

# SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

## **Az *Erwinia amylovora* (Burill) Winslov *et al.* bakteriofágjainak jellemzése és biológiai védekezésben való felhasználásuk vizsgálata**

PD-OTKA

Témavezető: Schwarczinger Ildikó

A kutatás időtartama: 2008.10.01. – 2012.09.30.

Célunk; bakteriofágra épülő biológiai védekezés megalapozása az almatermésűek tűzelhalását okozó *Erwinia amylovora* ellen. Vizsgálataink az *E. amylovora* bakteriofágjainak gyűjtésére, izolálására, a bakteriofágok jellemzésére, a bakteriofágok *E. amylovora*-ra kifejtett hatásának vizsgálatára és a magyar fág izolátumok más, a szakirodalomban korábban már leírt fág törzsekkel való összehasonlítására terjedtek ki.

### **EREDMÉNYEK**

#### **Bakteriofágok gyűjtése és izolálása**

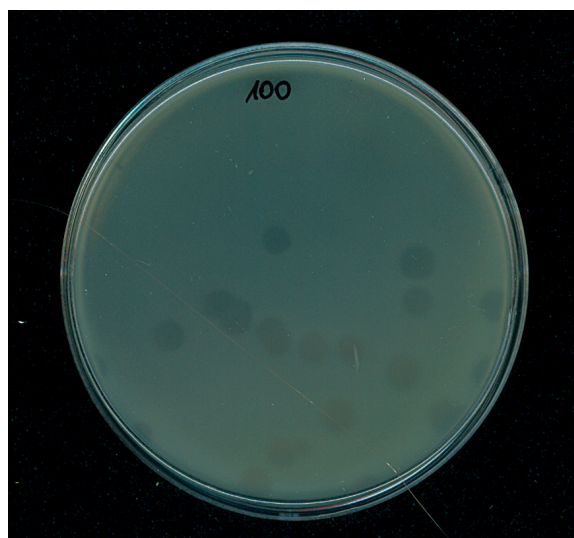
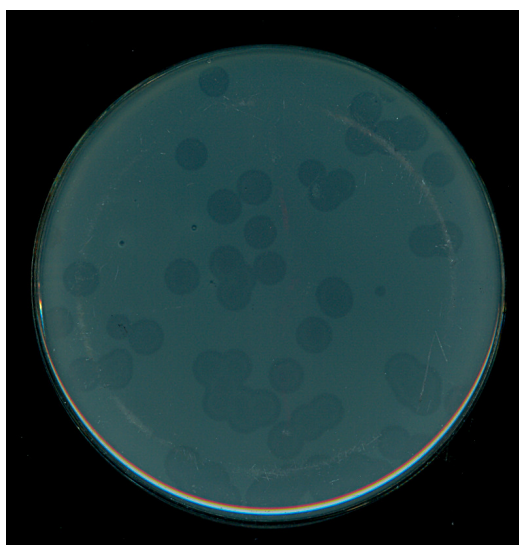
2006 óta végzünk bakteriofág izolálást Magyarország különböző területeiről gyűjtött alma, körte és birs fák erwiniás tüneteket mutató növényi részeiből. Jelenleg 25 fág izolátummal rendelkezünk, amelyből 16 izolátumot vizsgáltunk teljes körűen. A fágok izolálásához egyszerre több különböző - Dr. Németh József és Dr. Süle Sándor által Magyarországról izolált - *E. amylovora* törzset használtunk. Az összehasonlító vizsgálatokhoz az Amerikai Egyesült Államokból származó fág törzseket használtunk ( $\Phi$ Ea1h,  $\Phi$ Ea100,  $\Phi$ Ea104,  $\Phi$ Ea116), amelyeket Klaus Geider professzor úr (Julius Kühn Institute, Dossenheim, Németország) bocsátott rendelkezésünkre.

#### **Plakkmorfológia**

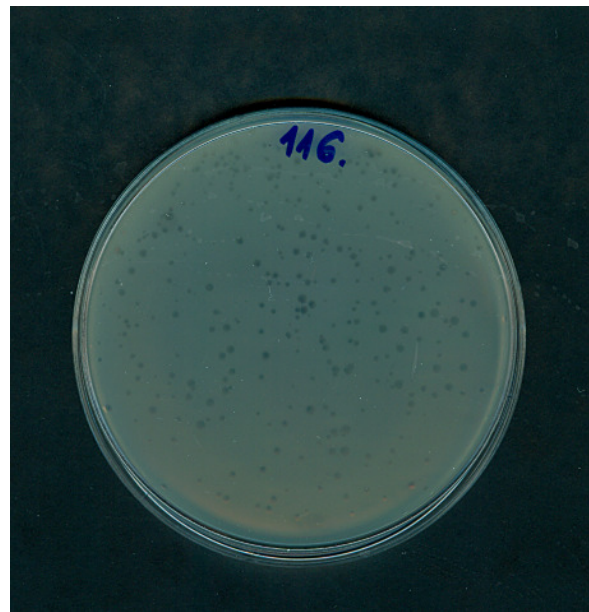
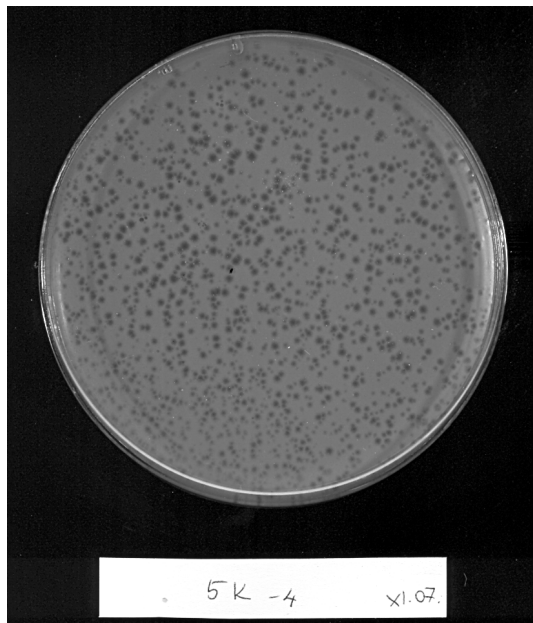
Az izolált bakteriofág izolátumokat a részletes munkatervben leírt módon tisztítottuk. Ezt követően megfigyeltük, hogy a felső, indikátor baktériumot tartalmazó lágyagar rétegen milyen morfológiájú tarfoltokat (plakkokat) képeznek. A vizsgálathoz az EaCFBP1430 számú francia törzset használtuk, amelynek profág tartalmát e vizsgálatokat megelőzően Mitomycines módszerrel ellenőriztük. Az izolált bakteriofágokat, a baktériumot tartalmazó agarlemezen kialakult plakk alakja, tisztasága és mérete alapján jellemeztük (1. táblázat). A különböző bakteriofág izolátumok eltérő méretű, 0,5-7,5mm nagyságú plakkokat képeztek a tesztbaktériumot tartalmazó agarlemezen. A magyar bakteriofág izolátumok közül a legkisebb plakkokat a H5K fág törzs képezi, bár plakkjai alig kisebbek a  $\Phi$ Ea116-os amerikai fágétól (1-2. ábra). Izolátumaink közül a legnagyobb plakkot a H7B és a H6/1 képez, míg az amerikai bakteriofágok közül a legnagyobb plakkjai a  $\Phi$ Ea100-as törzsnek vannak, azonban a H7B fág plakkja körüli sáv szélesebb, mint az amerikai fágé, ami nagyobb lítikus enzimaktivitásra utal.

**1. táblázat A plakkok jellemzői.**

Phage strain	Diameter of plaque (mm)	Width of halo (mm)
H1A	3,0-5,0	1,0-2,0
H1B	2,0-3,0	0-1,0
H2A	0,75-1,5	0,1-0,3
H2B	4,0-5,0	1,0-1,1
H4A	2,0-3,0	0,5-1,0
H4B	2,0-4,0	1,5-2,0
H5K	0,5-0,75	0,2-0,4
H5A	3,0-4,0	0,8-2,0
H5B	2,0-4,0	0,8-2,0
H7A	2,0-3,0	1,0-2,0
H7B	4,0-5,0	1,5-5,0
H6	2,0-4,0	0-1,0
H6/1	7,0-7,1	1,5-2,0
H8	2,0-4,0	0,8-1,0
H8N	6,0-6,1	1,8-2,0
H9K	1,5-5,0	1,0-2,0
H9N	5,0-7,0	1-2
H10K	0,5-0,6	1,0-1,2
H10	2,0-5,0	1,0-2,0
H11	1,0-5,0	1,0-1,5
H12N	1,0-1,2	0
H12	3,0-5,0	1,0-2,0
ΦEa1h	2,0-3,0	0,5
ΦEa100	3,0-7,0	0,5-3,0
ΦEa104	2,0-3,0	0
ΦEa116	1,0-2,0	0



**1. ábra A H7B (balra) és a ΦEa100 (jobbra) plakkjai LB táptalajon.**



2. ábra A H5K és a  $\Phi$ Ea116 plakkjai LB táptalajon.

### Gazdakör vizsgálat

A fágok gazdakörének vizsgálata több aspektusból is fontos. Egyrészt a fágok gazdaköre az adott fág törzs meghatározó jellemzője. Másrészt ez az első olyan vizsgálat, amely során a biológiai védekezés cél organizmusa, jelen esetben az *E. amylovora*-ra specifikus fágok elsődleges szelekciója történik. E teszt során kiválaszthatjuk a vizsgált fágok közül azt, amely a legtöbb *E. amylovora* törzset képes volt lizálni, tehát az adott baktériumgyepen tiszta plakkot képzett, míg más nem cél baktériumon nem képzett plakkokat. Az ilyen, lítikus fág perspektivikus lehet biológiai védekezés szempontjából. A baktériumrétegen homályos, vagy zavaros plakkot képező fág, az ún. lizogén fág, ezek használata a biológiai védekezés során nem ajánlatos, sőt kerülendő.

