

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM

KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR

NÖVÉNYKÓRTANI TANSZÉK

Tudományos Diákköri Dolgozat

***Az Enterobacteriaceae* családba tartozó növénypatogén, antagonista és szaprofita baktériumfajok rokonsági viszonyainak feltérképezése molekuláris vizsgálatok alapján**

Izsépi Ferenc

Növényorvos MSc II. évfolyam

Konzulensek:

Dr. Végh Anita egyetemi tanársegéd

Zámbó Ágnes PhD hallgató

Dr. Palkovics László tanszékvezető egyetemi tanár



Budapest, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1. Az <i>Enterobacteriaceae</i> család jellemzői	6
2.1.1. <i>Erwinia amylovora</i> baktérium jellemzői	6
2.1.1.1. A kórokozó gazdasági jelentősége	7
2.1.1.2. A kórokozó gazdanövényköre	8
2.1.1.3. A kórokozó által okozott tünetek	8
2.1.2. <i>Brenneria nigrifluens</i> baktériumfaj jellemzői.....	10
2.1.2.1. A kórokozó gazdasági jelentősége	10
2.1.2.2. A kórokozó által okozott tünetek	10
2.1.3. <i>Brenneria alni</i> baktériumfaj jellemzői	11
2.1.3.1. A kórokozó gazdasági jelentősége	11
2.1.3.2. A kórokozó gazdanövényköre és a kórokozó által okozott tünetek.....	11
2.1.4. <i>Brenneria salicis</i> baktériumfaj jellemzői	12
2.1.4.1. A kórokozó gazdasági jelentősége	12
2.1.4.2. A kórokozó gazdanövényköre és a kórokozó által okozott tünetek.....	12
2.1.5. <i>Brenneria goodwinii</i> baktériumfaj jellemzői.....	13
2.1.5.1. A kórokozó gazdasági jelentősége	13
2.1.5.2. A kórokozó gazdanövényköre	14
2.1.5.3. A kórokozó által okozott tünetek	14
2.1.6. <i>Erwinia rhapontici</i> baktériumfaj jellemzői	15
2.1.6.1. A kórokozó gazdasági jelentősége	15
2.1.6.2. A kórokozó gazdanövényköre és a kórokozó által okozott tünetek.....	16
2.2. Baktériumfajok azonosítása, elkülönítése molekuláris módszerekkel.....	17
2.2.1. A 16S rRNS marker	18
2.2.3. Háztartási gének	18
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	20
3.1. A vizsgálat helye és ideje	20
3.2. A vizsgálat anyaga	20
3.2.1. Vizsgált izolátumok.....	20
3.2.2. A kórokozók tenyésztése, fenntartása	21
3.2.3. Enzimek	21
3.2.4. Primerek.....	22
3.3. A vizsgálat módszere	22
3.3.1. A baktérium szuszpenzió előállítása	22
3.3.2. A polimeráz láncreakció paraméterei.....	22
3.3.3. Gélelektroforézis	24
3.3.4. A PCR termék tisztítása.....	24
3.3.5. A PCR-termékek klónozása.....	24
3.3.6. Kolónia-PCR.....	25
3.3.7. Klónok tisztítása szekvenálásra	25
3.3.5. A nukleinsav szekvencia meghatározása.....	25
3.3.6. A szekvencia analízishez felhasznált program	25
4. EREDMÉNYEK.....	26
4.1. A 16S rRNS gén filogenetikai vizsgálata	26
4.2. Háztartási gének filogenetikai vizsgálata	28

4.2.1. Az <i>atpD</i> háztartási gén filogenetikai vizsgálata.....	28
4.2.2. Az <i>infB</i> háztartási gén filogenetikai vizsgálata	30
4.3. A <i>Brenneria nigrifluens</i> izolátumok vizsgálata	32
4.3.1. A <i>Brenneria nigrifluens</i> izolátumok 16S rRNS génjének filogenetikai vizsgálata.....	32
4.3.2. A <i>Brenneria nigrifluens</i> izolátumok <i>atpD</i> génjének filogenetikai vizsgálata	33
4.3.3. A <i>Brenneria nigrifluens</i> izolátumok <i>infB</i> génjének filogenetikai vizsgálata.....	33
5. KÖVETKEZTETÉSEK.....	35
5.1. 16S rRNS gén filogenetikai vizsgálata.....	35
5.2. Háztartási gének vizsgálata.....	35
5.2.1. Az <i>atpD</i> gén filogenetikai vizsgálata	36
5.2.2. Az <i>infB</i> gén filogenetikai vizsgálata.....	36
5.3. A <i>Brenneria nigrifluens</i> izolátumok molekuláris vizsgálata.....	37
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	39
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	41
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	42
9. MELLÉKLETEK.....	48

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Az *Enterobacteriaceae* családba hozzávetőlegesen 30 nemzetség 150 baktériumfaja tartozik, melyek közül számos gazdaságilag jelentős növénypatogén kórokozót tartanak számon (Wilson, 2008). Az *Erwinia amylovora* baktériumfaj által okozott tűzelhalás az almatermésűek egyik legjelentősebb betegsége. Világszerte súlyos károkat okoz a gyümölcsstermesztésben, hazánkban 1995 óta van jelen, azóta karantén listás kórokozó (Bonn, 1999; Hevesi, 1996). Az *Erwinia rhapontici* baktérium az egész világon elterjedt, polifág kórokozó. A fertőzött növény két jellemző tünete a rothadás vagy a magvak rózsaszínre színeződése lehet. A faj mintegy 15 gazdanövényen károsít (Huang és mtsai., 2003).

A *Brenneria salicis* baktérium által okozott hervadásos betegség a fűz fajokon (*Salix* sp.) okoz jelentős kárt (Hauben és mtsai., 1998). A kórokozó Magyarországon is jelen van, hazánkban is volt példa a baktérium által okozott tömeges fűzfapusztulásra (Lakatos és Szabó, 2012). A *Brenneria goodwinii* baktériumfajt először Nagy-Britanniában észlelték, mint a tömeges tölgypusztulást (acute oak decline, AOD) okozó egyik kórokozót (Denman és mtsai., 2012). Európában több helyen is megfigyeltek hasonló tüneteket tölgyfajokon (*Quercus* sp.), a baktérium által okozott betegség során fekélyes sebek alakulnak ki a fák kérgén, később az idősebb fák el is pusztulhatnak (Denman és mtsai., 2010). A *Brenneria nigrifluens* baktérium által okozott sekély kéregrák a közönséges dió (*Juglans regia*) egyik jelentős betegsége, számottevő termés kiesést és minőségromlást okozhat (Jamalzade és mtsai., 2012). Hazánkban 2013-ban észlelték Zánkán egy idős, házikertben ültetett diófa törzsén (Végh és mtsai., 2013).

A baktériumok vizsgálata során általánosan használt marker a 16S rRNS-t kódoló nukleinsav szakasz, amely jól alkalmazható fajok nemzetség-, ill. fajszerű meghatározására (Lawrence és mtsai., 1991). A tapasztalatok azt mutatják, hogy a háztartási gének molekuláris vizsgálatával a fajszerű azonosítások nagyobb pontossággal végezhetőek, mint a 16S rDNS vizsgálatával (Mollet és mtsai., 1997). Az IF2 esszenciális fehérjét kódoló *infB* gén és az ATP-szintáz enzim β -alegységét kódoló *atpD* gén is jól alkalmazható a molekuláris vizsgálatokban (Hedegaard és mtsai., 1999; Brady és mtsai., 2008).

Munkánk során célul tűztük ki:

- Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumfajok rokonsági viszonyainak feltárását saját, valamint a nemzetközi adatbázisból származó izolátumok szekvenciáinak összehasonlításával.
- A molekuláris vizsgálatok elvégzését 16S rRNS gén, valamint két háztartási gén (*infB*, *atpD*) felhasználásával.
- A molekuláris markerek vizsgálatára alapozva létrehozni a vizsgált izolátumok filogenetikai törzsfáit, valamint az izolátumok rokonsági viszonyait megállapítani.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az *Enterobacteriaceae* család jellemzői

Az *Enterobacteriaceae* család a *Schizomycetes* osztályba, azon belül az *Eubacteriales* rendbe tartozik (Breed és Murray, 1957). Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó fajok gram-negatív, pálcika alakú baktériumok. Általában rendelkeznek csillókkal, amelyek peritrich elhelyezkedésűek. Endospórát nem képeznek, fakultatív anaerob szervezetek. A legtöbb ide tartozó faj kataláz pozitív és oxidáz negatív tulajdonsággal bír. Jellemző a családra, hogy a nitrátokat nitritekké redukálják, valamint glükóz-fermentáció során savat képeznek. A növekedésükhöz optimális hőmérséklet 25 °C és 37 °C közé esik (Lapage, 1979; Wilson, 2008).

Az *Enterobacteriaceae* családba hozzávetőlegesen 30 nemzetség és ezen belül 150 faj tartozik (Wilson, 2008). Számos faj az ember és állatok beleiben él bélrendszeri zavarokat okozva, míg más fajok növénypatogének, amelyek elhalást vagy lágyrothadást idéznek elő a növényi részekben. Léteznek szaprofita fajok is a családban, melyek a holt szerves anyag bomlását idézik elő (Breed és Murray, 1957).

2.1.1. *Erwinia amylovora* baktérium jellemzői

A baktérium előfordulását 1780-ban, a New York állambeli Hudson folyó völgyében észlelték egy körteültetvény területén (Denning, 1794). 1882-ben Burrill publikálta először a fajt *Mycrococcus amylovorus* néven, majd 1884-ben Joseph C. Arthur izolálta elsőként a világon (van der Zwet és Keil, 1979) és kísérletben bizonyította, hogy egy baktérium a betegség közvetlen okozója (1. ábra). 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).



1. ábra: *Erwinia amylovora* mikroszkópos felvétele

(<http://www.studyblue.com/notes/note/n/type-disease-fire-blight-of-apple-and-pear/deck/2775877>)

2.1.1.1. A kórokozó gazdasági jelentősége

Az *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow és mtsai. (1920) baktérium által okozott tűzfelhalás az almatermésűek egyik legfontosabb betegsége. Gazdasági jelentősége meghatározó a világ számos országában. Coxe amerikai kutató már 1817-ben már az Egyesült Államok gyümölcstermesztésének egyik fő problémájaként nevezi meg a betegséget. Az Egyesült Államok északnyugati részén 1998-ban 68 millió dollár veszteséget okozott mindössze egy év alatt (Bonn, 1999).

Angliában az első megjelenésről Crosse és mtsai. (1958) számolnak be, Maidstone melletti körtefákon észlelték a tüneteket. A betegség gyorsan terjedt tovább, az európai kontinensen 1966-ban jelent meg Hollandiában illetve ugyanebben az évben, Lengyelországban, a Balti-tenger partvidékéről is jelentették az előfordulását (Netherlands Plant Protection Service, 1966; Borecki és mtsai., 1967). Ezt követte Dánia (1968), az akkori NSZK északi partvidéke (1971), Belgium (1972) majd Franciaország (1972). A kórokozó 6 év alatt szinte egész Európát meghódította, ezért akkoriban arra következtettek, hogy a vándorló madarak játszanak szerepet a gyors elterjedésben (Meijneke, 1972; van der Zwet, 1994). Olaszország Emilia-Romagna régiójában egyetlen tenyésztési időszak alatt ötszázezer gyümölcsfa pusztult el a baktérium okozta betegség által (Calzolari és mtsai., 1999). Ausztráliában először 1997-ben észlelték a Royal Botanical Gardens területén Melbourne-ben (Rodoni és mtsai., 1999).

Az *Erwinia amylovora* hazánkban karantén kórokozó, elsőként 1995-ben észlelték a kórokozó által okozott tüneteket egy Nyárlőrinc melletti almaültetvényben, majd Hevesi Mária azonosította a baktériumot (Hevesi, 1996). A fertőzések ekkor elsősorban Békés, Bács-Kiskun és Csongrád megyékre koncentráálódtak, de Baranyában is azonosították a kórokozót. 1997-ben Zala és Szabolcs-Szatmár-Bereg megye is fertőzött területté vált, valamint további megyékből is jelentették a kórokozó előfordulását. 1999-ben már csak Vas és Nógrád megye számított fertőzésmentesnek (Németh, 1999). 2000-ben összesen 3780 ha gyümölcsös volt fertőzött a kórokozó által (Pálfi és mtsai., 2000). A következő években Szabolcs-Szatmár-Bereg és Borsod-Abaúj-Zemplén megyében is nőtt a fertőzött terület aránya (Merő, 2004; Csete és mtsai., 2004). Az ezt követő évek időjárási körülményei kedvezőtlenül befolyásolták a kórokozó terjedését, majd 2007-ben több megyében ismét erős fertőzöttséget tapasztaltak (Dénes, 2007).

2.1.1.2. A kórokozó gazdanövényköre

Az *Erwinia amylovora* a *Rosaceae* család 40 nemzetségének kb. 200 növényfaján fordulhat elő, ezek közül legfontosabbak a *Pyrus* és *Malus* nemzetség fajai. Ezen kívül gazdaságilag fontos gazdanövényei közé tartoznak a *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Pyracantha* és *Sorbus* nemzetség fajai (van der Zwet és Keil, 1979).

Az elmúlt években egyre több növényen jelent meg a kórokozó a világ különböző részein. Az Egyesült Államokban Evans (1996) tuskétlen szederről, Schnabel és Jones (2001) pedig málnáról izolálták a baktériumot. A betegség tüneteit japán szilván (Mohan és Thomson, 1996), valamint szilva és kajszi hibridjén is megfigyelték (Mohan, 2007). Európában is egyre több újabb gazdanövényről publikáltak az elmúlt években. Vanneste és mtsai. (2002) Németországban európai szilva, Korba és Sillerova (2010) Csehországban kajszi természetes fertőződéséről számoltak be. Végh és mtsai. (2012) Budaörsön szilvafa hajtásairól izolálták a kórokozót. Ez volt az első alkalom, hogy hazánkban szilva természetes fertőződéséről számoltak be.

2.1.1.3. A kórokozó által okozott tünetek

A betegség tüneteit van der Zwet és Keil (1979) írta le:

Virágelhalás: A megfertőzött virágokon először vízzel átitatott foltok jelennek meg, majd a virágok elkezdenek hervadni, száradni, végül barnásfeketék lesznek. A

virágkocsányokon hasonló tünetek jelentkeznek, meleg párás időben baktériumnyálka és exudátum is megjelenhet rajtuk.

Hajtás- és levélelhalás: A hajtásfertőződés a csúcson vagy a hajtások alapja felől történik szisztemikusan. A hajtások megbarnulnak, jellegzetes pásztorbot-szerű görbület alakul ki (2. ábra), gyakran nyálkacseppek is megjelennek. A fertőzött levelek fő- és mellékerei kezdetben vörös, majd fekete színt vesznek fel. A hajtáselhalás a fertőzőttség legnagyobb részét teszi ki, sőt, előfordulhat, hogy csak hajtáselhalás figyelhető meg az adott évben. A tünetek hasonlóak a virágelhalásnál említettekhez, azonban a fertőzés gyorsabban terjed, elérheti a napi 15-30 cm-t is. Az elszáradt levelek nem hullnak le a hajtásokról.

Gyümölcselelhalás: Leggyakrabban a fiatal, éretlen gyümölcsök betegednek meg (2. ábra). A kórokozó a gyümölcshéj lenticelláin, gyakran a fertőzött dárdából a kocsányon keresztül hatol be a gyümölcsbe. A fiatal gyümölcskezdemenyek fertőződés esetén elfeketednek. Az elpusztult gyümölcsök mumifikálódnak és a fán maradnak vagy lehullnak.

