

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**ÉTKEZÉSI PAPRIKA (*CAPSICUM ANNUM L. VAR. GROSSUM*)
TENYÉSZTHETŐ ENDOFITA BAKTÉRIUMAINAK BIODIVERZITÁSA
ÉS KOLONIZÁCIÓJUK MODELLEZÉSE**

FÜSTÖS ZOLTÁN

Budapest

2016

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Vatai Gyula
Egyetemi tanár, DSc
SZIE, Élelmiszertudományi Kar,
Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék

Témavezető: Dr. Maráz Anna
Professzor emerita, CSc
SZIE, Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

Témavezető: Dr. Belák Ágnes
Egyetemi docens, PhD
SZIE, Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

A jelölt a Szent István Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|-----------|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 5 |
| 1. BEVEZETÉS | 6 |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS | 8 |
| 2.1. Az étkezési paprika | 8 |
| 2.1.1. A paprika rendszertani besorolása, főbb növénysszervezettani és élettani jellemvonásai | |
| 2.1.2. Táplálkozás-élettani tulajdonságai és gyógyászati felhasználása | 10 |
| 2.2. Az étkezési paprika gazdasági jelentősége | 11 |
| 2.3. Talajkultúrás és hidroponikus rendszerek jellemzése, szerepük a paprikatermesztésben ... | 12 |
| 2.3.1. Talajkultúrás rendszerek | 12 |
| 2.3.2. Hidroponikus/talajmentes rendszerek | 13 |
| 2.4. Endofita baktériumok | 15 |
| 2.4.1. Definíciójuk és rövid jellemzésük | 15 |
| 2.4.2. Az endofita baktériumok növénybe való bejutása és vándorlása | 17 |
| 2.4.3. Növénnyel való együttélésük és a növényre gyakorolt jótékony hatásuk | 21 |
| 2.5. Nyers növényi élelmiszerekkel terjedő humánpatogén baktériumok | 23 |
| 2.5.1. Epifita humánpatogén baktériumok | 24 |
| 2.5.2. Endofita humánpatogén baktériumok | 24 |
| 2.6. Növénnyel asszociált baktériumok kölcsönhatásai a növényi endoszférában | 27 |
| 2.7. Endofita baktériumok kimutatására és izolálására alkalmas módszerek | 28 |
| 2.7.1. Hagyományos, tenyésztésen alapuló módszerek | 28 |
| 2.7.2. Tenyésztéstől független módszerek | 29 |
| 2.7.2.1. A FISH technika | 30 |
| 2.7.2.2. PCR – primer tervezési és ellenőrzési módszerek | 32 |
| 2.8. Filogenetikai analízisek – törzsfák szerkesztési szempontjai és az alkalmazható bioinformatikai módszerek | 34 |
| 2.9. A paprika bakteriális endofitáival kapcsolatos eddigi tudományos vizsgálatok és ezek konklúziói | 36 |
| 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK | 41 |
| 3.1. A baktériumok izolálásához felhasznált paprika minták | 41 |
| 3.2. A kísérletekben használt baktérium törzsek | 41 |
| 3.3. Alkalmazott tápközegek | 41 |
| 3.4. Alkalmazott oldatok | 42 |
| 3.5. Egyéb anyagok | 44 |
| 3.6. Módszerek | 45 |
| 3.6.1. Mintavétel és a feltehetően endofita baktériumok izolálása | 45 |
| 3.6.2. Az izolátumok fenotípusos jellemzése | 45 |
| 3.6.3. Általános molekuláris módszerek | 46 |
| 3.6.3.1. A baktérium izolátumok genomiális DNS-ének kivonása | 48 |
| 3.6.3.2. Az izolátumok molekuláris tipizálása RAPD-PCR módszerrel | 48 |
| 3.6.3.3. A <i>Pseudomonas</i> nemzetségbe tartozó izolátumok detektálása | 48 |
| 3.6.3.4. A <i>Pseudomonas</i> nemzetségbe tartozó izolátumok <i>rpoB</i> génjének felszaporítása | 48 |
| 3.6.3.5. Az izolátumok 16S rRNS génjének felszaporítása | 49 |
| 3.6.3.6. Az <i>rpoB</i> és a 16S rRNS gének szekvenálása | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6.4. Filogenetikai vizsgálatok | 49 |
| 3.6.5. FISH próbák tervezése és számítógépes értékelése | 50 |
| 3.6.6. A FISH lépései, új próbák gyakorlati értékelése és specifikusságuk vizsgálata..... | 51 |
| 3.6.6.1. A FISH lépései és a mikroszkópos vizsgálatra való előkészítés..... | 51 |
| 3.6.6.2. Az új oligonukleotid próbák gyakorlati értékelése | 52 |
| 3.6.6.3. Az új oligonukleotid próbák specifikusságának vizsgálata | 53 |
| 3.6.7. Primerek tervezése, <i>in silico</i> és gyakorlati értékelése..... | 53 |
| 3.6.8. A baktérium izolátumok paprikamag csírázásra gyakorolt hatásának vizsgálata..... | 54 |
| 3.6.9. Palántanevelési kísérlet | 55 |
| 3.6.9.1. A palánták feldolgozása, valamint tárolása a vizsgálatok megkezdéséig | 56 |
| 3.6.9.2. Potenciálisan endofita baktériumok kitenyésztése mesterségesen fertőzött palántákból, csoportosításuk és molekuláris analízisük | 57 |
| 3.6.9.3. Patogént modellező és patogén baktériumok kimutatása szelektív táptalajokon mesterségesen fertőzött palántákból..... | 57 |
| 3.6.9.4. A palántából kivont DNS vizsgálata PCR módszerrel..... | 58 |
| 3.6.9.5. Baktériumok kimutatása növényi szövetekből FISH technikával | 59 |
| 3.6.10. A kiválasztott endofita baktériumok patogén és patogént modellező baktériumokra gyakorolt hatásának vizsgálata..... | 60 |
| 3.6.10.1. Kontakt baktérium inhibíciós vizsgálatok..... | 60 |
| 3.6.10.2. Lyukdiffúziós vizsgálatok..... | 61 |
| 4. EREDMÉNYEK | 62 |
| 4.1. Feltehetően endofita baktériumok izolálása | 62 |
| 4.2. A potenciális endofita izolátumok fenotípusos jellemzése..... | 64 |
| 4.3. Az izolátumok tipizálása RAPD-PCR módszerrel | 65 |
| 4.4. A <i>Pseudomonas</i> nemzetségbe tartozó törzsek detektálása | 65 |
| 4.5. Az <i>rpoB</i> és a 16S rRNS gének PCR-es amplifikálása és szekvenálása..... | 66 |
| 4.6. A filogenetikai vizsgálatok eredményei | 71 |
| 4.7. A feltehetően endofita törzsek megoszlása a paprikákban | 74 |
| 4.8. A különböző KTE-kbe tartozó, feltehetően endofita törzsek paprikamag csírázására gyakorolt hatása..... | 78 |
| 4.9. Oligonukleotid próbák tervezése és specifikusságuk vizsgálata | 82 |
| 4.9.1. Az oligonukleotid próbák alkalmazhatóságának értékelése | 83 |
| 4.9.2. Az újonnan tervezett oligonukleotid próbák specifikusága | 85 |
| 4.10. Oligonukleotid primerek tervezése és specifikusságuk vizsgálata | 88 |
| 4.11. Mikrobákkal fertőzött paprikamagokból nevelt palánták baktériumbiótájának vizsgálati eredményei..... | 88 |
| 4.11.1. A feltételezett endofita baktériumokkal fertőzött növényekből izolált baktériumok jellemzése morfológiai, 16S rDNS szekvencia és RAPD-PCR tipizálás alapján | 88 |
| 4.11.2. Beoltáshoz használt patogént modellező és patogén baktériumok jelenlétének vizsgálata szelektív táptalajokon..... | 95 |
| 4.11.3. A fertőzéshez használt baktériumok közvetlen kimutatása a növényekből izolált DNS PCR-es vizsgálatával..... | 95 |
| 4.11.4. Baktériumok detektálási eredményei növényi mintákban FISH technikával | 99 |
| 4.12. A két endofita törzs patogén és patogént modellező baktériumokra gyakorolt hatása..... | 107 |
| 4.12.1. A kontakt inhibíciós vizsgálatok eredményei | 108 |

