') az *Erwinia amylovora*-t. A fertőzött fák egy olyan ültetvény közelében helyezkedtek el, ahol a kórokozóra igen fogékony körtefajtákat (*Pyrus ussuriensis*) telepítettek és ahol a betegség szinte minden évben jelentkezett. A tüneteket mutató kajszi leveleket táptalajra helyezték és 24 óra múlva megjelentek az *Erwinia amylovora*-val morfológiailag megegyező baktérium tenyészetek. A kajszi leveleken 0,5-0,7 cm átmérőjű, barnás, később elfeketedő foltokat figyeltek meg. A baktérium körtéről kajszira történő átvitelért feltehetően a füstösszárnyú körte-levélbolha (*Cacopsylla pyri*) volt a felelős. Miután a körtefákon elfogyott a táplálék, a rovarok új tápnövényre, jelen esetben a kajszira, vándoroltak ezzel elősegítve a baktériumos fertőződést (Korba és Sillerova, 2010).

Mesterséges fertőzési kísérletek

Az Amerikai Egyesült Államokban és Dél-Németországban mesterséges fertőzéseket végeztek különböző növényfajokon, és a baktérium ugyanolyan tüneteket okozott az *Amygdoloideae* alcsalád tagjain, mint a japán szilván (Mohan és Thomson, 1996), az európai szilván (Vanneste és mtsai., 2002), illetve a szilva és a kajszi keresztezésével nemesített Pluot® hibriden (Mohan, 2007). A szilváról izolált kórokozó képes tüneteket indukálni más *Prunus* fajokon is, így cseresznyén (*P. avium*), őszibarackon (*P. persica*), nektarinon (*P. persica* var. *nucipersica*) és mandulán (*P. amygdalus*). Ennek tükrében feltételezhető, hogy a csonthéjasok is széles körben fogékonyak a kórokozóra (Palacio-Bielsa és mtsai., 2012).

Üvegházi körülmények közt a növények baktériummal szembeni fogékonyságát vizsgálták. A japán szilva 'Fortuna' és az alma 'Jonathan' fajtáiról izolált *Erwinia amylovora* nem mutatott szignifikáns különbséget a *Prunus* fajok fertőzésekor. Mindkét baktérium izolátum a virágokon nekrotikus foltokat okozott, ám egyik sem jutott be a virágkocsányba (Mohan és Bijman, 1999).

Mohan és munkatársai (2002) mesterséges levél- és hajtásfertőzési kísérleteket végeztek. Vizsgálataik során a kajszi és a japán szilván jelentkeztek nagyobb mértékben a tűzelhalás tünetei, míg szilván, őszibarackon, nektarinon, cseresznyén és mandulán kis mértékben rezisztencia mutatkozott. A meggyen ellenben semmiféle szimptóma nem jelent meg. Éretlen termések fertőzésekor azonban a szilva és a cseresznye tűnt a legfogékonyabbnak (Mohan és mtsai., 2002).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 A vizsgálat helye, ideje

A tüzelhalás jellegzetes tüneteit mutató *Prunus cerasifera* növényfajról származó hajtásokat 2011. július végén Budapestről (Óbudáról) gyűjtöttük, majd a mintákat a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszékére szállítottuk. A dísz- és termesztett cseresznye- és meggyfajták virágait és éretlen terméseit Budapest parkjaiból, közterületeiről, valamint Sós-kútról gyűjtöttük (1998-ban telepített ültetvény, a fák váza koronaformájúak, sor- és tőtávolságuk: 7 x 5 m). A kórokozó klasszikus és molekuláris azonosítását, valamint a virágok és éretlen termések fogékonyság vizsgálatát a Növénykórtani Tanszék laboratóriumában végeztük el. A kórokozó 16S riboszómális RNS-ének egy szakaszát tartalmazó rekombináns plazmid nukleinsav szekvenciáját Szegeden a BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetben határoztattuk meg.

3.2 A vizsgálat anyaga

3.2.1 A kórokozó tenyésztése, fenntartása

A kórokozót (Ea-Cherryplum-Bu1) cseresznyeszilva (*Prunus cerasifera*) fertőzött hajtásáról izoláltuk, tiszta tenyészetbe hoztuk és fenntartottuk.

Tenyésztés: King-B táptalajon (King és mtsai., 1954), 26 °C-on történt.

A King-B táptalaj összetétele: 20 g pepton, 10 g glycerol, 1,5 g K₂HPO₄, 1,5 g MgSO₄ X 7 H₂O, 15 g agar, 1 liter desztillált víz. A táptalaj pH-ja 7,2 ideális az *E. amylovora* fejlődéséhez.

Megőrzése: glycerolos tartósítás útján történt -18 °C-on eppendorf csőben és/vagy -70 °C-on fagyasztó csőben. A közeg összetétele: 2,2 g Beef extract, 24 ml glycerol, 200 ml desztillált víz.

3.2.2 A klasszikus bakteriológiai vizsgálatokhoz használt növények

A kórokozó patogenitásának teszteléséhez és a Koch-posztulátumok teljesítéséhez éretlen körtét ('Alexander Lucas' fajta); a hiperszenzitív reakció vizsgálatához egészséges dohánynövényt (*Nicotiana tabacum* L. cv. *xanthi*) használtunk.

3.2.3 Dísz- és termesztett cseresznye- és meggyfajták

Cseresznyefajták

Prunus avium 'Carmen'

Brózik Sándor és Apostol János a 'Sárga Dragan' és 'H 203' fajtákból keresztezte (Nyéki és mtsai., 2011). Fája középerős, feltörő koronával. Középkorai érésű, exportárúként is igen keresett cseresznye. Termése igen nagy méretű, bordó színű. Friss fogyasztásra tökéletes, hatalmas gyümölcsöt terem, mely kemény húsú, kellemesen savanykás-édes (Hrotkó, 2003).

Prunus avium 'Linda'

A 'Hedelfingeni óriás' és a 'Germersdorfi óriás' mesterséges hibridje, melyet Brózik Sándor és Apostol Jánosné állított elő (Soltész, 1998). Középerős-erős fát nevel, enyhén széthajló, laza ágrendszerrel (Mónus, 1999). Június közepétől érik, a 'Germesdorfi óriás' előtt pár nappal. Gyümölcse nagy, kissé megnyúlt és sötét bordó, sokáig fán tartható. Kemény, roppanós húsa kellemesen édes-savanykás. Mind friss fogyasztásra, mind feldolgozásra alkalmas (Brózik és Kállay T-né, 2001).

Prunus avium 'Katalin'

Magyar nemesítésű fajta, a 'Germersdorfi Óriás' és a 'Podjebrád' hibridje, mely szintén Brózik Sándor és Apostol Jánosné nevéhez fűződik (Hrotkó, 2003). Fája középerős és feltörekvő. Gyümölcse igen nagy-nagy, alakja kissé megnyúlt, színe sötét bordó. A termés húsa kemény, ropogós, az íze pedig igen kellemes. Főként friss fogyasztásra alkalmas, de feldolgozásra, konzervnek és befőttnek is egyaránt kiváló. A kései érésű cseresznyék közül a legjobb fajta (Mónus, 1996).

Prunus serrulata 'Kanzan'

Japán nemesítésű, igen kedvelt és elterjedt díszcseresznye. Fordított, tölcser alakú koronájáról könnyen fel lehet ismerni. Rózsaszín, telt virágai áprilistól május végéig virágoznak és a szirmlevelei elvirágzás után sem barnulnak el, mely tovább növeli díszítő értékét. Termést nem hoz. Jó várostűrő tulajdonsága miatt utcai sorfának, parkfának vagy akár szoliterként is szívesen ültetik (Schmidt, 2004).

Prunus serrulata var. *hupehensis*

Szintén japán nemesítésű lombhullató díszfa. A termesztett fajtákéhoz hasonló, öt szirmból álló fehér és egyszerű virágai vannak, melyek áprilistól májusig nyílnak. Ellentétben az előző díszcseresznyével, ez a fajta apró, csonthéjas termést érlel (Internetes forrás 1).

Meggyfajták

Prunus cerasus 'Kántorjánosi 3'

Az Újfehértói Kutatóállomás munkatársai által tájszelekcióval nemesített meggyfajtánk. Közepes növekedésű, gömbkoronát nevelő fa, mely idősebb korban felkopaszodásra hajlamos (Brózik és Kállay T-né, 2001). Az 'Újfehértói fürtössel' egy időben, július elején érik. Gyümölcse közép nagy, kemény húsú, festőlevű, savanykás ízű. Jó eltarthatósága és magas szárazanyag tartalma miatt a legjobb export –és konzervfajtánk. *Monilinia laxa*-ra és *Blumeriella jaapii*-ra nem fogékony, a vírusokra pedig toleráns, tünetmentes (Mónus, 1999).

Prunus cerasus 'Újfehértói fürtös'

Pethő Ferenc és munkatársai 1961-ben tájszelekcióval állították elő és a mai napig az egyik fő termesztési fajtánk. Fája erős alkatú, koronája gömb alakú, csüngő habitusú, mely idősebb korban felkopaszodhat (Pór és Faluba, 1982). Gyümölcse közép nagy, kissé kemény, nem festőlevű, kellemesen savanykás-édes. Nyersen vagy akár konzervként fogyasztható, kedvelt exporttermék is egyben. *Monilinia laxa* kórokozóval szemben toleráns (Mónus, 1996).

Prunus cerasus 'Érdi bőtermő'

Maliga Pál és Apostol János a 'Pándy' és a 'Nagy angol meggy' fajtákból keresztezték. A fa középerős, lapított gömb alakú koronával (Pór és Faluba, 1982). Gyümölcse közép nagy, húsa kemény, piros festőlevű. Friss fogyasztásra és ipari célokra egyaránt termesztik. A fajta hátránya, hogy érzékeny a monilíniás betegségre. Ettől függetlenül a kiváló gyümölcsminősége, gépi betakarításra való alkalmassága és nagy termőképessége miatt az üzemi termesztés egyik fő meggyfajtája (Mónus, 1999).

Prunus cerasus 'Debreceni bőtermő'

Ménesi Attila tájszelekcióval létrehozott fajtája. Július elején érik, az 'Újfehértói fürtös' előtt két-három nappal (Soltész, 1998). Erős fát nevel, jó elágazódási hajlammal. Termése közép nagy, sötétpiros, enyhén festőlevű. Húsa kissé kemény és rostos, íze édes. Friss fogyasztásra és ipari felhasználásra egyaránt alkalmas. *Monilinia laxa* és *Blumeriella jaapii* kórokozókra kevésbé érzékeny (Brózik és Kállay T-né, 2001).