Ág- és törzselhalás: A megfertőzött vízhajtások és kisebb elágazások alapi részénél rákos sebek alakulnak ki, amelyek a kórokozó áttelelését szolgálják. Jellegzetes tünet a törzs megbetegedése során, a felületén lefolyó nyálka, kísérő tünetként kéregrepedések is kialakulhatnak. A kéreg alatt a fás részen gyakran jellegzetes vörösesbarna csíkozottság figyelhető meg.

Gyökérnyak és gyökérelhalás: A betegségnek ez a két típusa a legveszélyesebb, gyakran az egész fa pusztulását okozza. A fertőzés általában a gyökérnyaktól a gyökerek felé terjed, de előfordulhat fordítva is. A fertőzést leggyakrabban a földfeletti növényi részekről a talajba mosódott vagy a szállítószövetekben szisztemikusan lejutó baktériumok okozzák.



2. ábra: *Erwinia amylovora* fertőzés tünetei hajtáson és gyümölcsön
(www-s.aces.uiuc.edu; www.bitkisagligi.net)

2.1.2. *Brenneria nigrifluens* baktériumfaj jellemzői

A kórokozó először Kaliforniában jelent meg, ekkor még *Erwinia nigrifluens* néven írták le (Wilson és mtsai., 1957). A kórokozó ezután Európában is terjedni kezdett, Spanyolországban Lopez és mtsai. (1994) számoltak be megjelenéséről, majd Olaszországban több helyen is megjelent (Saccardi és mtsai., 1998; Morone és mtsai., 1998; Scortichini, 1999; Carella és mtsai., 2003; Loreti és mtsai., 2005). Franciaországban Menard és mtsai. (2004) jelezték a sekély kéregrák kórokozójának előfordulását. Magyarországon, Zánkán Végh és mtsai. (2013) is jelezték a kórokozó hazai előfordulását idős, házikertben ültetett diófa törzséről (3. ábra).



3. ábra: *Brenneria nigrifluens* okozta kéregrepedés, feketefolyás diófa törzsén
(Fotó: Végh Anita, 2012)

2.1.2.1. A kórokozó gazdasági jelentősége

A *Brenneria nigrifluens* (Wilson és mtsai., 1957) baktérium által okozott sekély kéregrák a közönséges dió (*Juglans regia* L.) egyik jelentős betegsége. A kórokozó nagymértékű gazdasági kárt képes okozni, számottevően csökkentheti a termésmennyiséget és a faiparban felhasznált faanyag minőségét is jelentős mértékben rontja (Jamalzade és mtsai., 2012).

2.1.2.2. A kórokozó által okozott tünetek

A fertőzést követően sekély, szabálytalan alakú fekélyesedés jelentkezik a törzs kéreg részén (4. ábra), később sötét színű, folyékony anyag szivárog a fekélyes sebekből. A paraalapszövetet eltávolítva a szöveteken gyakran nekrózis jelei láthatóak (4. ábra). Egyes esetekben a nekrózis kiterjedhet a kambiumra és a külső szíjácsra is (Jamalzade és mtsai.,

2012). Fiatal facsemetéken (Saccardi és mtsai., 1998) és idősebb fákon is jelentős károkat okozhat a kórokozó (Piccirillo, 2003).

Saccardi és mtsai. (1998) fiatal fertőzött fákon hosszirányú, barnás, némileg besüppedő, 5-20 cm-es foltokat észleltek, amelyek alatt a kérget eltávolítva fekete, hosszúkás csíkok voltak láthatóak. Megfigyelték a fertőzött egyedek törzsének erős deformáltságát is. Az idősebb, 15-20 éves fákon 4-5 cm hosszú, barna, ovális foltokat észleltek.



4. ábra: *Brenneria nigrifluens* által okozott kéregpedés és nekrozis diófa törzsén
(www.agricoltura.regione.campania.it; Yousefikopaei és mtsai., 2007)

2.1.3. *Brenneria alni* baktériumfaj jellemzői

2.1.3.1. A kórokozó gazdasági jelentősége

A *Brenneria alni* baktériumfajt Surico és mtsai. (1996) írták le először, mint az égerfajok (*Alnus* spp.) kéregrákosodását okozó kórokozót. A betegség tünetei hasonlítanak a *Brenneria nigrifluens* által okozott tünetekre, ez a baktériumfaj irodalmi adatok szerint azonban csak égerfajokon károsít. A betegség a fertőzés előrehaladtával jelentős károkat okozhat, akár a fák teljes pusztulásával is járhat.

2.1.3.2. A kórokozó gazdanövényköre és a kórokozó által okozott tünetek

Olaszországban Toszkána és Liguria környékén, enyves égeren (*Alnus glutinosa* L.) és szívlevelű égeren (*Alnus cordata* Desf.) figyelték meg a betegség tüneteit (Surico és Mugnai, 1992). Feltételezhetően más égerfajokon is előfordulhat a kórokozó, de irodalmi adatok szerint még nem számoltak be más fajokon való előfordulásáról.

Surico és mtsai. (1996) az alábbi tünetekről számolnak be: a fertőzés során eleinte apró nekrotikus, vizenyősnek tűnő foltok keletkeznek a törzs és az ágak kérgén, amelyek sekélyen besüppedőek, sötétbarna színűek, szabálytalan kör alakúak. A foltok gyakran a lenticellák körül fejlődnek ki, de a nóduszokon és levélripacsokon is megjelenhetnek. A fertőzés folyamán a nekrosis oldalirányban terjed, a fás részekben egyre mélyebbre hatol. Végül eléri a kambiumot és néha a farész első rétegeit, melyek sárgásbarnára majd barnára színeződnek. A foltok végül teljesen körbenőhetnek a törzset ezzel a fertőzött ág vagy az egész fa pusztulását okozva.

A betegség másik jellegzetes tünete tavasszal és nyáron jelentkezik: a foltok repedéseiből sötét színű, folyékony anyag szivárog, mely a törzs felületén lefolyva fekete elszíneződést okoz a fákon. Ez a tünet hasonlít a *Brenneria nigrifluens* esetében tapasztalt szivárgásra.

2.1.4. *Brenneria salicis* baktériumfaj jellemzői

2.1.4.1. A kórokozó gazdasági jelentősége

A *Brenneria salicis* (Hauben és mtsai., 1998) (a kórokozó korábbi neve: *Erwinia salicis*) baktériumfaj által okozott hervadásos betegség jelentős veszteségeket okozhat a fűzfa populációkban (Hauben és mtsai., 1998). A fertőzést követő néhány éven belül a beteg fák teljes pusztulását okozhatja, a kórokozó által okozott tömeges fapusztulásra Magyarországon is volt példa (Lakatos és Szabó, 2012).

A kórokozó fertőzött növényi részekkel, általában dugványokkal terjed. Az ily módon történő terjedés elkerülése nehéz, hiszen a fertőzött fiatal dugványokon nem láthatóak sem külső, sem belső elváltozások (Hauben és mtsai., 1998). A baktérium terjedése megvalósulhat szél, esővíz és a xilofág rovarok segítségével is (Lakatos és Szabó, 2012).

2.1.4.2. A kórokozó gazdanövényköre és a kórokozó által okozott tünetek

A baktérium az összes fűzfajt képes megfertőzni, leggyakrabban a fehér fűzön (*Salix alba* L.) és a fehér fűz törékeny fűzzel (*Salix fragilis* L.) alkotott hibridjein fordul elő (Lakatos és Szabó, 2012). Maes és mtsai. (2009) nyár és éger fajokon is megfigyelték a kórokozó kártételét.

A tünetek tavasszal vagy nyár elején jelentkeznak: a fiatal hajtásokon hervadt, száraz, barna levelek figyelhetők meg. A farész vizenyőssé, áttetsző színűvé válik, innen a betegség

angol elnevezése: „watermark disease” (5. ábra). A fiatal fák esetében már az első évben teljes pusztulás léphet fel. Az idősebb fákon minden évben újabb koronarészek hálnak el, végül pár éven belül az egész fa elpusztul. A fás részek sebzéseiből baktériumnyálka szivárog, a fertőzött ágak és törzs keresztmetszetén szürkés, barnás foltok és sávok figyelhetők meg (Hauben és mtsai., 1998; Lakatos és Szabó, 2012).



5. ábra: *Brenneria salicis* fertőzés tünetei fűzfán
(Lakatos és Szabó, 2012)

2.1.5. *Brenneria goodwinii* baktériumfaj jellemzői

2.1.5.1. A kórokozó gazdasági jelentősége

A *Brenneria goodwinii* baktériumfajt elsőként Denman és mtsai. (2012) azonosították, mint a Nagy-Britanniában jelentős tölgypusztulást (acute oak decline – AOD) okozó egyik kórokozót. Az említett betegség számottevő gazdasági károkat okoz az Egyesült Királyságban, a kiváltó okok között szerepelnek biotikus és abiotikus tényezők is, eddig több gomba- és baktériumfajt is kimutattak a fertőzött növényekből (Denman és mtsai., 2010; 2012). A betegség egyre nagyobb területeket hódít meg, pontos terjedési mechanizmusa még ismeretlen. A beteg fák a fertőzést követő 4-5 évben teljesen elpusztulnak (Denman és mtsai., 2010).

2.1.5.2. A kórokozó gazdanövényköre

A kórokozó leginkább a Nagy-Britanniában őshonos tölgyfajokat, a kocsányos tölgyet (*Quercus robur* L.) és a kocsánytalan tölgyet [*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.] fertőzi (Denman és mtsai., 2012), de hasonló tünetekről számoltak be Spanyolországban magyaltölgyön (*Quercus ilex* L.) valamint pireneusi tölgyön (*Quercus pyrenaea* Willd.) (Biosca és mtsai., 2003; Poza-Carrión és mtsai., 2008). A betegségre jellemző tüneteit figyelték meg tölgyfákon Belgiumban (Vansteenkiste és mtsai., 2004), Németországban (Hartmann és Blank, 1992) valamint Hollandiában és Lengyelországban is (Moraal és Hilszczanski, 2000).

2.1.5.3. A kórokozó által okozott tünetek

A fertőzés során 5-10 cm-es függőleges repedések keletkeznek a fák törzsén, melyekből tavasszal sötét színű, ragacsos exudátum szivárog (6. ábra). A kéreg alatti szöveteken (periderma, floém, kambium, egyes esetekben a szíjács is) foltok jelennek meg, melyek később nekrotizálódnak. A foltok általában 1-2 méterrel a talajszint fölött jelennek meg először. A fertőzést követően a fákon akár több mint 20 nedvedző seb is kialakulhat (Denman és mtsai., 2010; Denman és mtsai., 2012).

A legtöbb esetben a kéreg alatti foltok mentén megtalálhatóak a kétpettyes karcsú díszbogár [*Agrilus biguttatus* (Fabricius)] lárváinak járatai is (7. ábra). Jelenleg kérdéses még, hogy milyen szerepet játszhat a xilofág rovar a betegség terjesztésében (Denman és mtsai., 2012).



6. ábra: *Brenneria goodwinii* (AOD -acute oak decline) tünetei tölgyfa kérgén
(www.forestry.gov.uk)



7. ábra: Kétpettyes karcúdíszbogár (*Agrilus biguttatus*) rágásnyomai a baktériumos foltok mellett
(www.forestry.gov.uk)

2.1.6. *Erwinia rhapontici* baktériumfaj jellemzői

Az *Erwinia rhapontici* (Millard) Burkholder egy opportunista növénypatogén baktériumfaj (Sellwood és Lelliott, 1978). A kórokozót először 1924-ben írták le rebarbaráról (*Rheum rhaponticum* L.), innen származik a faj elnevezése is (Millard, 1924).

Világszerte elterjedt fajról van szó, a kórokozó megtalálható Észak-Amerikában, Európában, Északkelet-Ázsiában (Japán és Korea) valamint a Közel-Keleten (Izrael) (Bradbury, 1977; CMI, 1981). Vízből (Pouteau-Thouvenot és mtsai., 1965), talajból (Feistner és mtsai., 1997), magokból (Huang és mtsai., 2002) és egyéb növényi szövetekből is izolálták már (Letal, 1976; Sellwood és Lelliott, 1978; Tharreau és mtsai., 1992).

2.1.6.1. A kórokozó gazdasági jelentősége

A kórokozó két alapvető tünetet okozhat: rothadást vagy a magvak rózsaszín elszíneződését („pink seed”) (Huang és mtsai., 2003). Az utóbbi tünet gazdaságilag jelentősen csökkentheti a maghozamot és -minőséget, továbbá kedvezőtlen hatással lehet a csíranövények növekedésére (Huang és Erickson, 2002). Az Egyesült Államokban készült tanulmányok bizonyították, hogy a kórokozóval fertőzött durumbúza magjai tésztakészítésre alkalmatlanok, az ezekből készült búzadara ugyanis rózsaszín, ami kizáró ok az élelmiszeripari felhasználásban. Angliában azt tapasztalták, hogy a kórokozó által fertőzött magok a színeződés miatt összekeverhetőek bizonyos csávázószerekkel kezelt vetőmagokkal (Roberts, 1974).

2.1.6.2. A kórokozó gazdanövényköre és a kórokozó által okozott tünetek

Az *Erwinia rhapontici* tünetei rendkívül változatosak lehetnek, gyakran gazdanövényenként eltérőek. A kórokozó polifág, több mint 15 gazdanövényen károsít (Huang és mtsai., 2003).

Fertőzött vöröshagymán lágyrothadást figyeltek meg (Ouchi, 1986; Ouchi és mtsai., 1983). Jácinton a hagyma felső harmadán jelentkező sárgásbarnás nekrozisról számoltak be Csehországban (Kokoskova, 1992.) és Angliában (Sellwood és Lelliott, 1978). Paradicsomon lágyrothadást (Shaban és mtsai., 1991) valamint barna foltosságot is észleltek (Volcani, 1955). Izraelben citrusfélék barnásrózsaszínes foltosságát figyelték meg (Volcani, 1955). Snieskiene (1995) Litvániában amarillisz és szegfű virágrothadásáról számolt be. Gyökérnyaki elhalást figyeltek meg rebarbarán Kanadában (Letal, 1976) és Angliában (Metcalf, 1940; Millard, 1924). Hasonló tünetekről számoltak be Olaszországban ciklámenen (Carta, 1993) és Iránban cukorrépán (Hassanzadeh, 1993). Choi és mtsai. (1990) Koreában eperfa hajtás- és szárrothadását figyelték meg, Gvozdyak és mtsai. (1987) pedig gerberán észleltek hasonló tüneteket Oroszországban.

A kórokozó által okozott másik jellegzetes tünet a magvak rózsaszínre színeződése (8. ábra) (Huang és mtsai., 2003). Ez az elváltozás gyakran jelentkezik gabonaféléken, az amerikai kontinensen Kanadában (Letal, 1976) és az Egyesült Államokban (Forster és Bradbury, 1990), az európai országok közül Franciaországban (Luisetti és Rappilly, 1967), Belgiumban (Dutrecq és mtsai., 1990) és az egykori Jugoszlávia területén (Arsenijevic, 1995) számoltak be gabonaszemek fertőződéséről. Borsó, bab, lencse és csicseriborsó magjain is megjelenhet az elszíneződés (Schroeder és mtsai., 2002; Huang és mtsai., 2002; Huang és mtsai., 2003). Az rózsaszínre színeződött gabonaszemek köldökfoltja alatt üregesedés alakul ki, méretük csökken, nem csíráznak megfelelően. A kifejlődött csíranövényeken növekedési zavarok figyelhetők meg (Huang és mtsai., 2003).



8. ábra: *Erwinia rhapontici* által okozott „rózsaszín mag” tünet babon (1,3), borsón (2) és durumbúzán (4) (Huang és mtsai., 2003)

2.2. Baktériumfajok azonosítása, elkülönítése molekuláris módszerekkel

A mikrobiológiai és epidemiológiai vizsgálatokban alapvető fontosságú a kórokozók fajsztípusú azonosítása, elkülönítése a rokon fajoktól. A mikrobiológiában klasszikus módszernek számít az adott faj fenotípusos jellemzőinek (morfológia, anyagcsere, fiziológiai jellemzők) vizsgálata. Ezen módszerek csak viszonylagos pontossággal alkalmazhatóak, az egyértelmű azonosításra legtöbb esetben molekuláris módszerekre van szükség (Hedegaard és mtsai., 1999).