| | |
|--|------------|
| 4.12.2. A lyukdiffúziós vizsgálatok eredményei..... | 110 |
| 4.13. Új tudományos eredmények..... | 112 |
| 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK..... | 113 |
| 6. ÖSSZEFOGLALÁS..... | 115 |
| 7. SUMMARY | 118 |
| 8. MELLÉKLETEK | 121 |
| M1. Irodalomjegyzék | 121 |
| M2. A baktériumok izolálásához felhasznált két paprikafajta főbb jellegzetességei..... | 133 |
| M3. Növénytermesztési körülmények..... | 133 |
| M4. Az izolátumok részletes fenotípusos tulajdonságai | 135 |
| M5. A Gram-pozitív izolátumok fenotípusos tulajdonságai alapján készült fenogram | 146 |
| M6. A Gram-negatív izolátumok fenotípusos tulajdonságai alapján készült fenogram | 147 |
| M7. A Gram-pozitív izolátumok RAPD-PCR mintázatainak dendrogramja (D8635) | 148 |
| M8. A Gram-negatív izolátumok RAPD-PCR mintázatainak dendrogramja (M13)..... | 149 |
| M9. A munka során keletkezett génszekvencia adatok | 150 |
| KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS | 160 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACK: 1-**aminociklopropán**-1-**karboxilsav**