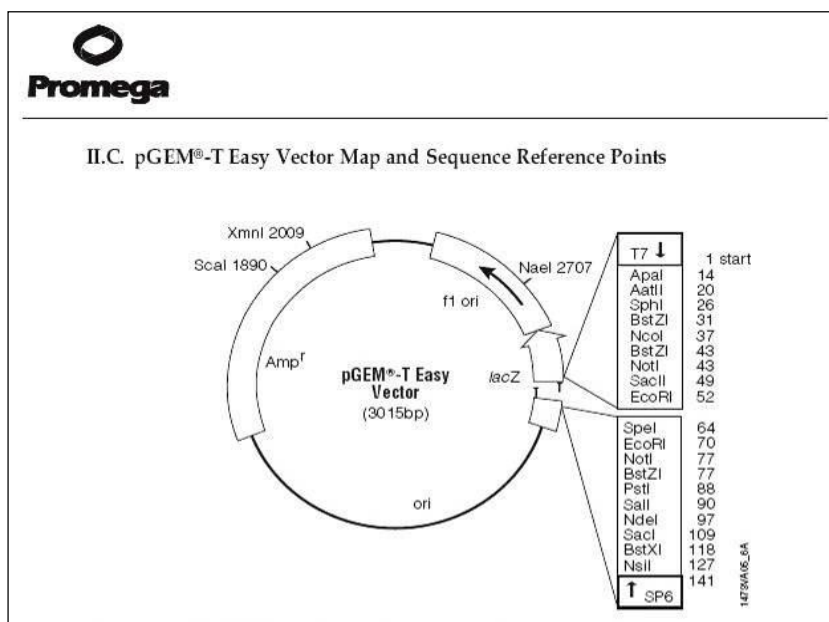
Prunus cerasus 'Érdi jubileum'

A 'Pándy meggy' és az 'Eugénia' fajták keresztezésével állította elő Maliga Pál és Apostol János (Soltész, 1998). Vastag törzse miatt későn fordul termőre. Fája középerős, laza ágrendszerű. Termése közép nagy, feketés színű, igen kemény húsú és erősen festőlevű. Export, friss és

feldolgozóipari célokra egyaránt termesztik, a legjobb gyümölcsle alapanyag. *Monilinia laxa*-ra érzékeny fajta (Hrotkó, 2003).

3.2.4 Plazmid és baktériumtörzs a klónozáshoz

A tisztított PCR-termékeket a Promega 3015 bázispár hosszúságú pGEM-T Easy plazmidjába ligáltuk (7. ábra). A PCR-termékek klónozásához az *Escherichia coli* baktérium DH 5- α törzsét használtuk.



7. ábra: A pGEM-T Easy Vektor felépítése

3.2.5 Táptalajok

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 (Maniatis és mtsai., 1989).

3.2.6 A vizsgálat során alkalmazott Kitek

A kórokozó biokémiai tulajdonságainak meghatározása során a Biomérieux (France) által gyártott API20E 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.

3.2.7 Enzimek, vegyszerek

A PCR-hez: Taq DNS polimeráz enzim (rekombináns) (5u/μl); puffere: 10x-es Taq puffer + KCl – MgCl₂, pH: 8,8 25 °C -on. A ligáláshoz: T4 DNS ligáz enzim (5u/μl); puffere: 10x-es T4 DNS ligáz puffer pH: 7,8 25 °C-on. A plazmidot tartalmazó baktérium kolóniák kék-fehér szín szelekciójához IPTG-t [10 μl (100 mM/ml)] és Xgal-t [40 μl (10 mg/ml)] használtunk. Az inzert beépülését a plazmidba *EcoRI* (10 u/μl) restrikciós endonukleázzal ellenőriztük. Az enzim puffere: 10x-es *EcoRI* puffer pH: 7,5 37 °C-on. A T4 DNS ligáz enzimet a Promega cégtől, míg a többi enzimet a Fermentas cégtől vásároltuk.

3.2.8 Primerek

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

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

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

3.2.9 PCR készülék

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

3.3 A vizsgálat módszere

3.3.1 A betegség tüneteinek megállapítása

A tűzelhalásra jellemző tüneteket (van der Zwet és Keil, 1979) cseresznyeszilváról származó hajtásokon figyeltük meg. A fiatal hajtásokon pásztorbotszerű görbület volt látható. A hajtások és a levelek megbarnultak, elhaltak. A fertőzött hajtásokat zacskóba gyűjtöttük és a vizsgálatokig a kórokozó számára kedvező környezeti feltételek mellett tartottuk (párás, meleg). A vizsgálatokat 1-2 napon belül elvégeztük.

3.3.2 A kórokozó izolálása táptalajon

A fertőzött hajtásokat alkohollal fertőtlenítettük, majd steril körülmények között 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 újra leoltottuk, majd tiszta tenyészetbe hoztuk.

3.3.3 A baktérium szuszpenzió előállítása

A hiperszenzitív reakcióhoz, a patogenitási teszthez, a biokémiai vizsgálathoz, a virág- és termésfertőzésekhez szükséges baktérium szuszpenziót a kórokozó 1 napos (26 °C) tenyészetéből nyertük. A spektrofotométert a vizsgálatok előtt desztillált vízzel kalibráltuk. A 24 órás, friss, tiszta tenyészetből származó baktérium szuszpenziót a spektrofotométerrel 5×10^7 sejt/ml töménységűre állítottuk be.

3.3.4 A kórokozó azonosítása klasszikus módszerekkel

3.3.4.1 A Gram-féle tulajdonság vizsgálata

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

3.3.4.2 Hiperszenzitív reakció

A baktérium szuszpenziót (5×10^7 sejt/ml) a dohánylevél (*Nicotiana tabacum* L. cv. xanthi) szövetébe juttattuk injekciós tűvel. Majd 24-48 óra elteltével figyeltük a hiperszenzitív reakció kialakulását, azaz a gyors szöveti nekrozist (Klement, 1963).

3.3.4.3 Patogenitás vizsgálat

A patogenitási teszt elvégzése különböző tesztnövényeken szintén nélkülözhetetlen módszer a kórokozó baktérium meghatározásához (Agrios, 1997). A körte ('Alexander Lucas' fajta) fertőzése steril körülmények között történt. A tesztelésnél a természetes fertőződés mechanizmusát szúrással imitáltuk. A termést 3-6 helyen szúrtuk meg baktérium szuszpenzióba (5×10^7 sejt/ml) mártott lándzsátűvel. A kontrollt steril desztillált vízbe mártott tűvel kezeltük. A fertőzött gyümölcsöt 25-27 °C-on inkubáltuk, 80-90%-os páratartalmat biztosítva.

A patogenitási teszt értékelése a gyümölcsökön 5 nap elteltével történt. Az eredményekre a fertőzést követően a gyümölcsökön kialakult *E. amylovora*-ra jellemző tünetekből (van der Zwet és Keil, 1979) következtettünk (a gyümölcsök esetében a vizenyős, barnuló foltokból).

3.3.4.4 A biokémiai tulajdonságok vizsgálata

A vizsgálatokat a gyártó utasításait követve végeztük el. Az API20E tesztcsíkot 24-48 órán át 36 °C -on inkubáltuk. Az API20E kit a baktériumfajok meghatározására szolgál. Értékelése során az eredményeket a gyártó által rendelkezésünkre bocsátott pozitív és negatív minta-tesztcsíkok alapján értékeltük (8. ábra).

pozitív teszt



negatív teszt

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

3.3.5 A kórokozó azonosítása molekuláris módszerrel

A 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata

PCR paraméterei

A PCR-hez használt indító szekvenciák:

1389r (reverse)

63f (forward)

A PCR elegy összetétele 50 µl végtérfogatra:

2 µl baktérium szuszpenzió (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 (lánc hosszabbítás)
5. 94 °C-on 0,5 perc denaturálás

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

Gélelektroforézis

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

A PCR-termék tisztítása

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

Ligálás

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

A ligáláshoz a következőket mértük össze 10 µl végtérfogatra:

- 5 µl steril 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.

Transzformálás *E. coli* DH 5α törzsébe

A -70 °C -on tárolt kompetens sejtet jégen kiolvastottuk, a ligátumot szintén jégre tettük. A már felolvadt kompetens sejtet hozzámértük a ligátumhoz, 30 percig hagytuk jégen állni, majd egy percig 42 °C -on tartottuk, hogy kinyíljanak az *E. coli* baktérium pórusai és a plazmid bejuthasson. Ezután azonnal jégre tettük és öt percig jégen tartottuk. Ezt követően hozzámértünk 500 µl antibiotikum-mentes 2TY folyékony táptalajt, és ezzel összeforgattuk. Egy órán át 37 °C -on ráztuk. Eközben 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.

Minipreparátum készítése

Hat egyedi fehér kolóniából 2–2 ml folyadékkultúrába (ampicillines LB) inokuláltunk, és 37 °C -on egy éjszakán át 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).

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.

Plazmid tisztítás szekvenáláshoz

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

A nukleinsav szekvencia meghatározása és analízise

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

3.3.6 Virágfertőzés és értékelés

A virág- és éretlen termésfertőzés módszereit a szakirodalom alapján végeztük el (Hevesi és mtsai., 2006; Honty, 2011), illetve némiképp módosítottuk. A szabadföldről gyűjtött virágokat fehér bimbós állapotban Eppendorf csövekbe helyeztük, melyekbe 1,5 ml 1%-os szacharóz oldatot mértünk. Az Eppendorf csöveket egy dobozba állítottuk, az aljába pedig desztillált víz és glicerín elegyét töltöttük, ezzel a zárt rendszerben megfelelő hőmérsékletet és páratartalmat biztosítottunk a virágoknak, melyet hőmérővel és páramérővel folyamatosan ellenőriztünk (9. ábra).



9. ábra: Virágfertőzés előkészítése (*Prunus serrulata* 'Kanzan')
(Fotó: Dudás, 2012)

A szakirodalom szerint a virágokat célszerű kapilláris technikával inokulálni, mert ez a módszer igen hasonlít a természetben lejátszódó fertőzési folyamatra, így megbízható, pontos eredményekre számíthatunk (Honty, 2011). Mi egy ehhez igen hasonló módszerrel, pipettával végeztük a fertőzést. A kórokozó 24 órás tenyészetéből steril desztillált vízzel baktérium szuszpenziót (5×10^7 sejt/ml) készítettünk és másnap a kinyílt virágok bibéire pipetta hegygel vittünk

fel egy cseppet (10. ábra). Fajtánként 20 virágot fertőztünk. Kontrollként pedig steril desztillált vizet használtunk (fajtánként 10 virágon). A kísérletet 5 nap múlva értékeltük a virágok hosszanti szétvágásával, majd a nekrosis mértékének megállapításával.