A nukleinsav alapú vizsgálatok (DNS-DNS hibridizáció, RFLP analízis, PCR alapú módszerek) sokkal több információt adnak a vizsgált fajról, mint a fenotípusos jellemzők. A fehérje és/vagy DNS szintű meghatározáshoz molekuláris markereket alkalmaznak (Hedegaard és mtsai., 1999).

2.2.1. A 16S rRNS marker

A baktériumok azonosítása során leggyakrabban használt marker a 16S rRNS (Hedegaard és mtsai., 1999). A molekula jól alkalmazható nemzetségszintű határozásra, illetve fajok azonosítására is (Lawrence és mtsai., 1991; Busse és mtsai., 1996; Cilia és mtsai., 1996). A 16S rRNS molekula a prokarióta riboszóma 30S alegységének alkotóeleme. Rendkívül jól használható molekuláris markerként, hiszen minden baktériumsejtben jelen van, nagy számban fordul elő és eltérő baktérium fajok esetében változó lehet a felépítése (Clark és Pazdernik, 2009).

Alkalmazásával kapcsolatban gyakran felmerül a probléma, miszerint több kópiája is szerepelhet egyazon genomban, a kópiák száma 1 és 15 között változhat (Klappenbach és mtsai., 2001). A kópiák száma bizonyos mértékben taxon-specifikus, de lehetséges az eltérés egy adott faj eltérő törzsei között is (Acinas és mtsai., 2004). Az eddigi tanulmányok alapján megállapítható, hogy a 16S rRNS technika nemzetségszinten több mint 90%-os pontosságú, fajszintű azonosítás esetében ez az arány azonban csak 65-85%. A vizsgálatot követően az izolátumok körülbelül 1-14%-a azonosítatlan marad (Drancourt és mtsai., 2000; Mignard és Flandrois, 2006; Woo és mtsai., 2003).

2.2.3. Háztartási gének

A háztartási gének a sejtek számára nélkülözhetetlen fehérjéket kódolnak (rRNS, riboszómális fehérjék, stb.) és kifejeződésük folyamatos (Clark és Pazdernik, 2009). Egyes háztartási gének rendkívül jól alkalmazhatóak az *Enterobacteriaceae* család tagjainak elkülönítésére. A tapasztalatok azt mutatják, hogy a háztartási gének molekuláris vizsgálatával nagyobb pontossággal végezhetőek a fajszintű azonosítások, mint a 16S rRNS technika alkalmazásával (Dauga, 2002; Hall, 1999; Mollet és mtsai., 1997; Paradis és mtsai., 2005).

Brady és mtsai. (2008) különböző háztartási génekkel végzett multilokus szekvencia analízissel (MLSA) vizsgálták *Pantoea* fajok rokonsági viszonyait. Megállapították, hogy *gyrB*, *rpoB*, *atpD* és *infB* gének jól használhatóak az *Enterobacteriaceae* család tagjainak azonosítására, elkülönítésére és filogenetikai vizsgálatokra (Brady és mtsai., 2008).

Az *infB* gén az IF2 esszenciális fehérjét (transzlációs iniciációs faktor) kódolja, mely a prokarióták fehérje szintézisében vesz részt (Hedegaard és mtsai., 1999). Az *infB* gén szekvenciáját először 1985-ben határozták meg (Sacerdot és mtsai., 1984), a további

vizsgálatok során kiderült, hogy IF2 fehérjét kódoló gén szekvenciája sok baktériumfaj esetében konzervált. Az *infB* gén legnagyobb mértékben konzervált része a fehérje GTP-kötő doménjét kódoló szakasz, de egyben megfelelően variábilis ahhoz, hogy markerként alkalmazzák. A gén konzervált régiójára primerek tervezhetők, ami lehetővé teszi az *Enterobacteriaceae* család rokonsági viszonyainak molekuláris feltérképezését (Hedegaard és mtsai., 1999).

Az *atpD* gén az ATP-szintáz enzim β -alegységét kódolja. Az ATP-szintáz a baktériumok plazmamembránjában helyezkedik el és az ATP-szintézisben játszik szerepet (Nelson és Taiz, 1989). A β -alegység tartalmazza az enzim aktív centrumát és ennek a régiónak a szekvenciája az evolúció során konzerválódott, ami alkalmassá teszi az *atpD* gén-t markerként használni az *Enterobacteriaceae* család tagjainak genetikai vizsgálatánál (Paradis és mtsai., 2005; Brady és mtsai., 2008).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgálat helye és ideje

A kórokozók tenyésztését, megőrzését és a baktériumfajok rokonsági viszonyainak feltérképezését, a molekuláris vizsgálatokat a Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Növénykórtani Tanszékének laboratóriumában végeztük 2012 és 2013-ban.

3.2. A vizsgálat anyaga

3.2.1. Vizsgált izolátumok

A rokonsági vizsgálatokhoz használt hazai izolátumok származásának adatai (1., 2., 3., táblázat). A rokonsági viszonyok feltérképezéséhez használt külföldi izolátumok az NCBI adatbázisból származnak, mely izolátumok tulajdonságait az 1., 2. és 3. melléklet mutatja be.

1. táblázat: a 16S rRNS vizsgálatához felhasznált hazai izolátumok

NCBI kód	Izolátum	Gazdanövény	Származás	Publikálta
feltöltés alatt	<i>Brenneria goodwinii</i>	<i>Ulmus sp.</i>	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria salicis</i>	<i>Salix sp.</i>	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Siófok	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Zamárdi	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Bázakerettye	-
HF936707	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Juglans regia</i>	Zánka	Végh és Palkovics, 2013.
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Juglans regia</i>	Látrány	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Budapest	-
HF546214	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Prunus armeniaca</i>	Pomáz	Végh és Palkovics, 2012.
HE610678	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Prunus domestica</i>	Budaörs	Végh és mtsai., 2012.
HF564622	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Prunus cerasifera</i>	Budapest	Végh és mtsai., 2012.

2. táblázat: Az *atpD* gén vizsgálatához felhasznált hazai izolátumok

NCBI kód	Izolátum	Gazdanövény	Származás	Publikálta
feltöltés alatt	<i>Erwinia rhapontici</i>	<i>Hypericum</i> sp.	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Zamárdi	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Bázakerettye	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Siófok	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria salicis</i>	<i>Salix</i> sp.	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Juglans regia</i>	Látrány	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria goodwinii</i>	<i>Ulmus</i> sp.	Budapest	-

3. táblázat: Az *infB* gén vizsgálatához felhasznált hazai izolátumok

NCBI kód	Izolátum	Gazdanövény	Származás	Publikálta
feltöltés alatt	<i>Erwinia rhapontici</i>	<i>Hypericum</i> sp.	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Siófok	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Zamárdi	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Bázakerettye	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Juglans regia</i>	Látrány	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria salicis</i>	<i>Salix</i> sp.	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria nigrifluens</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	Budapest	-
feltöltés alatt	<i>Brenneria goodwinii</i>	<i>Ulmus</i> sp.	Budapest	-

3.2.2. A kórokozók tenyésztése, fenntartása

Az izolátumokat King-B agar táptalajon (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) tenyésztettük. A kórokozók megőrzését glycerolos tartósítás útján végeztük -18 °C-on Eppendorf csőben és/vagy -70 °C-on fagyasztó csőben. A közeg összetétele: 2,2 g Beaf extract, 24 ml glycerol, 200 ml desztillált víz.

3.2.3. Enzimek

A vizsgálatok során a Fermentas cég enzimeit használtuk.

3.2.4. Primerek

A vizsgálatok során felhasznált különböző primerek adatait a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: A vizsgálatok során felhasznált primerek

Gén	Primer neve	Szekvencia
16S	1389r	5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3'
	63f	5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'
<i>atpD</i>	<i>atpD</i> 01-F	5'-RTAATYGGMGCSGTRGTNGAYGT-3'
	<i>atpD</i> 02-R	5'-TCATCCGCMGGWACRTAWAYNGCCTG-3'
	<i>atpD</i> 03-F	5'-TGCTGGAAGTKCAGCARCAG-3'
	<i>atpD</i> 04-R	5'-CCMAGYARTGCGGATACTTC-3'
<i>infB</i>	<i>infB</i> 01-F	5'-ATYATGGGHCAYGTHGAYCA-3'
	<i>infB</i> 02-R	5'-ACKGAGTARTAACGCAGATCCA-3'
	<i>infB</i> 03-F	5'-ACGGBATGATYACSTTCCTGG-3'
	<i>infB</i> 04-R	5'-AGYTTAGATTTCTGCTGACG-3'

3.3. A vizsgálat módszere

3.3.1. A baktérium szuszpenzió előállítása

A vizsgálatokhoz a baktérium szuszpenziót 1 napos (26 °C) tenyészetből készítettük. A vizsgálatok előtt a spektrofotométer kalibrálása desztillált vízzel történt. A 24 órás, friss, tiszta tenyészetből nyert baktérium szuszpenziót spektrofotométerrel 5×10^7 sejt/ml töménységűre állítottuk be.

3.3.2. A polimeráz láncreakció paraméterei

A PCR elegy összetétele 50 µl végtérfogatra:

35,5 µl steril H₂O

5 µl 10x Taq polimeráz enzim (5 u/µl)

3 µl MgCl₂ (25 mM)

2 µl 5 mM dNTPs

1 µl forward primer (20 pmol/µl)

1 µl reverse primer (20 pmol/µl)

0,5 µl Taq polimeráz enzim (5 u/µl)

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

A reakciók paraméterei:

16S rRNS gén:

1. 94 °C 3 perc (elődenaturálás),
2. 94 °C 15 másodperc (denaturálás),
3. 55 °C 30 másodperc (primer kötődés),
4. 72 °C 90 másodperc (láncszabbitsítás),
5. 72 °C 10 perc (láncszabbitsítás).

A 2., 3. és a 4. lépés 35 cikluson keresztül ismétlődik.

atpD gén:

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
2. 94 °C 35 másodperc (denaturálás),
3. 56 °C 30 másodperc (primer kötődés),
4. 72 °C 90 másodperc (láncszabbitsítás),
5. 72 °C 10 perc (láncszabbitsítás).

A 2., 3. és a 4. lépés 35 cikluson keresztül ismétlődik.

infB gén:

1. 94 °C 3 perc (elődenaturálás),
2. 94 °C 1 perc (denaturálás),
3. 45 °C 1 perc (primer kötődés),
4. 72 °C 90 másodperc (láncszabbitsítás),
a 2., 3. és 4. lépés 3 cikluson keresztül ismétlődik, majd
5. 94 °C 15 másodperc (denaturálás)
6. 50 °C 30 másodperc (primer kötődés)
7. 72 °C 90 másodperc (láncszabbitsítás)
az 5., 6. és 7. lépés 35 cikluson keresztül ismétlődik.
8. 72 °C 10 perc (láncszabbitsítás).

A 2., 3. és a 4. lépés 35 cikluson keresztül ismétlődik.

infB gén és atpD gén belső szakasza:

1. 94 °C 5 perc (elődenaturálás),
2. 94 °C 30 másodperc (denaturálás),
3. 54 °C 30 másodperc (primer kötődés),
4. 72 °C 55 másodperc (láncszabbitsítás),

5. 72 °C 10 perc (láncosszabbítás).

A 2., 3. és a 4. lépés 35 cikluson keresztül ismétlődik.

3.3.3. Gélelektroforézis

A PCR termék elválasztása GelRed-del (Biotium) festett 1%-os agaróz gélben történt, vízszintes mini elektroforézis készülék segítségével, 140 V-tal, TBE pufferben (1x TBE (12,11 g Tris; 5,135 g bórsav; 0,372 g EDTA 1000 ml végtérfogaton desztillált vízzel). A nukleinsav frakciók értékelését és fényképezését áteső ultraibolya fényben végeztük (UVP, BioDoc- ItTM System).

3.3.4. A PCR termék tisztítása

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

3.3.5. A PCR-termékek klónozása

A tisztított PCR-terméket ampicillin rezisztencia gént tartalmazó pGEM-T Easy vektorba kapcsoltuk. A ligálás (az inzert és a plazmid összekapcsolása) négy órán át, szobahőmérsékleten (20-24 °C) történt.

A 10 µl végtérfogatú reakcióelegy:

tisztított PCR-termék	3 µl
pGEM-T Easy Vektor (25 ng/µl)	1 µl
2x ligáz puffert (60 mM Tris-HCl (pH: 7,8); 5 µl 20 mM MgCl ₂)	
2,5 u T4 DNS ligáz (2,5 u/ µl)	1 µl

A ligálást követően a rekombináns plazmidot *E. coli* DH5α kompetens sejtekbe juttattuk. A 10 µl ligátumot 50 µl, 10 percig jégen kiolvasztott kompetens baktérium sejtszuszpenzióval elegyítettük, majd 20 percen keresztül jégen tartottuk. Ezután 1 percen keresztül 42 °C-os termosztátban inkubáltuk, majd 2 percig jégre helyeztük, utána 300 µl antibiotikum-mentes, folyékony LB táptalaj (10 g/l tripton; 5 g/l élesztőkivonat; 10 g/l NaCl; pH: 7.2) hozzáadását követően 1 órán keresztül rázattuk, 37 °C-on, 200 rpm fordulatszámmal. Ezt követően 100 µl-nyi szuszpenziót ampicillin tartalmú szilárd LB/IPTG+X-Gal táptalajon szélesztettünk (10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat; 10 g/l NaCl; 10 g/l agar; 50 µg/ml

ampicillin; szélesztés előtt a lemez felszínén 10 µl (100 mM/ml) IPTG-t és 40 µl (20 mg/ml) X-Gal-t oszlattunk szét).

A kész lemezeket egy éjszakán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk. A táptalajon csak azok a baktérium sejtek tudtak felszaporodni, melyek ampicillin rezisztencia gént hordoztak. A ligálás sikerességét kék-fehér szelekcióval ellenőriztük. Azok a baktérium kolóniák, melyekben az inzert beépülése megtörtént és így a plazmidban lévő enzim működésképtelenné vált, fehér színűek lettek, míg azok, amelyekben az inzert nem épült be a plazmidba, kék színűek voltak. Ezek után steril fogpiszkáló segítségével, minden lemezről 4-6 db fehér színű telepet oltottunk le. A fogpiszkálóval egy kolóniát leemeltünk, amit egy masterplate-hez érintettünk, majd 2 ml 50 µl/ml ampicillin tartalmú, folyékony LB táptalajt tartalmazó üvegcsőbe tettünk. A lezárt üvegcsövet egy éjszakán át, 37 °C-on ráztattuk, 200 rpm fordulatszámmal.

3.3.6. Kolónia-PCR

Az inzert beépülésének sikerességét kolónia PCR-rel ellenőriztük. A kolónia PCR során ugyanazokat a paramétereket alkalmaztuk, amit a 3.3.2. fejezetben ismertettük. A PCR termékek elválasztása, ill. láthatóvá tétele a 3.3.3. fejezetben leírtak szerint történt.

3.3.7. Klónok tisztítása szekvenálásra

A kiválasztott klónokat a masterplate-ről, 3x2 ml 50 µl/ml ampicillin tartalmú, folyékony LB táptalajt tartalmazó üvegcsőbe tettük. A lezárt üvegcsövet egy éjszakán át, 37 °C-on, 200 rpm fordulatszámmal ráztattuk. A plazmidot Quantum Prep Plasmid Miniprep Kittel a gyártó utasításainak megfelelően izoláltuk. A tisztított plazmidok koncentrációját NanoDrop 2000c spektrofotométerrel mértük.