Tesztorganizmusként 27 magyar és 8 külföldi *E. amylovora* törzset, 4 más *Erwinia* fajt, 6 *Pantoea agglomerans* törzset és 10 más növényi kórokozó baktérium fajt használtunk. A tesztbaktériumok fogékonyságát az indikátor baktériumot tartalmazó felső agar rétegen kialakult plakkok nagysága és tisztasága alapján háromfokozatú skálával jellemeztük (2-4 táblázat).

A vizsgálat eredményeként elmondható, hogy a magyar fágok szélesebb gazdakörrel rendelkeznek, mint az amerikai fágok. A vizsgált fágok közül 5 magyar és 1 amerikai fág bizonyult *Erwinia* specifikusnak, mivel ezek - az *Erwinia tasmaniensis* kivételével - lizálták az összes vizsgált *Erwinia* törzset, míg más, az *Erwinia*val nem közeli rokon patogén baktériumokkal szemben nem bizonyultak patogénnek. A gazdakör vizsgálatokat kiterjesztettük az *E. amylovora*val közeli rokon, de nem patogén baktériumokra is, azzal a céllal, hogy a bakteriofágok felszaporításához és a védendő növény felületére való kijuttatáshoz megtaláljuk a legmegfelelőbb organizmust. A kísérletben szereplő baktériumok közül a növényekre károsító hatással nem rendelkező *Erwinia billingiae* és a *Pantoea agglomerans* MB96 volt a legfogékonyabb a vizsgált fágokkal szemben. Gazdakör vizsgálatuk alapján a hazai fágok közül az 1B, 2A, 2B, 4A, 7A, 7B volt a leghatékonyabb, míg az amerikai fágok közül a  $\Phi$ Ea116-os lizálta a legtöbb tesztelt törzset.

**2. táblázat Különböző *Erwinia amylovora* törzsek és *Erwinia* fajok fágokkal szembeni fogékonysága**

<i>E. amylovora</i> törzsek (EA) /fágok	H1A	H1B	H2A	H2B	H4A	H4B	H5A	H5B	H7A	H7B	H6	H8	H9	H10	H11	H12	ΦEa Ea1h	ΦEa 100	ΦEa 104	ΦEa 116
EA HU1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 3	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 4	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 6	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 7	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 8	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 10	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 11	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 12	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 13	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 14	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 15	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EA HU 17	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
EA HU 18	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EaHU 19	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EaHU 20	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EaHU 21	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EaHU 22	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EaHU 24	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EaHU 25	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EaHU 26	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EaHU 27	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

<b>EaHU 28</b>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>EaHU 29</b>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>EaHU 30</b>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>EaHU 31</b>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Ea 1/79 del 100</b>	-	++	++	++	++	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++
<b>Ea DC502</b>	-	++	++	++	+	-	-	-	++	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++
<b>Ea/Oregon</b>	-	++	++	++	++	+	-	-	++	++	-	+	++	-	-	-	-	-	+	++
<b>Ea DoD505</b>	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+
<b>Ea RW</b>	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+
<b>Ea Sm</b>	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+
<b>Ea CFDP 1430</b>	+	++	++	+	++	+	+	+	++	++	+	+	++	+	+	+	+	+	+	++
<b>Ea63/05</b>	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+
<i>Erwinia billingiae</i> 661.	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	+	+
<i>Erwinia persicae</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erwinia rhapontici</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et.1. <i>pEa102</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

A magyar *Erwinia amylovora* törzsek mindegyike fogékony volt a fág izolátumokkal szemben függetlenül a fágok származásától. A külföldi *E. amylovora* törzsek közül a legfogékonyabbnak az *Ea DoD505* jelzésű német törzs bizonyult. Az egyéb erwinia fajok közül az *Erwinia billingiae* volt a legfogékonyabb. Csak az amerikai ΦEa1h lizálta az *Erwinia tasmaniensis*t. A *Pantoea* fajok szintén fogékonyak voltak a fágok többségére, kivéve a *Pantoea agglomerans* C9-1, amit a H4B, ΦEa1h, Φ100 és a Φ116 nem volt képes lizálni. A vizsgált egyéb kórokozó baktériumok közül a *Pantoea citrii*-n és a két *Pantoea stewartii ssp stewartii* törzsön kívül a *Pseudomonas syringae* H9-es törzs volt fogékony a fágokra. Közülük a legfogékonyabbnak a *Pantoea stewartii ssp stewartii* DC283 törzs bizonyult.

/Schwarczinger I; Müller I; Süle S; Geider K: *Bacteriophages of Erwinia amylovora: host range and biological control*, COST 864: Combining traditional and advanced strategies for plant protection in pome fruit growing, 3-5 June, 2009, Valencia, Spain, p. 50., 2009/

**3. táblázat Különböző *Pantoea agglomerans* törzsek és más *Pantoea* fajok fágokkal szembeni fogékonysága**

<i>Pantoea</i> fajok/fágok	H1A	H1B	H2A	H2B	H4A	H4B	H5A	H5B	H7A	H7B	H6	H8	H9	H10	H11	H12	ΦEa Ea1h	ΦEa 100	ΦEa 104	ΦEa 116
<i>Pantoea agglomerans</i> NB2	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++	+	++	++	+	+	++	++	++	++
<i>Pantoea agglomerans</i> MB96	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Pantoea agglomerans</i> JCM 1236	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	+	+	+	+	++	++	+	+
<i>Pantoea agglomerans</i> hu82245	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++
<i>Pantoea agglomerans</i> C9-1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	-	-	+	-
<i>Pantoea agglomerans</i> hu82647	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	++	+	+	+	++	++	++	++	++
<i>Pantoea citriae</i> CCM 4312	++	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++
<i>Pantoea stewartii</i> ssp <i>stewartii</i> DC283	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+
<i>Pantoea stewartii</i> ssp. <i>stewartii</i> SW2	-	++	++	++	+	+	-	-	++	++	+	+	++	+	+	+	+	++	++	++

**4. táblázat Kórokozó baktériumok fágokkal szembeni fogékonysága**

	H1A	H1B	H2A	H2B	H4A	H4B	H5A	H5B	H7A	H7B	H6	H8	H9	H10	H11	H12	ΦEa1h	Φ100	Φ104	Φ116
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Agrobacterium vitis</i> F2/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> DH5a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>zinniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas cichoriae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> H9	-	-	++	-	-	-	++	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++
<i>Pectobacterium carotovorum</i> ssp. <i>carotovorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## Fágtipizálás

Nemcsak a fágok jellemezhetők gazdakörük alapján, hanem az egyes baktérium törzsek is jellemezhetők fágokkal szembeni fogékonyaságuk alapján. Az orvostudományban a fágok ezen tulajdonságát régóta használják járványtani megfigyelésekre, egyes baktérium törzsek azonosítására, szelektálására, ezt nevezik fágtipizálásnak, fágtípus-meghatározásnak. E vizsgálathoz használt fágok, az ún. típusfágok. A típusfágokkal kapott plakkok morfológiai jellemzői alapján állapítható meg egy baktérium fág profilja, melyet többnyire szám vagy betűjellel történt kódolással adnak meg. Az 5. táblázatban 31 különböző *E. amylovora* törzs négy általunk kiválasztott típusfággal felállított fág profilját láthatjuk. Megelőző vizsgálatink eredményei alapján négy fág (H1A, H5A, H4B és a H8 jelzésű) izolátumot választottunk ki típusfágként. A fág érzékenység meghatározására itt is a dupla agarlemez módszert használtuk. Az izolátumok bakteriofág érzékenységére a plakk morfológiából következtettünk, attól függően, hogy tiszta, vagy zavaros plakkot képeztek, vagy egyáltalán nem képeztek plakkot. A Corvinus Egyetem Gyümölcsstermő Növények Tanszékének kutatóival együttműködve vizsgálatunk célja az volt, hogy különböző földrajzi helyekről, eltérő gazdanövényekről származó *E. amylovora* törzseket jellemezzük bakteriofágokkal szembeni érzékenységük alapján. A vizsgált baktérium izolátumokat a rajtuk képzett plakk típusok alapján 12 csoportba különítettük el. A legérzékenyebbnek a fágokkal szemben az Ea96-os törzs bizonyult, melyen mind a négy tesztelt fág tiszta plakkot képzett. Három fággal szemben volt teljesen fogékony az Ea15-ös és az Ea70-es törzs. Közöttük csak az volt a különbség, hogy míg az Ea15-ös törzs a H8-as fág képzett homályos plakkokat, addig az Ea70-es törzs a H5A fággal szemben nem volt annyira érzékeny. Ezek a baktérium törzsek a két fággal szembeni különböző érzékenysége alkalmassá teheti e két baktérium törzs egymástól való gyors elkülönítését. A legkevésbé fogékony vizsgált *E. amylovora* törzs az Ea 67-es, amelyen csak a H1A és a H5A fág tudott tiszta plakkot képezni, míg a másik két fággal szemben rezisztensnek bizonyult. A vizsgált törzsek között külön csoportot képvisel az Ukrajnában izolált Ea 96-os törzs, amely a vizsgált baktériumok közül egyedülállóan az összes fággal szemben fogékonynak bizonyult. Az USA-ból származó Ea 47, a sárga csoport magyar tagjához hasonlóan, csak a H5A-ra volt fogékony. A másik 3 fág csak homályos plakkot képzett e baktérium rétegen. A vizsgálatba bevont ausztriai, romániai és szerb (Eam9) törzsek mindannyian a világoszöld csoportba tartoznak, mivel mind a négy fág zavaros plakkot képzett rajtuk. Az Eam10 szintén szerb törzs a H1A és a H5A fágokra volt fogékony, míg a másik két fággal homályos plakkot képzett. A hazai izolátumok a különböző fágokkal eltérően viselkedtek. A vizsgált négy fág közül a leghatékonyabbnak a H5A fág bizonyult, amely a legtöbb Ea törzset képes volt teljesen lizálni, és legtöbbjükön – még a legellenállóbb Ea 67-es törzsön is szép, tiszta plakkot képzett. A vizsgálatnál használt fágok alkalmasak a csillaggal jelzett négy Ea törzs fágtipizálással való elkülönítésére. Ugyancsak alkalmasak e fágok a különböző színekkel jelzett Ea csoportok differenciálására.

