

## AZ ERWINIA NEMZETSÉGBE TARTOZÓ BAKTÉRIUMFAJOK BIOLÓGIAI DIVERZITÁSA: azonosítás, jellemzés és genetikai variabilitás

Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó jelentős növénypatogén baktériumfajok az *Erwinia amylovora*, a *Brenneria (Erwinia) nigrifluens* és az *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*). A három hónapos ösztöndíj időtartama alatt az előbb említett kórokozók okozta tipikus tüneteket mutató mintákat gyűjtöttem Marosvásárhelyről és Nyárádmenti településekről (Nyárádszereda, Nyárádremete, Jobbágytelke, Mikháza, Nyárádtő, Csíkfalva).



*Erwinia amylovora* okozta  
tünet körtén



*Brenneria nigrifluens* okozta  
tünet diófa törzsén



*Erwinia carotovora* okozta  
tünetek burgonyán

A vizsgált mintákat még a gyűjtés napján vagy legkésőbb másnap táptalajra helyeztem fertőtlenítés után. *Erwinia amylovora* okozta, tűzelhalás tüneteket mutató 54 db mintát főként a Nyárádmenti településekről gyűjtöttem különböző gazdanövényekről (alma, körte, birs, szilva). Diófákon sekély repedéseket és sűrű váladékfolyást mutató fát nem találtam. 28 db vékonyabb repedést mutató diófáról is mintát gyűjtöttem házi kertből és szórványosan előforduló fákról. Tárolt burgonya gumót 14 db-ot sikerült gyűjteni, melyeken kisebb folt és lágyulás volt tapasztalható.

### **Anyag és Módszer**

A baktériumok izolálásához, tenyésztéséhez King-B táptalajt használtunk. Az izoláláshoz tipikus tünetet mutató növényi részeket vizsgáltunk meg. A növényi részeket fertőtlenítettük, majd steril desztillált víz hozzáadásával daraboltuk és homogenizáltuk. A kapott szuszpenziót King-B táptalajra szélesztettük (King, 1954), majd tiszta tenyészetet állítottunk elő King-B táptalajon. A hiperszenzitív reakció vizsgálata során dohánynövények (*Nicotiana tabacum* L.

cv. Xanthi) levelébe  $5 \times 10^7$  sejt/ml töménységű baktérium szuszpenziót injektáltunk fecskendő segítségével. A tesztet 24-48 óra elteltével értékeltük a kialakult tünetek alapján (gyors szöveti nekrozis). A Gram-tulajdonságot KOH próbával határoztuk meg. A biokémiai tulajdonságok meghatározásához a Biolab által forgalmazott oxidáz-tesztsíkot és Biomérieux (France) által gyártott API kitet használtuk. A vizsgálat során a gyártó előírásának megfelelően jártunk el. A patogenitási tesztet az adott baktériumfaj gazdanövényein végeztük el. Minden izolátum patogenitását külön-külön teszteltük.  $5 \times 10^7$  sejt/ml töménységű baktérium szuszpenziót inokuláltunk. Kontroll esetében steril desztillált vízzel történt a kezelés, majd pára kamrába helyeztük, ahol szobahőmérsékleten 90-100% relatív páratartalmat biztosítottunk számukra. A kórokozók molekuláris azonosítására PCR (polimeráz-lánreakció) technikát alkalmaztunk. A baktériumok általános meghatározásához a 16S rRNS gént vizsgáltuk. Az amplifikációt követően a PCR termékek tisztítását a Roche Diagnostics GmbH által gyártott High Pure PCR Product Purification Kittel végeztük a gyártó utasításai szerint. A fragmentumokat a BaseClear B.V. (Leiden, Hollandia) céghez küldtük közvetlen szekvencia meghatározásra. A szekvenciák elemzéséhez és összeillesztéséhez CLC Genomics workbench (CLC Bio A/S, Cambridge, MA) software csomagot alkalmaztam. A kórokozók azonosításához az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázist, illetve annak BLAST programját használtam.

## **Eredmények**

A tűzelhalás tüneteit mutató 54 db mintából 36 db, a diófák repedéséből a 28 db mintából 11 db, míg a tárolt 14 db burgonya gumóból 5 db baktériumot tenyésztettem sikeresen, állítottam elő tiszta tenyészetet. Az *Erwinia amylovora* esetében az izolátumok almáról, körtéről és birsról származtak, melyek patogenitását igazoltam. Sajnos a kórokozó újabb gazdanövényéről, csonthéjas fajról, szilváról nem sikerült a kórokozó azonosítása. A *Brenneria nigrifluens* esetében a diófák sekély repedéséből sikerült 11 tiszta tenyészetet előállítani, azonban a patogenitásukat nem tudtam igazolni és a molekuláris vizsgálatok sem igazolták a *B. nigrifluens* jelenlétét. A burgonyagumóból sikerült 5 tiszta tenyészetet előállítanom, melyek patogenitását is igazoltam burgonya szeleteken.