3.3.5. A nukleinsav szekvencia meghatározása

A PCR termékeket, ill. a tisztított klónokat, a BAY-GEN Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetbe küldtük szekvencia meghatározásra, Szegedre.

3.3.6. A szekvencia analízishez felhasznált program

A szekvenciák összeillesztéséhez és elemzéséhez a CLC DNA Workbench 6.6 (CLC Bio, Cambridge, MA; Knudsen és mtsai.) software csomagot használtuk.

4. EREDMÉNYEK

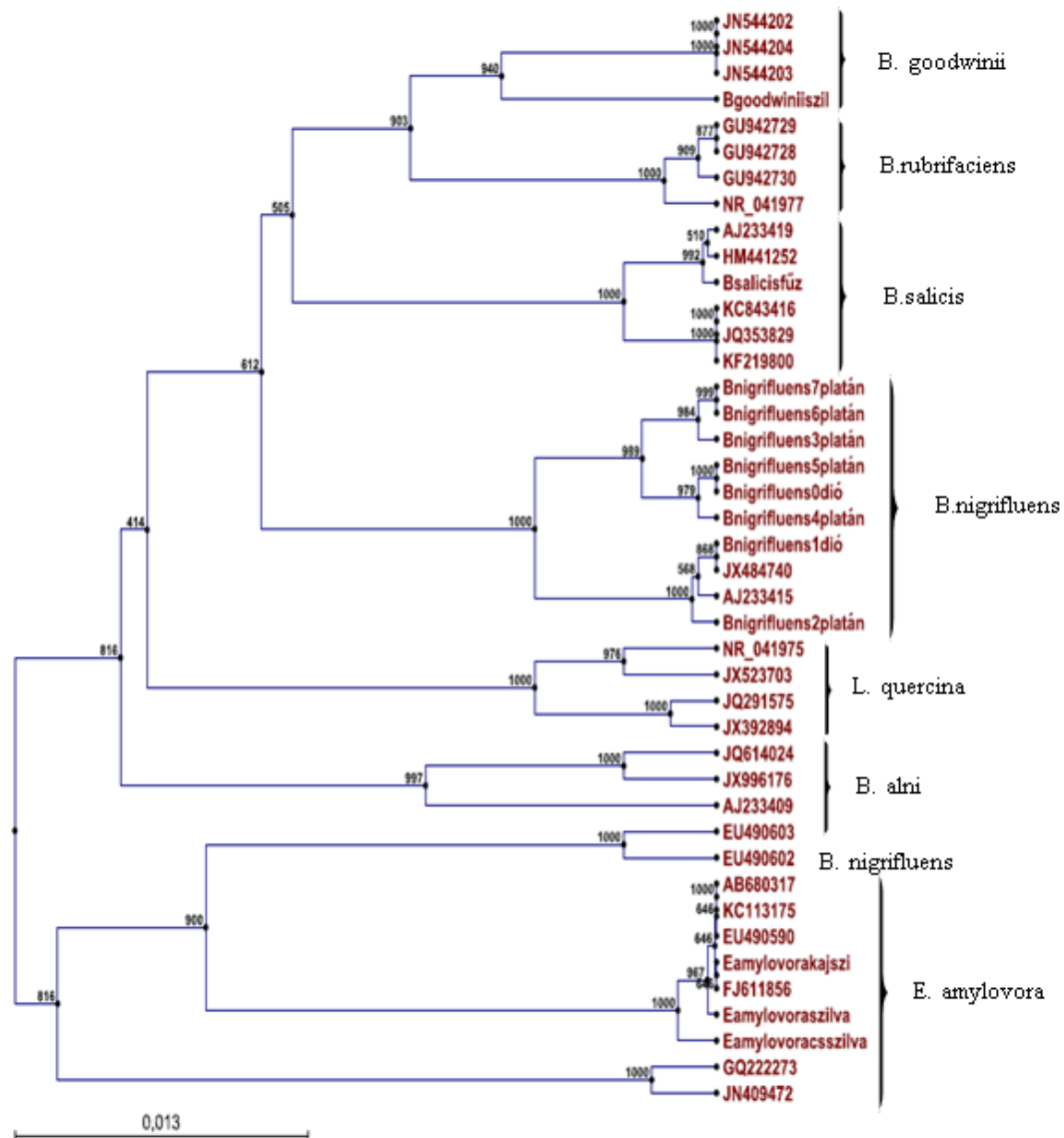
4.1. A 16S rRNS gén filogenetikai vizsgálata

Vizsgálatunk során 13 izolátum 16S rRNS génjének szekvenciáját határoztuk meg: *Erwinia amylovora* (1 izolátum cseresznyeszilváról, 1 izolátum szilváról, 1 izolátum kajsziról), *Brenneria nigrifluens* (2 izolátum dióról), *Brenneria nigrifluens* (6 izolátum platánról), *Brenneria goodwinii* (1 izolátum szilvról), *Brenneria salicis* (1 izolátum fűzfáról), valamint a nemzetközi adatbázisban megtalálható, további 29 izolátum szekvenciájával egészítettük ki vizsgálatainkat. A 16S rRNS gén alapján elkészült filogenetikai törzsfához összesen 42 izolátum szekvenciáját használtuk fel (9. ábra).

A filogenetikai törzsfán két nagy ág különíthető el, az egyik csoportot az *Erwinia amylovora* izolátumok, valamint egy amerikai *Brenneria nigrifluens* izolátum (EU490602) és egy olaszországi *Brenneria alni* (EU490603) izolátum alkotja. A további három olasz *Brenneria alni* izolátum (JQ614024, JX996176, AJ233409) a *Brenneria* nemzetség fajai között foglalnak helyet. Az *E. amylovora* izolátumok (*E. amylovora*-kajszi; *E. amylovora*-szilva, *E. amylovora*-cseresznyeszilva) egymással és a nemzetközi adatbázisból származó izolátumokkal 99%-os homológiát mutatnak. A kajsziról és szilváról származó izolátum egymással közeli rokonságot mutat, míg a cseresznyeszilváról származó izolátum elkülönülten helyezkedik el a filogenetikai törzsfán.

A másik nagy csoportba a következő fajok izolátumai tartoznak: *Brenneria goodwinii*, *Brenneria rubrifaciens*, *Brenneria salicis*, *B. nigrifluens*, *Lonsdalea quercina*, *B. alni*. A *B. salicis* izolátumok két csoportra oszthatók: az egyik csoportba a fűzfáról (*Salix* sp.) származó (LJ223419, HM441252), míg a másik csoportba a *Populus euphratica* fajról származó izolátumok (KC843416, JQ353829, KF219800) találhatók. A magyar izolátum az első csoportban helyezkedik el, és 100% homológiát mutat a *B. salicis* referencia törzsszel (AJ233419).

A *B. goodwinii* izolátumok esetében a kocsányos tölgyről (*Quercus robur*) származó, angliai izolátumok (JN544202, JN544203, JN544204) közeli rokonságot mutatnak, míg a magyarországi izolátum a *B. goodwinii* csoporton belül egy külön ágon helyezkedik el. A magyar izolátum 98 %-os homológiát mutat a koreai *B. rubrifaciens* izolátumokkal (GU942728, GU942729, GU942730).



9. ábra: *Erwinia* és *Brenneria* fajok filogenetikai törzsfája a 16S rRNS gén alapján. A filogenetikai törzsfá UPGMA módszerrel készült.

Magyarázat: A vízszintes vonalak az izolátumok egymástól való genetikai távolságát mutatják, a függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményeit mutatják, 1000 mintavétel esetén, mely filogenetikai fa megbízhatóságát mutatja. A törzsfá alatti skála 13 bázisváltozást mutat 1000 bázisonként.

A *B. nigrifluens* izolátumok két csoportot alkotnak. A platánról származó öt izolátum (*B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7), illetve egy dióról származó izolátum (*B. nigrifluens* 0) helyezkedik el az első csoportban. A második csoportban a következő izolátumok vannak: egy dióról (*B. nigrifluens* 1), egy platánról származó (*B. nigrifluens* 2) hazai izolátum, valamint a *B. nigrifluens* referencia izolátum (AJ233415), illetve egy szerb izolátum (JX484740). A magyar izolátumok közül a *B. nigrifluens* 0 izolátum 99%-os homológiát, míg

a *B. nigrifluens* 1 izolátum 100%-os homológiát mutat a *B. nigrifluens* referencia izolátummal (AJ233445). A magyar, platánról származó izolátumok közül a *B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7 a *B. nigrifluens* referencia izolátummal 99%-os, míg a *B. nigrifluens* 0, dióról származó izolátummal 100%-os hasonlóságot mutat. A platánról származó *B. nigrifluens* 2 viszont a *B. nigrifluens* referencia izolátummal közelebbi rokonságot mutat, mint a többi platánról származó hazai minta. Érdekes helyet foglalnak el az EU490603 *B. alni* és az EU490602 *B. nigrifluens* izolátumok, melyek inkább az *E. amylovora* izolátumokkal mutatnak közelebbi rokonságot.

4.2. Háztartási gének filogenetikai vizsgálata

4.2.1. Az *atpD* háztartási gén filogenetikai vizsgálata

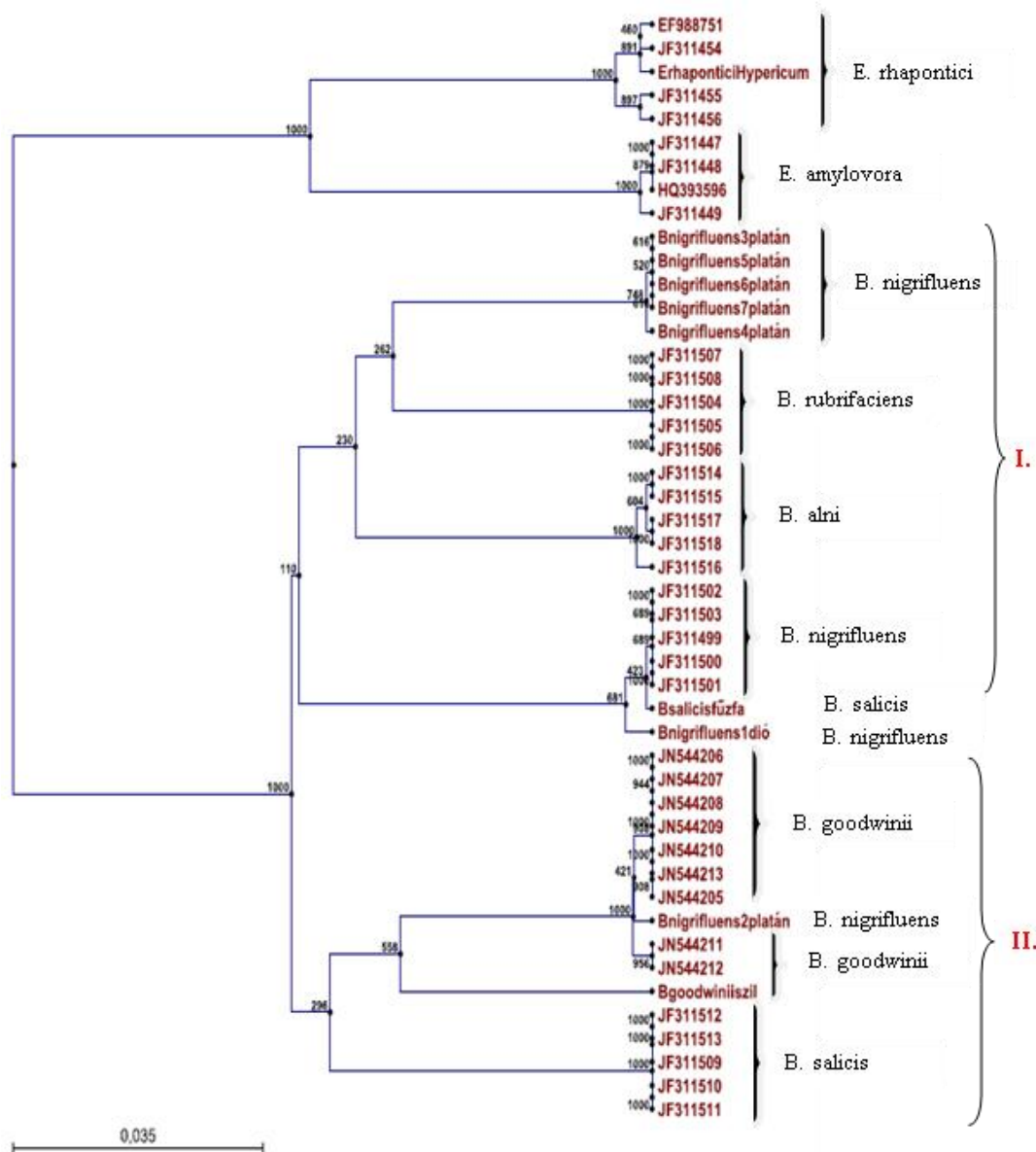
Az *atpD* gén molekuláris vizsgálatához 12 saját izolátum, ill. a nemzetközi adatbázisból származó, további 37 izolátum szekvenciáját használtuk fel. Az *atpD* gén alapján készült filogenetikai törzsfát az 10. ábra mutatja.

A filogenetikai törzsfát két ágra bontható. Az egyik ágon az *Erwinia*, a másik ágon pedig a *Brenneria* nemzetség tagjai foglalnak helyet. Az *Erwinia* nemzetségen belül még két kisebb csoport található: az egyik csoportban az *E. rhapontici* izolátumok találhatóak, míg a másik ágon az *E. amylovora* izolátumok. A magyar *E. rhapontici* izolátum 99%-os homológiát mutat az *E. rhapontici* referencia izolátummal (EF988751).

A *Brenneria* nemzetség két nagy csoportra osztható. Az I. csoportban a *B. rubrifaciens*, *B. alni*, *B. nigrifluens*; míg a II. csoportban a *B. goodwinii*, *B. salicis* izolátumok találhatóak. A *B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7, platánról származó izolátumok a *B. rubrifaciens* izolátumokkal (JF311504, JF311505, JF311506, JF311507, JF311508) mutatják a legnagyobb homológiát (93%). A *B. nigrifluens* 1 izolátum 99%-os homológiát mutat más *B. nigrifluens* izolátumokkal (JF311499, JF311500, JF311501, JF311502, JF311503).

A magyar *B. salicis* izolátum nem a nemzetközi adatbázisból származó *B. salicis* izolátumok (JF311509, JF311510, JF311511, JF311512, JF311513) között foglal helyet, hanem a legközelebbi rokonságot a *B. nigrifluens* izolátumokkal (JF311499, JF311500, JF311501, JF311502, JF311503) mutatja. A *B. nigrifluens* 2, platánról származó izolátum a *Brenneria* II. csoportban található, így teljesen elkülönül a korábban említett magyar platánról származó izolátumoktól, melyek a *Brenneria* I. csoportban helyezkednek el.

A magyar *B. goodwinii* izolátum 93%-os homológiát mutat a *B. goodwinii* izolátumokkal (JN544205, JN544206, JN544207, JN544208, JN544209, JN544210, JN544211 JN544213), a filogenetikai törzsfán elkülönülten helyezkedik el azoktól. Az adatbázisból származó *B. goodwinii* izolátumok nagyobb hasonlóságot mutatnak a magyar *B. nigrifluens* 2 platánról származó izolátummal, mint a magyar *B. goodwinii* izolátummal.



10. ábra: *Erwinia* és *Brenneria* fajok filogenetikai törzsfája az *atpD* gén alapján. A filogenetikai törzsfa UPGMA módszerrel készült.

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 35 bázisváltozást mutat 1000 bázisonként.