ALOA: **A**gar **L**isteria according to **O**ttaviani and **A**gosti

ATCC: **A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection, Manassas, USA

bp: **b**ázis**p**ár

CCM: **C**zech **C**ollection of **M**icroorganisms, Brno, Czech Republic

CLSM: **C**onfocal **L**aser **S**canning **M**icroscopy

CMC: **C**arboxy**m**ethyl-**C**ellulose (karboxi-metil-cellulóz)

DGGE: **D**enaturing **G**radient **G**el **E**lectrophoresis (denaturáló gradiens gélelektroforézist)

EC: **e**lectrical **c**onductivity (elektromos vezetőképesség)

FA: **F**ormamide

FISH: **F**luorescence ***I**n **S**itu* **H**ybridisation (Konfokális lézer szkennelő mikroszkóp)

GBN: **G**en**B**ank accession **n**umber (szekvencia azonosító szám)

GFP: **G**reen **f**luorescent **p**rotein (zöld színben fluoreszkáló fehérje)

N: Nisztatin

NNSB: **N**övényi **N**övekedést **S**erkentő **B**aktériumok

NSEB: **N**övekedést **S**erkentő **E**ndofita **B**aktériumok

KTE: **K**ezelhető **T**axonómiai **E**gység (angolul OTU: **O**perational **T**axonomic **U**nit)

PCR: **P**olymerase **C**hain **R**eaction (polimeráz láncreakció)

PGES: **P**epton **G**lükóz **E**lesztőkivonat **S**ó

RAPD: **R**andomly **A**mplified **P**olymorphic **D**N

rDNS/RNS: **r**iboszómális DNS/RNS

rhoB: riboszómális fehérje β alegysége

RRI: **r**endszerszintű **r**ezisztencia **i**ndukció

rRNS: **r**iboszómális RNS

T-RFLP: **T**erminal **R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism

V: **V**itamin

VRBL: **V**iolet **R**ed **B**ile **L**actose

WL: **W**allerstein **L**aboratory

Baktérium nemzetség nevek rövidítései:

Chryseobacterium: **C**.

Escherichia: **E**.

Listeria: **L**.

Pseudomonas: **P**.

1. BEVEZETÉS

Az étkezési paprika világszerte ismert és kedvelt zöldségnövény, amelyet mind nyersen, mind főtt ételekben előszeretettel fogyasztanak, mivel kedvező íz és érzékszervi, valamint táplálkozás-élettani tulajdonságokkal bír. Hazánkban a XX. században vált kiemelkedő szerepű táplálkozási cikké. Magyarországon napjainkban körülbelül 95 ezer, míg világszinten több mint 30 millió tonna az éves étkezési és Chili paprika termelés mennyisége, tehát gazdaságilag is fontos növénynek tekinthető.

Ezen terményt nagyon gyakran nyersen fogyasztják, tehát érdemes foglalkozni vele élelmiszerbiztonsági és mikrobiológiai szempontból is, mivel világszerte és európai szinten is egyre növekvő tendenciát mutatnak a nyers növényi élelmiszerekkel kapcsolatos megbetegedések. Ezek legnagyobb hányadát olyan baktériumokkal hozzák összefüggésbe, amelyek elsősorban állati eredetűek, de nem ismeretlenek a terményen/ben lévő opportunistáknak okozta megbetegedések sem. A növekvő járványügyi tendenciák oka valószínűleg az egyre nagyobb termelési mennyiségekben, az új technológiákban, a termőföld és az asztal közötti távolság megnövekedésében, az állattenyésztő telepek közelségében és a növény belső környezetéhez egyre jobban alkalmazkodni képes bakteriális patogénekben keresendő.

