

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**TENORIO-BAIGORRIA IMOLA
BUDAPEST
2024**



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Brenneria nemzetséghez tartozó baktériumfajok biológiai
diverzitása

DOI: 10.54598/005550

Tenorio-Baigorria Imola

**Budapest
2024**

A doktori iskola

Megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Vezetője: Zámboriné Dr. Németh Éva
egyetemi tanár, DSc
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Kertészettudományi Intézet,
Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezetők: Dr. Karacs-Végh Anita
egyetemi docens, PhD
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Növényvédelmi Intézet,
Növénykórtani Tanszék

Dr. Palkovics László
egyetemi tanár, DSc
Széchenyi István Egyetem, Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar,
Növénytudományi Tanszék

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

.....

A témavezetők jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A magyarországi városok és települések utcáinak, közterületeinek, parkjainak kedvelt lombhullató dísfái – többek között – a platán-, fűz-, nyár-, nyír-, vadgesztenye-, szil- és eperfák. A gyors növekedésű, hosszú élettartamú, hatalmas fákat (pl.: platán fajok) évszázadok óta telepítik Európa-szerte városi parkokba dísznövényként, illetve belterületeken útsorfaként. Egyesek közülük jó várostűrő fajok, mások kevésbé, de jelenlétük mindenképpen pozitívan hat a környezetükre, így az emberekre is, amelyeket összefoglaló néven ökoszisztéma-szolgáltatásokként említenek a szakirodalomban. Négy fő csoportba sorolhatóak a szolgáltatások, melyeket a környezetünkben élő növények biztosíthatnak számunkra: ellátó-, szabályozó- és fenntartó-, támogató-, valamint kulturális szolgáltatások. Azonban a városi fák által nyújtott ökoszisztéma-szolgáltatásokat jelentősen befolyásolják a klimatikus viszonyok változásai, amelyek hatására romlik a kondíciójuk, ezáltal ellenállóképességük a biotikus és az abiotikus tényezőkkel szemben. A legrosszabb helyzetben talán az útsorfák vannak, mert szinte mindenhol szorosan körbe vannak véve betonnal, és a kis talajjal borított terület betömörödhet, kevés vizet enged át a gyökerekhez, valamint levegőtlen lesz, így kevesebb oxigénhez jutnak a gyökerek. A közterületekre ültetett dísfák ki vannak téve a sózás veszélyének is (megnő a talaj sótartalma), emellett az építkezések közelében fokozott a veszélye a munkálatok közben okozott sérüléseknek. Kondíciójuk romlása miatt a változó tényezőket is rosszabbul tolerálják, így a változékony éghajlatunk tovább nehezíti túlélésüket. A növények ki vannak szolgáltatva a különböző környezeti tényezőknek, amelyekhez nem, vagy nehezen tudnak alkalmazkodni. A gyengülő kondíció és a különböző sérülések hozzájárulnak a kórokozók megtelepedéséhez és növelik a betegségek kialakulásának veszélyét.

A kétévente megjelenő 'Közterületi Sorfák Jegyzéke' összefoglalja az út- és utcafásításra alkalmas fásszárú növényfajokat és -fajtákat, részletezve azok főbb jellemzőit, többek között a várostűrő képességüket, legjelentősebb károsítóikat, mérszérzékenységeket. A Közterületi Sorfák Jegyzékében szereplő növényfajok harmada tartozik a gyenge várostűrésű kategóriába, és előfordulhat, hogy idővel ugyanaz fog történni velük, mint a közönséges vadgesztenyével. Az *Aesculus hippocastanum* néhány éve lekerült a listáról, a nemzetséget már csak az *Aesculus x carnea* 'Briotii' képviseli. A faj az International Union for Conservation of Nature (IUCN) vörös listáján is szerepel, mint veszélyeztetett faj, és ennek fő oka a vadgesztenyelevél-aknázómoly károsítása. A közterületek és parkok lombhullató fáin előforduló és kéregbetegséget okozó baktériumfajok jelenléte pedig tovább rontja a helyzetet – hatékony növényvédelmi kezelések híján. A kéregrepedés, nekrozis, rákosodás, valamint a felnyíló sebekből jellegzetes sötét, feketés vagy barnás színű baktériumnyálka szivárgás jellemző tünetei a *Brenneria* és *Lonsdalea*

nemzetség baktériumfajainak, melyek széles körben elterjedt kórokozók a világon. A *Brenneria* nemzetség jelenleg 11 fajt foglal magába (*B. alni*, *B. bubanii*, *B. corticis*, *B. goodwinii*, *B. izbisi*, *B. nigrifluens*, *B. populi*, *B. roseae*, *B. rubrifaciens*, *B. salicis*, *B. tiliae*), a *Lonsdalea* nemzetség pedig négy fajt (*L. britannica*, *L. iberica*, *L. populi*, *L. quercina*). Több fajukról is beszámoltak már Európában, többek között Nagy-Britanniában, Belgiumban, Hollandiában, Franciaországban, Olaszországban, Spanyolországban, vagy Szerbiában. A két nemzetség baktériumfajait emellett számos növényfajról izolálták, például *Alnus*, *Ficus*, *Juglans*, *Populus*, *Salix*, *Tilia* és *Quercus* fajokról. *Brenneria* és *Lonsdalea* fajokat hazánkban is leírtak, mostanáig négy baktériumfajt azonosítottak: dión és platánon a *Brenneria nigrifluens*, fűzfán a *Brenneria salicis*, dión és hibrid nyárfán a *B. bubanii* illetve szintén hibrid nyárfán a *Lonsdalea populi* baktériumfajt, melyek hasonló tüneteket okoznak. A *Brenneria* és *Lonsdalea* baktériumfajok jelenléte hazánkban fokozza a közterületek növényvédelmének problémakörét. A kórokozók elsősorban az idősebb fákat támadják, amelyeknek kezelése nehezen vagy egyáltalán nem megoldható. Egyrészt, mert nem áll rendelkezésre a baktériumok ellen közterületeken engedélyezett, hatékony növényvédő szer, emellett a kezelések időpontját tekintve csak az esti vagy az éjszakai órákban végezhetőek – a lakosság megfelelő tájékoztatását követően (43/2010. (V.23.) FVM rendelet a növényvédelmi tevékenységről). Másrészt, fontos lenne a baktériumok terjedését megakadályozni a fák metszésekor, a higiénés rendszabályok betartásával, például az eszközök fertőtlenítésével, de ez lassíthatja a munkálatokat, és a metszést végző dolgozók rutinjának módosítása szükséges hozzá.

Magyarországon a dió és a lombhullató díszfák bakteriális eredetű kéregbetegségei a kevésbé kutatott területek közé tartoznak, valamint kevés hazai tapasztalat, vizsgálat áll rendelkezésre a *Brenneria* nemzetségbe tartozó baktériumfajokkal kapcsolatosan. Ezért munkánk során a következő célokat tűztük ki:

1. Az ország különböző pontjain található közterületek, parkok lombhullató díszfáin és diófáin megjelenő, kéregbetegséget okozó baktériumfajok izolálása, azonosítása klasszikus és molekuláris módszerekkel,
2. A *Brenneria* nemzetségbe tartozó izolátumok rokonsági viszonyainak elemzése, a hazai izolátumok összehasonlítása a National Centre for Biotechnology Information (NCBI) adatbázisban rendelkezésre álló külföldi izolátumokkal.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. A vizsgálatok helye, ideje

Az ország különböző pontjain, 2012 és 2019 között mintákat gyűjtöttünk közterületeken, parkokban különböző díszfa fajokról, erdőterületről, valamint házikertben diófákról. A tünetekért felelős kórokozók azonosítását 2015 és 2019 között a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Budai Campus Növényvédelmi Intézetének Növénykórtani laboratóriumában végeztük.

2.2. A vizsgálatok anyaga

2.2.1. Izolátumok

13 helyszínen, nyolc növényfajról (*Aesculus hippocastanum*, *Betula pendula*, *Juglans regia*, *Morus alba*, *Platanus x acerifolia*, *Populus nigra*, *Salix alba*, *Ulmus* sp.) összesen 39 izolátumot gyűjtöttünk.