/Végh A; Palkovics L; Tóth M; Schwarzwinger I; Hevesi M: *Characterization of Erwinia amylovora isolates by colony type and bacteriophage sensitivity*, 12th International Workshop on Fire Blight. Warsaw, Poland, August 16-20, Acta Horticulturae, 2010

Végh A; Horváth B; Hevesi M; Schwarzwinger I; Palkovics L.: *Bakteriofágok hatásának vizsgálata Erwinia amylovora izolátumokra*, Növényvédelem 48 (12): 559-567, 2012

Végh A; Horváth B; Schwarzwinger I; Hevesi M; Palkovics L: *A bakteriofágok jelentősége az Erwinia amylovora elleni biológiai védekezésben*, Növényvédelmi Tudományos Napok, p.99, 2013/

5. táblázat Különböző *E. amyovora* törzsek fág érzékenysége (a- tiszta plakk, b- homályos plakk, c- nincs plakk)- (A színek ugyanazon típusba tartozó törzseket jelez).

<i>E. amyovora</i> törzsek/fágok	H1A	H4B	H5A	H8
Ea96*	a	a	a	a
Ea15*	a	a	a	b
Ea70*	a	a	b	a
Ea67 *	a	c	a	c
Ea29	b	b	b	a
Ea12	a	b	b	b
Ea10	a	b	a	b
Ea16	a	b	a	b
Ea22	a	b	a	b
Ea80	a	b	a	b
Ea95	a	b	a	b
Eam6	a	b	a	b
Eam8	a	b	a	b
Eam10	a	b	a	b
Ea19	b	b	a	b
Ea47	b	b	a	b
Ea50	b	b	a	a
Ea88	b	b	a	a
Ea31	b	a	b	a
Ea60	b	a	b	a
Ea26	b	a	b	b
Eam2	b	a	b	b
Eam4	b	a	b	b
Ea1	b	b	b	b
Ea6	b	b	b	b
Ea329/98	b	b	b	b
Ea-PlumBo1	b	b	b	b
Eam1	b	b	b	b
Eam5	b	b	b	b
Eam7	b	b	b	b
Eam9	b	b	b	b

***Erwinia amylovora* bakteriofágok morfológiai vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal**

A bakteriofágok morfológiai jellemzőit transzmissziós elektronmikroszkóppal, az MTA Kémiai Kutatóközpontjában Dr. Szabó László vezetésével vizsgáltuk (6. táblázat, 3. ábra). A vizsgált 19 izolátum közül 14 a *Myoviridae* család tagjaira jellemző ikozaéder alakú fejjel és hosszú, összehúzódó farki résszel rendelkezett. A másik 5 izolátumra, kisebb, izometrikus fej és rövid, széles farki része volt jellemző, ezért ezeket a *Podoviridae* családba soroltuk. A magyar fágok közül a legkisebb a H11-es jelzésű fág, ami kisebb a szakirodalomból ismert német és az amerikai fágoknál (a német és amerikai fágok adatait a 7. táblázat tartalmazza). A legnagyobb a H4A, amely viszont meghaladja méreteit tekintve az előbb említett külföldi törzseket. Eddig Magyarországról



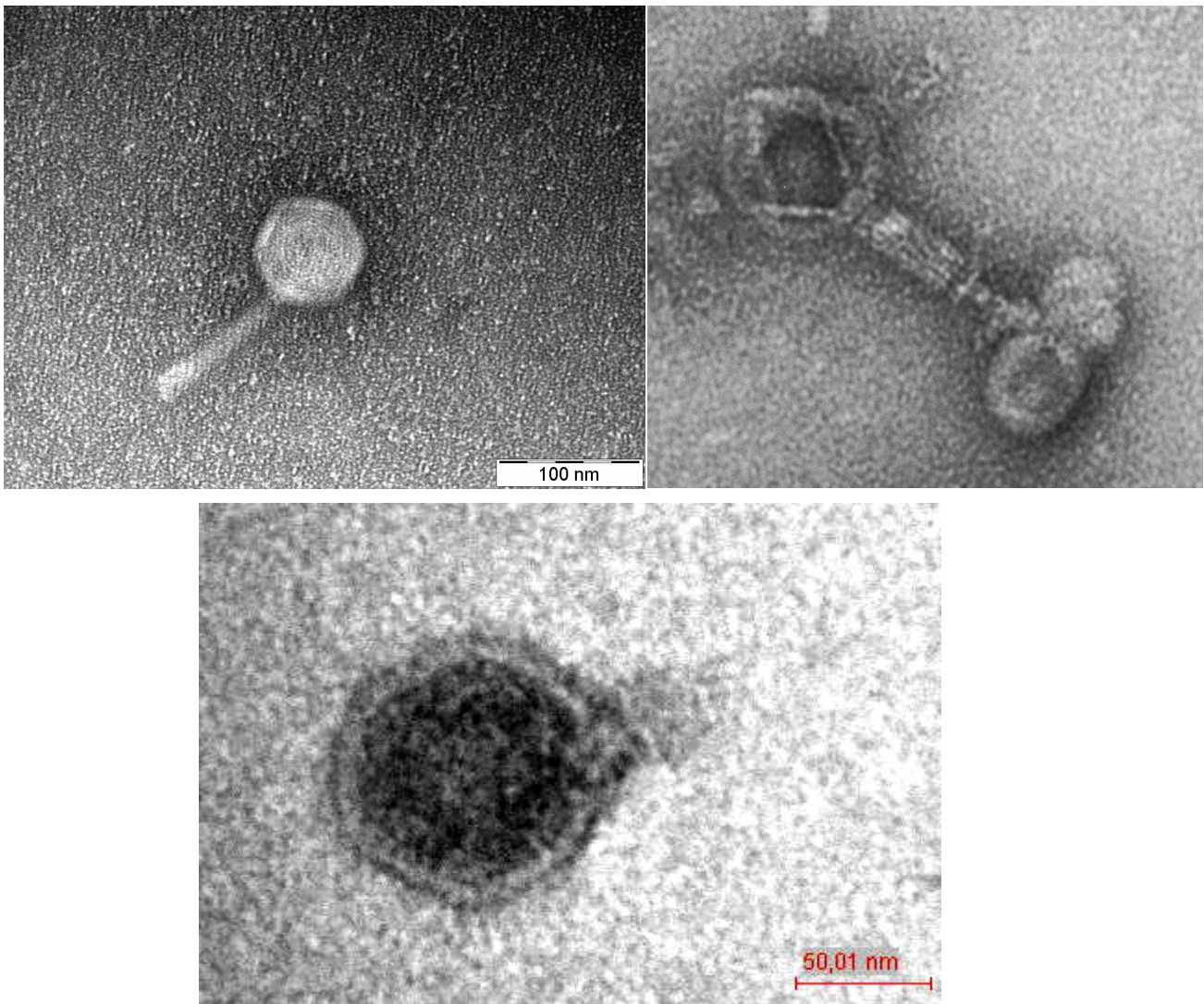
egy *E. amylovora* fágot írtak le ( $\Phi$ EaH2), ami a *Syphoviridae* családba tartozik (Dömötör *et al.*, 2012)

**6. Táblázat Magyar *Erwinia amylovora* fágok morfológiai jellemzői (Kerekített adatok)**

Morphology	Phage	Head diameter, mean $\pm$ SD (nm)	Tail length, mean $\pm$ SD (nm)	Tail width, mean $\pm$ SD (nm)
<i>Podoviridae</i> (Icosahedral head with short tail)	H11	55 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1
	H10	56 $\pm$ 4	9 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2
	H9N	61 $\pm$ 7	9 $\pm$ 3	12 $\pm$ 3
	H8N	63 $\pm$ 8	8 $\pm$ 4	10 $\pm$ 4
	H1B	73 $\pm$ 5	94 $\pm$ 17	17 $\pm$ 3
<i>Myoviridae</i> (Isometric head with contractile long tail)	H2B	57 $\pm$ 7	60 $\pm$ 39	18 $\pm$ 5
	H6	64 $\pm$ 3	90 $\pm$ 8	10 $\pm$ 0.2
	H10K	67 $\pm$ 7	103 $\pm$ 18	14 $\pm$ 3
	H9K	69 $\pm$ 5	96 $\pm$ 14	17 $\pm$ 3
	H2A	69 $\pm$ 7	107 $\pm$ 11	13,7 $\pm$ 1,0
	H4B	70 $\pm$ 9	98 $\pm$ 18	15 $\pm$ 4
	H1A	70 $\pm$ 3	117 $\pm$ 4	15 $\pm$ 2
	H7A	71 $\pm$ 8	99 $\pm$ 7	17 $\pm$ 3
	H12	72 $\pm$ 4	103 $\pm$ 4	15 $\pm$ 1
	H5A	72 $\pm$ 3	110 $\pm$ 5	13 $\pm$ 1
	H5B	74 $\pm$ 5	104 $\pm$ 9	14 $\pm$ 3
	H8	75 $\pm$ 3	113 $\pm$ 4	18 $\pm$ 2
	H7B	77 $\pm$ 5	108 $\pm$ 6	17 $\pm$ 1
H4A	78 $\pm$ 5	108 $\pm$ 10	17 $\pm$ 2	

**7. táblázat Német és amerikai *Erwinia amylovora* fágok morfológiai jellemzői (Müller *et al.*, 2011) (Kerekített adatok).**

Morphology	Phage	Head diameter, mean $\pm$ SD, (nm)	Tail length, mean $\pm$ SD, (nm)	Tail width, mean $\pm$ SD, (nm)
<i>Podoviridae</i>	$\Phi$ Ea1h	60 + 2		
	$\Phi$ Ea100	61 + 2		
	$\Phi$ EaJ08T	60 $\pm$ 1		
	$\Phi$ EaK08T	60 $\pm$ 3		
<i>Myoviridae</i>	$\Phi$ Ea104	72 $\pm$ 2	114 $\pm$ 3	18 $\pm$ 2
	$\Phi$ Ea116	73 $\pm$ 2	115 $\pm$ 2	20 $\pm$ 1
	$\Phi$ EaJ08C	73 $\pm$ 3	116 $\pm$ 5	22 $\pm$ 2



**3. ábra Fágok transzmissziós elektronmikroszkópi képe.**

Bal oldalon a H4A, jobb oldalon a H4B fág látható. Ez utóbbinál jól megfigyelhető a *Myoviridae* családra jellemző összehúzóó farok. Az alsó képen a *Podoviridae* családba tartozó, rövid farokkal rendelkező H11-es fág látható.