Ahhoz, hogy a növény - baktérium kapcsolatokat jobban megérthessük és ezen keresztül a termény élelmiszerbiztonsági kockázatát csökkenthessük, szükséges megismernünk a manapság szokványos agrotechnikákkal termesztett növények belsejében élő baktériumokat (endofitákat) mind minőségi, mind mennyiségi szempontból, valamint érdemes humánpatogénnal való kapcsolatukra, interakciójukra is fényt deríteni. A növényekben élő baktériumok azonosításának szerepe nemcsak biodiverzitásuk felderítésében lehet jelentős, hanem a humánpatogén és az opportunistáknak baktériumok esetleges jelenlétének igazolásában is. A növény és az endofita baktériumok kapcsolatát általában mutualista jellegűnek tekintik, ahol a baktériumok a növény által szolgáltatott tápanyagokat használják fel és a számukra káros környezeti hatásokkal szemben védelmet nyújtó, belső növényi környezet oltalmát is élvezik. Ezzel szemben a növények stressz-tűrőképességük, valamint növekedésük serkentését köszönhetik a jótékony endofita baktériumoknak. Ezen baktériumok növényre kifejtett hatásukat egyrészt direkt módon a fito-hormonszerű anyagok termelése és az etilén szintjének szabályozása révén, másrészt indirekt módon a növénypatogénnal szemben kifejtett inhibíciós hatásuk és a méreganyagok eltávolítása révén fejtik ki. Ismeretesek azonban olyan endofita baktériumok is, amelyek a humánpatogénnal szemben fejtenek ki antagonistáknak hatást. Az ilyen tulajdonsággal bíró baktériumok esetlegesen felhasználhatók, mint biokontroll ágensek, azonban azt sem lehet

kizárni, hogy vannak olyan endofita törzsek, amelyek hozzájárulnak a patogének túléléséhez, szaporodásához, ezáltal növelve az adott termény élelmiszerbiztonsági kockázatát.

Munkám során ezért feladatomban tekintettem a manapság elterjedt termesztési körülmények (talajkultúrás és hidroponikus) között nevelt, kétféle - Hó és Kárpia - étkezési paprikafajtából kitenyészhető endofita baktériumok izolálását, tipizálását, azonosítását és biodiverzitásuk vizsgálatát. Céлом volt továbbá kiválasztani mutualista törzseket és igazolni valódi endofita voltukat is. Végül vizsgálni kívántam humánpatogén, valamint ezeket modellező baktériumok paprika növénybe való bejutását paprikamag mesterséges fertőzésén keresztül, valamint *in vitro* inhibíciójukat kiválasztott valódi endofita törzsek hatására.

A célkitűzések megvalósításának a következő fő lépései voltak:

- I. Feltételezhetően endofita baktériumok izolálása talajkultúrás és hidroponikus körülmények között nevelt Hó és Kárpia étkezési paprika fajtákból.
- II. A feltételezhetően endofita izolátumok hasonlósági csoportokba rendezése fenotipizálás és RAPD-PCR-es genotipizálás alapján, majd ezt követően az egyes csoportokból kiválasztott reprezentatív törzsek molekuláris identifikálása az rRNS, illetve az *rpoB* gén szekvenciái alapján.
- III. A törzsek biodiverzitásának és rokonsági kapcsolatainak vizsgálata filogenetikai analízissel: filogenetikai törzsfák szerkesztése a baktérium törzsek 16S rRNS génszekvencia adatai alapján, ezt követően egy-egy reprezentatív törzs kiválasztása a törzsfák taxonómiai egységeiből a valódi endofita jelleg igazolásához.
- IV. Az feltételezett endofita izolátumok paprikamag csírázásra gyakorolt hatásának vizsgálata.
- V. Módszerfejlesztés a feltételezeten endofita baktériumok és humánpatogén vagy ezeket modellező törzsek molekuláris módszerekkel (PCR és FISH-CLSM) való kimutatásához.
- VI. A kiválasztott feltételezeten endofita és humánpatogén vagy ezeket modellező törzsek növénybe való bejutásának és kolonizációjának vizsgálata paprikamag mesterséges fertőzésével.
- VII. A valódi endofita törzsek humánpatogén, illetve ezeket modellező törzsekre gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro* kontaktinhibíciós és lyukdiffúziós vizsgálatokkal.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az étkezési paprika

Az étkezési paprika az egész világon népszerű zöldségnövény, de Közép-Európában, és még inkább Magyarországon néptáplálkozási cikknek tekinthető. A Kolumbusz hajóján 1494-ben behozott paprika Magyarországon már 1570-ben, Zrínyi Miklós nevelőanyja kertjében ismert volt, és ezt követően a fűszerpaprikaként használt hosszú típus nagyon elterjedt. Ezzel szemben az „étkezési paprika” típusok csak a XIX. század végén váltak ismertté, azonban specialitásuk és kiemelkedő szerepük kialakulásához viszonylag rövid idő, mindössze 100 év is elegendő volt. Hazánkban való megjelenését a török megszállás elől menekülő bolgár kertészeknek köszönhetjük, akik forradalmian új és jól kidolgozott termesztési technológiájukkal terjesztették el az egész országban (Balázs, 1994).