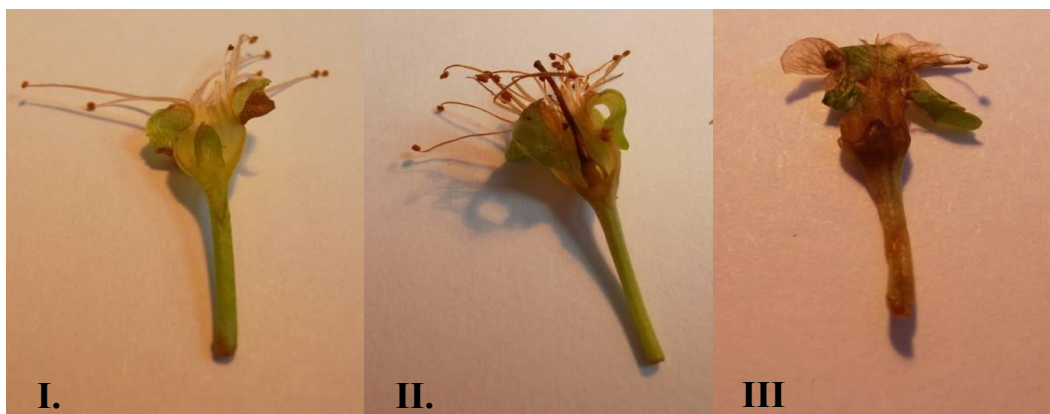
10. ábra: Meggy- és cseresznyevirágok fertőzése
(Fotó: Végh, 2012)

A virágfertőzés értékeléséhez Hevesi és munkatársai (2006) egy hatos fokozatú skálát használtak (Pusey, 1999):

0. nincs nekrosis;
1. magházon kezdeti nekrosis látható;
2. a nekrosis a magház feléig terjedt;
3. a magház több mint a felén, esetleg a teljes felületre kiterjedt nekrosis;
4. teljes magház és kocsány is nekrotizálódott;
5. teljes magház és a virágkocsány nekrotizálódott, felületükön baktériumnyálka jelent meg.

A cseresznye és a meggy virágainak mérete és felépítése miatt nehéz egyértelműen elkülöníteni a hatféle fokozatot. A saját értékeléseink során módosítottuk az általuk alkalmazott fertőzési skálát, mely alapján mi 3 csoportot különböztettünk meg (11. ábra):

- I. nincs nekrosis;
- II. részleges nekrosis látható a magházon;
- III. teljes magház és kocsány nekrotizálódott, esetleg baktériumnyálka jelent meg a felületen.



11. ábra: A meggy- és cseresznyefajták virágainak fogékonysági kategóriái
(I= tünetmentes, II= részleges elhalás, III= teljes nekrotizáció)
(Fotó: Dudás, 2012)

A skála alapján az alábbi képlettel meghatároztuk a virágok betegségi fokát (B_v), mellyel az adott fajta fogékonyságára következtethetünk (Bertrand és Gottwald, 1978).

$$B_v = \frac{\sum f_i * n_i}{n}$$

Ahol : B_v a betegség mértéke
 f_i a fertőzési index
 n_i a fertőzési indexhez tartozó gyakoriság
 n a fajtán belül vizsgált összes növényi rész.

3.3.7 Termésfertőzés és értékelés

Az éretlen gyümölcsöket szintén szabadföldről szereztük be. A felszínüket alkohollal fertőtlenítettük, majd baktérium szuszpenzióba (5×10^7 sejt/ml) mártott bonctűvel szúrtunk meg fajtánként 15 termést (12. ábra). Kontrollként steril desztillált vizet használtunk. Az inokulált gyümölcsöket egy tálban üveggyöngyökre helyeztük, az üvegtál aljába pedig kevés desztillált vizet töltöttünk, majd lezártuk, ezzel biztosítva a baktérium számára kedvező, párás környezetet.



12. ábra: Éretlen meggy- és cseresznyetermések fertőzése
(Fotó: Végh, 2012)

A megfertőzött termékek értékelésekor a szakirodalom 4 csoportot különít el (Hevesi, 2006):

0. nincs tünet;
1. a fertőzés helye vízzel átitatott volt, majd barnult, 5 mm átmérőjű nekrosis alakult ki, amelyet 20 mm átmérőjű sárga, ill. piros udvar szegélyezett;
2. a nekrosis átmérője meghaladta a 40 mm-t, felületén apró (mm) baktériumcseppecskék jelentek meg;
3. a fertőzés az egész gyümölcsre kiterjedt, barnásan márványozottá vált, felülete baktérium-nyálkacseppekkel borított volt, a fertőzés helyén 2-3 mm átmérőjű baktérium-nyálkacsepp mutatkozott.

A saját értékeléseink során ebben az esetben is módosítottuk az általuk alkalmazott fertőzési skálát, mely alapján szintén 3 csoportot különböztettünk meg (13. ábra). A fertőzést követő 4. napon vizsgáltuk a termésen kialakult elhalás mértékét és három csoportba soroltuk őket:

- I. tünetmentes;
- II. vizenyős, nekrotikus folt jelentkezett a szúrásnyom körül;
- III. az egész gyümölcs megfertőződött, előfordult baktériumnyálka is a felszínen.



13. ábra: A meggy- és cseresznyefajták terméseinek fogékonysági kategóriái
 (I= tünetmentes, II= részleges elhalás, III= teljes nekrotizáció)
 (Fotó: Dudás, 2012)

A fertőzés mértéke szerint meghatároztuk a virágfertőzésnél is használt képlet alapján a gyümölcsök megbetegedésének mértékét (B_t).

$$B_t = \frac{\sum f_i * n_i}{n}$$

4. EREDMÉNYEK

4.1 A kórokozó azonosítása cseresznyeszilva hajtásról (*Prunus cerasifera*) klasszikus módszerekkel

4.1.1 Az *E. amylovora* okozta tünetek

A barnuló pásztorbotszerűen meggörbülő hajtásokat cseresznyeszilváról szedtük 2011 nyarán. A tünetek tipikusan *E. amylovora* jelenlétére utaltak (14. ábra). Hazánkban a kórokozó megjelenése cseresznyeszilván új eredmény, ezért fontosnak tartottuk a gazdanövény meghatározását. A gazdanövényt a Budapesti Corvinus Egyetem, Növényteni Tanszékén *Prunus cerasifera*-ként azonosították.



14. ábra: A tűzelhalás tünetei cseresznyeszilva hajtásán
(Fotó: Némethy, 2011)

4.1.2 A Gram-féle tulajdonság

A 3%-os kálium-hidroxid feloldotta a baktérium sejtfalát, így az általunk új gazdanövényről, cseresznyeszilváról származó izolátum Gram-negatív.

4.1.3 Hiperszenzitív reakció vizsgálata

Az izolátum 5×10^7 sejt/ml töménységű szuszpenziójával inokulált dohány növény levelein 24-48 óra elteltével kialakult a hiperszenzitív reakciót jelző gyors szöveti nekrozis (15. ábra).



15. ábra: A cseresznyeszilváról származó izolátum hiperszenzitív reakciója dohánynövény levelén
(Fotó: Dudás, 2011)

4.1.4 Patogenitási teszt

A cseresznyeszilváról származó izolátum esetében elvégeztük a patogenitási tesztet. Kísérletünkben éretlen körtegyümölcsöt fertőztünk és ellenőriztük, hogy kialakul-e a betegségre jellemző tünet. A baktérium szuszpenzióval inokulált teszt növények fertőződtek. Megállapítottuk, hogy a körtegyümölcsök 5 nap elteltével intenzíven reagáltak, kialakultak a tűzelhalásra jellemző tünetek. A mesterséges visszafertőzés sikeres volt.

A körtéken az inokuláció helyén diffúz, besüppedő konzisztenciájú foltok jelentek meg a vizsgált izolátum esetében (16. ábra). A fertőzött gyümölcsről sikeresen visszaizoláltuk a kórokozót (Koch, 1876), és a későbbiekben ezzel végeztük el a virágok és termések inokulációját.



16. ábra: A cseresznyeszilváról származó izolátummal inokulált körte gyümölcs
(Fotó: Dudás, 2011)

4.2 Az izolátum tenyészbélyege King-B táptalajon

Az *E. amylovora* baktérium King-B táptalajon könnyen tenyésztethető, fenntartható. A kórokozó tenyészet a King-B táptalajon krémszínű, ép szélű, sima felületű, valamint nem termel fluoreszkáló pigmentet (17. ábra).



17. ábra: A cseresznyeszilváról származó izolátum tenyészet a King-B táptalajon
(Fotó: Dudás, 2011)

4.3 Az izolátum biokémiai jellemzői

Az API20E kit az *Enterobacteriaceae* családba tartozó fajok meghatározására szolgál, így ezzel is megerősíthetjük, hogy az általunk izolált baktérium nagy valószínűséggel az *E. amylovora*. A cseresznyeszilváról származó izolátumnál pozitív eredményt kaptunk a β -galaktozidáz, citrát hasznosításra, acetoin termelésre valamint glükóz, mannit, szorbit, szacharóz, melibióz, arabinóz vizsgálatokban. Negatív eredményt adott az arginin-dihidroláz, lizin-dekarboxiláz, ornitin-dekarboxiláz, H_2S termelés, ureáz, triptofán-deamináz, indol termelés, zselatináz, inozit, rhamnóz, amygdalin vizsgálatokra (18. ábra; 1. táblázat).



18. ábra: Az API20E kit 24 órás teszt eredménye az Ea-Cherryplum-Bu1 izolátum esetében
(Fotó: Dudás, 2011)

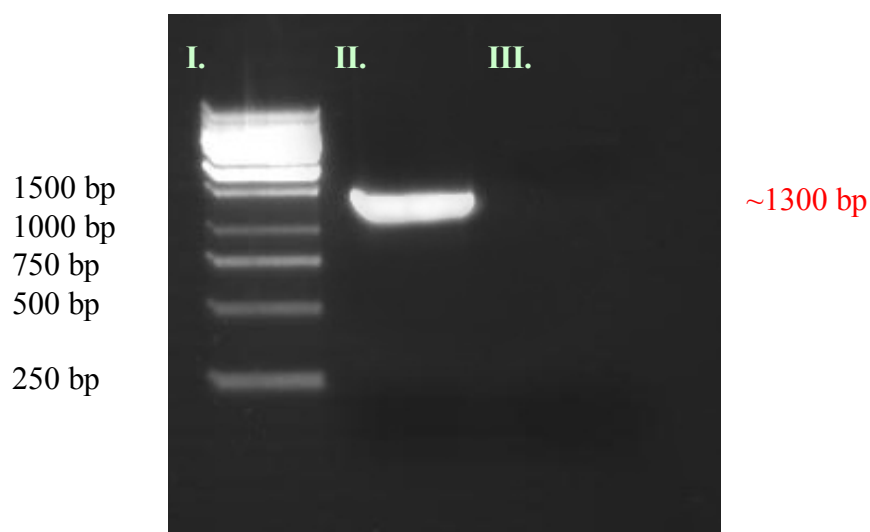
1. táblázat Az API20E kit 24 órás teszt eredménye a vizsgált *E. amylovora* izolátumok esetében

ONPG	β-galaktozidáz	+	GEL	Gelatináz	-
ADH	arginin-dihidroláz	-	GLU	Glükóz	+
LDC	Lizin DeCarboxiláz	-	MAN	Mannit	+
ODC	Ornitin DeCarboxiláz	-	INO	Inozit	-
CIT	Citrát hasznosítás	+	SOR	Sorbit	+
H 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	+

4.4 Az izolátum molekuláris vizsgálata

Az Ea-Cherryplum-Bu1, cseresznyeszilváról származó izolátum 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata

A reakció eredményeként kb. 1300 bp hosszúságú PCR-termék keletkezett (19. ábra).