### **Molekuláris biológiai (PCR, RFLP) vizsgálatok**

A magyar fág izolátumok molekuláris biológiai vizsgálatához nemzetközi gén adatbázisokból ismert *E. amylovora* fágok bázissorrendje alapján, e fágok bizonyos DNS szakaszaira specifikus indító szekvenciákat terveztünk és PCR vizsgálattal valószínűsítettük e gének meglétét, vagy hiányát a magyar fágokban. Munkánk során 12 különböző DNS szakaszra specifikus primer párt használtunk (8. táblázat). A 9. táblázatban szereplő első három primer pár az amerikai  $\Phi$ Ea1h fágban jelenlévő 3 különböző enzimet kódoló génre specifikus: ezek az enzimek a holin, a lizozim és a EPS-depolimeráz (dpo). A depolimerázra specifikus primerek a szakirodalmi adatoknak megfelelően 622bp nagyságú fragmentet amplifikáltak 9 magyar fág izolátumban, amelyek szekvenciáit összehasonlítottuk a génbankban lévő  $\Phi$ Ea1h fág dpo génjének szekvenciájával. A magyar származású fágok depolimeráz kódoló génjének bázissorrendje 98-99%-ban egyezett meg a  $\Phi$ Ea1h depolimeráz génjének bázissorrendjével. A másik három primer pár az  $\Phi$ Ea116 fág 3 különböző génszakaszára specifikus, amelyek egy peptidáz, egy termináz és egy Mu-szerű profág

protein gént kódolnak. A táblázatban szereplő első hat primert Geider professzor tervezte az adott szakaszokra. A *PEa1-A/B* primerpár Gill és et al. (2003) tervezték a  $\Phi$ Ea1h-ra. A *PhiEa104-F/R* primer párt a  $\Phi$ Ea104-re terveztük. A *PhiEa1h cap-F/R* a  $\Phi$ Ea1h, míg a *H2 cap-F/R* a  $\Phi$ Ea2H kapszid proteint kódoló génjére specifikus.

### 8. táblázat. A PCR vizsgálatok és a használt primerek adatai

Vizsgált DNS szakasz	Primer	Primer szekvencia	Várható termék hossz (bp)	PCR program
<i>EPS depolimeráz</i>	<i>DPO-F</i>	5' CTCTGGACATACCGTGGAAGT 3'	622	MM2
	<i>DPO-R</i>	5' TCATCAGCGGTGGTTGTGTC 3'		
<i>Holin</i>	<i>Hol-F</i>	5' GCTAACGGTGTCTCTCATA 3'	361	
	<i>Hol-R</i>	5' CAGTTGCCGCGTTCTTGTTT 3'		
<i>Lizozim</i>	<i>Liz-F</i>	5' GCTGGACTTCTGGTAGACTT 3'	537	
	<i>Liz-R</i>	5' GCTTGCTGGTAACTCCTGTA 3'		
<i>Termináz</i>	<i>Term-F</i>	5' GAAGCTGTGTAAGCCTCTGT 3'	1000	
	<i>Term-R</i>	5' GTG AGGCTGGTTCGTCAACT 3'		
<i>Peptidáz</i>	<i>Pept-F</i>	5' CAACTGTCCAAGACGGTGTA 3'	500	
	<i>Pept-R</i>	5' CAGAGATACCGCGAGAACTT 3'		
<i>Mu-szerű profág protein</i>	<i>Mu-F</i>	5' CCGAGGTAGTGAATGGCTAA 3'	750	
	<i>Mu-R</i>	5' CTCTGTCCAGAAGCCATGT 3'		
$\Phi$ Ea1h-ra tervezett	<i>PEa1-A</i>	5' AATGGGCACCGTAAGCAGT 3'	304	
	<i>PEa1-B</i>	5' TAATGGGTATGATAGAAGGCAGAC 3'		
$\Phi$ EaH2 <i>ams-F</i> -szerű régióra tervezett	<i>H2Ams-F</i>	5' AGCTGTCAAACCTTCAACGTGC 3'	609	
	<i>H2Ams-R</i>	5' TGACGTTCTTCACCGGACAG 3'		
<i>E. amylovora</i> <i>CFBP1430 ams-F</i> génjére tervezett	<i>EaAms-F-F</i>	5' CAGAAGATGACGGCGGCTAT 3'	677	
	<i>EaAms-F-R</i>	5' GCAGCGCGGTAAATTAAGCA 3'		
$\Phi$ Ea1h kapszidjára tervezett	<i>PhiEa1h cap-F</i>	5' GGTAGGCACCAATAGC 3'	474	
	<i>PhiEa1h cap-R</i>	5' CAGTTGAACGCAGTCC 3'		
$\Phi$ Ea2H kapszidjára tervezett	<i>H2 cap-F</i>	5' GTATTCTGAACGCGCTGCTG 3'	508	
	<i>H2 cap-R</i>	5' CAGTCCAGAGACTTGGCGTT 3'		
$\Phi$ Ea104 –re tervezett	<i>PhiEa104-F</i>	5' GGCTGCTGGCGCTCCTTACC 3'	665	
	<i>PhiEa104-R</i>	5' ATCAGGCCGTGCGCCAAGTC 3'		

#### Program MM2

95°C 1 min  
 94°C 30 sec  
 50°C 30 sec  
 72°C 1 min  
 Go to 2 35 times  
 72°C 5 min  
 4°C hold

#### Program: MM3

95°C 1 min  
 94°C 30 sec  
 57°C 30 sec  
 72°C 30 min  
 Go to 2 34 times  
 72°C 7 min  
 4°C hold

**9. táblázat: A PCR vizsgálatok eredménye.** Az azonos színek a PCR vizsgálat eredménye alapján egy csoportba sorolt fágokat jelölik. A feketével jelzett fágok nem tartoznak egy csoportba, de nagy hasonlóságot mutatnak a  $\Phi$ Ea116-tal. (nv: nem vizsgált)

Primer /fág	$\Phi$ Ea116	H1A	H1B	H2A	H2B	H10	H10K	H11	H12N	H5K	H7B	H12	$\Phi$ Ea104	H5B	H4B	H5A	H4A	H6	H9N	H8	H7A	H8N	H9K	$\Phi$ Ea1h	$\Phi$ Ea100
<i>DPO</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>Hol</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Liz</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Pept</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Term</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Mu</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>PEa1</i>	n v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	nv	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	nv
<i>EaAms-F</i>	n v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nv	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nv
<i>H2Ams-F</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>PhiEa1h cap</i>	n v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	nv
<i>H2 cap</i>	n v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nv
<i>PhiEa104</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nv	nv

A PCR vizsgálatok eredményeként a magyar fágokat 4 nagy csoportra osztottuk. Az első zölddel jelölt csoport tagjai az amerikai  $\Phi$ Ea116-hoz hasonlóan termináz, peptidáz, és Mu-szerű profág proteint kódoló gén pozitívak. Ettől a következő három fág a H5K, a H7B és a H12 csak egy-egy DNS szakasszal tér el. A kék és árnyalatival jelzett fágok nagyon hasonlítanak a  $\Phi$ Ea104-re, de még a legnagyobb azonosságot mutató H5B sem lehet azonos a  $\Phi$ Ea104-gyel, mivel az erre a fagra tervezett specifikus primerrel nem kaptunk jelet. A negyedik (piros) csoport tagjai az *E. amylovora* ams-F génjén kívül mindenre negatív eredményt adtak.

A múlt év végén az NCBI génybankban hozzáférhetővé vált egy magyar *E. amylovora* fág teljes genomjának szekvencia adata is ( $\Phi$ EaH2 NC 019929.1). Ez a törzs jelentősen eltér az eddig ismert *Erwinia amylovora* fágokétól, ezért fontosnak találtuk a saját fág izolátumaink e törzssel való molekuláris genetikai összehasonlítását is. Különösen izgalmas kérdés, hogy a mi izolátumaink tartalmazzák-e azt a DNS szakaszt, ami a Dömötör és munkatársai által izolált fágban benne van, és ami nagyfokú homológiát mutat az *E. amylovora* ams-F génjével. Ez a gén egy olyan fehérjét kódol, ami szükséges az *Erwinia amylovora* baktérium virulenciájában jelentős szerepet játszó amilovorán bioszintéziséhez. A szerzők e gén jelenléte miatt megfontolandónak tartják az általuk izolált törzs biológiai védekezésben való alkalmazását. Vizsgálatunkhoz először a  $\Phi$ EaH2 fág erre a DNS szakaszára terveztünk primer párt (*H2Ams-F/R*). A PCR vizsgálat azt mutatta, hogy a kérdéses szakasz egyik általunk izolált fágban sincs jelen. Ezt követően a baktérium ams-F génjére is terveztünk primer párt (*EaAms-F/R*), amelyre azonban mindegyik fág pozitív lett. Ugyanakkor a negatív kontrollként használt minta, a  $\Phi$ Ea1h is gyengén pozitív lett, ezért felmerült a

kontamináció lehetősége. A baktérium szennyeződés kizárása érdekében tervezzük, hogy az eredeti vad fág törzseket amilovorant nem termelő baktérium törzsben szaporítjuk fel, majd ezt követően ellenőrizzük e DNS szakasz jelenlétét és szekvenciáját.