2.1.1. A paprika rendszertani besorolása, főbb növény szerkezeti és élettani jellemvonásai

Az étkezési paprika a *Solanaceae* (burgonyafélék) családjának tagja, ezen belül pedig a *Solanoideae* alcsaládhoz, a *Solaneae* törzshöz, a *Capsicinae* altörzshöz és a *Capsicum* nemzetséghez tartozik (Bosland és Votava, 2012). Ebbe a nemzetségbe körülbelül 30 ismert faj sorolható, de az aktuális fajok száma még mindig vitatott. A harminc faj nagy része vad típusú, csupán a *C. chinense* (kínai paprika), a *C. frutescens* (cserjés paprika), a *C. pubescens* (szőrös paprika), a *C. baccatum* (bogyós paprika) és a *C. annuum* (közönséges paprika) fajok termesztett változatai, fajtái váltak jelentőssé és ismertté (Wing *et al.*, 2013). Magyarországon valamennyi étkezési és fűszerpaprika-fajta a *C. annuum* fajba tartozik (Balázs, 1994), míg a termesztett étkezési paprika fajtatípusok ezen faj két fő változatához, a *C. annuum* var. *grossum* és a *C. annuum* var. *longum*-hoz sorolhatók. Az előbbihez tartoznak például a fehér töltenivaló (TV), Kápia, paradicsom alakú, míg utóbbihoz a hegyes erős paprika fajtatípusok (DélkerTÉSZ, 2012).

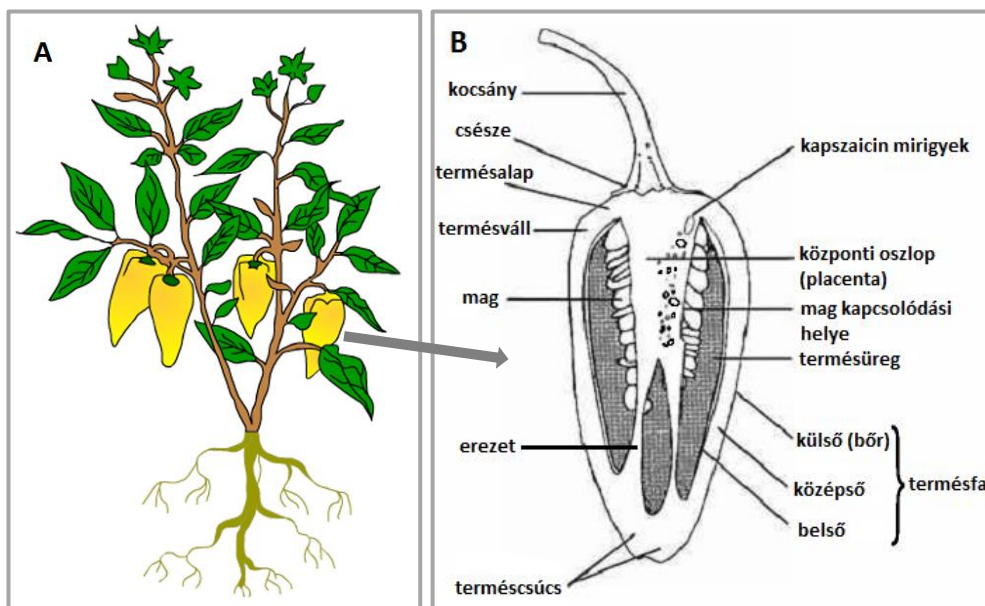
Vizsgált két fajta főbb jellegzetességei:

I. Hó fajta:

A fehér töltenivaló (TV) paprikák fajtatípusába tartozik, közepesen vastaghúsú (húsvastagsága 3-4 mm), sárgásfehér, sima felületű, kúpos alakú, 80-110 g bogyótömegű, édes, zamatos ízű és nem csípős termést hoz. Átlagos hossza 60-120 mm, vállszélessége 40-70 mm. Folytonos növekedésű, továbbá jellemző még rá a tömör állag, a vékony héj és az intenzív paprika illat (DélkerTÉSZ, 2012).

II. Kárpia fajta:

A Kárpia fajtatípusba tartozik, vastaghúsú (húsvastagsága 4-7 mm), sötétzöldből sötétpiros színbe érő, sima felületű, kúpos alakú, amely 100-120 g bogyótömegű, intenzív édes ízű és nem csípős termést hoz. Hossza 60-120 mm közötti, vállszélessége 40-70 mm, továbbá jellemző még rá a tömör állag, a közepesen vastag héj és az örölt paprika illat (DélkerTÉSZ, 2012).