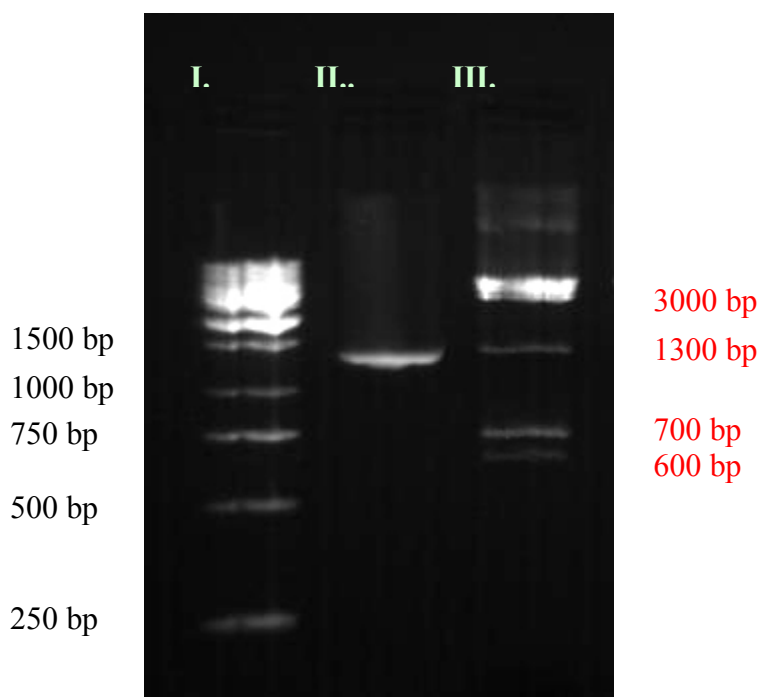
19. ábra: A cseresznyeszilváról származó izolátum (Ea-Cherryplum-Bu1) PCR analízise
Jelmagyarázat: I. 1 kB méretmarker, II. PCR termék, III. negatív kontroll

Minipreparátum

A nyolc minipreparátum mindegyikénél a plazmid tartalmazta a kívánt hosszúságú PCR terméket. Az 1-es számú klónt választottuk ki, és szaporítottuk fel a szekvencia meghatározásához.

Tisztított, EcoRI enzimmel hasított plazmid

Az *EcoRI* enzimmel hasított rekombináns plazmidból különböző hosszúságú részlegesen vágott, ill. egy 600 bp és egy 700 bp hosszúságú teljesen hasított inzertek vágódtak ki (20. ábra). A szekvencia analízis megerősítette az *EcoRI* restrikciós enzim hasítóhely jelenlétét a bakteriális szekvenciárészben.



20. ábra: A cseresznyeszilváról származó izolátum hasított plazmidja

Jelmagyarázat: I. 1 kb méretmarker, II. PCR termék, III. *EcoRI* enzimmel vágott rekombináns plazmid, a specifikus hasítási termékeket jelöltük (600 bp, 700 bp), az 1300 bp fragment részlegesen vágott hasítási termék, ill. a 3000 bp hosszúságú plazmid.

A magyar izolátum részlegesen meghatározott 16S rDNS nukleotid szekvenciáját (1323 bázis) elküldtük a nemzetközi adatbankba, amely az HF564622 hivatkozási számon található (1. melléklet).

A nemzetközi adatbázisban található szekvenciákkal összehasonlítottuk a cseresznyeszilváról származó izolátum szekvenciáját. Az összehasonlítás alapján az Ea-Cherryplum-Bu1 izolátum a vizsgált szakaszon 100% homológiát mutatott egy galagonyáról (FN434113.1) és egy almáról (FN666575.1) származó izolátummal.

4.5 A dísz- és termesztett cseresznye- és meggyfajták fogékonyságának eredményei

Dísz- és termesztett meggy- és cseresznyefajták virágait és gyümölcseit mesterségesen fertőztük *Erwinia amylovora* baktériummal. A fertőzések mértékét megállapítottuk, majd képlet alapján kiszámoltuk a megbetegedések erősségét, illetve ez alapján meghatároztuk az egyes fajták fogékonyságát a kórokozóra.

Kísérletünk során egyik fajta sem bizonyult teljes mértékben ellenállónak. A betegségek erőssége (B_v , B_t) alapján három csoportot alakítottunk ki a fogékonyság mértékének meghatározására:

- Mérsékelt rezisztens (MR) $B_v, B_t = 0-0,7$
- Mérsékelt fogékony (MF) $B_v, B_t = 0,71-1,4$
- Fogékony (F) $B_v, B_t = 1,41-2$

Meggyfajták:

Prunus cerasus 'Érdi bőtermő'

A fertőzés során vizsgált 20 db virágból 18 tünetmentesnek bizonyult, míg 2 virágon nekrotikus foltok jelentkezték. Ezzel szemben termésfertőzéskor csupán 1 db gyümölcs nem mutatott tüneteket, míg 14-en kisebb-nagyobb vizenyős-nekrotikus foltok jelentkezték. Így megállapítottuk, hogy e fajtának a virágai mérsékelt rezisztensek, míg a termései mérsékelt fogékonyak a kórokozóra (2. táblázat; 21. ábra).

2. táblázat: 'Érdi bőtermő' virág- és termésfertőzésének eredménye

'Érdi bőtermő' virágfertőzése				
	f_i	n_i	$f_i \cdot n_i$	B_v
I.	0	18	0	
II.	1	2	2	
III.	2	0	0	
	Σ	20	2	0,1

'Érdi bőtermő' termésfertőzése				
	f_i	n_i	$f_i \cdot n_i$	B_t
I.	0	1	0	
II.	1	14	14	
III.	2	0	0	
	Σ	15	14	0,93



21. ábra: 'Érdi bőtermő' fajta termésfertőzése *E. amylovora* kórokozóra kontrollhoz viszonyítva (Fotó: Dudás, 2012)

Prunus cerasus 'Újfehértói fürtös'

A virágok fertőzése után 6 db volt fertőzésmentes, 12 virágon kis mértékben jelentkeztek elhalások, míg 2 virág teljesen elszáradt. A termésekből 15 darab állt rendelkezésünkre, ebből 14 db mérsékelten megfertőződött, míg 1 termés tünetmentesnek bizonyult. Ezek alapján a fajta virága és termése is mérsékelten fogékony az *Erwinia amylovora*-ra (3. táblázat).

3. táblázat: 'Újfehértói fürtös' virág- és termésfertőzésének eredménye

'Újfehértói fürtös' virágfertőzése				
	fi	ni	fi*ni	B_v
I.	0	6	0	
II.	1	12	12	
III.	2	2	4	
	Σ	20	16	0,8

'Újfehértói fürtös' termésfertőzése				
	fi	ni	fi*ni	B_t
I.	0	1	0	
II.	1	14	14	
III.	2	0	0	
	Σ	15	14	0,93

Prunus cerasus 'Kántorjános 3'

A virágok és a termések nagy része ennél a fajtánál részlegesen elhalt a fertőzés során, és csupán 3 virág és 1 gyümölcs volt tünetmentes. Így ez a fajta is mérsékelten fogékonyak mutatkozik (4. táblázat).

4. táblázat: 'Kántorjános 3' virág- és termésfertőzésének eredménye

'Kántorjános 3' virágfertőzése				
	fi	ni	fi*ni	B_v
I.	0	3	0	
II.	1	17	17	
III.	2	0	0	
	Σ	20	17	0,85

'Kántorjános 3' termésfertőzése				
	fi	ni	fi*ni	B_t
I.	0	1	0	
II.	1	14	14	
III.	2	0	0	
	Σ	15	14	0,93

Prunus cerasus 'Debreceni bőtermő'

Virágfertőzés után 9 db virág nem mutatott tüneteket, míg 9 virágon vizenyős vagy nekrotikus foltok alakultak ki, 2 virág pedig teljesen elbarnult. Vizsgálataink során ebből a fajtából 15 db gyümölcsöt volt lehetőségünk fertőzni. Ezek közül mindegyiken jelentkeztek a tűzelhalás tünetei, 2 esetben az egész termés vizenyős lett és baktériumnyálka is megjelent a felületükön. Mind a virág, mind a termés mérsékelten fogékony kategóriába sorolható (5. táblázat).

5. táblázat: 'Debreceni bőtermő' virág- és termésfertőzésének eredménye

'Debreceni bőtermő' virágfertőzése				
	fi	ni	fi*ni	B_v
I.	0	9	0	
II.	1	9	9	
III.	2	2	4	
	Σ	20	13	0,65

'Debreceni bőtermő' termésfertőzése				
	fi	ni	fi*ni	B_t
I.	0	2	0	
II.	1	12	12	
III.	2	1	2	
	Σ	15	14	0,93

Prunus cerasus 'Érdi jubileum'

A virágok nagy része, 14 darab, ellenállónak bizonyult a fertőzés során, illetve egy virág súlyosan fertőződött a baktériummal. Gyümölcsfertőzéskor 15 termést tudtunk vizsgálni, ebből 13 db mérsékelt tüneteket mutatott, 2 gyümölcsön pedig nem jelentkeztek tünetek. A virágok mérsékelt ellenállóságot mutattak, míg a termések mérsékelt fogékonyságot (6. táblázat).

6. táblázat: 'Érdi jubileum' virág- és termésfertőzésének eredménye

'Érdi jubileum' virágfertőzése				
	f_i	n_i	f_i*n_i	B_v
I.	0	14	0	
II.	1	5	5	
III.	2	1	2	
	Σ	20	7	0,35

'Érdi jubileum' termésfertőzése				
	f_i	n_i	f_i*n_i	B_t
I.	0	2	0	
II.	1	13	13	
III.	2	0	0	
	Σ	15	13	0,86

Cseresznyefajták

A cseresznyefajták esetében nem volt lehetőségünk éretlen terméseket vizsgálni, csupán virágokat fertőztünk meg, kivéve a *Prunus serrulata* var. *hupehensis* fajtánál, ahol a gyümölcsfertőzést is el tudtuk végezni.

Prunus avium 'Carmen'

A fajta virágainak közel a fele tünetmentes volt, míg a másik fele részleges elhalásokat mutatott. Ez alapján a fajtát a mérsékelt fogékony kategóriába soroltuk (7. táblázat; 22. ábra).