2.2.2. Primerek

A kórokozók nemzetség-szintű meghatározásához elsőként a 16S rRNS-t kódoló gén vizsgálatát végeztük el, melyhez a 63F/1389R oligonukleotid indítószekvenciákat használtuk (Brosius et al. 1978). A szakirodalom alapján a 16S rRNS génszakasz nem alkalmas az egymáshoz közel álló baktériumfajok elkülönítésére (Hedegaard et al. 1999, Spröer et al. 1999). A háztartási gének filogenetikai elemzése megbízhatóbb eredményeket ad, emellett azok multilokus szekvencia analízise (MLSA) alkalmasnak bizonyult több baktérium nemzetség (*Pantoea*, *Tatumella*, *Erwinia*) taxonómiai kérdéseinek megoldására (Brady et al. 2009, 2010, Moretti et al. 2011). A négy háztartási gén kiválasztásakor figyelembe vettük a *Brenneria* fajok leírásához kapcsolódó szakirodalmat, melyekben általában az *atpD*, *infB*, *gyrB* és *rpoB* gének szekvenciáit elemezték (Brady et al. 2012, 2014, Denman et al. 2012, Kile et al. 2022).

2.3. A vizsgálatok módszerei

2.3.1. Tünetek megfigyelése

A *Brenneria* és *Lonsdalea* fajokra jellemző tüneteket leggyakrabban a városi környezetben élő díszfákon figyeltük meg. A nyár végi – őszi hónapokban a meleg, párás időjárási körülmények kedvezően hathatnak a baktériumok felszaporodására, aminek következtében megindul a kisebb kéregrepedésekből, metszési sebekből a váladék. Kedvező körülmények között nagyobb mennyiségben is látható, akár több méter hosszan is sötétre színezheti a fák törzsét.

2.3.2. *Izolálás és tenyészbélyegek megállapítása*

A mintavételt követően a kéreg és exudátum mintákat hűtőszekrényben, 4 °C-on tároltuk a feldolgozásig. A kéregből kisebb szeleteket steril műanyag csőbe helyeztünk, és steril desztillált vizet töltöttünk rá úgy, hogy ellepje azokat. Ugyanezt tettük az exudátumok esetében is, de kevesebb vízmennyiséggel. 100 µl mennyiséget mértünk táptalajra (King B) (King et al. 1954), és szélesztettük.

A KÓROKOZÓK AZONOSÍTÁSA KLASSZIKUS MÓDSZEREKKEL

2.3.3. *Gram tulajdonság vizsgálata*

Az izolátumok 24 órás tiszta tenyészetéből steril fogpiszkáló segítségével leemeltünk és tárgylemezre helyeztünk 1-1 kolóniát, majd a kolóniákra cseppentett 3%-os kálium-hidroxid (KOH) oldattal homogenizáltuk (Suslow et al. 1982).

2.3.4. *Hiperszenzitív reakció indukáló képesség vizsgálata*

A hiperszenzitív reakció kialakulását dohány növényeken vizsgáltuk. A növények levelébe injektáltuk az izolátumok 24 órás tenyészetéből készített szuszpenzióját (10^7 CFU), majd 24 és 48 óra elteltével értékeltük a vizsgálatot (Klement 1963). Minden vizsgálat alkalmával pozitív kontroll szuszpenzióval is fertőztünk, amelyhez saját *Erwinia amylovora* (Ea1) izolátumot, vagy *Brenneria rubrifaciens* típusörzset (DSM 4483) használtunk.

2.3.5. *Biokémiai tulajdonságok vizsgálata*

A kórokozók biokémiai tulajdonságainak meghatározásához az API 20E gyorstesztet alkalmaztuk. A gyártó utasításainak megfelelően a mikrocöveket baktérium szuszpenzióval töltöttük meg, 24 óráig 26 °C-on inkubáltuk, majd értékeltük a tapasztalt színváltozások alapján.

2.3.6. *Patogenitási teszt*

A patogenitási vizsgálatokhoz egy- és kétéves *Aesculus hippocastanum*, *Betula pendula*, *Juglans regia*, *Morus alba*, *Platanus x acerifolia*, *Populus nigra*, *Populus x euramericana*, *Salix alba* és *Ulmus pumila* facsemetéket fertőztünk baktérium szuszpenzióval (10^7 CFU). A kontroll növényeket steril desztillált vízzel kezeltük, pozitív kontrollként a *Brenneria salicis* DSM 30166 és a *Lonsdalea populi* NY060 típusörzsekkkel inokuláltunk. Két módszert alkalmaztunk a fertőzőképesség bizonyítására. Az első módszer során a hajtásvégeknél elhelyezkedő levelek levélalapját injektáltuk baktérium szuszpenzióval. Az inokulációt követően átlátszó műanyag tasakokkal 72 órára lefedtük a fertőzött hajtásokat, majd steril desztillált vizet fűjtünk a tasakok belsejébe, hogy biztosítsuk a fertőzéshez szükséges páratartalmat. A második módszert egy korábbi kutatásban leírtak alapján végeztük (Li et al. 2014). A csemeték törzsének kergét fertőtlenítettük 75%-os etanollal, kereszt alakú vágást ejtettünk rajtuk steril szikével, majd a

sebekbe baktérium szuszpenziót juttattunk. A sebzéseket Parafilmmel zártuk le, hogy megvédjük a kiszáradástól. Mindkét kísérlet esetén 3 hónap elteltével értékeltük a kialakult tüneteket.

2.3.7. *Brenneria nigrifluens* kórokozó gyors azonosítása zöld dión

Moretti és Buonauro (2010) gyors azonosítási módszere alapján, etanolos fertőtlenítést követően steril fogpiszkálóval megszúrtuk a termések burkát, melyen baktérium szuszpenziót juttattunk be. Az inokulálást követően a terméseket zárható műanyag dobozokba helyeztük, amelyekbe desztillált vízzel átitatott papírtörölő rétegeket tettünk, a lezárást megelőzően desztillált vizet fűjtünk a belső oldalakra, hogy biztosítsuk a megfelelő páratartalmat a fertőzéshez, majd az értékelésig szobahőmérsékleten (~26 °C) tartottuk. Az inokulálást követő hetedik napon értékeltük a dióterméseket.

A KÓROKOZÓK AZONOSÍTÁSA MOLEKULÁRIS MÓDSZEREKKEL

2.3.8. *Nukleinsav szekvenciák analízise*

A filogenetikai törzsfák elkészítéséhez az NCBI GenBank adatbázisban elérhető *Brenneria* és *Lonsdalea* nemzetség törzseinek 16S rRNS, *atpD*, *gyrB*, *infB* és *rpoB* gén szekvenciáit töltöttük le. A megfelelő szubsztitúciós modellt és paramétereket a MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) szoftverben rendelkezésre álló modellteszt eredménye alapján választottuk ki (Nei és Kumar 2000, Kumar et al. 2016). A filogenetikai törzsfákat a MEGA7 szoftverben készítettük el (Kumar et al. 2016).

A multilokus szekvencia analízishez (MLSA) a négy alignmentet a MEGA11 szoftverben rendelkezésre álló programmal kapcsoltuk össze, majd a modellteszt alapján kiválasztottuk a megfelelő szubsztitúciós modellt (Tamura et al. 2021). A törzsfákat a 16S rRNS génszakaszhoz hasonlóan a MEGA7 verziójában készítettük.

A filogenetikai törzsfákhoz készített illesztéseken mindkét esetben a CLC Genomics Workbench 8.5 szoftverben elérhető páronkénti összehasonlítást is végeztünk (Internet1).

3. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE

2012 és 2019 között 13 helyszínen gyűjtöttünk mintákat kéregbetegséget és baktériumnyálka folyást mutató fákról. Összesen 39 izolátumot vizsgáltunk klasszikus és molekuláris módszerekkel. Két izolátum származott *Juglans regia* gazdanövényről, melyeket Zánkán és Látrányban gyűjtöttünk. Egy izolátum származott *Salix alba* gazdanövényről, melyet Budapesten gyűjtöttünk. 11 izolátum származott *Platanus x acerifolia* gazdanövényről, melyeket Budapesten, Zamárdiban, Bázakerettyén, Siófokon és Balatonfüreden gyűjtöttünk. 10 izolátum származott *Ulmus* gazdanövényről, melyeket Budapesten és Kecskeméten (szilfaerdő) gyűjtöttünk. Hét izolátum származott *Betula pendula* gazdanövényről, melyeket Budapesten, Szentendrén, Leányfalun és Nyírderszen gyűjtöttünk. Egy izolátum származott *Populus nigra* és két izolátum származott *Morus alba* gazdanövényről, melyeket Budapesten gyűjtöttünk. Öt izolátum származott *Aesculus hippocastanum* gazdanövényről, melyeket Budapesten, Ebesen és Mátészalkán gyűjtöttünk.

3.1. A kórokozók által okozott tünetek megállapítása

2012 és 2019 között, az ország több pontján jellegzetes tüneteket figyeltünk meg díszfákon és dión. A fák törzsén kisebb-nagyobb méretű, sekély repedések voltak láthatóak, a fűzfa kivételével, melynek törzsén hosszirányban, nagy mértékben felnyílt a kéreg és a fán részleges ágelhalás volt megfigyelhető. Nyár végétől, augusztustól nyálkafolyást tapasztaltunk ezekből a kéregrepedésekből, metszési sebekből, valamint a növényvédelmi kezelésben részesült fákon az injektlás pontjaiból (közönséges vadgesztenye). A szivárgó váladék mennyisége, állaga, színe hasonló volt a dión, eperfákon, nyárfán, nyírfákon, platánokon és vadgesztenyéken: sötétbarna színű és kisebb mennyiségű volt. A baktériumnyálka megjelenése a szilfákon kis mértékben különbözött, állaga sűrűbb, nyálkásabb volt, nagyobb mennyiségben volt jelen a törzs kérgén és felülete fényes volt. A tüneteket egyaránt tapasztaltuk a közterületeken, parkokban és házikertekben lévő fásszárú növényfajokon. A városi környezetben jelentős stressznek vannak kitéve a növények, ami vélhetően csökkenti ellenállóképességüket, ezáltal fogékonyabbak lesznek a különböző biotikus tényezőkre. Emellett a klímaváltozás is egy további tényező, amely hozzájárulhat a fák kondíciójának további gyengüléséhez.

3.2. Klasszikus vizsgálati módszerek eredményei

3.2.1. Tenyészbélyegek megállapítása

A dióról, eperfáról, fűzfáról, nyárfáról, nyírfáról, platánról, szilfáról és vadgesztenyéről származó izolátumok King B táptalajon, szobahőmérsékleten (~26 °C) tenyésztethetők voltak. A vizsgált izolátumok tenyészbélyegei megegyeztek, a kolóniák sima felületűek, épszélűek, kör

alakúak, krémszínűek voltak, enyhe kékes árnyalattal és a táptalaj felületéről enyhén kiemelkedtek.

3.2.2. *Gram tulajdonság*

A 3%-os KOH oldat mind a 39 izolátum esetében feloldotta a baktériumok sejtfalát, tehát az általunk dióról, eperfáról, fűzfáról, nyárfáról, nyírfáról, platánról, szilfáról és vadgesztenyéről izolált baktériumfajok Gram-negatívak.

3.2.3. *Hiperszenzitív reakció*

A saját *Erwinia amylovora* (Ea1) és *Brenneria rubrifaciens* (DSM 4483) baktériumfajok törzsei minden esetben jól látható nekrozist okoztak a szuszpenziójukkal inokulált dohány növények (*Nicotiana tabacum* L. cv. 'Xanthi') levelén. A dióról, platánról, szilről, nyírről, nyárról, fűzről, eperfáról és vadgesztenyéről származó 39 izolátum szuszpenziójával injektált dohány leveleken egyik esetben sem alakult ki szöveti nekrosis.

3.2.4. *Biokémiai tulajdonságok vizsgálata*

A vizsgálatot mind a 39 izolátumunk szuszpenziójával elvégeztük az API 20E biokémiai teszt alkalmazásával.

A vadgesztenyéről gyűjtött 5 izolátum biokémiai tulajdonságai többségében (18 reakció) megegyeztek, nagyjából homogének, az Aes1 izolátum két reakcióban adott más eredményt. Emellett az Aes1 izolátum a *platán* izolátumokkal minden reakcióra egyező eredményt adott. A többi vadgesztenyéről származó izolátum a Juglans1 törzssel 18 tulajdonságban megegyezett.

A nyírfáról származó hét izolátum a triptofán deamináz, glükóz fermentáció/oxidáció és szorbit fermentáció/oxidáció reakciókra eltérő, minden más reakcióra ugyanazt az eredményt adták. Az izolátumok tulajdonságainak különbözősége arra utal, hogy heterogén csoportot képeznek. Továbbá, a Bet1 izolátum a Juglans2 izolátummal 18 tulajdonságban, a Bet2 és Bet3 izolátumok szintén a Juglans2 izolátummal 17 tulajdonságban megegyeztek. A Bet4 törzs a Pop1, Juglans2 és a *platánfáról* származó 10 törzs eredményei 17 reakcióban egyeztek meg. A Bet5 izolátum Pop1 és Juglans2 izolátumokkal szintén 17 tulajdonságban ugyanazt az eredményt adták. A Bet6 és Bet7 törzsek esetén pedig a Pop1 izolátummal kaptuk a legtöbb, 18 tulajdonságban egyező eredményt.

A nyárfáról gyűjtött izolátum a nyírfáról származó izolátumok mellett az öt vadgesztenye és tíz *platán* izolátummal 16 reakció esetén adott egyező eredményt.

A budapesti és kecskeméti *szilfákról* gyűjtött tíz izolátum minden tulajdonsága megegyezett, homogén csoportot alkottak. Emellett a Juglans2 és Pl6 izolátumokkal 18 tulajdonságban mutatott egyezést.

A Juglans1 és Juglans2 izolátumok egymáshoz képest a reakciók közel felére (9 reakció) eltérő eredményt adtak. A Juglans1 18 tulajdonságban a P11, P12, P13, P14, P15, P17, P18, P19, P110 és P111 izolátumokkal, a Juglans2 pedig az Aes1, Bet1, a 10 szilfa izolátummal és 11 platán izolátummal 18 tulajdonságban egyezett meg.

A *platánfáról* származó 10 törzs homogén csoportot alkotott, minden biokémiai reakcióban egyező eredményt adtak, egy kivétel volt, a P16 izolátum, amely két reakciónál eltért. Emellett a P16 megegyezett 18 tulajdonságban az Aes1, Juglans2, valamint a 10 *szilfáról* származó izolátummal.

Az *eperfáról* gyűjtött két izolátum biokémiai reakciói minden teszt esetén megegyeztek, homogének voltak. A többi gazdanövényről származó izolátum közül a P16 törzssel 14 reakcióra adtak egyező eredményt.

3.2.5. Patogenitási vizsgálat

A patogenitási vizsgálatot 37 izolátumunk esetén végeztük el.

Hajtásfertőzés:

A fertőzési pontnál kisméretű, nekrotikus léziókat tapasztaltunk minden izolátumunk esetén. Egy fűzfáról, tíz szilfáról és öt platánról gyűjtött izolátumnál az inokuláció helyéhez közeli leveleken hervadást, barnulást, száradást és hajtáselhalást tapasztaltunk. A hajtásokat kettévágva halvány, feketés sávok, gyengébb tünetek voltak láthatóak egy dióról (Juglans1), két eperfáról, egy nyárfáról, hét nyírfáról, tíz platánról és öt vadgesztenyéről származó izolátumunk esetén. A betegségre jellemző repedések a kérgen, valamint váladékfolyás egy izolátumunk esetén sem jelent meg – három hónapot követően sem.