1. ábra. Az étkezési paprika növény (A) (Anonym, 2008) és termésének felépítése (B) (Bosland és Votava, 2012).

Az étkezési paprika növény és termésének általános felépítését az **1. ábra** szemlélteti. Termésük az úgynevezett (felfűjt) bogyótermés, amelynek fontosabb alkotórészei (**1/B. ábra**) a terméscső, a központi oszlop a magokkal, az erezet, a csésze és a kocsány. Gazdasági és termesztési szempontból a termés minden alkotórésze jelentős. Érdekes azonban kiemelni a terméscsövet, amely az adott fajtára jellemző termésüreget adja és a bogyótermés legfontosabb értékalkotó része. A magokra jellemző a lapított vese alakzat, a sima felület és a 3-4 évig tartó csírázóképeség (Balázs, 1994; Bosland és Votava, 2012; Wing *et al.*, 2013).

A hazánkban szokványos technológiákkal termesztett *C. annuum* fajták egyéves növények, amelyek növekedéséhez megfelelő fényt, vizet, hőt és tápanyagot kell biztosítani. A terméskötéshez 5000 luxnál nagyobb fényerősség szükséges, legalább napi 12-14 órán át. Nagy vízigényű növényről van szó, amely a talaj vízkapacitásának 60-70%-os telítettsége és 90-95%-os relatív levegő páratartalom mellett terem optimálisan. Hőigényét tekintve a különböző fejlődési stádiumaitól függően 25 ± 5 °C az ideális. Tápanyagigényét tekintve nitrogénre, foszforra, káliumra, kalciumra, magnéziumra, mint makroelemekre és vasra, bórra, rézre,

mangánra, mint mikroelemekre van a legnagyobb szüksége. Fontos továbbá, hogy a szükséges tápanyag mennyiséghez is hozzájussanak a növényéke, az általuk tolerált koncentrációban, így megközelítőleg 1 ezrelékes tápoldat ajánlott a vízkultúrák termesztés esetén, ami 25 g N, 19,7 g P₂O₅ és 73 g K₂O-t jelent 100 liter vízben feloldva (Balázs, 1994; Bosland és Votava, 2012).

2.1.2. Táplálkozás-élettani tulajdonságai és gyógyászati felhasználása

Mivel az étkezési paprika fogyasztása hazai szinten eléggé jelentős (10 kg/fő körüli, és világszinten is emelkedés mutatkozik), valamint kiemelkedő vitamintartalommal rendelkezik, ezért hazánkban fontos vitaminforrásnak tekinthető (Balázs, 1994).

1. Táblázat. A friss paprikák (beleértve a magyar, jalapeno, erős chili, sárga, zöld és piros édes paprikákat is) táplálkozás-élettani szempontból fontosabb összetevői (Wing *et al.*, 2013)

| Összetevők | Mennyiség/ 100 g friss paprika | RDA % | Vitaminok | Mennyiség/ 100 g friss paprika | RDA % |
|------------------------|---------------------------------------|--------------|-----------------------|--------------------------------|---------------|
| Fehérje (g) | 0,8-2 | | C-vitamin (mg) | 44,3-183,5 | 73-306 |
| Összes lipid (g) | 0,2-0,6 | | B1-vitamin (mg) | 0,03-0,14 | 2,5-13,1 |
| Szénhidrát (g) | 5,4-9,5 | | B2-vitamin (mg) | 0,03-0,09 | 2,5-8,2 |
| Összes élelmi rost (g) | 0,9-3,7 | | B3-vitamin (mg) | 0,05-1,2 | 0,3-8,9 |
| Ásványi anyagok | Mennyiség/ 100 g friss paprika | RDA % | B5-vitamin (mg) | 0,1-0,32 | 2-6,3 |
| Kalcium (mg) | 7-18 | 0,7-1,8 | B6-vitamin (mg) | 0,22-0,51 | 17,2-39,1 |
| Vas (mg) | 0,3-1,2 | 2,7-8 | Folsav (µg) | 10-47 | - |
| Magnézium (mg) | 10-25 | 3,2-8,1 | Kolin (mg) | 5,5-11,1 | |
| Foszfor (mg) | 20-46 | 2,9-6,6 | A vitamin (µg) | 10-157 | 1-15,7 |
| Kálium (mg) | 175-340 | 8,75-17 | β-karotin (µg) | 120-670 | 2,4-13,4 |
| Nátrium (mg) | 1-13 | 0,04-0,54 | α-karotin (µg) | 15-39 | |
| Cink (mg) | 0,1-0,3 | 1,1-2,5 | β-kriptoxantin (µg) | 0-50 | |
| Réz (mg) | 0,07-0,13 | 4,4-8,9 | Lutein+zeaxantin (µg) | 51-725 | |
| Mangán (mg) | 0,1-0,24 | 4,5-10,8 | E-vitamin (mg) | 0,37-0,69 | 4,6-8,6 |
| Szelén (µg) | 0,1-2 | 0,2-3,6 | K-vitamin (µg) | 4,9-14,3 | 8,9-26 |