24 órás inkubációt követően a táptalajon felnőttek a fajokra jellemző fehéres-krémes színű, kiemelkedő, ép szélű baktériumtelepek. Az izolátumok mindegyike King-B táptalajon könnyen tenyészthető és fenntartható volt. A tűzelhalás tüneteit mutató mintákról izolált 36 izolátum (Ea1-Ea36), a dióról származó 11 izolátum (Bn1-Bn11) és a burgonyáról származó 5 izolátum (Ec1-Ec5) mindegyike Gram-negatív tulajdonságú. Dohánynövény (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi) levelein 24 óra elteltével pozitív reakciót, azaz gyors szöveti nekrozist-

hiperszenzitív reakciót tapasztaltunk minden izolátum esetében. A patogenitást a tűzelhalás esetében alma, körte, birs, szilva terméseken és leveleken; a dió sekély kéregpedéseiből származó izolátumok esetében dió hajtásokat, leveleket és terméseket, míg a burgonyáról származó izolátumok esetében burgonyszeleteket vizsgáltuk, az izolátumok szuszpenziójával külön-külön. A mesterségesen fertőzött termések esetében a fertőzést követő 5-7. napon, a leveleken 7-10. napon, míg a hajtások esetében 21-30. napon alakultak ki a különböző betegségekre jellemző tünetek. A steril desztillált vízzel inokulált kontroll csoportokon nem alakultak ki elváltozások a különböző értékelési időpontokig. A kórokozót sikeresen visszaizoláltuk a fertőzött növényi részekből King B táptalajra, így a Koch posztulátumok (Koch, 1878) alapján bizonyítottuk a kórokozók megbetegítő képességét, kivéve a dióról származó izolátumok esetében. A biokémiai vizsgálatok még folyamatban vannak.



**Klasszikus bakteriológiai vizsgálatok képekben (Gram-tulajdonság -KOH próba, hiperszenzitív reakció, tenyészbélyeg King-B táptalajon, patogenitás teszt)**

Az összes vizsgált izolátum 16S rRNS gén molekuláris vizsgálata során ~1300 bázispár hosszúságú termékek keletkeztek. A szekvencia analízis alapján a tűzelhalás tüneteit mutató mintákból származó izolátumaink egymással 99,5-100% azonosságot, míg az adatbázisban szereplő más (magyarországi, egyiptomi) adatbázisban szereplő *Erwinia amylovora* izolátumokkal 98-99,5% azonosságot mutattak. A burgonyáról származó izolátumaink egymással 100%, míg egyéb *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* izolátumokkal 99,2-100% azonosságot mutattak. A dió sekély kéregrák kórokozóját, a gyűjtött, vizsgált mintákból nem sikerült igazolni molekuláris vizsgálat alapján sem a *Brenneria nigrifluens* jelenlétét.

A vizsgálatokat tovább folytatjuk, mindenképp szeretnénk több mintát gyűjteni és feldolgozni. Tervezzük további szilvaminták gyűjtését, a tűzelhalás betegség csonthéjasokon való előfordulásának igazolására Romániában is. Valamint tervezzük egy másik Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj kapcsán a dió sekély kéregrákját vizsgálni és további mintákat gyűjteni, a kórokozót, a *Brenneria nigrifluens* fajt elsőként azonosítani Erdélyben. A vizsgálatokat több évig tervezzük, sokkal több izolátumra van szükség, hogy végső következtetést vonjunk le az

*Enterobacteriaceae* családba tartozó jelentős növénypatogén fajokkal kapcsolatban Marosvásárhelyen és a Nyárárdmenti településeken, de mindenképp hiánypótló ezen fajok vizsgálata, és az izolátumok jellemzése, összehasonlítása, mivel az *Erwinia amylovora*-t is 1992-ben írták le először Romániában.

### **Támogatás hasznosulása**

Az anyagi támogatás nagyban hozzájárult kutatásom megvalósulásához. A kórokozók klasszikus és molekuláris módszerekkel történő azonosítása jelentős anyagi költséggel jár, melynek finanszírozásához a pályázat is nagyban hozzájárult. Több a kísérlethez szükséges műanyag laborszerek, vegyszerek kerültek beszerzésre. A kutatás további folytatásához is már megkezdtek további minták gyűjtését is.

### **Kutatási eredmények tervezett hasznosítása**

Mivel a kísérleteket nemrég fejeztem be, a kísérleti eredmények publikálása tervben van a növényvédelem szakterület rangos nemzetközi folyóirataiban ill. hazai és nemzetközi konferenciákon. Növényvédelmi Tudományos Napokon való részvétel, ahol a kutatási anyag bemutatása történik oktatók, kutatók számára. Az új tudományos eredményekről, a kórokozókról, növényvédelmi problémák megoldásáról tájékoztatni kell a termeszítőket folyóiratokban, szaklapokban. A kísérleti eredmények alkalmazása, beillesztése a MATE, Budai Campus, Növényvédelmi Intézet és a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem oktatási tananyagaiba.