Törzs sebzés:

A törzs sebzés módszert 18 izolátumunk esetén végeztük el. A törzsön ejtett sebzések az esetek többségében beforrtak, nekrózis és barna sávok a törzs félbevágásával váltak láthatóvá. Az említett tünetek két eperfáról, egy nyárfáról, hét nyírfáról, öt platánról és három vadgesztenyéről származó izolátumra volt jellemző. A nyírfákról származó izolátumok mindegyikénél, 1-1 ismétlés esetén az előbbitől eltérő tünetek jelentek meg. Már a fertőzéstől számított második hónapban tapasztaltuk a sebzés körül megjelenő feketedést. A hajtásokat kettévágva láthatóvá vált, hogy ez nem hatolt a mélyebb szövetekbe. A vízzel inokulált kontroll növényeknél nem tapasztaltunk nekrózist, és sötét színű sávokat sem.

3.2.6. *Brenneria nigrifluens* kórokozó gyors azonosítása zöld dión

A Moretti és Buonaurio (2010) által kidolgozott gyors azonosítási vizsgálat során 29, egy dióról, egy fűzfáról, hat platánról, tíz szilfáról, hét nyírfáról, egy nyárfáról, két eperfáról és egy vadgesztenyéről származó izolátum szuszpenziójával inokuláltuk a zöld dióterméseket külön-külön.

A Bet1, Bet2, Bet3, Bet5, Bet6, Bet7, PL6, Salix1, Ulmus1, Ulmus2, Ulmus3, Ulmus4, Ulmus5, Ulmus6, Ulmus7, Ulmus8, Ulmus9, Ulmus10, Morus1 és Morus2 izolátumok esetén az inokulációs pont körül nekrotizálódtak a sejtek, de baktériumnyálka nem volt látható, és a dióbél ép maradt. Az Aes1, Juglans1, Pl7, Pl8, Pl10 és Pl11 izolátumokkal történt fertőzés értékelésekor a szűrés helye körül nekrozist tapasztaltunk, valamint a dióbél enyhén barnult, vizenyős volt. A Bet4 és Pl9 izolátummal való fertőzés eredményeképpen az inokulációs pont körüli nekrosis mellett a dióbél elfeketedése, elfolyósodása volt látható. A Pop1 izolátum esetén a fertőzési pont körüli nekrosis mellett baktériumnyálka szivárgás is megjelent.

3.3. Molekuláris vizsgálati módszerek eredményei

3.3.1. Azonosítás a 16S rRNS gén vizsgálata alapján

A 16S rRNS gén vizsgálata során körülbelül 1300 bázispár hosszúságú PCR termékek keletkeztek, melyek szekvenciáját klónozást követően meghatároztattuk. A páronkénti összehasonítás során 37 izolátumunk szekvenciáját vetettük össze az NCBI GenBankból letöltött 22 *Brenneria* törzs szekvenciájával. A következő izolátumok a *B. populi* Hauben et al. 1998 YMAPO5 törzs szekvenciájával egyeztek meg legnagyobb mértékben: Juglans1, Juglans2 (94,45-94,52%-ban), Salix1 (97,26%-ban), Pl1-11 (91,19-94,60%-ban), Ulmus1-10 (93,41-93,86%-ban), Bet5 (85,05%-ban), Pop1 (96,60%-ban), Morus1, Morus2 (92,75-92,97%-ban), Aes1, Aes2, Aes3 (91,71%-ban). Emellett a *B. nigrifluens* OR1 törzs szekvenciája 89,40-89,92%-ban a Bet1, Bet3, Bet4, Bet7 és 92,27%-ban az Aes4 izolátumokkal mutatott azonosságot. Továbbá, a Bet2 izolátum 89,14%-ban, az Aes5 izolátum szekvenciája pedig 90,10%-ban egyezett meg a *B. tiliae* EX1a törzs szekvenciájával.

A részleges 16S rRNS gén szekvenciáin alapuló filogenetikai törzsfa 37 izolátumunk rokonsági viszonyait mutatja a *Pectobacteriaceae* család 35 törzsének (*Brenneria* spp., *Dickeya* spp., *Lonsdalea* spp., *Pectobacterium* spp.) szekvenciáihoz hasonlítva. A Juglans1 azonosítási kódú, dióról gyűjtött izolátum, valamint tíz platánról és az öt vadgesztenyéről származó izolátum egymás közelében, egy külön ágon helyezkedtek el. A platán izolátumok közül a Pl1 és Pl2, a Pl7, Pl10 és Pl11 alkotott egy csoportot, a Pl3, Pl4 és Pl5, Pl9 izolátumok a Juglans1 (dióról), valamint a Pl8 törzsszel egy külön csoportba, illetve a vadgesztenyéről gyűjtött izolátumok (Aes1, Aes2, Aes3, Aes5) egy harmadik csoportba rendeződtek. Az említett platán és vadgesztenye izolátumoktól elkülönülten helyezkedett el az Aes4 törzs. Ezekhez az izolátumokhoz az NCBI GenBank

adatbázisban rendelkezésre álló *Brenneria* fajok közül a nyárfáról származó *B. corticis* gBX10-1-2, a hársfáról izolált *B. tiliae* (WC1b.1, EX1a), a közönséges dióról izolált *B. nigrifluens* (DSM 30175, OR1 és a BNK1) törzsek, továbbá a *Juglans*2 és Pl6 izolátumaink álltak legközelebbi rokonsági kapcsolatban. A nyírfáról gyűjtött izolátumok egymáshoz viszonyítva kis mértékben különböztek, de egy elkülönült csoportba rendeződtek. A törzsfán két klád között helyezkedtek el, a fentebb említett *B. corticis*, *B. tiliae* és *B. nigrifluens* fajok, illetve a *B. alni* (égerről) és *B. populi* Li et al. 2015 (nyárfáról) fajok között. Egy ágon csoportosult a Pop1, fekete nyárfáról gyűjtött izolátumunk és a *B. populi* Hauben et al. 1998 NCPPB 4299, nyárfáról származó típus törzs, valamint a *B. populi* YMAPO5 törzs. A *Salix*1 azonosítási kódú izolátum (füzfáról) egy ágon helyezkedett el a *B. salicis* LMG 2698 típus törzsszel, amelyet füzfáról izoláltak. Külön ágon található a két eperfa izolátumunk, melyekhez a két közönséges dióról gyűjtött *B. izbisi* izolátum (KBI 423^T, KBI 429), a füzfáról származó *B. salicis* típus törzs (LMG 2698), és a nyárfáról azonosított *B. populi* Hauben et al. 1998 izolátumok (NCPPB 4299, YMAPO5) voltak legközelebbi rokonságban. A szilről származó izolátumok szinte teljes mértékben megegyeztek egymással, és külön ágon, egy csoportban voltak. Hozzájuk legközelebb álló rokon fajok a hazánkban azonosított *B. bubanii* (4f2, Kf) és a *B. goodwinii* fajok (LMG 26270, LMG 26272, Mf3-1, J1-1, Sz2).

3.3.2. Azonosítás a háztartási gének vizsgálata alapján

A páronkénti összehasonítás során 12 izolátumunk szekvenciáját vetettük össze az NCBI GenBankból letöltött 15 *Brenneria* törzs szekvenciájával. A platánról származó izolátumok szekvenciái 83,01-83,83%-ban, míg a szilfáról gyűjtött izolátumok szekvenciái 86,90-89,05%-ban egyeztek meg a *B. populi* subsp. *brevivirga* D8-10-2-5 törzs szekvenciájával.