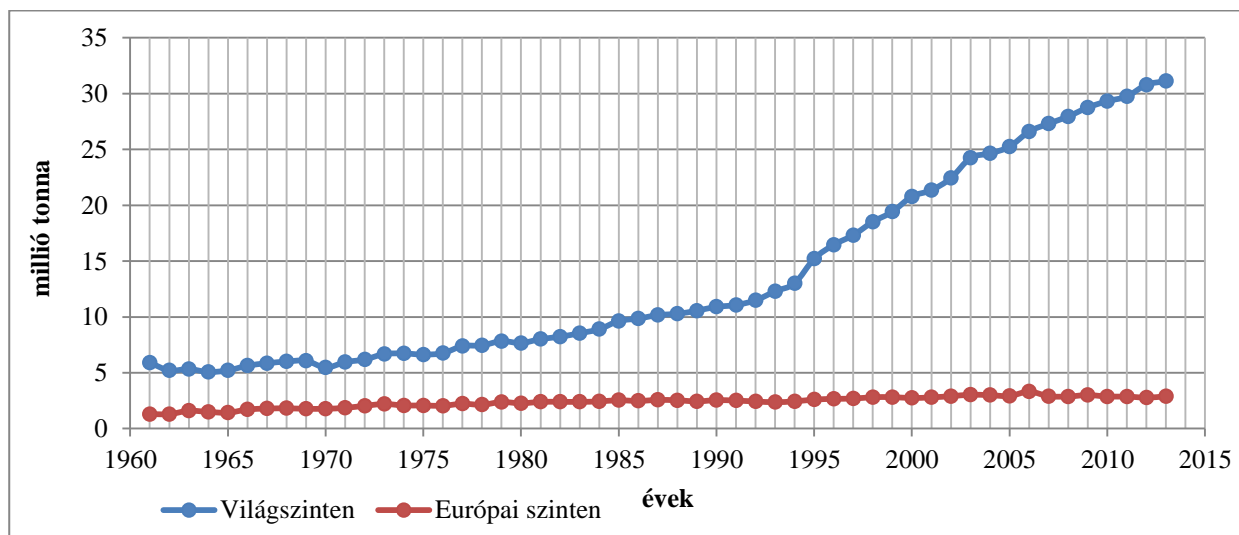
Az **1. táblázatban** összefoglalva látható a friss paprikák fontosabb táplálkozás-élettani összetevőinek átlagos mennyisége és hogy mekkora részét teszik ki az ajánlott napi bevitelnek egy felnőttre nézve. Zöld háttérrel kiemelttem a jelentősebb mennyiségben előforduló összetevőket is. Tudva azt, hogy a táblázatban szereplő 100 g-nyi mennyiség egy közepes méretű édes paprikának felel meg, mindközül kitűnik a számunkra legfontosabb alkotórésze, a

C-vitamin (félkövérrel jelölve), aminek mennyisége adott esetben a napi ajánlott bevitel 306%-át is elérheti (Wing *et al.*, 2013).

Más, az **1. táblázatban** nem szereplő, de igen fontos paprika komponensek a kapszaicinoidok, amelyek több kapszaicin komponensből álló, csípősségért felelős anyagok. Kis mennyiségben (200-250 µg/bogyó) a nem csípős paprikák is tartalmazzák, viszont a csípős fajtákban 1000 µg felett fordulnak elő (Balázs, 1994; Bosland és Votava, 2012; Wing *et al.*, 2013). Ezen komponenseket az orvosi gyógyászatban is alkalmazzák, legfőbbképpen, mint helyi érzéstelenítőket és gyulladáscsökkentőket. A modern Maja gyógyszerkönyv egy felmérése szerint több olyan gyógynövénykészítmény is tartalmazza a *Capsicum spp.* termésének húsát, amely különféle mikrobiális eredetű betegségek gyógyítására szolgál. Valószínűleg ez is volt a paprika domesztikációjának oka az őshonos amerikaiak körében (Bosland és Votava, 2012; Wing *et al.*, 2013).