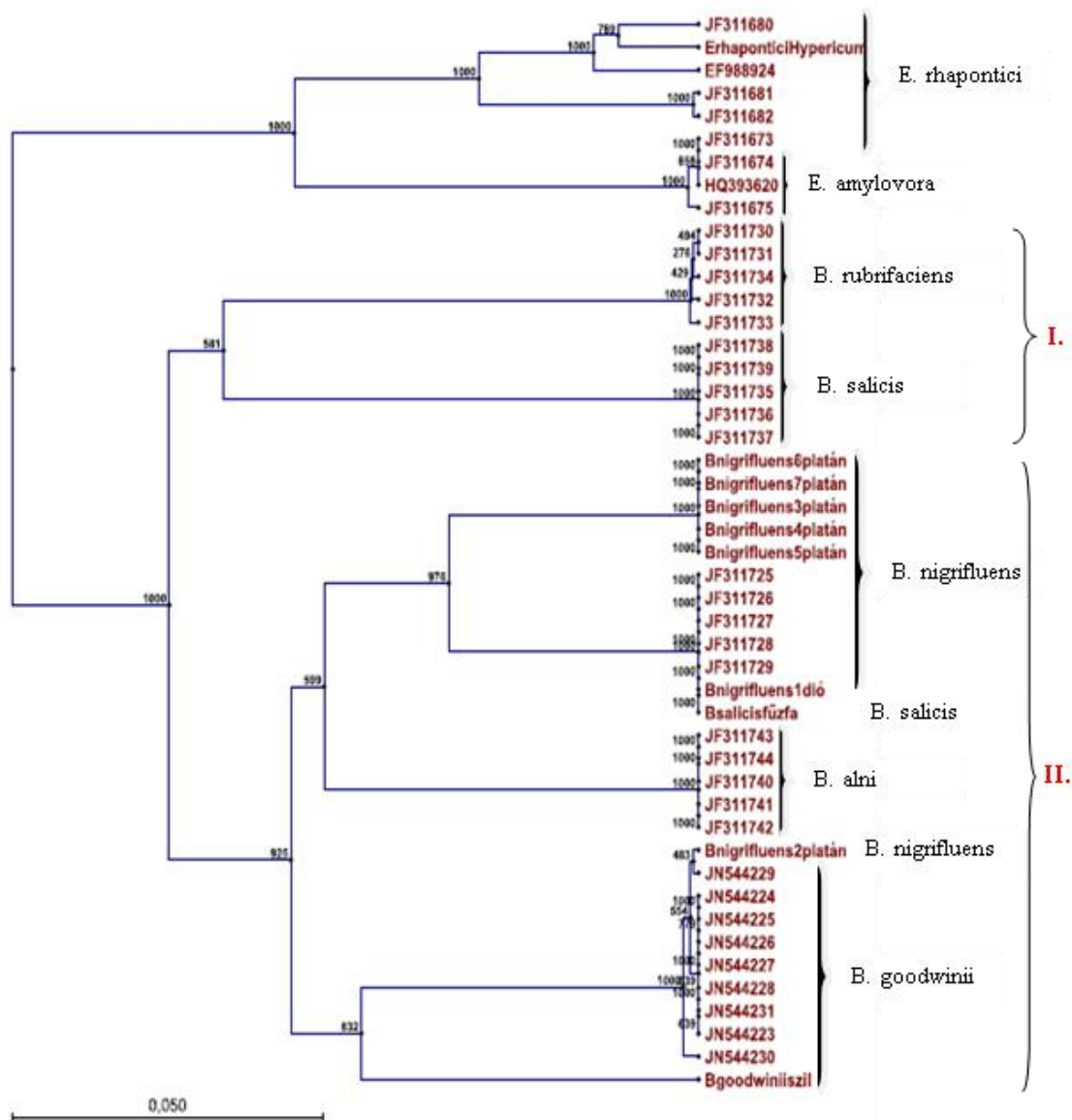
4.2.2. Az *infB* háztartási gén filogenetikai vizsgálata

Az *infB* gén molekuláris vizsgálatához szintén 10 saját izolátum, ill. a nemzetközi adatbázisból 37 izolátum szekvenciáját használtuk fel. Az *infB* gén alapján készült filogenetikai törzsfát az 11. ábra mutatja. A filogenetikai törzsfán az *infB* gén esetében is - az *atpD* gén alapján készült filogenetikai törzsfához hasonlóan - 2 ágat tudunk elkülöníteni: az egyik ág az *Erwinia* nemzetség tagjait, a másik ág a *Brenneria* nemzetség tagjait foglalja magában. Az *Erwinia* csoporton belül még két kisebb csoport található. Az egyik ágon az *E. rhapontici* izolátumok találhatóak, míg a másik ágon az *E. amylovora* izolátumok. A magyar *E. rhapontici* izolátum 99%-os homológiát mutat az *E. rhapontici* referencia izolátummal (EF988924).

A *Brenneria* ágon belül 2 külön csoport látható, hasonlóan az *atpD* gén alapján készült filogenetikai törzsfa esetében. Az I. csoportban a *B. rubrifaciens*, *B. salicis* fajok találhatóak, a II. csoportban pedig a *B. nigrifluens*, *B. alni*, és *B. goodwinii*. A magyar izolátumok csak a II. csoportban foglalnak helyet.

A platánról származó *B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7 izolátumok 92%-os homológiát mutatnak a *B. nigrifluens* izolátumokkal (JF311725, JF311726, JF311727, JF311728, JF311729), 90%-os hasonlóságot pedig a *B. alni* izolátumokkal (JF311740, JF311741, JF311742, JF311743, JF311744). A platánról származó *B. nigrifluens* 2 izolátum a többi platánról származó izolátumtól (*B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7) teljesen elkülönülten helyezkedik el a filogenetikai törzsfán és 99%-os homológiát mutat a *B. goodwinii* izolátumokkal. A *B. nigrifluens* 1, dióról származó izolátum 100%-os hasonlóságot mutat a *B. nigrifluens* izolátumokkal (JF311725, JF311726, JF311727, JF311728, JF311729) és a törzsfa alapján a legnagyobb homológiát a magyar *B. salicis* izolátummal mutatja.

A magyar *B. salicis* izolátum ebben az esetben is - hasonlóan az *atpD* gén alapján készült filogenetikai törzsfa esetében - teljesen elkülönülten helyezkedik el a *B. salicis* izolátumoktól (JF311735, JF311736, JF311737, JF311738, JF311739). A magyar izolátum 100%-os homológiát mutat a *B. nigrifluens* izolátumokkal (JF311725, JF311726, JF311727, JF311728, JF311729). A magyar *B. goodwinii* izolátum 90%-os homológiát mutat a *B. goodwinii* izolátumokkal (JN544205, JN544206, JN544207, JN544208, JN544209, JN544210, JN544211, JN544212, JN544213), a filogenetikai törzsfán elkülönülten helyezkedik el ezektől az izolátumoktól.



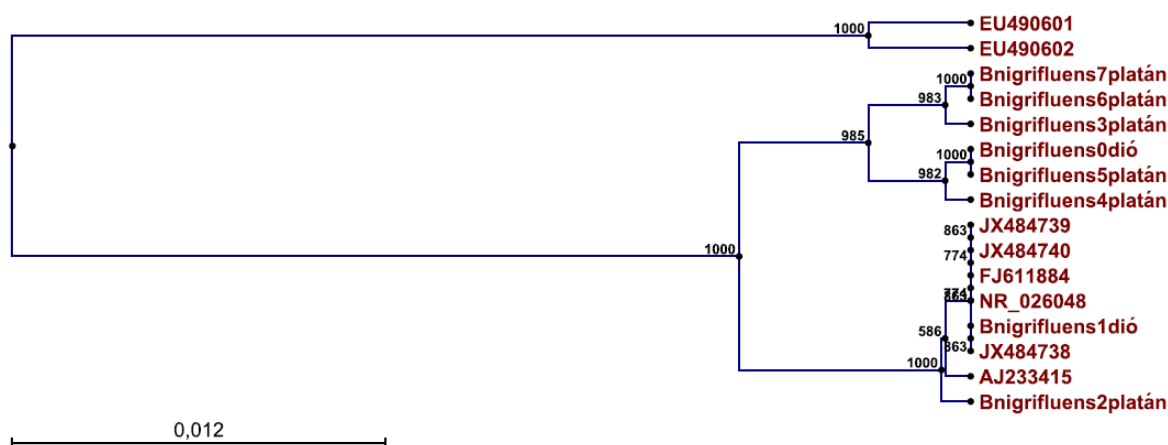
11. ábra: *Erwinia* és *Brenneria* fajok filogenetikai törzsfája az *infB* gén alapján. A filogenetikai törzsfá UPGMA módszerrel készült.

Magyarázat: A vízszintes vonalak az izolátumok egymástól való genetikai távolságát mutatják, a függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményeit mutatják, 1000 mintavétel esetén, mely filogenetikai fa megbízhatóságát mutatja. A törzsfá alatti skála 50 bázisváltozást mutat 1000 bázisonként.

4.3. A *Brenneria nigrifluens* izolátumok vizsgálata

4.3.1. A *Brenneria nigrifluens* izolátumok 16S rRNS génjének filogenetikai vizsgálata

A korábbi vizsgálatok alapján a különböző *Brenneria nigrifluens* izolátumok rokonsági viszonyait érdemes külön is megvizsgálni. Az NCBI-ban található összes izolátum, valamint a hazai, saját izolátumok szekvenciáit is felhasználtuk a vizsgálathoz (12. ábra).



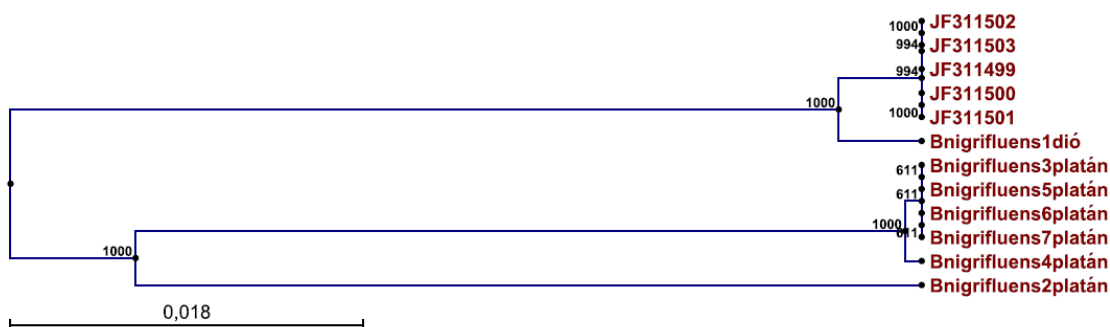
12. ábra: *Brenneria nigrifluens* izolátumok filogenetikai törzsfája a 16S rRNS gén szekvenciája alapján. A filogenetikai törzsfá UPGMA módszerrel készült.

Magyarázat: A vízszintes vonalak az izolátumok egymástól való genetikai távolságát mutatják, a függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményeit mutatják, 1000 mintavétel esetén, mely filogenetikai fa megbízhatóságát mutatja. A törzsfá alatti skála 12 bázisváltozást mutat 1000 bázisonként.

A filogenetikai törzsfá 2 külön ágra osztható, az első ágon mindösszesen 2 amerikai izolátum foglal helyet (EU490601, EU490602). A második ágon az összes többi izolátum található. A második ágon elhelyezkedő izolátumokat további két csoportra oszthatjuk: az I. csoportban a magyar izolátumok zöme található (*B. nigrifluens* 0, 3, 4, 5, 6, 7), melyek 2 kisebb csoportba oszlanak (a *B. nigrifluens* 3, 6 és 7, valamint a *B. nigrifluens* 0, 4 és 5 alkotnak egy csoportot). A II. csoportban a *B. nigrifluens* 2, platánról származó izolátum és az AJ233415 izolátumok elkülönülnek a csoportban található többi izolátumtól, így a *B. nigrifluens* 1, dióról származó izolátumtól, valamint az összes többi NCBI-ban megtalálható izolátumtól: JX484738, JX484739, JX484740, FJ611884, NR_026048, AJ233415.

4.3.2. A *Brenneria nigrifluens* izolátumok *atpD* génjének filogenetikai vizsgálata

Az *atpD* gén alapján készült filogenetikai törzsfa (13. ábra) esetében két külön ág látható, az I. ágon a törzsbaktériumok (JF311499, JF311500, JF311501, JF311502, JF311503), valamint a magyar *B. nigrifluens* 1, dióról származó izolátum található, mely más izolátumoktól elkülönülten helyezkedik el. A *B. nigrifluens* 1 izolátum 99%-os homológiát mutat a *B. nigrifluens* izolátumaival (JF311499, JF311500, JF311501, JF311502, JF311503). A II. ágon egy nagyobb csoport és egy kisebb csoport található. A kisebb csoportban csak a magyar *B. nigrifluens* 2, platánról származó minta helyezkedik el, míg a nagyobb csoportban az összes többi platánról származó magyar izolátum (*B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7). Ezek az izolátumok 93%-os hasonlóságot mutatnak a *B. rubrifaciens* izolátumokkal (JF311504, JF311505). A *B. nigrifluens* 4 izolátum elkülönülten helyezkedik el ezen a csoporton belül. A *B. nigrifluens* 2, platánról származó izolátum 99%-os homológiát mutat a *B. goodwinii* izolátumokkal (JN544205, JN544206, JN544211, JN544212), a *B. salicis* izolátumokkal (JF311510, JF311509) pedig 91%-os a hasonlóság.



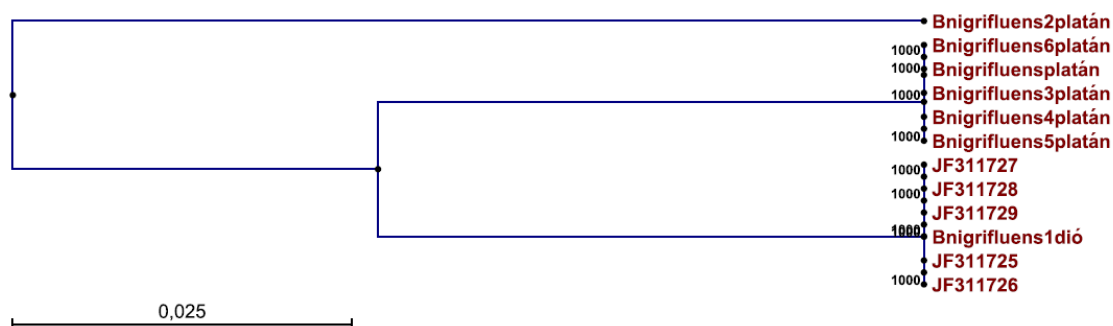
13. ábra: *Brenneria nigrifluens* izolátumok filogenetikai törzsfája az *atpD* gén alapján. A filogenetikai törzsfa UPGMA módszerrel készült.

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 18 bázisváltozást mutat 1000 bázisonként.

4.3.3. A *Brenneria nigrifluens* izolátumok *infB* génjének filogenetikai vizsgálata

Elvégeztük az *infB* gén filogenetikai vizsgálatát csak a *Brenneria nigrifluens* izolátumok esetében is. Az eredményeket az 14. ábra mutatja. A *B. nigrifluens* 2, platánról származó izolátum teljesen elkülönülten helyezkedik el. A többi platánról származó izolátum

(*B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7) nagy hasonlóságot mutat. A II. ágon belül kialakult 2 csoport esetében hasonló a helyzet, mint az *atpD* gén alapján készült filogenetikai törzsfá esetében. Az egyik csoportot a JF311499, JF311500, JF311501, JF311502, JF311503 izolátumok, ill. a magyar *B. nigrifluens* 1, dióról származó izolátum alkotja, míg a másik csoportot a magyar *B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7, platánról származó izolátumok. A *B. nigrifluens* 4 izolátum ebben az esetben nem különül el a többi platánról származó izolátumtól. A *B. nigrifluens* 1 izolátum 100%-os homológiát mutat a *B. nigrifluens* izolátumokkal (JF311725, JF311726, JF311727, JF311728, JF311729). A *B. nigrifluens* 2, platánról származó izolátum ebben az esetben is a *B. goodwinii* izolátumokkal (JN544223, JN544224, JN544229, JN544230) mutat 99%-os hasonlóságot. A *B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7 izolátum csak 92%-os homológiát mutat a *B. nigrifluens* izolátumokkal (JF311725, JF311726, JF311727, JF311728, JF311729).