A részleges, négy háztartási gén szekvenciáján alapuló filogenetikai törzsfá öt platánról (Pl7, Pl8, Pl9, Pl10, Pl11) és hét szilfáról (Ulmus1, Ulmus2, Ulmus4, Ulmus5, Ulmus6, Ulmus7, Ulmus8) gyűjtött izolátumunk rokonsági viszonyait mutatja a *Pectobacteriaceae* család 35 baktériumtörzsének (*Brenneria* spp., *Dickeya* spp., *Lonsdalea* spp., *Pectobacterium* spp.) szekvenciáihoz képest. A szilfáról gyűjtött izolátumok egymáshoz viszonyítva kis mértékben eltértek, de egy külön ágon, a *Brenneria* típus törzsektől elkülönülve helyezkedtek el. Legközelebbi rokonságban a *Brenneria populi* Li et al. 2015 D9-5 és *Brenneria populi* subsp. *brevivirga* D8-10-2-5 típus törzsekkel álltak, melyeket *Populus x euramericana* rákos sebekből izoláltak. A platánról származó izolátumok szintén kis mértékben különböztek egymástól, és egy különálló csoportba rendeződtek. A Pl7 izolátum a többi, platánról izolált törzs mellett, de elkülönülve helyezkedett el. A hozzájuk legközelebbi rokon faj a *Brenneria goodwinii* LMG 26270 és LMG 26262 izolátumok, amelyeket AOD tüneteket mutató tölgyfákról izoláltak.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK

Kutatásunkkal hozzájárulunk a hazánkban dión és díszfákon előforduló, kéregbetegséget és nyálkaszivárgást okozó baktériumfajok teljesebb ismeretéhez. Ezt azért is fontosnak tartjuk, mert az általunk vizsgált növényfajok közül a közönséges vadgesztenye már az IUCN vörös listáján a veszélyeztetett kategóriában szerepel, aminek fő oka a *Cameraria ohridella* károsítása és annak következményei (Allen és Khela 2017). Sok a megválaszolatlan kérdés a *Brenneria* és *Lonsdalea* fajokkal, terjedésükkel, környezeti igényeikkel, tűrőképességükkel és fertőzésüknek hosszútávú hatásaival kapcsolatban, melyeknek ismerete szükséges ahhoz, hogy mérlegelni tudjunk, melyik fajok továbbterjedését kell megakadályozni, mert tovább rontják az egyébként is gyengülő kondícióban lévő értékes városi díszfáinkat. Emellett meg kell előzni azt, hogy még több növényfaj kerüljön veszélyeztetett besorolás alá, ezáltal közelítve a kihalás felé.

2012. évtől kezdődően figyeltünk fel diófákon, díszfákon (*Aesculus hippocastanum*, *Betula pendula*, *Morus alba*, *Platanus x acerifolia*, *Populus nigra*, *Salix alba*, *Ulmus* sp.) és egy szilfaerdőben a kéregrepedésekre, amelyekből baktériumnyálka szivárgott. A tapasztalt tünetek hasonlóak voltak a szakirodalomban *Brenneria* és *Lonsdalea* fajokra jellemző, különböző növényfajokon okozott tünetekhez. A tüneteket mutató fákról izolált baktériumok tenyészbélyei megegyeztek a korábban publikált *Brenneria* fajokról leírtakkal, valamint az izolált baktériumtörzsek Gram tulajdonságukban (negatív) és a hiperszenzitív reakcióban (nem okoztak szöveti nekrozist – kivétel a *B. rubrifaciens*) megegyeztek a szakirodalomban *Brenneria* és *Lonsdalea* fajokkal kapcsolatban publikált eredményekkel (Surico et al. 1996, Saccardi et al. 1998, Brady et al. 2012, Hauben és Swings 2015, Kile et al. 2022).

A patogenitás igazolásához kétféle módszert alkalmaztunk, 37 izolátummal hajtásokat fertőztünk, valamint megsebeztük a törzset, amit 18 izolátum szuszpenziójával inokuláltunk. Három hónappal később, az értékelés során nem tapasztaltuk baktériumnyálka megjelenését, és rákos sebek sem alakultak ki, mely megegyezik Kile és munkatársai (2022) megfigyeléseivel, akik a *Brenneria tiliae* fajjal hársfa hajtásokat fertőztek. 11 héttel a fertőzést követően csak nekrotikus léziók megjelenését tapasztalták. Egy spanyol kutatásban (egy hónap után) szintén nem tapasztaltak nyálkaszivárgást, és rákos sebek sem alakultak ki, de a fertőzési pontban kalluszosodást figyeltek meg, ami a kontrollnál nem volt látható (Biosca et al. 2006). Továbbá, a *Brenneria izbisi* patogenitásának vizsgálatakor kétéves dió növények törzsét inokulálták. 14 hónap elteltével a kérgen léziók jelentek meg, amelyet eltávolítva barna nekrotikus sávok voltak láthatóak, de nyálkafolyást és rákos sebeket nem figyeltek meg (Gašić et al. 2022). Saccardi és munkatársai (1998) azonban a *Brenneria nigrifluens* fajjal végzett patogenitási teszt során 5 hónappal az inokulációt követően, nyálkafolyást, vizenyősséget és feketedést figyeltek meg.

Mindezek alapján feltételezhetően hosszabb időre van szükségük a *Brenneria* nemzetség tagjainak – optimális környezeti feltételek mellett – ahhoz, hogy rákos sebek és nyálkafolyás is megjelenjen. Emellett szerepe lehet más tényezőknek is, mint a fertőzéshez felhasznált növények kora. Vélhetően az említett tényezők játszhatnak szerepet abban, hogy az általunk is alkalmazott, Li és munkatársai (2014) által publikált módszer nem teljesen ugyanazt az eredményt mutatta, mint amelyeket tapasztaltunk. Szabadföldi fertőzéseiknél ugyanis a nyárfákon rákos sebeket, valamint a jellegzetes, fehér nyálkafolyást is megfigyeltek.

Minden izolátumunk biokémiai tulajdonsága megegyezett a típustörzsek (*Brenneria alni* PVfi20, *B. bubanii* 4f2^T, *B. corticis* gBx10-1-2^T, *B. goodwinii* LMG 26270^T, *B. izbisi* KBI 423^T, *B. nigrifluens* DSM 30175^T, *B. populi* Li et al. D9-5^T, *B. salicis* LMG 2698^T és *B. tiliae* WC1b.1^T) jellemzőivel a következő reakciókban: lizin decarboxiláz, indol termelés, gelatináz, szacharóz fermentáció/oxidáció és arabinóz fermentáció/oxidáció. Az öt vadgesztenyéről gyűjtött izolátum a *B. corticis* típustörzsszel (Aes1: 17 reakció; Aes2-5: 15 reakció) és a *B. nigrifluens* típustörzsszel (Aes1: 17 reakció; Aes2-5: 15 reakció) egyezett meg a legtöbb reakcióban. A nyárfáról származó izolátumok esetén nagyobb a változatosság a hasonló tulajdonságokkal bíró típustörzsekkel illetően, de az izolátumok egymáshoz viszonyítva is mutatnak különbségeket. A Bet1 17 reakcióban mutatott egyezést a *B. bubanii*, *B. corticis* és *B. nigrifluens* fajokkal, míg a Bet2 és Bet3 izolátumok ugyanezekkel a fajokkal 16 tulajdonságban. A Bet4 izolátum 16 tulajdonságban adott egyező eredményt a *B. bubanii*, *B. corticis*, *B. nigrifluens*, *B. salicis* és *B. tiliae* típustörzsekkel. A Bet 5 izolátum a *B. corticis* törzsszel pedig 18 reakcióban egyezett meg. A Bet6 és Bet7 izolátumok esetén a *B. corticis*, a *B. nigrifluens* valamint a *B. tiliae* fajokkal 17 tulajdonságban mutatott egyezést. 17 reakcióban adott egyező eredményt a Pop1 izolátum (nyárfáról) a *B. tiliae* törzsszel, valamint 18-ban a szilről származó izolátumok a *B. goodwinii* törzsszel. A Juglans1 izolátum a *B. alni* típustörzsszel 14, a Salix1 izolátumunk pedig a *B. alni*, *B. corticis* és *B. nigrifluens* típustörzsszel 14 tulajdonságban egyezett meg. A Juglans2 19, valamint a platánról származó izolátumok (kivéve Pl6) 17 reakcióban egyeztek meg a *B. corticis* és *B. nigrifluens* fajokkal. A Pl6 izolátum a *B. goodwinii* törzsszel 18 tulajdonságban adott egyező eredményt. A két eperfáról gyűjtött izolátum pedig 14 reakcióban mutatott egyezést a *B. corticis* és *B. goodwinii* típustörzsekkel.