7. táblázat: 'Carmen' virágfertőzésének eredménye

'Carmen' virágfertőzése				
	f_i	n_i	f_i*n_i	B_v
I.	0	9	0	
II.	1	11	11	
III.	2	0	0	
	Σ	20	11	0,55



22. ábra: 'Carmen' fajta fertőzött virága
(Fotó: Dudás, 2012)

Prunus avium 'Linda'

A vizsgált virágok nagy része mérsékelt fogékonyságot mutatott a kórokozóra, míg 3 virágon nem jelentkeztek tünetek, 5 virág pedig teljesen elpusztult. Így a fajta mérsékelt fogékonynak mondható (8. táblázat; 23. ábra).

8. táblázat: 'Linda' virágfertőzésének eredménye

'Linda' virágfertőzése				
	fi	ni	fi*ni	B_v
I.	0	3	0	
II.	1	12	12	
III.	2	5	10	
	Σ	20	22	1,1



23. ábra: 'Linda' fajta virágfertőzése
(Fotó: Dudás, 2012)

Prunus avium 'Katalin'

A 'Katalin' fajtánál minden virágon megfigyelhettünk tüneteket, közülük 4 darabon igen súlyos volt a fertőzés mértéke. A fajta szintén mérsékelt fogékonynak tűnik a tűzelhalás betegségére (9. táblázat).

9. táblázat: 'Katalin' virágfertőzésének eredménye

'Katalin' virágfertőzése				
	fi	ni	fi*ni	B_v
I.	0	0	0	
II.	1	16	16	
III.	2	4	8	
	Σ	20	24	1,2

Prunus serrulata 'Kanzan'

A legtöbb virágon jelentkeztek a tünetek, két egyed kivéve. 5 virágon teljes nekrózis volt látható, így ez a díszcsereesznye a mérsékelt fogékony fajták közé tartozik (10. táblázat).

10. táblázat: *Prunus serrulata* 'Kanzan' virágfertőzésének eredménye

<i>Prunus serrulata</i> 'Kanzan' virágfert.				
	fi	ni	fi*ni	B_v
I.	0	2	0	
II.	1	13	13	
III.	2	5	10	
	Σ	20	23	1,15

Prunus serrulata var. *hupehensis*

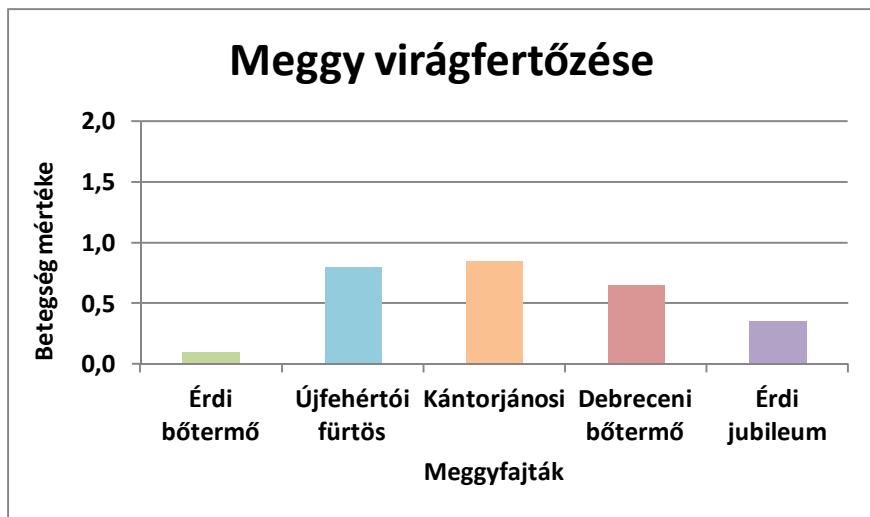
A cseresznyefajták közül a virágfertőzés során ez bizonyult a legellenállóbbnak, hiszen két egyed kivételével az összes virág tünetmentes volt. Ellenben a gyümölcsök szinte minden esetben kisebb-nagyobb elváltozásokat mutattak. Így a virág szempontjából a fajta ellenálló, míg a termés mérsékelten fogékony a kórokozóra (11. táblázat).

11. táblázat: *Prunus serrulata* var. *hupehensis* virág- és termésfertőzésének eredménye

<i>Prunus serrulata</i> var. <i>hupehensis</i> virágfertőzése				
	fi	ni	fi*ni	B _v
I.	0	18	0	
II.	1	2	2	
III.	2	0	0	
	Σ	20	2	0,1

<i>Prunus serrulata</i> var. <i>hupehensis</i> termésfertőzése				
	fi	ni	fi*ni	B _t
I.	0	1	0	
II.	1	19	19	
III.	2	0	0	
	Σ	20	19	0,95

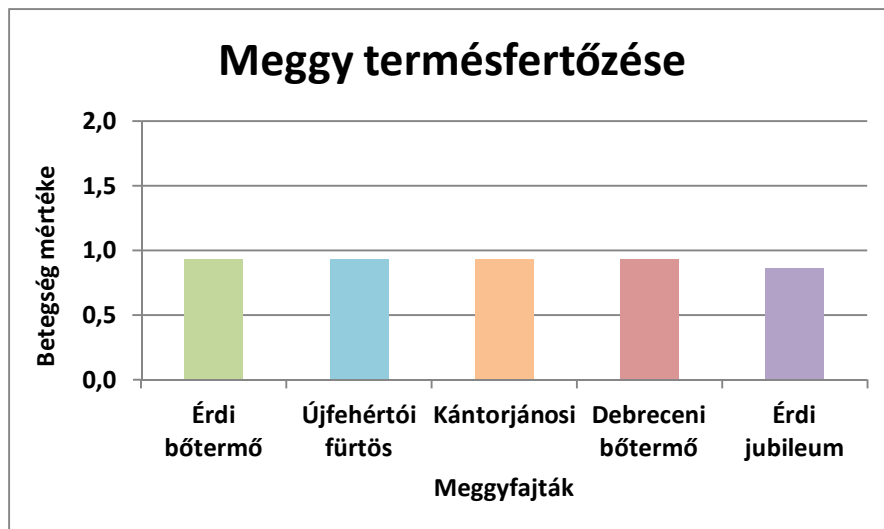
Az egyes meggy- és cseresznyefajták megbetegedési mértékét grafikonon is ábrázoltuk, mely jól illusztrálja, hogy mely fajták bizonyultak a legellenállóbbnak, illetve legfogékonyabbnak a virág- és termésfertőzés során. A tesztelt meggyfajták virágfertőzése során az 'Érdi bőtermő' volt a legellenállóbb, így eredményeink alapján ez a fajta mérsékelten rezisztensnek tűnik az *Erwinia amylovora* baktériummal szemben (24. ábra). Megállapíthatjuk továbbá, hogy az 'Érdi jubileum' virágai szintén mérsékelten ellenállóak, míg a 'Debreceni bőtermő', 'Kántorjánosi 3' és az 'Újfehértói fürtös' mérsékelten fogékony fajták.



24. ábra: Meggyfajták virágfertőzésének eredménye

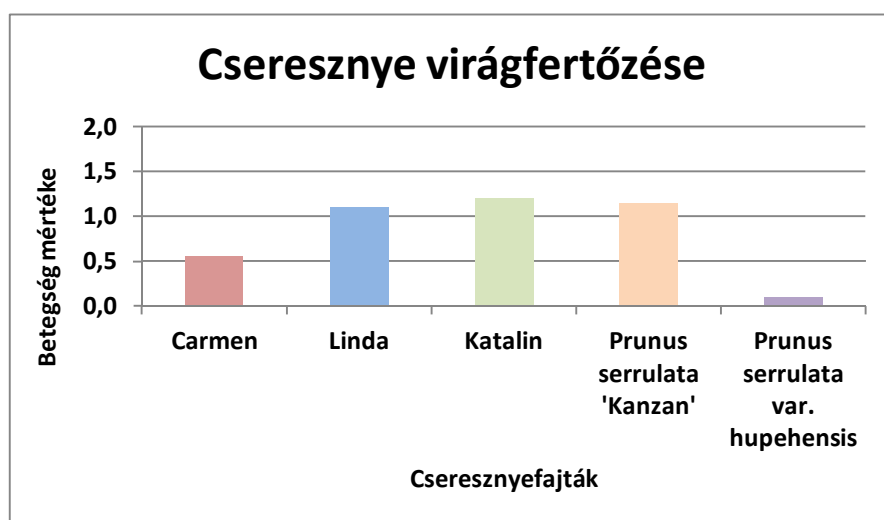
Kísérleteink során igaznak bizonyult az az állítás, miszerint a különböző növényi szervek eltérő ellenállósággal rendelkeznek egy fajtán belül is (Hevesi és mtsai., 2006). A 25. ábrán alapján az 'Érdi bőtermő' virágai szinte mind tünetmentesek voltak, ellenben a termésfertőzés során majdnem minden gyümölcsön megjelentek a nekrotikus foltok. Bár az 'Érdi jubileum' megbetegedése volt a

legkisebb mértékű, mégis minden vizsgált meggyfajta termése mérsékelten fogékony a tűzelhalás betegségére.



25. ábra: Meggyfajták termésfertőzésének eredménye

A cseresznyefajták esetében csak virágfertőzési kísérletekre volt lehetőségünk. A legkiemelkedőbb eredményt a *Prunus serrulata* var. *hupehensis* fajta adta, hiszen szinte az összes virág ellenállóságot mutatott a baktériummal szemben (26. ábra). Meg kell jegyeznünk azonban, hogy ennél a fajtánál végeztünk egyedül termésfertőzést, és ebben az esetben is szignifikáns eltérést mutatott a két növényi szerv ellenállósága. Míg e díszcseresznye virágai mérsékelten rezisztensek voltak, addig a termései kivétel nélkül kisebb-nagyobb mértékben megfertőződtek, így azok mérsékelten fogékonyak tekinthetők. További eredményeink alapján a 'Carmen', Linda', 'Katalin', *Prunus serrulata* 'Kanzan' virágai mérsékelten fogékonyak.



26. ábra: Cseresznyefajták virágfertőzésének eredménye

5. KÖVETKEZTETÉS

2011 nyarán fiatal cseresznyeszilva hajtásáról sikeresen izoláltuk az *Erwinia amylovora*-t. Eddig a tűzelhalás cseresznyeszilván (*Prunus cerasifera*) történő természetes fertőződéséről hazánkban még nem számoltak be. Más *Prunus* fajokon történő előfordulását már jelezték a kórokozónak. Az USA-ban (Mohan és Thomson, 1996; Mohan, 2007) európai szilva (*Prunus domestica*), japán szilva (*Prunus cerasifera*) és szilva és kajszi hibridjén (Pluot®) hajtásszáradásáról (Mohan, 2007) számoltak be. A kórokozó csak a hajtásokat pusztítja és az idősebb részekre nem terjed át, valamint a virágok fertőződése nem ismert (Mohan és Bijman, 1998). Németországban (Vanneste és mtsai., 2002) és Magyarországon (Végh és mtsai., 2012) európai szilvafa (*Prunus domestica*) hajtásának természetes fertőződését publikálták. 2010-ben Csehországban a kajszi (*Prunus armeniaca*) (Korba és Sillerova, 2010) leveleinek és hajtásainak fertőződését is jelezték. Vizsgálataink során az irodalomtól eltérő tünetekkel nem találkoztunk (van der Zwet és Keil, 1979).