A magyarországi fágok DNS mintázata az EcoRI enzimes hasítás után megegyezett egymással, de nem hasonlított egyik amerikai fág EcoRI enzimes hasítási mintázatához sem. Ugyanakkor e magyar fág izolátumok BglII restrikciós enzimmel való hasítás után eltérő DNS mintázatot adtak. A magyar fágok egyikét sem hasította a más, ismert *E. amylovora* bakteriofágok hasításához korábban sikeresen használt BamHI enzim. Eddigi vizsgálataink eredményeiből arra lehet következtetni, hogy az általunk izolált fágok nem azonosak az eddig ismert négy amerikai és a hazánkban leírt *E. amylovora* fágokkal.

### **Bakteriofágok hatásának vizsgálata**

A fágok *E. amylovora* baktériumra kifejtett hatását *in vitro* körülmények között folyadékkultúrában, e kórokozóra fogékony növények virágain, éretlen körte szeleteken és alma magoncokon vizsgáltuk.

#### **A H5B és a H6 fág hatásának vizsgálata**

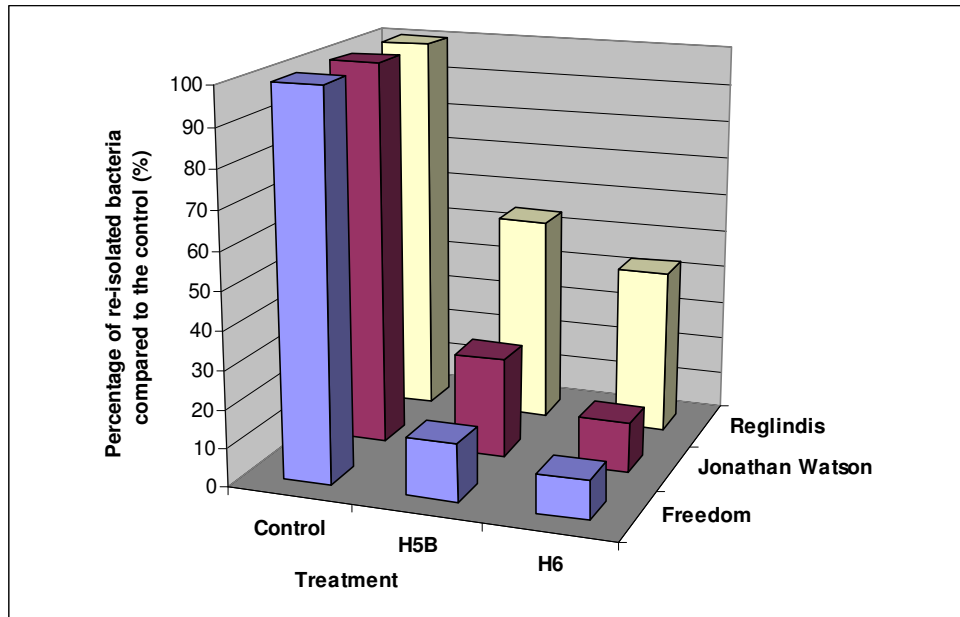
##### **- folyadékkultúrában**

A fágok (H4A, H5B, H6 és a H11) hatását a tesztbaktériummal (Ea1/79 Sm) együtt LB folyékony táptalajban, 24 órás rázatás után mért optikai sűrűség (OD) alapján értékeltük. Mind a négy vizsgált bakteriofág szignifikánsan, legalább 46%-al csökkentette a tesztbaktérium mennyiségét a kontrollhoz képest. A leghatékonyabbnak a H5B és a H6 fág izolátum bizonyult, amelyek 97%-al, ill. 83%-al csökkentették a tesztbaktérium optikai sűrűségét a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva.

##### **- különböző almafajták virágain**

E kísérlet eredményei alapján azzal a két fág izolátummal (H5B, H6), amelyek leghatékonyabban lizálták a tesztbaktériumot, további vizsgálatokat végeztünk olyan alma virágokon, amelyek különböző fogékonyságú alma fajtákról származtak (Jonathan Watson, Reglindis, Freedom). A vizsgálat célja annak tisztázása, hogy a bakteriofágok hatása függ-e a kezelt növény *E. amylovora*-val szembeni fogékonyságától. A levágott virágokat előbb a fág lizátumokkal kezeltük ( $10^{12}$  PFU/ml, majd mesterségesen inokuláltuk egy sztreptomycin rezisztens természetes mutáns *E. amylovora* törzs (Ea1/79 Sm) egyéjszakás rázatott kultúrájával ( $5 \times 10^5$  CFU/ml). Négy nap elteltével sztreptomycin tartamú táptalajra szélesztve visszaizoláltuk a virágokról az életben maradt kórokozó baktériumokat. A fágok hatását a visszaizolált kolóniák száma alapján értékeltük. Eredményeink azt mutatták, hogy a fágokkal történt kezelések mindkét fág esetében és mindhárom almafajtán szignifikánsan csökkentették a baktériumszámot (4. ábra.). A legjobb hatást a három fajta közül a mérsékelten rezisztens Freedom fajtán tapasztaltuk, ahol a fágok jelentősen, 85-90%-al csökkentették a visszaizolált baktériumok számát. Tehát e fágok használata különösen perspektivikus lehet a mérsékelten rezisztens alma fajtákon.

/Schwarczinger I; Kiss M; Tóth M; Hevesi M; Süle S: Control of Fire Blight by Bacteriophages on Apple Flowers., Proceedings of the 12th International Workshop on Fire Blight. Warsaw, Poland, August 16-20, 2010. (Eds.): P. Sobiczewski et al. Acta Hort. 896, ISHS 2011. 457-462, 2011/



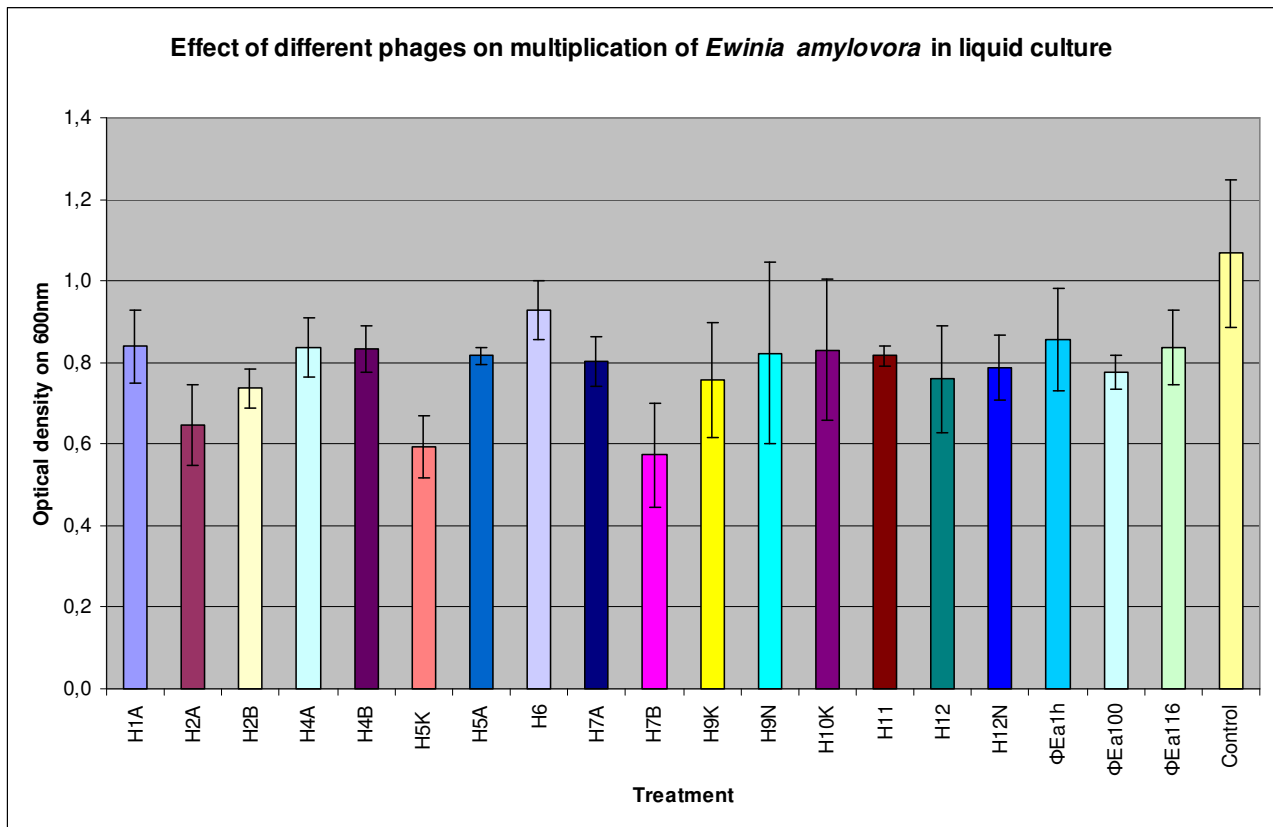
4. ábra A H5B és a H6 fág hatása az *Erwinia amylovorara* különböző fogékonyságú alma fajtákon