A zöld diókon végzett vizsgálatok eredményeként megállapítható, hogy minden vizsgált izolátumunk váltott ki tünetet. Annak ellenére, hogy a típustörzsek izolátumai nem fertőzték a terméseket, köztük a *B. salicis* DSM 30166 sem, a saját, fűzfáról gyűjtött izolátumunk (Salix1) viszont az inokulációs pontban feketedést váltott ki. A többi izolátumunk is okozott valamilyen mértékű tünetet – nekrosis, dióbél vizenyősödése, feketedése, vagy elfolyósodása –, amelyek viszont más gazdanövényekről származnak.

A molekuláris vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy egyes izolátumok bizonyos génszakaszai (*atpD*, *gyrB*, *infB*, *rpoB*) nem amplifikálódtak többszöri ismétlés után sem, vagy több aspecifikus termék keletkezett. Próbáltuk kiszűrni a probléma lehetséges forrását, de nem jártunk sikerrel. Brady és munkatársai (2008, 2014a), valamint Kile és munkatársai (2022) is beszámoltak arról, hogy néhány törzsnél más, alacsonyabb (46 °C és 50 °C az 55 °C helyett) primerkötődési hőmérsékletet állítottak be, hogy javítsák háztartási génszakaszok felszaporítását. Egy másik vizsgálatban viszont az anellálási hőmérséklet emelésével kaptak jó eredményt (Erjavec 2019). Mindezekből valószínűsíthető, hogy más primerkötődési hőmérséklet beállításokkal, vagy egyes PCR összetevők (MgCl₂, primerek, templát, stb.) koncentrációjának módosításával, optimalizálásával elérhető lenne izolátumaink hiányzó génszakaszainak felszaporítása.

A részleges 16S rRNS gén szekvenciáin alapuló filogenetikai törzsfá és a biokémiai tesztek eredményei alapján a dióról, a platánról és a vadgesztenyéről származó izolátumok a nyárfáról izolált *B. corticis*, valamint a közönséges dióról izolált *B. nigrifluens* álltak legközelebbi rokonsági kapcsolatban. A négy háztartási gén összekapcsolt szekvenciái alapján készített törzsfán azonban a hozzájuk legközelebbi rokon faj a *B. goodwinii* (LMG 26270^T és LMG 26262) volt, amelyet tölgyfákról izoláltak. Az MLSA páronkénti összehasonlítás eredménye viszont a *B. populi* subsp. *brevivirga* (83,01-83,83%) fajjal mutatta a legtöbb egyezést. Emellett a nyírfáról gyűjtött izolátumok a törzsfán a *B. corticis* és *B. nigrifluens* fajok melletti ágon helyezkedtek el, amelyekhez biokémiai tulajdonságaik alapján is közel álló rokon fajok. Egy ágon csoportosult a Pop1, fekete nyárfáról gyűjtött izolátumunk és a *B. populi* Hauben et al. 1998 baktériumfaj (nyárfa) törzseivel, amelyek 16S rRNS szekvenciája a páronkénti összehasonlítás eredménye szerint 91,32-96,60%-ban egyezett izolátumunk szekvenciájával. Azonban ettől eltérően a biokémiai tulajdonságok a *B. tiliae* fajjal mutattak több egyezést. A Salix1 azonosítási kódú izolátum (fűz) egy ágon helyezkedett el a *B. salicis* LMG 2698 típus törzsszel, amely fűzfáról származik. A páronkénti összehasonlítás és biokémiai tulajdonságok viszont eltérést mutattak, előbbi esetén a *B. populi* Hauben et al. 1998 YMAPO5 törzsszel 97,26%-ban volt egyező a két szekvencia, valamint a legtöbb tulajdonságban Salix1 izolátumunk a *B. corticis*, *B. nigrifluens* fajokkal egyezett. Külön ágon volt található a két eperfa izolátumunk, melyekhez a két közönséges dióról gyűjtött *B. izbisi* izolátum (KBI 423^T, KBI 429), a fűzfáról származó *B. salicis* típus törzs (LMG 2698), és a nyárfáról azonosított *B. populi* Hauben et al. 1998 izolátumok (NCPPB 4299, YMAPO5) voltak legközelebbi rokonságban. Emellett a páronkénti összehasonlítás eredménye alapján a *B. populi* Hauben et al. 1998 YMAPO5 törzsszel 92,75-92,97%-ban egyeztek meg, viszont a biokémiai tulajdonságok más fajokkal mutattak nagyobb mértékű egyezést (*B. corticis*, *B. goodwinii*).

A szilről származó izolátumok a szinte teljes mértékben megegyeztek egymással, és külön ágon, egy csoportban voltak. Hozzájuk a 16S rRNS gén alapján a legközelebb álló rokon fajok a hazánkban azonosított *B. bubanii* (4f2, Kf) és a *B. goodwinii* fajok (LMG 26270, LMG 26272, Mf3-1, J1-1, Sz2) voltak, utóbbiak az akut tüdőgyulladás kialakulásában szerepet játszó baktériumok. A multilókusz szekvencia analízis alapján a *B. populi* Li et al. 2015 és *B. populi* subsp. *brevivirga* voltak a legközelebbi rokon fajok, valamint az MLSA páronkénti összehasonlítás eredménye szintén a *B. populi* subsp. *brevivirga* (86,90-89,05%) fajjal mutatta a legtöbb egyezést. A biokémiai tulajdonságok azonban a *B. goodwinii* faj eredményeivel egyeztek a legtöbb reakcióban.

A 16S rRNS gén szekvenciáin alapuló filogenetikai törzsfa több ponton is eltért az MLSA törzsfától: a típustörzsek is máshol helyezkedtek el, illetve a platánról és szilfáról izolált törzseink is. Azonban más kutatásban is arra jutottak, hogy az *Enterobacterales* renden belül a 16S rRNS nemzetség-szintű meghatározásra igen, de faj-szintű azonosításra nem ad megbízható eredményt (Naum et al. 2008, Maddock et al. 2022b). Ez alapján a 16S rRNS filogenetikai törzsfa azt mutatja, hogy izolátumaink a *Pectobacteriaceae* családon belül a *Brenneria* nemzetséghez tartoznak. Emellett feltételezhető, hogy a fűzről izolált *Salix* törzs *Brenneria salicis*. Továbbá, a Pop1 nyárfáról gyűjtött izolátum vélhetően a *B. populi* Hauben et al. 1998 fajhoz tartozhat, melyet szintén nyárfán azonosítottak, biokémiai tulajdonságai azonban nem állnak rendelkezésre ennek megerősítésére.

A 16S rRNS gén és az MLSA törzsfa abban megegyezett, hogy a szilről és platánról származó izolátumok szekvenciái külön ágon helyezkedtek el, feltehetően új *Brenneria* fajok lehetnek – de ennek megerősítéséhez további vizsgálatok elvégzése szükséges. Emellett a P17, a P18, a P19, a P110 és a P111 platánról izolált törzsek némileg különböztek egymástól. Hasonló tapasztalatokat közöltek kutatásukban Brady és munkatársai (2012), akik kismértékű genetikai variabilitást figyeltek meg, tölgyfáról gyűjtött *Lonsdalea britannica* izolátumoknál is – 16S rRNS és négy háztartási gén (*atpD*, *gyrB*, *infB*, *rpoB*) vizsgálati eredményei alapján –, amely feltételezésük szerint azok különböző gyűjtési helyeire vezethető vissza. Emellett Kile és munkatársai (2022) a *Brenneria tiliae* faj esetén is hasonló következtetésre jutottak. Ez magyarázatot adhat az ugyanazon gazdanövényről származó, de a filogenetikai törzsfán különbséget mutató izolátumaink (P17, P18, P19, P110, P111) esetén is.