A baktérium Gram-negatív, dohánynövényen hiperszenzitív reakciót vált ki (Hevesi, 1996), saját megfigyeléseink is megegyeztek ezzel. Az inokulált dohányleveleken 24-48 óra elteltével erőteljes szöveti nekrosis jelentkezett. Bereswill és munkatársai (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 munkatársai (1998) alapján a King-B táptalaj alkalmas az *E. amylovora* tenyésztésére. A kórokozó tenészete King-B táptalajon folyós, tejszerű, mukoid, krémszínű, mely táptalajon egységes kolóniákat képez, amely eredménnyel eltéréseket az irodalmi adatoktól nem tapasztaltunk (King és mtsai, 1954).

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

A molekuláris vizsgálatok során vizsgáltuk a 16S rRNS-t kódoló gén bázissorrendjét. A cseresznyeszilváról, hazánkban új gazdanövényről izolált kórokozó esetében a 16S rRNS gén vizsgálat során PCR technika segítségével 1300 bp hosszúságú PCR termék keletkezett, mely szekvenciáját meghatároztattuk. Az összehasonlítás alapján a vizsgált szakaszon 100% homológiát mutatott a cseresznyeszilva izolátum egy galagonyáról (FN434113.1) és egy almáról (FN666575.1) származó izolátummal.

Általánosságban a fajták fogékonyságáról az irodalomban mind a hajtások, illetve mind a virágok ellenállóságát vizsgálják. A fajták *Erwinia amylovora* fogékonyságának vizsgálataira

hazánk eltérő ökológiai körülményei miatt saját vizsgálatokra is szükség van. 1999 óta folyamatos nemesítési program és kutatómunka folyik a Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcstermő Növények Tanszékén hazai alma- és körtefajták *E. amylovora* baktériummal szembeni fogékonyságára illetve rezisztenciájára. Ennek a programnak része volt, hogy a történelmi körtefajtákat fogékonysági kategóriákba sorolták hajtás, virág valamint érett és éretlen gyümölcsök inokulációs vizsgálatai alapján, amelyekhez három izolátumból álló baktérium törzskeveréket használtak (Tóth és mtsai., 2004; Honty és mtsai., 2004, 2006; Honty, 2011).

Hevesi (2006) és Honty (2011) kidolgozták a virágok és gyümölcsök fertőzésének módszerét, ahol a külső sérüléseken át történő fertőzést imitálják (szúrással történő inokuláció). Ezen módszereket alkalmaztuk a dísz- és termesztett cseresznye- és meggyfajták fogékonyságának virág- és termésfertőzés vizsgálatai során, ahol az értékelési skálát módosítottuk. Hazánkban *Prunus* növényfajról származó *Erwinia amylovora* izolátummal még nem végeztek mesterséges fertőzési kísérleteket, valamint a *Prunus* fajok fogékonyságáról sincsenek adatok.

Az USA-ban és Dél-Németországban is végeztek mesterséges fertőzéseket különböző növényfajokon, és a baktérium ugyanolyan tüneteket okozott az *Amygdaloideae* alcsalád tagjain, mint a japán szilván (Mohan és Thomson, 1996), az európai szilván (Vanneste és mtsai., 2002), illetve a szilva és a kajszli keresztezésével nemesített Pluot® hibriden (Mohan, 2007). A szilváról izolált kórokozó képes tüneteket indukálni *Prunus* fajokon is, így cseresznyén (*P. avium*), őszibarackon (*P. persica*), nektarinon (*P. persica* var. *nucipersica*) és mandulán (*P. amygdalus*). Ennek tükrében feltételezhető, hogy a csonthéjasok is fogékonyak a betegségre (Palacio-Bielsa és mtsai., 2012). Melyet a mi eredményeink is alátámasztanak, mivel a *Prunus* fajról származó izolátum fertőzi a dísz- és termesztett cseresznye- és meggyfajták virágait és éretlen terméseit.

Üvegházi körülmények közt a baktériummal szembeni fogékonyságukat vizsgálták a növényeknek. A japán szilva 'Fortuna' és az alma 'Jonathan' fajtáiról izolált *Erwinia amylovora* nem mutatott szignifikáns különbséget a *Prunus* fajok fertőzésekor. Mindkét baktérium izolátum a virágokon nekrotikus foltokat okozott, ám egyik sem jutott be a virágkocsányba (Mohan és Bijman, 1999). Az általunk fertőzött cseresznye- és meggyfajták virágain szintén tapasztaltuk a kórokozó által okozott tüneteket, a nekrotikus foltokat.

Mohan és munkatársai (2002) mesterséges levél- és hajtásfertőzési kísérleteket végeztek. Vizsgálataik során, a kajszin és a japán szilván jelentkeztek nagyobb mértékben a tűzelhalás tünetei, míg szilván, őszibarackon, nektarinon, cseresznyén és mandulán kis mértékben rezisztencia mutatkozott. A meggyen ellenben semmiféle szimptóma nem jelent meg. Éretlen termések fertőzésekor azonban a szilva és a cseresznye tűnt a legfogékonyabbnak (Mohan és mtsai., 2002). Eredményeink alapján a vizsgált cseresznye- és meggyfajták fogékonyak a tűzelhalás betegség kórokozójára.

A termesztett meggyfajták virágfertőzése során az 'Érdi bőtermő' bizonyult a legellenállóbbnak. Megállapíthatjuk továbbá, hogy az 'Érdi jubileum' virágai szintén mérsékelten ellenállóak, míg a 'Debreceni bőtermő', 'Kántorjánosi 3' és az 'Újfehértói fürtös' mérsékelten fogékony fajták.

A különböző növényi szervek eltérő ellenállósággal rendelkeznek egy fajtán belül is (Hevesi és mtsai., 2006). Vizsgálataink szerint az 'Érdi bőtermő' virágai szinte mind tünetmentesek voltak, ellenben a termésfertőzés során majdnem minden gyümölcsön megjelentek a nekrotikus foltok. Bár az 'Érdi jubileum' megbetegedése volt a legkisebb mértékű, mégis minden vizsgált meggyfajta termése mérsékelten fogékony a tűzelhalás betegségére.

A cseresznyefajták esetében csak virágfertőzési kísérleteket végeztünk. A legkiemelkedőbb eredményt a *Prunus serrulata* var. *hupehensis* fajta adta, hiszen szinte az összes virág ellenállóságot mutatott a baktériummal szemben, valamint csak ennél a fajtánál végeztünk egyedül termésfertőzést, és ebben az esetben is szignifikáns eltérést mutatott a két növényi szerv ellenállósága. Míg e díszcseresznye virágai mérsékelten rezisztensek voltak, addig a termései kivétel nélkül kisebb-nagyobb mértékben megfertőződtek, így azok mérsékelten fogékonyak tekinthetők. További eredményeink alapján a 'Carmen', 'Linda', 'Katalin', *Prunus serrulata* 'Kanzan' virágai mérsékelten fogékonyak.

Paulin és munkatársai (1990) kísérletükben megállapították, hogy az általuk vizsgált gyümölcsök fogékonyasága nagyban eltér a gyümölcsösben tapasztalható hajtás- és virágfogékonyaságtól, melyet Honty (2011) is alátámaszt, mert több körtefajta ('Packham's Triumph', 'Pap körte') esetében tapasztalta, hogy a laboratóriumi körülmények között végzett hajtás- és virágfertőzések alapján nagyon fogékonyak, míg az éretlen gyümölcsök fertőzése során pedig mérsékelt rezisztenciát mutattak. Thibault és munkatársai (1989), valamint Le Lezec és munkatársai (1998) megállapították, hogy a vizsgált fajták különböző szervei (hajtás, virág, gyümölcs) közül az egyik az adott évben mérsékelt rezisztenciát, majd később nagyfokú fogékonyaságot mutatott, másrészt pedig a legtöbb fajtánál az egyes szervek az inokuláció hatására eltérő módon reagáltak. A vizsgált szerv a különböző években eltérő módon viselkedett a fertőzés hatására a legtöbb esetben (Honty, 2011). A kísérleteink is ezt támasztották alá, hogy az egyes szervek fertőzése során eltérő eredményeket kapunk. Az ellenállóság megítéléséhez elsősorban a virág rezisztenciáját tartjuk elsődlegesnek, de szükségesnek tartjuk, hogy ezek az adatok kiegészüljenek a hajtás- és gyümölcsfertőzés vizsgálatok eredményeivel is.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A „tűzelhalás betegség” (kórokozó: *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow munkatársai, 1920) súlyos gazdasági veszteséget, problémát jelent az egész világon. Gazdanövény körébe tartozó *Rosaceae* család mintegy 40 nemzetség 200 faj növényeit képes megbetegíteni. A gazdanövények közül a *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Malus*, *Pyrus*, *Photinia*, *Pyracantha* és *Sorbus* nemzetséghez tartozó fajok a legfontosabbak. A kórokozó megjelenését egyre több új gazdanövényről publikálták az elmúlt években. Az Amerikai Egyesült Államokban a tüskétlen szedren (Evans, 1996) és málnán is jelezték a kórokozó megjelenését (Schnabel és Jones, 2001). Beszámoltak a japán szilva fiatal hajtásainak természetes fertőződéséről is (Mohan és Thomson, 1996). Az USA-ban szilva és kajszi fajhibridjén hajtásszáradásról (Mohan, 2007), Észak-Németországban európai szilva fertőződéséről (Vanneste, 2002) és Csehországban a kajszi (*P. armeniaca*) természetes fertőződéséről jelentek meg publikációk (Korba és Sillerova, 2010). Hazánkban *Prunus* fajon történő előfordulását is jelezték már (Végh és mtsai., 2012).

2011 nyarán tűzelhalásra emlékeztető tüneteket figyeltünk meg Budapesten, Óbudán házi kertbe ültetett cseresznyeszilva (*Prunus cerasifera*) hajtásán. A fiatal hajtásra pásztorbatszerű görbület, barnuló elhalás volt jellemző. A fertőzött hajtást a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszékén vizsgáltuk tovább. A kórokozót klasszikus – tenyészbélyeg, biokémiai (API 20E) és fiziológiai tulajdonság, patogenitási teszt - és molekuláris vizsgálati módszerrel - 16S rRNS – azonosítottuk.

A kórokozó tenyésztéséhez King-B táptalajt használtunk, melyen ép szélű, kiemelkedő, mukoid kolóniák képződtek. Meghatároztuk a kórokozó alapvető biokémiai és fiziológiai tulajdonságait. A kórokozó patogenitását egészséges körtegyümölcsökre ('Alexander Lucas' fajta) történő inokulációval bizonyítottuk. Eredményeinket összevetve az irodalmi adatokkal a kórokozót *Erwinia amylovora*-ként azonosítottuk a tenyésztési, biokémiai és fiziológiai tulajdonságok alapján.