14. ábra: *Brenneria nigrifluens* izolátumok filogenetikai törzsfája az *infB* gén alapján. A filogenetikai törzsfá UPGMA módszerrel készült.

Magyarázat: A vízszintes vonalak az izolátumok egymástól való genetikai távolságát mutatják, a függőleges vonalak az izolátumok egyezőségét jelzik az elágazásokig. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap-analízis eredményeit mutatják, 1000 mintavétel esetén, mely filogenetikai fa megbízhatóságát mutatja. A törzsfá alatti skála 25 bázisváltozást mutat 1000 bázisonként.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. 16S rRNS gén filogenetikai vizsgálata

A baktériumok esetében a 16S rRNS gén vizsgálata nemzetség-, ill. fajszintű meghatározáshoz általánosan használt (Lawrence és mtsai., 1991). Munkánk során 13 hazai izolátum szekvenciáját határoztuk meg és hasonlítottuk össze a nemzetközi adatbázisban található további 29 izolátum szekvenciájával. A 16S rRNS alapján készült filogenetikai törzsfá vizsgálata során megállapítottuk, hogy az *Erwinia* nemzetség fajai külön ágon helyezkednek el a *Brenneria* nemzetség fajaitól. Meglepő módon az *Erwinia amylovora* ágon 2 *Brenneria* izolátum is elhelyezkedik: egy amerikai *B. nigrifluens* (EU490602), ill. egy olasz *B. alni* (EU490603). A 2 faj rokonsági viszonyai, ill. elhelyezkedése a törzsfán alátámasztják azt, hogy a 16S rRNS fajszintű azonosításra kevésbé alkalmas a baktériumok esetében, mint a háztartási géneken alapuló molekuláris vizsgálatok.

A *Brenneria* fajokat tartalmazó ágon a következő fajok találhatóak: *B. goodwinii*, *B. rubrifaciens*, *B. salicis*, *B. nigrifluens*, *B. alni*, *Lonsdalea quercina*. A *B. salicis* izolátumok két csoportot alkotnak, az egyik csoportban a *Populus euphratica* növényfajról származó (KC843416, JQ353829, KF219800), a másik csoportban a *Salix* nemzetség növényfajairól származó izolátumok (LJ223419, HM441252) találhatóak. A magyar *B. salicis* izolátum az utóbbi csoportban foglal helyet és 100%-os homológiát mutat a *B. salicis* referencia izolátummal (AJ233419).

A *B. goodwinii* izolátumok esetében szintén 2 csoport figyelhető meg. Az adatbázisból származó izolátumok (JN544202, JN544203, JN544204) alkotnak egy csoportot, míg a másik csoportban csak a magyar *B. goodwinii* izolátum foglal helyet. A magyar izolátum 98%-os homológiát mutat a koreai *B. rubrifaciens* izolátumokkal (GU942728, GU942729, GU942730), ami magyarázatot ad arra, hogy miért különül el a *B. goodwinii* izolátumoktól.

5.2. Háztartási gének vizsgálata

Korábbi vizsgálatok azt mutatják, hogy a háztartási gének molekuláris vizsgálatával a fajszintű azonosítások nagyobb pontossággal végezhetőek, mint a 16S rRNS gén vizsgálatának alkalmazásával (Mollet és mtsai., 1997). Vizsgálataink során az *infB* és az *atpD* gének molekuláris vizsgálatát végeztük el. Így például a magyar *Brenneria salicis* izolátum a 16S rRNS gén alapján a *B. salicis* izolátumok közé tartozik, és 100%-os homológiát mutat a

B. salicis referencia izolátummal (AJ233445). A háztartási gének molekuláris vizsgálata alapján azonban a magyar izolátum nem a *B. salicis* izolátumokkal mutatta a legnagyobb homológiát, hanem a *B. nigrifluens* izolátumokkal. Hasonlóan a platánról származó *B. nigrifluens* 2 izolátum 16S rRNS gén alapján a *B. nigrifluens* izolátumok közé tartozik, míg a vizsgált másik két gén esetén, pedig a *B. goodwinii* izolátumokkal mutatta a legnagyobb homológiát.

5.2.1. Az *atpD* gén filogenetikai vizsgálata

Az *atpD* gén vizsgálatakor 12 saját izolátum, valamint további 37, a nemzetközi adatbázisból származó izolátum szekvenciáját használtuk fel. A filogenetikai törzsfá alapján elmondható, hogy az *Erwinia* nemzetség és a *Brenneria* nemzetség tagjai külön ágon helyezkednek el.

A *Brenneria* nemzetség további két csoportra osztható: az I. csoportban a *B. rubrifaciens*, *B. alni*, *B. nigrifluens*; míg a II. csoportban a *B. goodwinii* és *B. salicis* izolátumok találhatók. A *B. salicis* izolátum nem a *B. salicis* izolátumokkal (JF311509, JF311510, JF311511, JF311512, JF311513) egy ágon helyezkedik el, hanem a *B. nigrifluens* törzsbaktériumokkal (JF311499, JF311500, JF311501, JF311502, JF311503) mutatja a legközelebbi rokonságot.

A *B. goodwinii* izolátum csupán 93%-os homológiát mutat az adatbázisban szereplő egyéb *B. goodwinii* izolátumokkal (JN544205, JN544206, JN544207, JN544208, JN544209, JN544210, JN544211, JN544213). A homológia mértéke magyarázatot ad arra, hogy miért helyezkedik el elkülönülten a magyar izolátum a *B. goodwinii* izolátumok között. Az adatbázisból származó *B. goodwinii* izolátumok nagyobb hasonlóságot mutatnak a magyar *B. nigrifluens* 2, platánról származó mintával, mint a magyar *B. goodwinii* izolátummal.

5.2.2. Az *infB* gén filogenetikai vizsgálata

Az *infB* gén vizsgálatakor 12 saját izolátum ill. 37 a nemzetközi adatbázisból származó izolátum szekvenciáját használtuk fel. Az *infB* gén alapján készült filogenetikai törzsfá alapján megállapítható, hogy az *Erwinia* illetve *Brenneria* nemzetség tagjai elkülönülnek egymástól. A *Brenneria* nemzetségen belül szintén 2 csoport különül el, de az *atpD* gén esetében leírt csoporttól eltér, annak tekintetében, hogy mely fajok helyezkednek el az egyes csoportokban. Az I. csoportban a *B. rubrifaciens*, *B. salicis*; a II. csoportban a *B.*

nigrifluens, *B. alni* és a *B. goodwinii* fajok találhatók. A magyar izolátumok a II. csoportban foglalnak helyet.

A *B. salicis* izolátum ebben az esetben sem a *B. salicis* izolátumok (JF311735, JF311736, JF311737, JF311738, JF311739) között foglal helyet, hanem a *B. nigrifluens* izolátumokkal (JF311725, JF311726, JF311727, JF311728, JF311729) mutatja a legnagyobb hasonlóságot (100%). A homológia mértéke megmagyarázza az izolátum törzsfán való elhelyezkedését.

A magyar *B. goodwinii* izolátum (JN544205, JN544206, JN544207, JN544208, JN544209, JN544210, JN544211, JN544212, JN544213) csupán 90%-os homológiát mutat a *B. goodwinii* izolátumokkal, így elkülönülve helyezkedik el azoktól a filogenetikai törzsfán.

5.3. A *Brenneria nigrifluens* izolátumok molekuláris vizsgálata

A *Brenneria nigrifluens* izolátumokat külön is megvizsgáltuk, mivel a korábbi törzsfák nem adtak egyértelmű tájékoztatást a rokonsági viszonyokról. A 16S rRNS gén szekvenciája alapján készült filogenetikai törzsfa alapján megállapítottuk, hogy 2 izolátum (EU490601, EU490602) a *B. nigrifluens* izolátumoktól teljesen elkülönülten helyezkedik. A magyar izolátumok közül a *B. nigrifluens* 1, dióról származó illetve a *B. nigrifluens* 2, platánról származó izolátum az adatbázisból származó izolátumok (JX484738, JX484739, JX484740, FJ611884, NR_026048, AJ233415) között foglal helyet, azonban a *B. nigrifluens* 2 izolátum, mely platánról származik, a csoporton belül is elkülönülten található meg. A többi magyar, platánról származó izolátum különálló csoportot alkot (*B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7).

Az *atpD* gén esetében megállapítható, hogy a *B. nigrifluens* 1 izolátum, mely dióról származik az adatbázisból származó izolátumok (JF311499, JF311500, JF311501, JF311502, JF311503) között foglal helyet, akárcsak a 16S rRNS gén esetében. A *B. nigrifluens* 2 izolátum ebben az esetben elkülönülten helyezkedik el a többi, platánról származó izolátumtól. A többi izolátum a *B. nigrifluens* 4 kivételével közeli rokonságot mutat egymással (*B. nigrifluens* 3, 5, 6, 7).

Az *infB* gén alapján készült filogenetikai törzsfa alapján szintén megállapíthatjuk, hogy a magyar *B. nigrifluens* 1, dióról származó minta az adatbázisból származó izolátumok (JF311725, JF311726, JF311727, JF311728, JF311729) között foglal helyet. A 3 gén (16S rRNS, *atpD*, *infB*) molekuláris vizsgálata alapján elmondhatjuk, hogy a magyar *B. nigrifluens* 1, dióról származó izolátum az adatbázisban megtalálható összes *B. nigrifluens*

izolátummal mutatja a legnagyobb hasonlóságot, és nem a magyar *B. nigrifluens* izolátumokkal. A *B. nigrifluens* 2 izolátum az *infB* gén alapján készült törzsfa esetében az összes *B. nigrifluens* izolátumtól különállóan helyezkedik el. A 3 gén vizsgálata alapján elmondhatjuk, hogy ez az izolátum kevés hasonlóságot mutat a magyar izolátumokkal. Az összes többi, platánról származó izolátum (*B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7) nagy hasonlóságot mutat egymással.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során gazdaságilag jelentős az *Enterobacteriaceae* családba tartozó, *Brenneria* illetve *Erwinia* fajok rokonsági viszonyainak feltérképezését végeztük el a 16S rRNS gén, valamint 2 háztartási gén (*atpD* és *infB*) molekuláris vizsgálata alapján. A 16S rRNS gén filogenetikai vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy egy olasz *B. alni* (EU490603) és egy amerikai *B. nigrifluens* (EU490602) izolátum az *Erwinia* izolátumok között helyezkedik el. Ez az eredmény is alátámasztja azt, hogy a 16S rRNS gén csak nemzetség szintű azonosításra alkalmas.

A magyar *Brenneria salicis* izolátum a 16S rRNS gén alapján a *B. salicis* izolátumok közé tartozik és 100%-os homológiát mutat a *B. salicis* referencia izolátummal (AJ233445). A háztartási gének molekuláris vizsgálata alapján azonban a magyar izolátum nem a *B. salicis* izolátumokkal mutatta a legnagyobb homológiát, hanem a *B. nigrifluens* izolátumokkal.

A magyar *Brenneria goodwinii* izolátum a 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata alapján a *B. goodwinii* izolátumok közé tartozik. A háztartási gének vizsgálata alapján a *B. goodwinii* izolátum csak 93% (*atpD*) ill. 90%-os (*infB*) homológiát mutat a *B. goodwinii* izolátumokkal. A homológia mértéke magyarázatot ad arra, hogy a magyar izolátum miért különül el a filogenetikai törzsfán a többi *B. goodwinii* izolátumtól.

A *B. nigrifluens* izolátumok szekvenciáit összehasonlítottuk a nemzetközi adatbázisban található összes *B. nigrifluens* izolátum szekvenciájával. A 16S rRNS gén filogenetikai törzsfája alapján megállapítottuk, hogy a magyar izolátumok közül a *B. nigrifluens* 1, dióról származó illetve a *B. nigrifluens* 2, platánról származó izolátum az adatbázisból származó *B. nigrifluens* izolátumokkal mutatja a legnagyobb hasonlóságot. A többi platánról származó izolátum (*B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7), illetve egy dióról származó izolátum (*B. nigrifluens* 0) különálló csoportot alkotnak.

A magyar *B. nigrifluens* 1, dióról származó minta mindhárom gén (16S rRNS, *atpD*, *infB*) vizsgálata alapján az adatbázisból származó *B. nigrifluens* izolátumokkal mutatja a legnagyobb hasonlóságot. Azonban a *B. nigrifluens* 2, platánról származó izolátum kevés hasonlóságot mutat a magyar izolátumokkal. Az összes többi platánról származó izolátum (*B. nigrifluens* 3, 4, 5, 6, 7) nagy hasonlóságot mutat egymással.

A platánról származó *B. nigrifluens* 2 izolátum 16S rRNS gén alapján a *B. nigrifluens* izolátumok közé tartozik, míg a vizsgált másik két gén esetén, pedig a *B. goodwinii* izolátumokkal mutatta a legnagyobb homológiát.

További minták gyűjtése, kórokozók izolálása, valamint azok molekuláris vizsgálata szükséges ahhoz, hogy az *Enterobacteriaceae* családba tartozó *Brenneria*, illetve *Erwinia* nemzetség rokonsági viszonyait még részletesebben, pontosabban vizsgáljuk. Az utóbbi években, hazánkban is újonnan megjelent kórokozók elleni védekezési lehetőségeket szükséges lenne kidolgozni, valamint a kórokozók rendszerezését pontosítani, melyekhez a saját eredményeink is hozzájárulnak.

Összefoglalva a 16S rRNS gén vizsgálata, csak nemzetség szintű azonosításra, míg a 2 háztartási gén (*atpD* és *infB*) molekuláris vizsgálata a fajok közötti különbségek kimutatására, egymástól való pontos elkülönítésre alkalmasak.

Ezen molekuláris vizsgálatok eredményei hazánkban új eredmények, melyek hozzájárulnak az *Enterobacteriaceae* család pontosabb, új eredményekkel kiegészített elemzéséhez is. Vizsgálatainkat több baktériumfajra és újabb gének vizsgálatával is tervezzük kiegészíteni.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Palkovics Lászlónak, a Budapesti Corvinus Egyetem Növénykórtani Tanszék vezetőjének, aki lehetővé tette a kísérletek elvégzését és szakmai hozzáértésével hozzájárult a dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom továbbá tanszéki konzulenseimnek, Dr. Végh Anitának és Zámbo Ágnesnek, akik rengeteg segítséget nyújtottak a munkám során.