Javaslatok a kutatás folytatásához:

- további molekuláris vizsgálatok elvégzése: PCR optimalizálása (PCR elegyben magnézium, primer és DNS koncentráció módosítása, Gradiens PCR), hogy a hiányzó

16S rRNS és háztartási gének szekvenciáival is ki lehessen egészíteni a filogenetikai törzsfákat,

- zsírsavanalízis és DNS-DNS hibridizáció elvégzése az izolátumokkal,
- további biokémiai tesztek (API 20NE, API 50CHB/E, Biolog GN2 Microplate) elvégzése,
- elektronmikroszkópos felvételek készítése (baktériumsejtek morfológiai bélyegeinek megállapításához),
- további tünetes növényfajok és a hazai tölgyfák felmérése (akut tölgy leromlás),
- esetleges vektorok felderítése,
- az Egyesült Királyságban folyó kutatások mintájára a hazai rizoszféra mikrobiom vizsgálata, az egészséges és a tüneteket mutató növényfajok gyökérzónájában előforduló baktériumfajok összehasonlítása,
- a baktériumfajok kölcsönhatásának vizsgálata Brady és munkatársainak (2022) kutatása alapján.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A különböző díszfa fajokon kéregbetegséget okozó *Brenneria* fajok felderítése és jellemzése egy olyan tudományterület, mely kevésbé feltárt, így dolgozatomban számos új információ leírására került sor, amelyek közül a következőket szeretném kiemelni:

1. Magyarországon elsőként jellemeztünk 39 *Brenneria* – két dióról, egy fűzfáról, 11 platánról, 10 szilfáról, hét nyírfáról, egy nyárfáról, két eperfáról és öt vadgesztenyéről gyűjtött – izolátumot klasszikus (morfológiai-, Gram-, biokémiai tulajdonságok, hiperszenzitív reakció indukáló képesség, patogenitási teszt) és molekuláris módszerek (16S rRNS, négy háztartási gén) alapján, melyekkel a nemzetközi adatokhoz is hozzájárultunk.
2. Megállapítottuk, hogy a *Platanus x acerifolia* (Pl17–Pl111) és az *Ulmus* sp. (Ulmus1, Ulmus2, Ulmus4–8) növényfajokról származó izolátumaink feltehetően két új, *Brenneria* nemzetségbe tartozó faj tagjai lehetnek. Emellett a világon elsőként közöltünk szekvencia adatokat a platán és a szil gazdanövényekről izolált baktériumfajok háztartási génjeiről (*atpD*, *gyrB*, *infB*, *rpoB*) és elemeztük azokat multilókusz szekvencia analízissel.
3. Kimutattuk, hogy az elvégzett vizsgálatok alapján egy dióról (Juglans1), a tizenegy platánról (Pl1–Pl111) és az öt vadgesztenyéről (Aes1–Aes5) származó izolátumunk egy fajhoz tartozhat, amely polifág, vagy ugyanazon fajhoz tartozó különböző alfajok lehetnek.
4. *Betula pendula* és *Morus alba* díszfákról gyűjtött izolátumaink (Bet1–Bet5, Bet7, Morus1, Morus2) esetén megállapítottuk, hogy biokémiai tulajdonságaik és részleges 16S rRNS gén szekvenciáik alapján elkülönülnek az ismert *Brenneria* fajoktól, feltehetően új tagjai lehetnek a nemzetségnek.
5. Megállapítottuk, hogy a *Populus nigra* növényfajról izolált kórokozó (Pop1 izolátum), a *Brenneria populi* Hauben et al. 1998 baktériumfajhoz tartozik és elsőként közöltünk szekvencia adatot a baktériumfaj részleges 16S rRNS génszakaszáról és biokémiai tulajdonságairól.
6. Eddigi vizsgálataink alapján kimutattuk, hogy a Juglans2, dióról és a Pl6, platánról gyűjtött izolátumok a *Brenneria nigrifluens* baktériumfajhoz tartoznak, valamint a platán új gazdanövénye a kórokozónak az izolátum részleges 16S rRNS gén elemzése alapján.
7. A világon elsőként írtunk le *Brenneria* fajt *Aesculus hippocastanum* gazdanövényről és közöltük az izolátumok jellemző tulajdonságait, részleges 16S rRNS gén szekvencia adatait – amelyek alapján elkülönülnek az ismert *Brenneria* fajoktól; a legközelebbi rokon fajok a *B. corticis*, *B. nigrifluens* és a *B. tiliae*.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Impakt faktoros folyóiratcikkek

- Zlatković, M., **Tenorio-Baigorria, I.**, Lakatos, T., Tóth, T., Koltay, A., Pap, P., Marković, M., Orlović, S. 2020. Bacterial Disease on *Populus x euramericana* Caused by *Lonsdalea populi* in Serbia. *Forests*, **11** (10): 1080. e-ISSN: 1999-4907; IF: 2,59 (2020)
- Tenorio-Baigorria, I.**, Botyánszki, G., Gyuris, R., Zsigó, Gy., Palkovics, L., Végh, A. 2022. *Brenneria nigrifluens* Isolated from *Aesculus hippocastanum* L. Bark in Hungary. *Forests*, **13** (2): 227. e-ISSN: 1999-4907; IF: 3,23 (2021)

Lektorált folyóiratban (MTA listás) megjelent közlemények

- Tenorio-Baigorria, I.**, Végh, A. Galambos, N., Dávid, O., Palkovics, L. 2017. Díszfák kéregbetegségét okozó baktériumfajok. *Növényvédelem*, **78** (53): 11. 477-484.

Egyéb tudományos cikkek

- Koltay, A., Lakatos, T., Tóth, T., **Tenorio-Baigorria, I.** 2020. Bakteriális eredetű kéregelhalás nemesnyáron. *Erdészeti Lapok*. CLV. Évf. **6**: 30-33.

Konferencia közlemények („full paper”)

- Végh, A., Borsos, G., **Tenorio-Baigorria, I.**, Bujdosó, G., Izsépi, F., Palkovics, F. 2015. Bark canker disease on walnut in Hungary. *Acta Horticulturae*, II International Workshop on Bacterial Diseases of Stone Fruits and Nuts, p. 47.
- Tenorio-Baigorria, I.**, Végh, A., Némethy, Zs., Hadar, Zs., Palkovics, L. 2018. Baktérium okozta kéregbetegség szilfákon. *Georgikon for Agriculture*, **22** (1): 113-118.

Konferencia közlemények („abstract”)

- Végh, A., **Tenorio-Baigorria, I.**, Borsos, G., Bujdosó, G., Izsépi, F., Palkovics, L. 2015. Bacterial bark canker disease on walnut in Hungary. 1st European Fruit Research Institutes Network, Shell Fruit Species Meeting, Budapest, p. 18.
- Végh, A., **Tenorio-Baigorria, I.**, Borsos, G., Bujdosó, G., Izsépi, F., Palkovics, L. 2016. A *Brenneria nigrifluens* gyors azonosítási módszere. 62. Növényvédelmi Tudományos Napok kiadványa, p. 93. ISSN: 0231 2956
- Végh, A., Dávid, O., **Tenorio-Baigorria, I.**, Némethy, Zs., Palkovics, L. 2016. A platán új baktériumos betegsége. 62. Növényvédelmi Tudományos Napok kiadványa, p. 45. ISSN: 0231 2956
- Tenorio-Baigorria, I.**, Végh, A., Palkovics, L. 2017. Plant protection problems of ornamental trees in public spaces and parks. 15th Wellmann Scientific Conference, Hódmezővásárhely, p. 76. ISBN 978-963-306-530-3
- Tenorio-Baigorria, I.**, Végh, A., Palkovics, L. 2017. Díszfákat fenyegető, újonnan megjelenő baktériumfajok. XX. Bolyai konferencia, Budapest, p. 33.
- Tenorio-Baigorria, I.**, Karacs-Végh, A., Koltay, A., Palkovics, L. 2019. *Brenneria* and *Lonsdalea* species in Europe. Meeting of IUFRO WP 7.03.10 Methodology of forest insect and disease survey in Central Europe, Suceava, p. 86.
- Végh, A., **Tenorio-Baigorria, I.**, Palkovics, L. 2019. Díszfák baktériumos betegségei. 24. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum, Debrecen, p. 34-35.