A molekuláris vizsgálatok során vizsgáltuk a 16S rRNS-t kódoló gén bázis-sorrendjét. A 16S rRNS gén vizsgálat során univerzális primereket (63f, 1389r) használtunk. A magyar izolátum (Ea-CherryPlum-Bu1, NCBI nyilvántartási száma: HF564622) a vizsgált szakaszon 100% homológiát mutatott egy galagonyáról és egy almáról származó *E. amylovora* izolátummal, míg a többi izolátummal 99 %-os volt az azonosság. Fiatal cseresznyeszilva hajtásról sikeresen izoláltuk és meghatároztuk a tűzelhalás kórokozóját, az *E. amylovora*-t. Eredményünk új tudományos eredménynek számít, mert a kórokozó cseresznyeszilván történő megjelenéséről hazánkban még nem számoltak be. A tűzelhalás betegség előfordulása cseresznyeszilván a *Prunus* fajok spontán

fertőződésének és a kórokozó fennmaradásának lehetőségét, valamint járványszerű fellépését vetíti elő.

A kórokozó azonosítása után mesterséges fertőzési vizsgálatokat végeztünk dísz- és termesztett cseresznye- és meggyfajtákon. Ezen kísérlet célja volt, hogy megvizsgáljuk a fajták virágainak- és éretlen terméseinek fogékonyságát a *Prunus* fajról származó *Erwinia amylovora* kórokozó baktériumra, mivel hazánkban ilyen adatok még nem állnak rendelkezésünkre. A vizsgálati módszereket részben a külföldi (van der Zwet és Keil, 1979) és részben a hazai (Hevesi és mtsai., 2006; Honty, 2011) rezisztenciakutatásban alkalmazottak közül vettük át, ahol a fertőzési skálát módosítottuk. A fajták fogékonyságának illetve ellenállóságának megállapításához a virágokon és a gyümölcsökön kialakult tüneteket vettük alapul. A betegség kialakulását folyamatosan figyeltük és a tüneteket a 4-5. nap elteltével értékeltük. A fajtákat virág- és termés fogékonyság alapján 3 fertőzési fokozatba soroltuk. Megállapítottuk, hogy a vizsgált cseresznye- és meggyfajták fogékonyak a baktériumra. A termesztett meggyfajták virág- és termés fertőzése során az 'Érdi bőtermő' bizonyult a legellenállóbbnak, a 'Debreceni bőtermő', 'Kántorjánosi 3' és az 'Újfehértói fürtös' fajták pedig mérsékelten fogékonyak. A különböző növényi szervek eltérő ellenállósággal rendelkeznek egy fajtán belül is. A cseresznyefajták esetében csak virágfertőzési kísérleteket végeztünk. A legkiemelkedőbb eredményt a *Prunus serrulata* var. *hupehensis* fajta adta, hiszen szinte az összes virág ellenállóságot mutatott a baktériummal szemben, valamint csak ennél a fajtánál végeztünk egyedül termésfertőzést, és ebben az esetben is szignifikáns eltérést mutatott a két növényi szerv ellenállósága. Míg e díszcseresznye virágai mérsékelten rezisztensek voltak, addig a termései kivétel nélkül kisebb-nagyobb mértékben megfertőződtek, így azok mérsékelten fogékonyak tekinthetők. További eredményeink alapján a 'Carmen', 'Linda', 'Katalin', *Prunus serrulata* 'Kanzan' virágai mérsékelten fogékonyak. Az ellenállóság megítéléséhez elsősorban a virág rezisztenciáját tartjuk elsődlegesnek, de szükségesnek tartjuk továbbá a hajtás- és gyümölcs fertőzések eredményeivel is kiegészíteni, többször megismételni, hogy végleges következtetést vonhassunk le egy fajta *Erwinia amylovora* kórokozóval szembeni fogékonyságára/ellenállóságára.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet és tiszteletemet kifejezni mindazon személyeknek, akik segítségemre voltak a dolgozatom megírásakor:

Köszönettel tartozom Dr. Palkovics Lászlónak, a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszék vezetőjének, aki lehetővé tette, hogy a szükséges molekuláris technikákat tanszékén elsajátítsam, anyagi háttérrel biztosított kísérleteimhez és szakmai hozzáértésével hozzájárult dolgozatom eredményes elkészítéséhez.

Köszönetet mondok tanszéki konzulensemnek, Végh Anitának, aki idejét és energiáját nem sajnálva segített a kutatások során és a dolgozatom írásakor.

Köszönöm Dr. Némethy Zsuzsannának, hogy rendelkezésemre bocsátotta a vizsgálataimhoz szükséges növényi anyagokat és szakmai tudásával segítette munkámat.

Hálával tartozom Dr. Nagy Gézának a Sós-kútról származó termesztett meggy- és cseresznyefajtákért, melyeket a virág- és terméshozókéhez használtam fel.

A vizsgált növényfajok fajtáinak azonosításában Dr. Höhn Mária, a Növénytan Tanszék tanszékvezetője segített, amiért szintén szeretnék köszönetet mondani.

Köszönöm a Növénykórtani Tanszék minden munkatársának és hallgatójának, akik munkám során segítségemre voltak.

Nem utolsó sorban hálával és köszönettel tartozom családomnak és páromnak, akik mindenben támogatnak és megteremtették számomra a nyugodt környezetet a felkészüléshez.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Agrios, N. G. 1997. Plant Patology (4th Edition). London: Academic press. 413 p.
2. Atanosova, I., Kabadjova, P., Bogatzevska, N., Moncheva, P. 2005. New host plants of *Erwinia amylovora* in Bulgaria. In: Naturforsch 60.évf. 11-12.sz. p.893-898.
3. Bagi F., Bognár K. 2011. Növényvédelmi ismeretek. Hódmezővásárhely. Szegedi Tudományegyetem Mg-i Kar. p.181-182.
4. Balaž, J. 1999. Status of *Erwinia amylovora* in Yugoslavia: Distribution, identification and control. In: Acta Hort. 489.sz. p.99-104.
5. Bastas, K. K., Katircioglu, Y.Z. 1999. Studies of fire blight (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.) on pome fruit trees in Konya province in Turkey. In: Acta Hort. 489. 111-114.
6. Battilani, P., Mazzoli, L., Mazzucchi, U. 1998. A geophytopathological study of fireblight in pear growing-area of Po valley (Northern Italy). In: Acta Hort. 489. sz. p.93-98.
7. Benlioglu, K., Özakman, M. 1999. Characterization of Turkish isolates of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. In: Acta Hort. 489.sz. p.127-131.
8. Bereswill, S., Jock, S., Belleman, P., Geider, K. 1998: Identification of *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containing copper sulfate and by capsule staining with lecitin. In: Plant Disease 82. évf. 2. sz. p. 158-164 p.
9. Bertrand, P. F., Gottwald, T. R. 1978. Evaluating fungicides for pear disease control. In: Zehr E. I. (szerk.) Methods for Evaluating Plant Fungicides, Nematicides and Bactericides. St. Paul Minnesota. p. 179-181.
10. Brózik S., Kállay T-né. 2001. Csonthéjas és héjas gyümölcsfajták. Budapest. Mezőgazda. p. 9-38.
11. Bubán T., Németh J., Sallai P. 1999. Tüzelhalás. Gyakorlati útmutató az „Almatermésűek baktériumos hajtásszáradása és elhalása (kórokozó: *Erwinia amylovora*) betegségről és a védekezés lehetőségeiről az integrált gyümölcstermesztés keretei között”. Újfehértó. Almatermők Szövetsége. p. 108-116.
12. Burrill, A. C. 1882. The bacteria: an account of their nature and effects, together with a systematic description of the species. In: III. Indus. Univ. Ann. Rpt. 11. sz. p. 93-157.
13. Calzolari A., Finelli F., Mazzoli G.L. 1999. A severe unforeseen outbreak of fire blight in the Emilia-Romagna region. In: Acta Hort. 489.sz. p. 171-176.
14. Chester, F. D. 1897. A preliminary arrangement of the species of the genus bacterium; bacteria associated with diseases of plants; notes on pear blight; pear canker treatment. In: Del. Agr. Expt. Sta. Ann. Rpt. 9. sz. p. 127.

15. Choi, Y-C., Gu, W., Hecht, N.B., Feinberg, A. P., Chae, C-B. 1996. Molecular Cloning of Mouse Somatic and Testis-Specific H2B Histone Genes Containing a Methylated CpG Island. In: DNA and Cell Biology. 15. évf. 6. sz. p. 495-504.
16. 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. sz. p. 840–862.
17. 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.
18. Dénes Z. 2007. Újra itt a tűzelhalás. In: Magyar Nemzet XLL. évfolyam. (július)
19. Emmet, B.J., Baker, L.A.E. 1971. Insect transmission of fireblight. In: Plant Pathology. 20. évf.1. sz.p. 41
20. Evans, I.R. 1996. Fire blight of raspberries in Alberta. In: Acta Hort. 411.sz. 69-72.
21. Glits M., Folk Gy. 2000. Kertészeti növénykórtan. Budapest. Mezőgazda. p.171-172.
22. Hevesi M. 1996. *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al. hazai megjelenése almán. Bp. In: Agroinform.Növényvédelem 32 (5).sz p. 225-228.
23. Hevesi M., Király I., Honty K., Tóth M. 2006. Új almahibridek tűzelhalással szembeni fogékonyságának összehasonlító vizsgálata a hajtások, virágok és a gyümölcsök inokluációjára alapján. In: Kertgazdaság. 38. évf. 2. sz. p.8-16.
24. Honty K., Hevesi M., Göndör M., Tóth M., Bács-Várcuti V., Ferenczy A. 2004. Susceptibility of some traditional pear cultivars of Hungarian and foreign origin to the pathogenic bacterium *Erwinia amylovora*. In: International Journal of Horticultural Science 10. sz. p.41-45
25. Honty K., Göndör M., Tóth M., Kása K., Hevesi M. 2006. Susceptibility of pear cultivars to fire blight in Hungary. In: Acta Horticulturae 704. sz. p. 583-587.
26. Honty K. 2011. Körtefajták tűzelhalással szembeni ellenállósága és a betegség folyamatának jellemzése néhány biokémiai paraméter vizsgálatával. Doktori értekezés. Budapest. Budapesti Corvinus Egyetem Gyümölcstermő Növények Tanszék. p. 5-15.
27. Horváth Cs., Eke I., Hevesi M., Klement Z., Németh J. 1997. Amit a tűzelhalásról tudni kell. In: Kertészet és Szőlészet. 46.évf. 17. sz. p. 2-3.
28. Hrotkó K. 2003. Cseresznye és meggy. Budapest. Mezőgazda. p. 47-89.
29. King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. In: J. Lab. Clin. Med. 44. sz. p. 301-307.
30. Klement Z. 1963. Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonas*. In: Nature, 199.sz. p. 299–300.
31. Koch R. 1876. Untersuchungen Über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten. Leipzig: F. C. W. Vogel. p. 8-62.