#### Egy-egy bakteriofág, illetve ezek kombinációjának vizsgálata

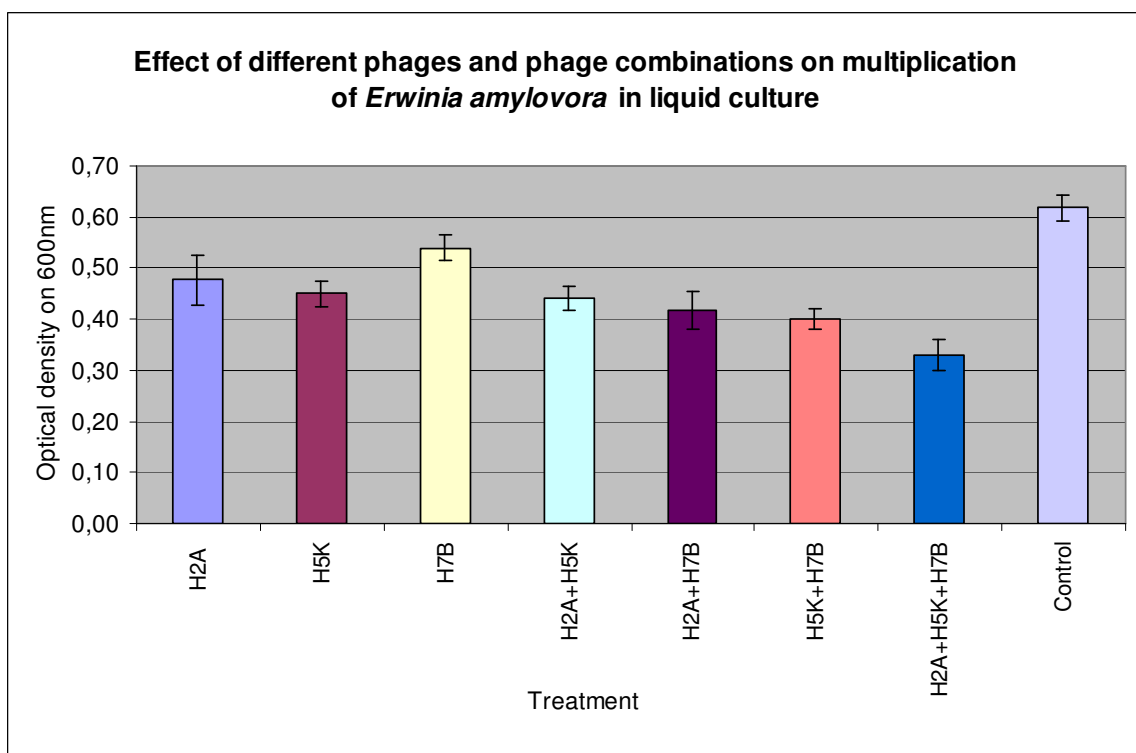
##### - Különböző alma fajták virágain

A vizsgálat célja, egy-egy bakteriofág és ezek kombinációjának baktériumszám csökkentő hatásának összehasonlítása. 16 magyar és 4 amerikai fág hatását teszteltük folyadékkultúrában, 36 órás rázatást követően és a folyékony kultúra fénytörése (OD) alapján értékeltük a kísérletet (5-6. ábra). Ezt követően a legjobb hatást nyújtó bakteriofág kombinációt (H2A + H5K + H7B) teszteltük különböző alma fajták és egy birsalma ('Royal Gala', 'Golden', 'Idared', 'Pinova', Berecki birs) virágain (7. ábra). A kezelés módszere annyiban tért el az előzőtől, hogy a fágizátumot és a baktériumszuszpenziót egyszerre juttattuk ki a virágok bibéire. Mindegyik almafajtán 20-20 virágot használtunk kezelésenként, ahol a bakteriofágokkal vagy külön-külön, vagy mindhárom fággal egyszerre kezeltük a virágokat. A fertőzést követő négy nap elteltével, antibiotikum tartalmú táptalajon szélesztve izoláltuk vissza a kórokozót, majd a kialakult telepek száma alapján értékeltük a kísérletet. Mind az 5 almafajta esetén a fágos kezelés csökkentette a visszaizolált baktérium számát. Az Idaredet kivéve minden fajtán a fágkombináció eredményezte a legjobb hatást. A fágkombináció a legeredményesebb az *E. amylovorával* szemben a különösen fogékony 'Royal Gala' fajtán volt, ahol a kezelés 95%-al, szignifikánsan csökkentette a virágokról visszaizolált baktérium számát, a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva.

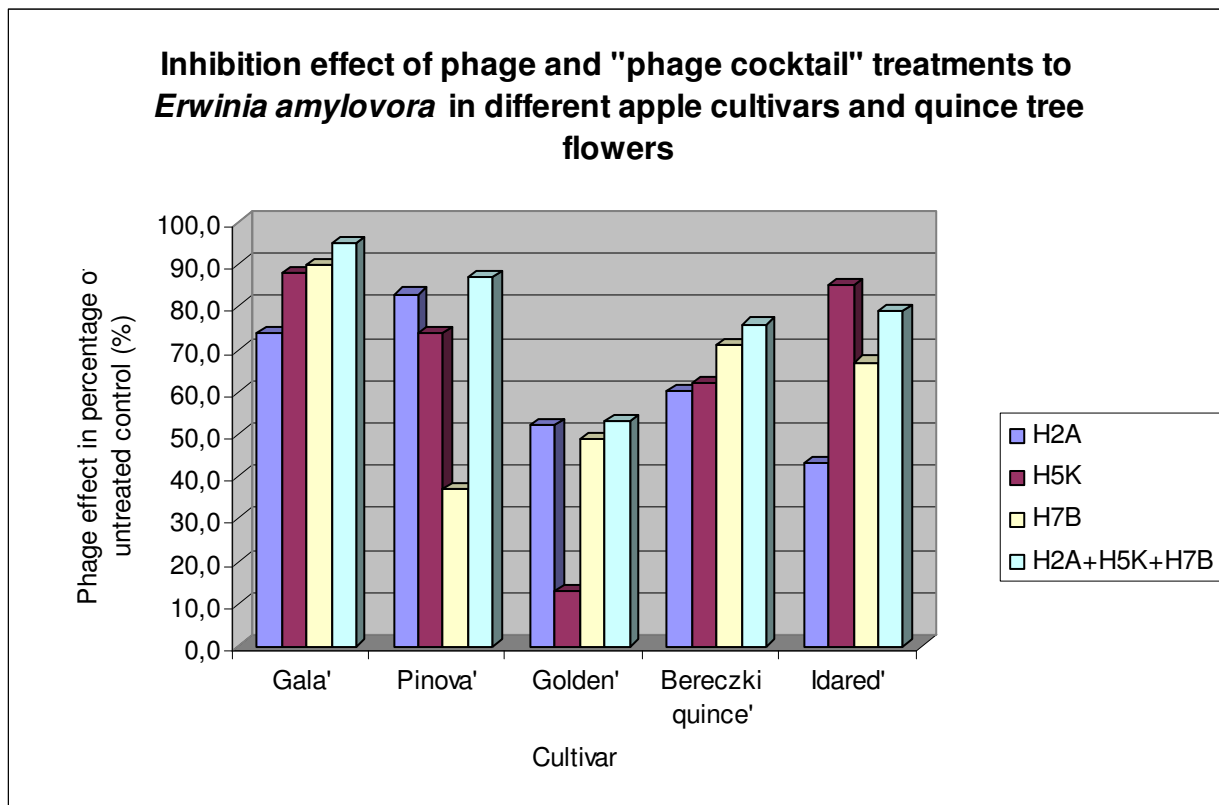
/Schwarczinger I; Kolozsváriné Nagy J; Süle S; Geider K. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in Hungary. Előkészületben lévő közlemény/



5. ábra Fágok hatása az *Erwinia amylovora* szaporodására folyadékkultúrában. (Az ábrákon három ismétlés átlaga és szórása látható).