- Zlatković, M., **Tenorio-Baigorria, I.**, Lakatos, T., Tóth, T., Koltay, A., Pap, P., Marković, M., Orlović, S. 2020. Bacterial Disease on *Populus x euramericana* Caused by *Lonsdalea populi* in Serbia. Short rotation woody crops webinar series, 2020. December 3., The University of Minnesota Extension, United States.
- Zlatković, M., **Tenorio-Baigorria, I.**, Lakatos, T., Tóth, T., Koltay, A., Pap, P., Marković, M., Orlović, S. 2021. Occurrence of *Lonsdalea populi* and *Neocosmospora solani* (*Fusarium solani*) sensu lato in Serbian poplar nurseries. IPC (International Poplar Commission) 26th Session, Róma, 2021. október 5-8.

Tudományos könyvrészletek

- Zlatković, M., Pap, P., Tenorio-Baigorria, I., Koltay, A., Ogris, N., Cech, T. 2021. Diseases of poplars and their hybrids with an emphasis on disease management recommendations. In: Perspectives for forest and conservation management in riparian forests. Slovenian Forestry Institute, Silva Slovenica Publishing Centre, 129-130.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Allen, D. J. Khela, S. (2017): *Aesculus hippocastanum* (errata version published in 2018). In *The IUCN Red list of Threatened Species; IUCN Global Species Programme Red List Unit: Cambridge, UK, 2017*, online: <https://www.iucnredlist.org/species/202914/122961065> (accessed on 21 May 2022)
- Biosca, E. G., Martín, S., Zuriaga, P., Montón, C., López-Ocaña, L., López, M. M. (2006): Characterization of *Brenneria* sp. from poplar cankers in Spain. In Mendez-Vilas, A. (szerző) *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interactions*, 385-389.
- Brady, C. L., Cleenwerck, I., Denman, S., Venter, S. N., Rodríguez-Palenzuela, P., Coutinho, T. A., De Vos, P. (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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **62**: 1592-1602.
- 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.
- Brady, C., Hunter, G., Kirk, S., Arnold, D., Denman, S. (2014): Description of *Brenneria roseae* sp. nov. and two subspecies, *Brenneria roseae* subspecies *roseae* ssp. nov. and *Brenneria roseae* subspecies *americana* ssp. nov. isolated from oak. *Systematic and Applied Microbiology*, **37** (6): 396-401.
- Brady, C., Kaur, S., Crampton, B., Maddock, D., Arnold, D., Denman, S. (2022): Transfer of *Erwinia toletana* and *Erwinia iniecta* to a novel genus *Winslowiella* gen. nov. as *Winslowiella toletana* comb. nov. and *Winslowiella iniecta* comb. nov. and description of *Winslowiella arboricola* sp. nov., isolated from bleeding cankers on broadleaf hosts. *Frontiers in Microbiology*, **13**, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1063107>
- Brady, C. L., Venter, S. N., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Vancanneyt, M., Swings, J., Coutinho, T. A. (2009): *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**: 2339-2345.
- Brady, C. L., Venter, S. N., Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P., Coutinho, T. A. (2010): Transfer of *Pantoea citrea*, *Pantoea punctata* and *Pantoea terrea* to the genus *Tatumella* emend. as *Tatumella citrea* comb. nov., *Tatumella punctata* comb. nov. and *Tatumella terrea* comb. nov. and description of *Tatumella morbirosei* sp. nov. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**: 484-494.
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J., Noller, H. F. (1978): Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **75**: 4801-4805.
- 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**: 2451-2456.

- Erjavec, M. S. (2019): Annealing Temperature of 55 °C and Specificity of Primer Binding in PCR Reactions. In: Nagpal, M. L., Boldura, O., Baltă, C., Enany, S. editors. *Synthetic Biology – New Interdisciplinary Science*, London: IntechOpen; 2019 Online: <https://www.intechopen.com/chapters/66513>, doi: 10.5772/intechopen.85164 [accessed on 2022 Aug 01].
- Gašić, K., Zlatković, N., Kuzmanović, N. (2022): Polyphasic study of phytopathogenic bacterial strains associated with deep bark canker of walnut in Serbia revealed a new species, *Brenneria izbisi* sp. nov. *Frontiers in Plant Science*, 13:1055186. doi: 10.3389/fpls.2022.1055186
- Hauben, L., Swings, J. (2015): *Brenneria*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Wiley & Sons Inc., in association with Bergey's Manual Trust, 1-14.
- Hedegaard, J., Steffensen, S. A., Nørskov-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.
- Kile, H., Arnold, D., Allainguillaume, J., Denman, S., Brady, C. (2022): *Brenneria tiliae* sp. nov., isolated from symptomatic *Tilia x moltkei* and *Tilia x europaea* trees in the UK. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **72** (10), <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005515>
- King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **44** (2): 301-307.
- Klement, Z. (1963): Rapid Detection of the Pathogenicity of Phytopathogenic Pseudomonads. *Nature*, **199**: 299-300.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**: 1870-1874.
- Li, Y., He, W., Ren, F., Guo, L., Chang, J., Cleenwerck, I., Ma, Y., Wang, H. (2014): A Canker Disease of *Populus x euramericana* in China Caused by *Lonsdalea quercina* subsp. *populi*. *Plant Disease*, **98** (3): 368-378.
- Li, Y., He, W., Ren, F., Guo, L., Chang, J., Cleenwerck, I., Ma, Y., Wang, H. (2014): A Canker Disease of *Populus x euramericana* in China Caused by *Lonsdalea quercina* subsp. *populi*. *Plant Disease*, **98** (3): 368-378.
- Maddock, D., Arnold, D., Denman, S., Brady, C. (2022): Description of a novel species of *Leclercia*, *Leclercia tamurae* sp. nov. and proposal of a novel genus *Silvania* gen. nov. containing two novel species *Silvania hatchlandensis* sp. nov. and *Silvania confinis* sp. nov. isolated from the rhizosphere of oak. *BMC Microbiology*, **22**: 289.
- Moretti, C., Buonauro, R. (2010): Immature walnut fruit inoculation for evaluation of *Brenneria nigrifluens* pathogenicity. *Phytopathologia Mediterranea*, **49**: 80-83.
- Moretti, C., Hosni, T., Vandemeulebroecke, K., Brady, C., De Vos, P., Buonauro, R., Cleenwerck, I. (2011): *Erwinia oleae* sp. nov., isolated from olive knots caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **61**: 2745-2752.
- Naum, M., Brown, E. W., Mason-Gamer, R. J. (2008): Is 16S rDNA a Reliable Phylogenetic Marker to Characterize Relationships Below the Family Level in the Enterobacteriaceae? *Journal of Molecular Evolution*, **66**: 630-642.
- Nei, M., Kumar, S. (2000): Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Spröer, C., Mendrock, U., Swiderski, J., Lang, E., Stackebrandt, E. (1999): The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **49** (4): 1433-1438.
- Saccardi, A., Bonetti, V., Melegatti, A., Cristanini, M. (1998): Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on English walnut (*Juglans regia*) in the Veneto region (Northern Italy). *Journal of Plant Pathology*, **80** (1): 63-65.
- Surico, G., Mugnai, L., Pastorelli, R., Giovannetti, L., Stead, D. E. (1996): *Erwinia alni*, a New Species Causing Bark Cankers on Alder (*Alnus* Miller) Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46** (3): 720-726.
- Suslow, T. V., Schroth, M. N., Isaka, : (1982): Application of a Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Without Staining. *Phytopathology*, **72** (7): 917-918.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021): MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, **38** (7): 3022-3027.
- 43/2010. (IV. 23.) FVM rendelet a növényvédelmi tevékenységről, 6. § (2a-b).
- Internet1: QUIAGEN CLC Genomics Workbench 8.5 (<https://digitalinsights.qiagen.com/>)