Végül szeretnék köszönetet mondani páromnak, aki végig támogatott a dolgozat elkészülte során.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V., Polz, M.F. 2004. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol.* 186. 2629-2635.
2. Arsenijevic, M. 1995. Fitopatogene bakterije parazita strnih zita. (Plant pathogenic bacteria pathogens of small grain cereals). *Zastita-bilja* (Yugoslavia). 46. 239-247.
3. Biosca, E.G., González, R., López-López, M.J., Soria, S., Montón, C., Pérez-Laorga, E. and López, M.M. 2003. Isolation and characterization of *Brenneria quercina*, causal agent for bark canker and drippy nut of *Quercus* spp. in Spain. *Phytopathology*. 93. 485-492.
4. Bonn, W.G. 1999. Opening adress. In: *Acta Horticulturae* 489. 27-28.
5. Borecki, Z., Basak, W., Zawadzka, B. and Millikan, D. 1967. Fire blight in continental Europe. *PLant Disease Reporter*. 51. 3.
6. Bradbury, J.F. 1977. *Erwinia rhapontici*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 555. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew Surrey, England.
7. Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Vancanneyt, M., Swings, J., Coutinho, T. 2008. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Systematic and Applied Microbiology*. 31. 447-460.
8. Brady, C.L., Cleenwerck, I., Denman, S., Venter, S.N. 2012. Proposal to reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand and Schroth 1967) Hauben et al. 1999 into a new genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* comb. nov., descriptions of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* subsp. *iberica* subsp. nov. and *Lonsdalea quercina* subsp. *britannica* subsp. nov., emendation of the description of the genus *Brenneria*, reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* comb. nov., and emendation of the description of *Dickeya dadantii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 (7). 1592-1602.
9. Breed, N.R. and Murray, E.G.D. 1957. Family IV. *Enterobacteriaceae* Rahn, 1937. In: Breed, N.R., Murray, E.G.D. and Smith, N.R. (ed.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, seventh edition. Baltimore. The Williams & Wilkins Co. 332-334.
10. Busse, H.J., Denner, E.B. and Lubitz, W. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J Biotechnol* 47. 3-38.
11. Calzolari, A., Finelli, F. and Mazzoli, G.L. 1999. A severe unforeseen outbreak of the blight in the Emilia-Romagna Region. *Acta Horticulturae* 489. 171-176.
12. Carella, D., Spigno, P., Devita, N. 2003. Occurrence of trunk canker of walnut in Campania region (Italy). *Informatore Fitopatologico*. 53. 32-33.
13. Carta, C. 1993. *Erwinia rhapontici* (Millard) Burkholder: a new report from cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.). *Phytopathologia Mediterranea*. 32. 257-260.
14. Choi, S.H., Kim, Y.T., Lee, K.H. and Kim, C.U. 1990. The shoot and stem rot of mulberry caused by *Erwinia rhapontici*. *Korean J. Plant Pathol.* 6. 106-112.
15. Cilia, V., Lafay, B. and Christen, R. 1996. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol Biol Evol.* 13. 451-461.
16. Clark, D.P., Pazdernik, N.J. 2009. *Biotechnology: Applying the genetic revolution*. Academic Press. London. 34., 50-50., 354.

17. CMI. 1981. Distribution maps of plant diseases. Map No. 145. Edition 3. Commonwealth Mycological Institute. CAB, UK.
18. Coxe, W. 1817. Pears. In: Coxe, W. (ed.) Cultivation of Fruit Trees. Philadelphia. 175-176.
19. Crosse, J.E., Benett, M. and Garrett, C.M.E. 1958. Fire blight of pear in England. Nature (London). 182. 1530.
20. Csete S., Garai A., Zsolnai G. 2004. Helyzetkép a tűzelhalásról 2004 tavaszán Borsod-Abaúj-Zemplén megyében. Gyakorlati Agroforum. 15 (3). 68-69.
21. Dauga, C. 2002. Evolution of the gyrB gene and molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 52. 531-547.
22. Dénes Z. 2007. Újra itt a tűzelhalás. <http://mno.hu/portal/415108>. 2007. június 9.
23. Denman, S., Brady, C., Kirk, S., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., De Vos, P. 2012. *Brenneria goodwinii* sp. nov., associated with acute oak decline in the UK. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 62 (10). 2451-2456.
24. Denman, S., Susan, K. and Webber, J. 2010. Managing acute oak decline. Forestry Commission. 1-4.
25. Denning, W. 1794. On the decay of apple trees. New York Society for the Promotion of Agricultural Arts and Manufacturers Transaction 2. 219-222.
26. Drancourt, M.C., Bollet, A., Carlioz, R., Martelin, J., Gayral, P., Raoult, D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J. Clin. Microbiol. 38. 3623-3630.
27. Dutrecq, A., Debras, P., Stevaux, J., Klaessens, D. 1990. Estimation de la flore bactérienne sur les épis de froment d'hiver. Parasitica. 46. 69-84.
28. Evans I.R. 1996. Fire blight of raspberries in Alberta. Acta Horticulturae. 41. 69-72.
29. Feistner, G.J., Mavridis, A., Rudolph, K. 1997. Proflavonoides and phytopathogenicity in *Erwinia* spp. Biometals. 10. 1-10.
30. Forster, R.L. and Bradbury, J.F. 1990. Pink seed of wheat caused by *Erwinia rhapontici* in Idaho. Plant Dis. 74-81.
31. Gvozdyak, R.I., Ogorodnik, L.E., Yakovleva, L.M., Romanenko, V.M. 1987. Biology of the pathogens of bacterial rot of Gerbera. Mikrobiologicheskii Zhurnal. 49. 7-11.
32. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. 41. 95-98.
33. Hartmann, G. and Blank, R. 1992. Winterfrost, Kahlfrass und Prachtkäferbefall als Faktoren im Ursachenkomplex des Eichensterbens in Norddeutschland. Forst und Holz. 47(15). 443-452.
34. Hassanzadeh, N. 1993. Taxonomic study on some bacterial plant pathogens in Iran. Appl. Entomol. Phytopathol. 60. 17-18.
35. Hauben, L., Steenackers, M. and Swings, J. 1998. PCR-Based Detection of the Causal Agent of Watermark Disease in Willows (*Salix* spp.) Applied and Environmental Microbiology. Vol. 64. No. 10. 3966-3971.
36. Hedegaard, J., Steffensen, S.A.A., Norskov-Lauritsen, N., Mortensen, K.K., Sperling-Petersen, H.U. 1999. Identification of Enterobacteriaceae by partial sequencing of the gene encoding translation initiation factor 2. International Journal of Systematic Bacteriology. 49. 1531-1538.
37. Hevesi, M. 1996. Az *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. hazai megjelenése alman. Növényvédelem. 32 (5). 225-228.

38. Huang, H.C. and Erickson, R.S. 2002. Impact of pink pea disease on seed size, seedling emergence and growth vigor. Pages 24-25 in: Proceedings of Canadian Phytopathological Society Annual Meeting. June 16-19, 2002. Waterton Lakes Lodge, Waterton, Alberta.
39. Huang, H.C., Erickson, R.S., Yanke, L.J., Mundel, H.H., Hsieh, T.F. 2002. First report of pink seed of common bean caused by *Erwinia rhapontici*. Plant Dis. 86. 921.
40. Huang, H.C., Hsieh, T.F. and Erickson, R.S. 2003. Biology and Epidemiology of *Erwinia rhapontici*, Causal Agent of Pink Seed and Crown Rot of Plants. Plant Pathology Bulletin. 12. 69-76.
41. Jamalzade, A., Shamsbakhsh, M., Rahimian, H. 2012. Genetic diversity of *Brenneria nigrifluens* strains in North of Iran (Margin of Caspian Sea). Cercetari Agronomice in Moldova. Vol. 45. No. 2. 57-68.
42. Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R., Schmidt, T.M. 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. Nuc Acid Res. 29. 181-184.
43. Kokoskova, B. 1992. The appearance of *Erwinia rhapontici* on hyacinth in Czechoslovakia. Ochrana Rostlin. 28. 146-148.
44. Korba, J. and 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.
45. Lakatos F. és Szabó I. 2012. Növényvédelem az erdőgazdálkodásban. Szaktudás Kiadó Ház. Budapest. 110.
46. Lapage, S.P. 1979. Proposal of *Enterobacteraceae* nom. nov. as a substitute for the illegitimate but conserved name *Enterobacteriaceae* Rahn 1937. Request for an opinion. In: *International Journal of Systematic Bacteriology*. 29. 265-266.
47. Lawrence, J.G., Ochman, H. and Hartl, D.L. 1991. Molecular and evolutionary relationships among enteric bacteria. J Gen Microbiol. 137. 1911-1921.
48. Letal, J.R. 1976. Crown rot of rhubarb in Alberta. Can. Plant Dis. Surv. 56. 67-68.
49. Lopez, M.M., Marti, R., Morente, C., Orellana, N., Ninot, T., Aleta, N. 1994. Phytopathogenic bacteria identified in walnut in Spain. Investigacion Agraria. Produccion y Proteccion Vegetales. 2. 307-314.
50. Loreti, S., Galleli, A., Piccirillo, P., Belisario, A. 2005. Bacterial bark canker on English walnut. Acta Horticulturea. 705. 433-435.
51. Luisetti, J. and Rapilly, F. 1967. Sur une alteration d'origine bacterienne des graines de ble. Ann. Epiphyt. Phytogenet. 18. 483-486.
52. Maes, M., Huvenne, H., Messens, E. 2009. *Brenneria salicis*, the bacterium causing watermark disease in willow, resides as an endophyte in wood. Environmental Microbiology. 11 (6). 1453-62.
53. Meijneke, C.A.R. 1972. Prevuur en zijn verspreiding. Gewasbescherming 3. 128-136.
54. Menard, M., Delort, F., Baudery, A., Saux, M.L.E. 2004. First report of bacterial canker of walnut caused by *Brenneria nigrifluens* in France. Plant Disease. 88. 220.
55. Merő F. 2004. Helyzetkép a tűzelhalásról 2004 tavaszán Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében. Gyakorlati Agróforum. 15 (3). 70-71.
56. Metcalfe, G. 1940. *Bacterium rhaponticum* (Millard) Dowson, A cause of crown-rot disease of rhubarb. Ann. Appl. Biol. 27. 502-508.
57. Mignard, S. and Flandrois, J.P. 2006. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. J. Microbiol. Methods. 67. 574-581.

58. Millard, W.A. 1924. Crown rot of rhubarb. Bull. Univ. Leeds. 138. 28.
59. Mohan, S.K. 2007. Natural infection of shoot blight in Pluot® caused by *Erwinia amylovora*. 11th International workshop on Fire Blight. Portland, Oregon. 1217 August, 2007. Abstracts. 64.
60. Mohan, S.K. and Thomson, S.V. 1996. An outbreak of fire blight in plums. Acta Horticulturae. 411. 73-76
61. Mollet, C. Drancourt, M., Raoult, D. 1997. rpoB Sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Mol. Microbiol. 26. 1005–1011.
62. Moraal, L. and Hilszczanski, J. 2000. *Agrilus biguttatus* (Col.: Buprestidae) in relation with oak decline. Recent advances on oak health in Europe. Selected papers from a conference held in Warsaw, Poland. 22-24 November 1999 2000. 219-224.
63. Moretti, C., Hosni, T., Vandemeulebroecke, K., Brady, C., De Vos, P., Buonauro, R. and Cleenwerck, I. 2010. *Erwinia oleae* sp. nov., isolated from olive knots caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61 (11). 2745-2752.
64. Morone, C., Janse, J.D., Scortichini, M. 1998. Bark canker of Persian walnut (*Juglans regia*) tree incited by *Erwinia nigrifluens* in Italy. Journal of phytopathology. 146. 637-639.
65. Naum, M., Brown, E.W. and Mason-Gamer, R. J. 2008. Is 16S rDNA a reliable phylogenetic marker to characterize relationships below the family level in the *Enterobacteriaceae*. J. Mol. Evol. 66 (6). 630-642.
66. Nelson, N. and Taiz, L. 1989. The evolution of H⁺-ATPases. Trends Biochem Sci. 14. 113-116.
67. Németh J. 1999. Occurrence and spread of fire blight (*Erwinia amylovora*) in Hungary (1996-1998), management of the disease. Acta Hort. 489. 177-185.
68. Netherlands Plant Protection Service. 1966. A Case of Fire Blight in The Netherlands. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Report 286. Wageningen. 1.
69. Ouchi, A. 1986. Soft rot of onion and the casual bacteria (by *Erwinia rhapontici* and *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*). Shokubutsu Boeki (Plant Protection, Japan) 40. 14-19.
70. Ouchi, A., Ohsawa, T., and Nishimura, J. 1983. Two pathogenic bacteria, *Erwinia rhapontici* (Millard 1924) Burkholder 1948 and *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Brown 1918) Stevens 1925, causing a soft rot of onion. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 49. 619-626.
71. Pálfi K., Vendrei Zs., Csete S., Simon Z., Sótónyi J., Lőrinczné Izsáki G. 2000. Az almatermésűek tűzelhalás betegsége (*Erwinia amylovora*) Magyarországon, 2000-ben. Integrált termesztés a kertészeti és szántóföldi kultúrákban. XXI. 12-17.
72. Paradis, S., Boissinot, M., Paquette, N., Belanger, S.D., Martel, E.A., Boudreau, D.K., Picard, F.J., Oulette, M., Roy, P.H., Bergeron, M.G. 2005. Phylogeny of the *Enterobacteriaceae* based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 55. 2013–2025.
73. Piccirillo, P. 2003. Il quadro fitopatologico del noce (*Juglans regia* L.) attraverso le osservazioni dell-ISF di Caserta. Frutticoltura. 10. 39-43.
74. Popovic, T., Ivanovic, Z., Zivkovic, S. and Trkulja, N. 2013. First report of *Brenneria nigrifluens* as the causal agent of shallow-bark canker on walnut trees (*Juglans regia*) in Serbia. Plant Disease. 97 (11). 1504.
75. Pouteau-Thouvenot, M., Gaudemer, A., Barbier, M. 1965. Sur la ferrosamine. Pigment de *Bacillus roseus fluorescens*. Bull. Soc. Chim. Biol. 47. 2085-2094.
76. Poza-Carrión, C., Aguilar, I., Gallego, F.J., Nuñez-Morena, Y., Biosca, E.G., González, R., López, M.M. and Rodríguez-Palenzuela, P. 2008. *Brenneria quercina* and *Serratia* spp. isolated from

- Spanish oak trees: molecular characterization and development of PCR primers. *Plant Pathology*. 57. 308-319.
77. Rezzonico, F., Smits, T.H.M., Montesinos, E., Frey, J.E. and Duffy, B. 2009. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC Microbiol.* 9. 204
 78. Roberts, P. 1974. *Erwinia rhapontici* (Millard) Burkholder associated with pink grain of wheat. *J. Appl. Bacteriol.* 37. 353-358.
 79. Rodoni, B., Kinsella, M. Gardner, R., Merriman, P., Gillings, M. and Geider, K. 1999. Detection of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight, in the Royal Botanic Gardens, Melbourne, Australia. *Acta Horticulturae*. 489. 169-170.
 80. Saccardi, A., Bonnetti, V., Melegatti, A., Cristini, M. 1998. Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on English walnut (*Juglans regia*) in the Veneto region (Northern Italy). *Journal of Plant Pathology*. 80. 63-65.
 81. Sacerdot, C., Dessen, P., Hershey, J.W., Plumbridge, J.A. and Grunberg-Manago, M. 1984. Sequence of the initiation factor IF2 gene: unusual protein features and homologies with elongation factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81. 7787-7791.
 82. Schnabel, E.L. and Jones A.L. 2001. Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*. *Apple Environ Microbiology*. 67. 59-64.
 83. Schroeder, B.K., Lupein, S.L., Dugan, F.M. 2002. First report of pink seed of pea caused by *Erwinia rhapontici* in the United States. *Plant Dis.* 86. 188.
 84. Scortichini, M. 1999. Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on walnut for timber production in Latium region. *Informatore Fitopatologico*. 49. 52-54.
 85. Sellwood, J.E. and Lelliott, R.A. 1978. Internal browning of hyacinth caused by *Erwinia rhapontici*. *Plant Pathology*. 27. 120-124.
 86. Shaban, M.A., Kabashnaya, L.V., Gvozdyak, R.I., Vakulenko, A.K. 1991. Bacteria of genus *Erwinia*: Pathogens of tomato diseases in the Ukraine (USSR). *Mikrobiologicheskii Zhurnal* (Kiev). 53. 58-63.
 87. Snieskiene, V. 1995. Bacterial diseases found in Lithuania in 1983-1994 in flowers grown on closed ground. *Biologija* No. 3-4. 148-149.
 88. Sproer, C., Mendrock, U., Swiderski, J., Lang, E. and Stackebrandt, E. 1999. The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (4). 1433-1438.
 89. Surico, G. and Mugnai, L. 1992. Infezioni de *Erwinia* sp. su Ontano in Toscana e Liguria. *Informatore Fitopatologico*. 12. 41-43.
 90. Surico, G., Mugnai, L., Pastorelli, R., Giovannetti, L., Stead, D.E. 1996. *Erwinia alni*, a New Species Causing Bark Cankers of Alder (*Alnus* Miller) Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 46. No. 3. 720-726.
 91. Tharreau, D., Gagnard, J.L., Luisetti, J., Gibon, C.B. 1992. Presence d'une microflore bacterienne abondante et variee a la surface de trois plantes aromatiques et medicinales. *Herba Gallica*. No. 2. 79-89.
 92. Tóth T., Lakatos T., Koltay A. 2013. *Lonsdalea quercina* subsp. *populi* subsp. nov., isolated from bark canker of poplar trees. *Int. J. Syst. evol. Microbiol.* 63 (6). 2309-2313.
 93. van der Zwet T. and Keil, H.M. 1979. Fire Blight – A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. *Agriculture Handbook* 510. US Department of Agriculture. Washington DC.