6. ábra Fágok és fágkombinációk hatásának összehasonlítása

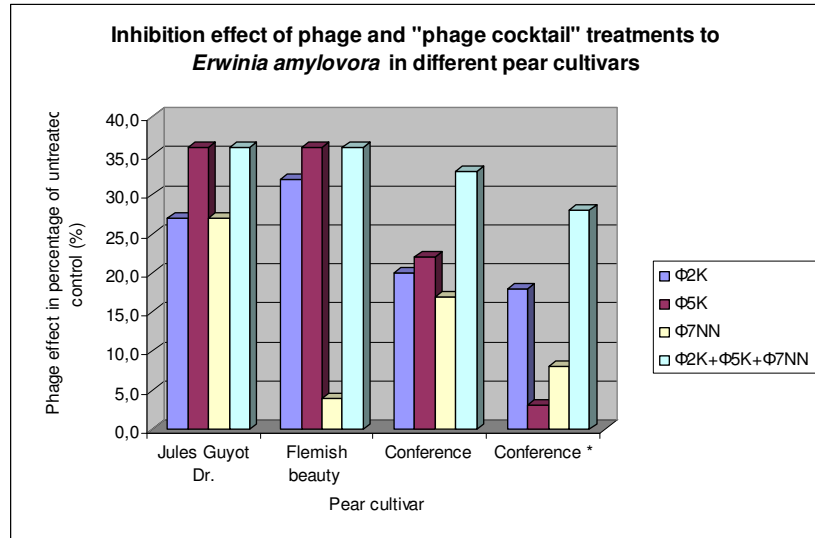


**7. ábra Fágok és kombinációjuk hatása az *E. amylovora*ra különböző fogékonyságú alma és birs fák virágain**

**- Zöld körteszeleten**

Két fogékony ('Conference', 'Dr. Gulyot Gyula') és egy rezisztens körte fajta ('Erdei Vajkörte'='Flemish beauty') éretlen körteszeletein vizsgáltuk az előbb említett fág izolátumok (H2A + H5K +H7B) baktérium visszaszorító hatását. A virágos kísérlethez hasonlóan ebben az esetben is külön-külön és kombinációban is alkalmaztuk a fágokat. A fertőzéshez párhuzamosan az Ea1/79 vad típusú erwinia törzset és ennek sztreptomycin rezisztens spontán mutáns törzsét az Ea 1/79 Sm-et használtuk azért, hogy az *E. amylovora* elleni védekezési kísérletekben „gold standard”-ként használt sztreptomycin szulfát hatásával is össze tudjuk hasonlítani a fágok hatását. A kísérletben a körte szeleteket fágizátum szuszpenziójába áztattuk, majd fertőztük a kórokozó baktériummal. A kezelés hatását az okozott tünetek súlyossága alapján felállított bonitálási skála alapján értékeltük (8. ábra). A két erwinia törzs által okozott tünetek súlyossága nem különbözött szignifikánsan egymástól. A legsúlyosabb tüneteket a vártnak megfelelően a fogékony 'Conference' fajtán, legenyhébbeket a rezisztens 'Erdei Vajkörtén' idéztek elő. A kezelések sokkal kevésbé voltak hatásosak a körte szeleteken, mint a virágokon. A kombinációk csak 18-49%-al csökkentették a tüneteket. A fágok szignifikánsan csökkentették a tüneteket az erwiniás kontrollhoz viszonyítva, de a kezelések nem különböztek szignifikánsan egymástól és a fágkombinációk hatása sem különbözött szignifikánsan az egyéb kezelésektől. A fágok baktériumelimináló hatása messze elmaradt a sztreptomycin szulfátétól, mert a sztreptomocinnal kezelt körteszeletek mindegyike tünetmentes maradt. A fágkombináció a leghatásosabb a rezisztens 'Erdei Vajkörtén' volt (33% az Ea 1/79, 49% az Ea 1/79 Sm). A fágok hatékonysága nemcsak a növény fogékonyságától, hanem a kórokozó fággal szembeni érzékenységétől is függ. Ezt az is bizonyítja, hogy e fágokra fogékonyabb erwinia törzs (az Ea 1/79 Sm) hatását e fágkombináció sokkal jobban (24-49%-al) vissza tudta szorítani, mint a kevésbé fogékony vad törzsét (18-33%).





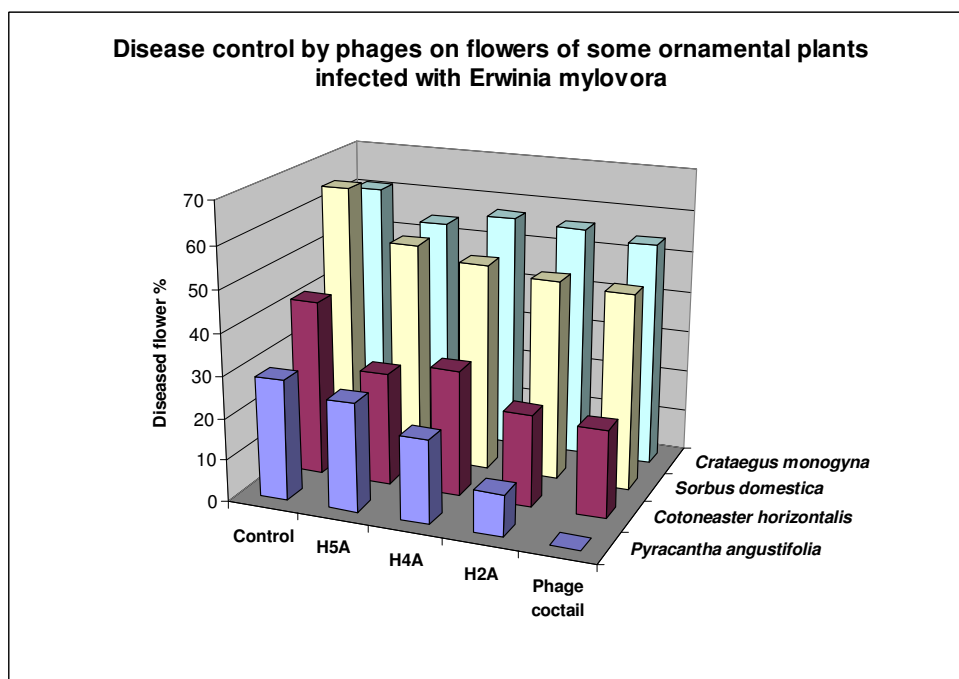
### 8. ábra Fágok és kombinációjuk hatása az *E. amylovora*ra különböző körte fajtákon

A csillaggal jelölt fajta streptomycin rezisztens Ea1/79Sm törzssel lett fertőzve, míg a többi esetben az Ea1/79 vad törzset használtuk.

#### - Dísznövényeken

A kísérletben négy tüzelhalásra szintén fogékony dísznövényfajon vizsgáltuk a különböző fágkombinációk baktériumelimináló hatását. A növények virágait kezeltük ( $10^9$ CFU/ml Ea1/79 SM) és a fágok ( $10^4$ PFU/ml) hatását aszerint értékeltük, hogy 100 virágból hány darabnál volt megfigyelhető kocsánybarnulás. A fágkombinációk közül a H2A+H4A+H5A bizonyult a leghatásosabbnak és szignifikánsan jobb eredmény volt elérhető a kombináció használatával összevetve egy-egy fág külön kifejtett hatásával (9. ábra).

/Kolozsvári Nagy J; Király L; Schwarczinger I: *Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight*, Cent. Eur. J. Biol. 7(1): 1-12, 2012 IF: 0.818/



### 9. ábra Fágok és kombinációjuk hatása az *E. amylovora*ra különböző dísznövényeken.

## 16 magyar bakteriofágok *E. amylovorara* kifejtett hatásának vizsgálata körte szeleten

A vizsgálat során 16 magyar fág izolátum *E. amylovorara* kifejtett hatását hasonlítottuk össze egymással, ill. 4 amerikai fággal. A vizsgálatokhoz az éretlen, zöld körteket 0,5cm vastag szeletekre vágunk, amelyeket fágizátumban áztattunk. Ezt követően a szeletek közepére csöppentéssel juttattuk a tesztbaktériumot (Ea 1/79SM). Négy nap elteltével a kialakult tünetek alapján felállított bonitálási skála alapján értékeltük a fágok hatását. A kísérlet során a vizsgált izolátumok közül a legjobb hatást a H11-es izolátummal értük el, amellyel történt kezelés hatására a kezelt körte szeleteknek csak 12%-án jelentek meg a baktérium cseppek és alakult ki enyhe nekrozis, míg az erwinás kontroll 64%-án súlyos nekrozis volt megfigyelhető (10. ábra).

/Schwarczinger I; Müller I; Süle S; Geider K: *Bacteriophages of Erwinia amylovora: host range and biological control*, COST 864: Combining traditional and advanced strategies for plant protection in pome fruit growing, 3-5 June, 2009, Valencia, Spain, p. 50., 2009/



10. ábra A H11-es bakteriofág *Erwinia amylovorara* kifejtett hatása körte szeleten. Bal oldalon az erwinias kontroll, jobb oldalon a faggal előkezelt, majd baktériummal inokulált körteszeletek láthatók.

### „Fág-szállító” mikroorganizmus vizsgálat

Vizsgálataink során felmerült, az az ötlet, hogy az adott fágra fogékony *E. amylovora* antagonista baktériumot használjunk fel a fágok növényre való kijuttatásához. Kísérletünkhöz Hevesi Lászlóné által szelektált biológiai védekezésre perspektivikus HIP32 nevű *Pantoea agglomerans* antagonista törzset választottuk. Sajnos e törzsről kiderült, hogy egyik általunk izolált fágra sem fogékony, és a fág-baktérium adaptációs kísérletünk se járt eredménnyel, ezért e baktérium „fág-szállító mikroorganizmusként” biztosan nem használható fel. Ezen kívül (folyékony kultúrában) vizsgáltuk, hogy a fágot és a HIP32-öt együtt alkalmazva az erwiniával szemben, kimutatható-e szinergista, vagy additív hatás, ahhoz képest, ha az antagonista baktériumot, vagy a fágot önmagában használjuk. Azt tapasztaltuk, hogy a legjobb hatás, akkor érhető el, ha a HIP32-öt önmagában használtuk a kezelésre. A jövőben tervezzük más antagonista, vagy szaprofita baktérium hasonló célú vizsgálatát.

## **„Host-range mutáns” fág izolálása**

Vizsgálataink során több esetben is kialakult *E. amylovora* telep a bakteriofág plakkján, de ezekből nem sikerült fágot visszaizolálnunk. A fág plakkján kialakult telepből felszaporított baktérium minden esetben ellenálló volt azzal a fággal szemben, amelyen a telepe kialakult. Ugyanakkor Mitomycines kezeléssel profág sem volt kimutatható e baktérium törzsekből.

## **Fágok hatásának vizsgálata mikroszaporított alma növényeken**

A mikroszaporított növényeket fággal permetezve, majd baktérium szuszpenzióba mártott ollóval a leveleket megvágva, vagy levélhórnáljba való szúrással mesterségesen inokulálva a növényeket nem volt kimutatható a kezeléseket pozitív hatása. Emiatt is döntöttünk amellett, hogy inkább steril körülmények között, perlitben felnevelt magoncokon kísérletezünk ehelyett.