32. Korba, J., Sillerova, J. 2010. First occurrence of Fire Blight on apricot (*Prunus armeniaca*) in Czech Republic. In: Acta Hort. 896.sz. p. 289-291.
33. Lecomte, P., Paulin, J.P., Audusseau, C., Huberdeau, D. 1996. Az *Erwinia amylovora* szerepe az almaalanyok elhalásában (in French ford. Böszörményi E.) In: Phytoma 486. sz. p.36-40.
34. Le Lezeč, M., Laurens, F., Michelesi, J. 1998. Suscettibilità varietale del melo e del pero al „colpo di fuoco batterico”. In: Rivista di Frutticoltura 98. évf. 3. sz. p. 9-14.
35. Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E. F. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual (3rd volume). New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
36. Merő F. 2004. Helyzetkép a tűzelhalásról 2004 tavaszán Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében. In: Gyakorlati Agrofórum 15. évf. 3. sz. p. 70–71.
37. Miller, P.W. 1929. Studies of fire blight of apple in Wisconsin. In: Journal of Agricult. Research 39. évf. 8. sz. p. 579-621.
38. Mohan, S.K., Thomson, S.V. 1996. An outbreak of fire blight in plums. In: Acta Hort. 411. sz. p.73-76.
39. Mohan, S.K., Bijman, V. P. 1999. Susceptibility of *Prunus* species to *Erwinia amylovora*. In: Acta Hort. 489.sz. p.145-148.
40. Mohan, S.K., Bijman, V.P., Fallahi, E. 2002. Field evaluation of *Prunus* species for susceptibility to *Erwinia amylovora* by artificial inoculation. In: Acta Hort. 590.sz. p.377-380.
41. Mohan, S. K. 2007. Natural incidence of shoot fire blight in Pluot® caused by *Erwinia amylovora*. In: 11th International Workshop on Fire Blight. Workshop Program. Acta Hort. p.64.
42. Mónus B. 1996. A csonthéjas gyümölcsök korszerű termesztése és biotermesztése. PRIMOM Vállalkozásélénkítő Alapítvány. Nyíregyháza. p. 14-26, 134-148.
43. Mónus B. 1999. A meggy és a cseresznye integrált termesztése. PRIMOM Vállalkozásélénkítő Alapítvány. Nyíregyháza. p. 34-49, 144-154.
44. Németh J. (szerk.: Szőnyegi S.) 1997. Az almatermésűek baktériumos hajtásszáradása és elhalása (tűzelhalás). Kórokozó: *Erwinia amylovora*. Budapest. Agroinform. p. 10-32
45. Németh J. 1999. Occurrence and spread of fire blight (*Erwinia amylovora*) in Hungary (1996-1998). Management of disease. In: Acta Hort. 489. sz. p.177-185.
46. Nyéki J., Soltész M., Szabó Z. 2011. Intenzív cseresznyetermesztés. Debreceni Egyetem AGTC Kutatási és Fejlesztési Intézet. p. 9-12.
47. Osborn, T. J., Hulme, M., Jones, P.D., Basnett T. A. 2000. Observed trend in the daily intensity of United Kingdom precipitation. In: Int. Journal of Climatology. 20. évf. 4. sz. p. 347-364.

48. Öden, S. 1998. Occurrence of fire blight in pear trees grown in Van and around. In: Acta Hort. 489. sz. p. 107-109.
49. Palacio-Bielsa, A., Rosello, M., Llop, P. 2012. *Erwinia* spp. from pome fruit trees: similarities and differences among pathogenic and non-pathogenic species. In: Trees 26 évf. 1. sz.p.13-29.
50. Paulin, J. P., Keck, M., Chartier, R., Zislavsky, W. 1990. Versuche zur Beurteilung der Feuerbrandanfälligkeit von Kernobstsorten nach Infektion unreifer Früchte. In: Pflanzenschutzberichte 51. évf. 2. sz. p. 91-98.
51. Pálfi K., Vendrei Zs., Csete S., Simon Z., Sótonyi J., Lőrinczné Izsányi G. 2000. Az almatermésűek tűzelhalás betegsége (*Erwinia amylovora*) Magyarországon, 2000-ben. In: Integrált termesztés a kertészeti és szántóföldi kultúrákban 21. sz. p.12-17.
52. Pejchinovski, F.D. 1996. Fire blight in Republic of Macedonia (distribution and control). In: Acta Hort. 411. sz. p.17-20.
53. Pór J., Faluba Z. 1982. Cseresznye és meggy. Budapest. Mezőgazdasági Kiadó. p. 56-79.
54. Pusey, P. L. 1999. Water relations and infection by *Erwinia amylovora* based on crab apple blossommodel. In: Acta Hort. 489: sz. p. 521–524.
55. Schmidt G. 2004. Díszfák. Budapest. Mezőgazda. p. 63.
56. 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: Appl. Environ. Microbiology. 67.évf. 1. sz. p.59-64.
57. Soltész M. 1998. Gyümölcsfajtaismeret és –használat. Budapest. Mezőgazda. p. 288-319.
58. Starr, M.P., Cardona, C., Folsom, D. 1951. Bacterial fire blight application of the API 20 E system in diagnosis. Journal of Phytoof raspberry. In: Phytopathology 41. sz. p. 915–919.
59. Steiner P., Zeller W. 1996. A tűzelhalás Magyarországon. Jelentés a Magyar Köztársaság Földművelésügyi Minisztériuma számára.
60. Thibault, B., Belouin, A., Lecomte, P. 1989. Sensibilité varietable du poirier au feu bacterien. In: L' Arboriculture Fruitière. 421.sz. p. 29-34.
61. Thomson, S. V. 1986. The role of stigma in fire blight infections. In: Phytopathology 76.évf. 5. sz. p.476-482.
62. Thomson, S. V. 2000. Epidemiology of fire blight. In Fire blight: The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. Vanneste, J. (szerk) Oxon, UK. p. 9-36.
63. Tóth, M., Honty, K., Kása, K., Hevesi, M., Göndör, M. 2004. Susceptibility of pear cultivars to fire blight in Hungary. In: 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy 5-9. July 2004.
64. Trevisan, V. 1889. Bacilli endofitobii destruenti. In: His, Generi e le Specie delle Batteriaceae, Milano, p. 19.

65. Van de Peer, Y., Chapelle, S., De Wachter, R. 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. In: Nucleic Acids Res. 24. évf. 17. sz. p. 3381-91.
66. Van der Zwet, T., Keil, H. L. 1979. Fire blight – a bacterial disease of Rosaceous plants. US Government Printing Office. Washington. In: Agriculture H.B. 510.sz. p. 200.
67. Van der Zwet, T., Beer, S.V., 1995. Fire Blight – its nature, prevention and control. A practical guide to integrated disease management. In: USDA. Agriculture Information Bulletin 631. évf. 1. sz. p. 97.
68. Vanneste, J. L., Lex, S., Vermeulen, M., Berger, F. 2002. Isolation of *Erwinia amylovora* from blighted plums (*Prunus domestica*) and poteto roses (*Rosa rugosa*). In: Acta Hort. 590. p.89-94.
69. Végh A., Némethy Zs., Hajagos L., Palkovics L. 2012. First riport of *Erwinia amylovora* causing Fire Blight on plum (*Prunus domestica*) in Hungary. In: Plant Disease. 96.évf. 5.sz. p. 759.
70. 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. sz. p. 191-229.

Internetes források

1. http://en.hortipedia.com/wiki/Prunus_serrulata_var._hupehensis

9. MELLÉKLET

1. melléklet

Ea-Cherryplum-Bu1 16S rRNS gén szekvenciája és jellemzői a nemzetközi adatbázisban

ID HF564622; SV 1; linear; genomic DNA; STD; PRO; 1323 BP.
AC HF564622;
DT 10-DEC-2012 (Rel. 115, Created)
DT 10-DEC-2012 (Rel. 115, Last updated, Version 1)
DE *Erwinia amylovora* partial 16S rRNA gene, isolate Ea-CherryplumBU1.
OS *Erwinia amylovora*
OC Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
OC Enterobacteriaceae; *Erwinia*.
RN [1]
RP 1-1323
RA Palkovics L.;
RL Submitted (01-NOV-2012) to the INSDC.
RL Department of plant Pathology, Corvinus University Of Budapest, Menesi Road
RL 44., H-1118, HUNGARY.
RN [2]
RA Vegh A., Nemethy Z.S., Dudas A., Palkovics L.;
RT "First occurrence of fire blight on cherry plum (*Prunus cerasifera*) in
RT Hungary";
RL Unpublished.
FH Key Location/Qualifiers
FT source 1..1323
FT /organism="Erwinia amylovora"
FT /host="Prunus cerasifera cv. Nigra"
FT /isolate="Ea-CherryplumBU1"
FT /mol_type="genomic DNA"
FT /country="Hungary"
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; 310 C; 431 G; 253 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 tgaggtaacg gctcacctag gcgacgatcc ctactgggtc tgagaggatg 240
accagccaca ctggaactga gacacggctc agactctac gggaggcagc agtggggaaat 300
attgcacaat gggcgcaagc ctgatgcagc catgccgcgt gtatgaagaa ggccttcggg 360
ttgtaaagta ctttcagcgg ggaggaaggg tgagagggtta ataactctct gcattgacgt 420
taccgcgaga agaagcaccg gctaactccg tgccagcagc cgcggtataa cggagggtgc 480
aagcgtaaat cggaattact gggcgtaaag cgcacgcagg cggctctgca agtcggatgt 540
gaaatccccc ggcttaacct gggaactgca ttgaaactg gcaggctaga gtctcgtaga 600
ggggggtaga attccaggtg tagcggtgaa atgcgtagag atctggagga ataccggtgg 660
cgaaggcggc cccctggacg aagactgacg ctacggtcgc aaagcgtggg gagcaaacag 720
gattagatac cctggtagtc cagccgtaa acgatgtcga ctggaggct gttcccctga 780
ggagtggctt ccgagagtaa cgcgttaagt cgaccgctg gggagtacgg ccgcaagggt 840
aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgat 900
gcaacgcgaa gaaccttacc tggccttgac atccacggaa ttctgcagag atgcggaagt 960
gccttcggga accgtgagac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt tgtgaaatgt 1020
tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct tacccttgt tgccagcat tcggtcggga 1080
actcaaagga gactgccggt gataaaccgg aggaaggtgg ggtacacgtc aagtcacat 1140
ggcccttacg gccagggcta cacacgtgct acaatggcgc atacaagag aagcgacctc 1200
gcgagagcaa gcggacctca taaagtgcgt cgtagtccgg atcggagtct gcaactcgac 1260
tccgtgaagt cggaatcgct agtaatcgta gatcagaatg ctacggtgaa tacgttcccg 1320
ggc 1323