94. van der Zwet, T. 1994. The various means of dissemination of the fire blight bacterium *E. amylovora*. Bull. Eppo. 24. 209-214.
95. van der Zwet, T., Beer, S.V. 1995. Fire Blight- Its Nature, Prevention and Control. USDA Bulletin. 631-697.
96. 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*). Acta Horticulturae. (ISHS) 590. 89-94.
97. Vansteenkiste, D., Tirry, L., Van Acker, J. and Stevens, M. 2004. Predispositions and symptoms of *Agrilus* borer attack in declining oak trees. Annals of Forest Science. 61. 815-823.
98. Végh A., Némethy Zs., Hajagos L., Palkovics L. 2012. Új gazdanövényen (*Prunus domestica* L. 'd'Agen') jelent meg az *Erwinia amylovora* Magyarországon. Növényvédelem. 48 (8). 378-382.
99. Végh A., Tóth A., Zámbo Á., Borsos G., Palkovics L. 2013. A dió (*Juglans regia* L.) kéregrepedése, feketefolyása: új baktériumos betegség Magyarországon. Növényvédelem. 49 (9). 397-401.
100. Volcani, Z. 1955. *Erwinia rhapontici* pathogenic to citrus fruits. Bull. Res. Coun. Israel. 5. 129-130.
101. Wilson, E.E., Starr M.P., Berger J.A. 1957. Bark canker, a bacterial disease of Persian walnut tree. Phytopathology. 47. 669-673.
102. Wilson, M. 2008. Bacteriology of humans. London. Blackwell Publishing. 299-300.
103. Winslow, C. E. A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, Jr. C., Rogers, L. A., Smith, G. H. 1920. The families and genera of the bacteria. Final report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. Journal of Bacteriology 5. 191-229.
104. Woo, P.C.Y., K.H.I. Ng, S.K.P. Lau, K.-T. Yip, A.M.Y. Fung, K.-W. Leung, D.M.W. Tam, T.-L. Que, and K.-Y. Yuen. 2003. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. J. Clin. Microbiol. 41:1996-2001.

9. MELLÉKLETEK

1. melléklet: A 16S rRNS gén vizsgálatához felhasznált, az NCBI-ből származó külföldi izolátumok származásának adatai

NCBI kód	Izolátum	Gazdanövény	Származás	Publikálta
JN544202	<i>Brenneria goodwinii</i> LMG 26270	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544204	<i>Brenneria goodwinii</i> LMG 26271	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544203	<i>Brenneria goodwinii</i> LMG 26272	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
GU942729	<i>Brenneria rubrifaciens</i> KNU28183	-	-	Thapa és mtsai., 2010.
GU942728	<i>Brenneria rubrifaciens</i> KNU28182	-	-	Thapa és mtsai., 2010.
GU942730	<i>Brenneria rubrifaciens</i> KNU28184	-	-	Thapa és mtsai., 2010.
NR_041977	<i>Brenneria rubrifaciens</i> DSM 4483	<i>Juglans regia</i>	-	Sproeer, 1999.
AJ233419	<i>Brenneria salicis</i> DSM 30166	<i>Salix</i> sp.	-	Sproeer, 1999..
HM441252	<i>Brenneria salicis</i> P2-54	-	-	Chen és mtsai., 2010.
KC843416	<i>Brenneria salicis</i> 16	<i>Populus euphratica</i>	Kína	Rozahon, 2013.
JQ353829	<i>Brenneria salicis</i> CGN-4	<i>Populus euphratica</i>	Kína	Chen és mtsai., 2012.
KF219800	<i>Brenneria salicis</i> KBN-1-7	<i>Populus euphratica</i>	Kína	Abdurahman, 2013.
JX484740	<i>Brenneria nigrifluens</i> OR3	<i>Juglans regia</i>	Szerbia	Popovic és mtsai., 2012.
AJ233415	<i>Brenneria nigrifluens</i> DSM 30175	<i>Juglans regia</i>	USA	Sproeer, 1999.
NR_041975	<i>Lonsdalea quercina</i> DSM 4561	<i>Quercus</i> sp.	-	Sproeer, 1999.
JX523703	<i>Lonsdalea quercina</i> subsp. <i>quercina</i> LMG 2725	<i>Quercus</i> sp.	USA	Li, 2012.
JQ291575	<i>Lonsdalea quercina</i> subsp. <i>populi</i> NY060	<i>Populus x euramericana</i>	Magyarország	Tóth és mtsai., 2013.
JX392894	<i>Lonsdalea quercina</i> subsp. <i>quercina</i> PY7-2	<i>Populus</i> sp.	-	Li és mtsai., 2012.
JQ614024	<i>Brenneria alni</i> Bal-2	<i>Corylus avellana</i>	Olaszország	Lamichhane és mtsai., 2012.
JX996176	<i>Brenneria alni</i> BraNep	<i>Olea europaea</i>	Nepál	Lamichhane, 2012.
AJ233409	<i>Brenneria alni</i> DSM 11811	<i>Alnus</i> sp.	Olaszország	Sproeer, 1999.
EU490603	<i>Brenneria alni</i> pvfi20	-	Olaszország	Naum és mtsai., 2008.
EU490602	<i>Brenneria nigrifluens</i> 4789	<i>Juglans regia</i>	USA	Naum és mtsai., 2008.
AB680317	<i>Erwinia amylovora</i> NBRC 12687	<i>Pyrus communis</i>	-	Nakagawa és mtsai., 2011.
KC113175	<i>Erwinia amylovora</i> KSI 1412	-	Irán	Hashemi Shahraki és mtsai., 2012.
EU490590	<i>Erwinia amylovora</i> 278	-	-	Naum és mtsai., 2008.
FJ611856	<i>Erwinia amylovora</i> CFBP 1232	<i>Pyrus communis</i>	Egyesült Királyság	Rezzonico és mtsai., 2009.
GQ222273	<i>Erwinia amylovora</i> HSA 2	-	-	Li és Jin, 2009.
JN409472	<i>Erwinia amylovora</i> SP23	-	Kína	Zhou, 2011.

2. táblázat: Az *atpD* gén vizsgálatához felhasznált, az NCBI-ből származó külföldi izolátumok származásának adatai

NCBI kód	Izolátum	Gazdanövény	Származás	Publikálta
EF988751	<i>Erwinia rhapontici</i> LMG 2688	<i>Rheum rhabarbarum</i>	Egyesült Királyság	Brady és mtsai., 2008.
JF311454	<i>Erwinia rhapontici</i> LMG 2642	<i>Prunus persica</i>	-	Brady és mtsai., 2012.
JF311455	<i>Erwinia rhapontici</i> LMG 2645	<i>Pyrus communis</i>	Egyesült Királyság	Brady és mtsai., 2012.
JF311456	<i>Erwinia rhapontici</i> LMG 2648	<i>Crataegus</i> sp.	-	Brady és mtsai., 2012.
JF311447	<i>Erwinia amylovora</i> LMG 1885	<i>Crataegus monogyna</i>	Belgium	Brady és mtsai., 2012
JF311448	<i>Erwinia amylovora</i> LMG 1969	<i>Malus sylvestris</i> cv. Golden Delicious	Franciaország	Brady és mtsai., 2012.
HQ393596	<i>Erwinia amylovora</i> LMG 2024	<i>Pyrus communis</i>	Egyesült Királyság	Moretti és mtsai., 2010.
JF311449	<i>Erwinia amylovora</i> LMG 2085	<i>Rubus idaeus</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311507	<i>Brenneria rubrifaciens</i> LMG 5116	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311508	<i>Brenneria rubrifaciens</i> LMG 5118	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311504	<i>Brenneria rubrifaciens</i> LMG 2709T	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311505	<i>Brenneria rubrifaciens</i> LMG 2711	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311506	<i>Brenneria rubrifaciens</i> LMG 5109	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311514	<i>Brenneria alni</i> NCPPB 3934T	<i>Alnus cordata</i>	Olaszország	Brady és mtsai., 2012.
JF311515	<i>Brenneria alni</i> NCPPB 3935	<i>Alnus</i> sp.	-	Brady és mtsai., 2012.
JF311517	<i>Brenneria alni</i> NCPPB 3833	<i>Alnus glutinosa</i>	Olaszország	Brady és mtsai., 2012.
JF311518	<i>Brenneria alni</i> NCPPB 3835	<i>Alnus cordata</i>	Olaszország	Brady és mtsai., 2012.
JF311516	<i>Brenneria alni</i> NCPPB 3936	<i>Alnus</i> sp.	-	Brady és mtsai., 2012.
JF311502	<i>Brenneria nigrifluens</i> LMG 5953	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311503	<i>Brenneria nigrifluens</i> LMG 5956	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311499	<i>Brenneria nigrifluens</i> LMG 2694T	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311500	<i>Brenneria nigrifluens</i> LMG 2696	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311501	<i>Brenneria nigrifluens</i> LMG 5107	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JN544206	<i>Brenneria goodwinii</i> R-43477	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544207	<i>Brenneria goodwinii</i> LMG 26271	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544208	<i>Brenneria goodwinii</i> R-43479	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544209	<i>Brenneria goodwinii</i> R-43654	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544210	<i>Brenneria goodwinii</i> R-43655	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544213	<i>Brenneria goodwinii</i> LMG 26272	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544205	<i>Brenneria goodwinii</i> R-43476	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544211	<i>Brenneria goodwinii</i> LMG 26270	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544212	<i>Brenneria goodwinii</i> R-43657	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JF311512	<i>Brenneria salicis</i> LMG 5119	<i>Salix alba</i> var. <i>calva</i>	Egyesült Királyság	Brady és mtsai., 2012.
JF311513	<i>Brenneria salicis</i> LMG 18278	<i>Salix</i> sp.	Belgium	Brady és mtsai., 2012
JF311509	<i>Brenneria salicis</i> LMG 2698T	<i>Salix alba</i> var. <i>calva</i>	Egyesült Királyság	Brady és mtsai., 2012.
JF311510	<i>Brenneria salicis</i> LMG 2700	<i>Salix</i> sp.	Egyesült Királyság	Brady és mtsai., 2012.
JF311511	<i>Brenneria salicis</i> LMG 2706	<i>Salix caprea</i>	Egyesült Királyság	Brady és mtsai., 2012.

3. melléklet: Az *infB* gén vizsgálatához felhasznált, az NCBI-ből származó külföldi izolátumok származásának adatai

NCBI kód	Izolátum	Gazdanövény	Származás	Publikálta
JF311680	<i>Erwinia rhapontici</i> LMG 2642	<i>Prunus persica</i>	-	Brady és mtsai., 2012.
EF988924	<i>Erwinia rhapontici</i> LMG 2688	<i>Rheum rhabarbarum</i>	Egyesült Királyság	Brady és mtsai., 2008.
JF311681	<i>Erwinia rhapontici</i> LMG 2645	<i>Pyrus communis</i>	Egyesült Királyság	Brady és mtsai., 2012.
JF311682	<i>Erwinia rhapontici</i> LMG 2648	<i>Crataegus</i> sp.	-	Brady és mtsai., 2012.
JF311673	<i>Erwinia rhapontici</i> LMG 1885	<i>Crataegus monogyna</i>	Belgium	Brady és mtsai., 2012.
JF311674	<i>Erwinia amylovora</i> LMG 1969	<i>Malus sylvestris</i> cv. Golden Delicious	Franciaország	Brady és mtsai., 2012.
HQ393620	<i>Erwinia amylovora</i> LMG 2024	<i>Pyrus communis</i>	Egyesült Királyság	Moretti és mtsai., 2010.
JF311675	<i>Erwinia amylovora</i> LMG 2085	<i>Rubus idaeus</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311730	<i>Brenneria rubrifaciens</i> LMG 2709T	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311731	<i>Brenneria rubrifaciens</i> LMG 2711	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311734	<i>Brenneria rubrifaciens</i> LMG 5118	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311732	<i>Brenneria rubrifaciens</i> LMG 5109	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311733	<i>Brenneria rubrifaciens</i> LMG 5116	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311738	<i>Brenneria salicis</i> LMG 5119	<i>Salix alba</i> var. <i>calva</i>	Egyesült Királyság	Brady és mtsai., 2012.
JF311739	<i>Brenneria salicis</i> LMG 18278	<i>Salix</i> sp.	Belgium	Brady és mtsai., 2012.
JF311735	<i>Brenneria salicis</i> LMG 2698T	<i>Salix alba</i> var. <i>calva</i>	Egyesült Királyság	Brady és mtsai., 2012.
JF311736	<i>Brenneria salicis</i> LMG 2700	<i>Salix</i> sp.	Egyesült Királyság	Brady és mtsai., 2012.
JF311737	<i>Brenneria salicis</i> LMG 2706	<i>Salix caprea</i>	Egyesült Királyság	Brady és mtsai., 2012.
JF311725	<i>Brenneria nigrifluens</i> LMG 2694T	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311726	<i>Brenneria nigrifluens</i> LMG 2696	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311727	<i>Brenneria nigrifluens</i> LMG 5107	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311728	<i>Brenneria nigrifluens</i> LMG 5953	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311729	<i>Brenneria nigrifluens</i> LMG 5956	<i>Juglans regia</i>	USA	Brady és mtsai., 2012.
JF311743	<i>Brenneria alni</i> NCPPB 3833	<i>Alnus glutinosa</i>	Olaszország	Brady és mtsai., 2012.
JF311744	<i>Brenneria alni</i> NCPPB 3835	<i>Alnus cordata</i>	Olaszország	Brady és mtsai., 2012.
JF311740	<i>Brenneria alni</i> NCPPB 3934T	<i>Alnus cordata</i>	Olaszország	Brady és mtsai., 2012.
JF311741	<i>Brenneria alni</i> NCPPB 3935	<i>Alnus cordata</i>	Olaszország	Brady és mtsai., 2012.
JF311742	<i>Brenneria alni</i> NCPPB 3936	<i>Alnus</i> sp.	-	Brady és mtsai., 2012.
JN544229	<i>Brenneria goodwinii</i> LMG 26270	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544224	<i>Brenneria goodwinii</i> R-43477	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544225	<i>Brenneria goodwinii</i> LMG 26271	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544226	<i>Brenneria goodwinii</i> R-43479	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544227	<i>Brenneria goodwinii</i> R-43654	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544228	<i>Brenneria goodwinii</i> R-43655	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544231	<i>Brenneria goodwinii</i> LMG 26272	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544223	<i>Brenneria goodwinii</i> R-43476	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.
JN544230	<i>Brenneria goodwinii</i> R-43657	<i>Quercus robur</i>	Egyesült Királyság	Denman és mtsai., 2012.