## **„Fág-transzport” vizsgálata növényben**

Irodalmi adatok és saját tapasztalatok alapján is elmondható, hogy a fág alapú biológiai védekezés egyik „Achilles sarka” a fágok fényérzékenysége. A fágok UV-fénytől való védelmének egyik lehetősége, ha a fágokat közvetlenül a védendő növénybe tudnánk juttatni. Ennek tisztázására megelőző vizsgálatokat végeztünk. Bakteriofág lizátummal öntöttünk 'Freedom' és 'Jonathan Watson' alma magoncokat, majd különböző időpontokban a kezelt növények leveleiből mintát vettünk és kísérletet tettünk a fágok visszaizolálására. Mindkét alma fajtából a negyedik naptól kezdődően sikerült visszaizolálnunk a kezelésre használt bakteriofággal megegyező morfológiai bélyegű bakteriofágot. Más növényi kórokozó baktérium fágjairól már ismert, hogy képesek a növénybe bejutni, de az *E. amylovora* fágokról ez eddig tudomásunk szerint új adat.

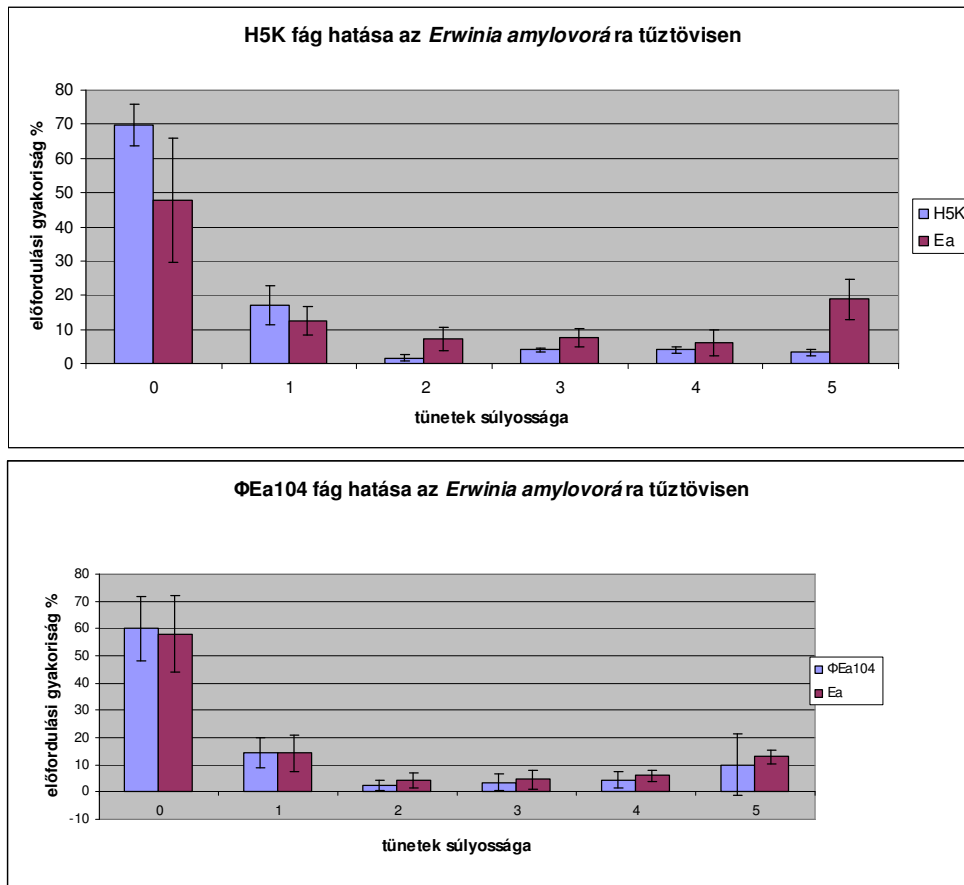
/Kolozsváriné Nagy J; Schwarczinger I.,: *Egy Erwinia amylovora-ra specifikus hazai bakteriofág izolátum gyökéren keresztüli felvételének és transzlokációjának vizsgálata a tűzelhalás elleni biológiai védekezés tükrében*, Jövők Konferencia, Keszthely, 2013. május 15. p. 40. 2013/

## **„Fág transzport” vizsgálat tűztövis virágokon**

A vizsgálat célja annak tisztázása, hogy a fás szárba is képesek-e a fágok bejutni, ill. szállítódni és, hogy a növénybe jutott fágoknak milyen hatása van az *E. amylovora* fertőzésre. Ezen kívül e teszt során egy magyar (H5K) és egy amerikai fág (ΦEa104) hatásának összehasonlítására is mód nyílt. Vizsgálatunkhoz modellnövényeként 20cm-es, virágzó tűztövis vesszőket használtunk, amelyeket egyenként 70ml fág-lizátumba ( $10^{13}$  PFU/ml) állítottunk. A mesterséges inokulációt a fágos kezelést követő 5. napon permetezéssel végeztük (1.8ml/vessző,  $5 \times 10^5$  CFU/ml). A tüneteket egy 0-5-ig terjedő bonitálási skála alapján értékeltük a fertőzést követő 6. napon.

### **Bonitálási skála**

0	a vacok ép, zöld
1	a csészelevelek alapjánál barna szegély
2	a vacok 1/3-a barna
3	a vacok 1/2-e barna
4	a vacok egésze barna
5	a virág szár is barna



**11-12. ábra Fágok hatása az *Erwinia amylovora* okozta tünetekre tűztövösen**

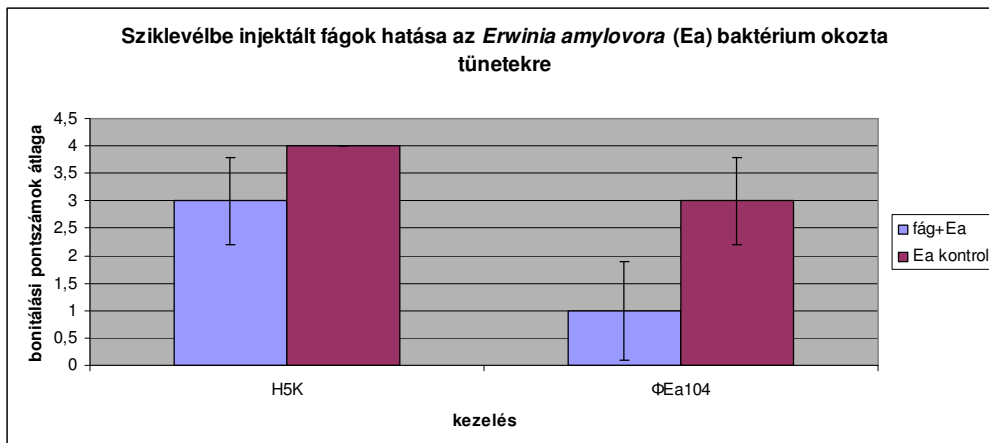
A H5K szignifikánsan csökkentette a legsúlyosabb tüneteket mutató virágok számát a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva és nagyobb számban fordultak elő a tünetmentes és a legenyhébb tüneteket mutató virágok a fággal kezeltknél, mint a kontrollnál, bár itt a hatás nem volt szignifikáns (11-12. ábra). Ezzel szemben a ΦEa104-es fággal történt kísérletben nem volt szignifikáns különbség a kezelt és a kezeletlen virágok között. A két ismétlés között nem volt szignifikáns különbség.

### **Sziklevélbe injektált fágok hatása az *Erwinia amylovora* baktérium okozta tünetekre**

4-6 leveles Pinova alma magoncok sziklelevelét injektáltuk a H5K és a ΦEa104 fággal ( $10^{13}$ PFU/ml), majd a szűrés helyére 10ul baktérium szuszpenziót cseppentettünk (Ea1/79Sm,  $10^6$  CFU/ml). Hat nap elteltével a kialakult tünetek alapján felállított bonitálási skála alapján értékeltük a kísérletet. A két fág közül a ΦEa104 nyújtotta a kedvezőbb hatást, átlagosan harmadára csökkentette a tünetek súlyosságát az alma magoncokon (13. ábra). Az ismétlések között nem volt szignifikáns különbség. /Schwarczinger I; Kolozsváriné Nagy J; Penetration and translocation of bacteriophages into the plant and its role in control of fire blight. Előkészületben lévő közlemény

#### **Bonitálási skála**

<b>0</b>	Ép, zöld sziklelevél
<b>0,5</b>	Apró nekrotikus foltok az injektálás helyénél
<b>1</b>	A sziklelevél 1/5-e barna
<b>2</b>	A sziklelevél 1/3-a barna
<b>3</b>	A sziklelevél 1/2-e barna
<b>4</b>	Az egész sziklelevél barna
<b>4,5</b>	A barnulás átterjed a másik sziklelevélre is
<b>5</b>	A másik sziklelevél is barna



13. ábra Sziklevélbe injektált fágok hatása az *Erwinia amylovora* okozta tünetekre

#### Az eredmények rövid összefoglalása:

Elsőkén izoláltunk Magyarországon *Myoviridae*, illetve *Podoviridae* családba tartozó *E. amylovora* bakteriofágokat. Tizenhat magyar *E. amylovora* fág izolátumot jellemeztünk plakk morfológia, partikulum morfológia, gazdakör és folyadékkultúrában kifejtett hatásuk alapján. PCR vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a magyar fágok nem azonosak a kontrollként használt 4 amerikai *E. amylovora* fággal. A PCR vizsgálatok alapján a vizsgált izolátumainkat négy csoportba soroltuk. Különböző fágkombinációkat hatását vizsgáltuk (eltérő fogékonyságú) természetű, ill. dísznövényeken. Virágon elvégzett *in vitro* kísérleteiben a legjobb hatást a H5B+H6 és a H2A + H5K+H7B fágkombinációkkal értük el. Négy kiválasztott fággal meghatároztuk különböző *E. amylovora* törzsek fágprofilját. Kimutattuk, hogy az *E. amylovora* fágok képesek a növények gyökerén és vesszőjén keresztül felszívódni és a növényben szétterjedt fágok képesek az *E. amylovora* baktérium okozta tüneteket mérsékelni.