2.2. Az étkezési paprika gazdasági jelentősége

A chili és az étkezési paprikákat világviszonylatban a fontos zöldségek között tartják számon és a FAOstat (<http://faostat.fao.org>) 2015-ös adatai alapján (**2. ábra**) lényegében folyamatosan növekedő termelési tendencia mutatkozik 1970-től egészen napjainkig. A termelés mennyiségét tekintve 2013-ban már több mint 30 millió tonnát termeltek évente.



2. ábra. A termelt Chili és étkezési paprika mennyiségének alakulása világszinten 1961-2013 között (FAOStat, 2015).

Európai viszonylatban is elsősorban növekvő termelési tendencia (**2. ábra**) volt tapasztalható, viszont nem figyelhető meg az 1994 utáni, világszinten tapasztalt gyors növekedés. A 2000-es évektől kezdődően pedig inkább stagnálás tapasztalható (2006-os évtől eltekintve), mintsem

lényegi növekedés. Mennyiségi szempontból megfigyelhető, hogy 2013-ban megközelítőleg a világ termelésének egytizedét az európai termelés tette ki.

2.3. Talajkultúrák és hidroponikus rendszerek jellemzése, szerepük a paprikatermesztésben

A nagymennyiségű, kereskedelmi célokra szánt étkezési paprikatermesztésben a talajkultúrák és egyre inkább a hidroponikus, vagy más néven talajmentes rendszerek az elterjedtek. Alkalmazott még a hagyományos szabadföldi termesztés is, de ez csökkenő tendenciát mutat, mert gazdasági (pl. termésátlag szabadföldi termesztésnél: 5-6 kg/m², talajkultúrák: 8-9 kg/m², míg a hidroponikus esetében: 12-14 kg/m² vagy akár ennél több is elérhető) és agrotechnikai okokból (szerves trágyázás igénye, nagy kézimunka igény, nagy a kórokozó és kártevő veszély, talaj elsősodása, peszticidekkel való szennyezettség és kimerültség) nem tud versenyben maradni az előbbi két rendszerrel szemben (Balázs, 1994; Bosland és Votava, 2012; Lantos, 2014; Asaduzzaman *et al.*, 2015). A következőkben csak a talaj- és a hidrokultúrák rendszerek tárgyalására kerül sor.

2.3.1. Talajkultúrák rendszerek

Mivel többféle változat, technikai kivitelezési forma létezik az étkezési paprika talajkultúrák termesztésére, ezért a továbbiakban a leginkább ismert, nagyüzemileg használatos megoldások kerülnek tárgyalásra.

Mindegyik technika esetében legelső lépés a magok elvetése, amely leggyakrabban egy szaporító ládában lévő talajba (esetleg kőzetgyapot kockákba) történik, amelyet általában melegházi körülmények között, gépi vagy kézi gondozással nevelnek a megfelelő hőmérsékleti (fajtától függően 25-30 °C), fény, valamint víz (kőzetgyapot esetében tápoldat) ellátottság mellett 7-14 napig. Következő lépés a palántanevelés, amely lehet tűzdeléses (7-10 hétig tartó, egyre inkább kiszoruló), valamint tűzdelés nélküli (5-6 hétig tartó). Mindkét esetben a palántanevelés történhet szaporító ládában, a palántaágy talajában, valamint földlabdában (más néven tápkockában). Legelterjedtebb a tápkockás nevelés, ahol általában a tápkocka összetételéből adódóan tartalmazza a szükséges tápanyagokat, de gyorsan ható műtrágyák használata esetén időszakos tápoldatozást is alkalmaznak. Ezt követi a fűtés nélküli hajtás esetén a palánták edzése (az új környezethez való szoktatás a palántanevelés utolsó 10-12 napjában), ami a fűtéses hajtásra szánt növényeknél elmarad. Következő fázis a palánták előkészítése és gépi vagy kézi ültetése a termesztő létesítmények talajába, ami a paprika esetében május közepére tehető. A kiültetés helyének a melegágyas, üvegház és a műanyag borítású (fóliasátrak) létesítményekben jöhetnek szóba, amelyekből a melegágyas és üvegház termesztés

kiszorulóban van a kis létesítési és üzemeltetési költséggel bíró fóliasátrakkal szemben (Balázs, 1994; Lantos, 2014). Végül a létesítmény talajába vagy konténerekbe (zsákos, álló, fekvő ágykonténerek, stb.) átültetett palánták nevelése következik, amely komplex ökoteknikai (időjárással kapcsolatos eljárások, talajművelés, növénytáplálás, növényvédelem) és fitoteknikai (termékenyülés és érésszabályozás, növényi részek eltávolítása, rögzítés) eljárások összességét jelenti (Balázs, 1994).

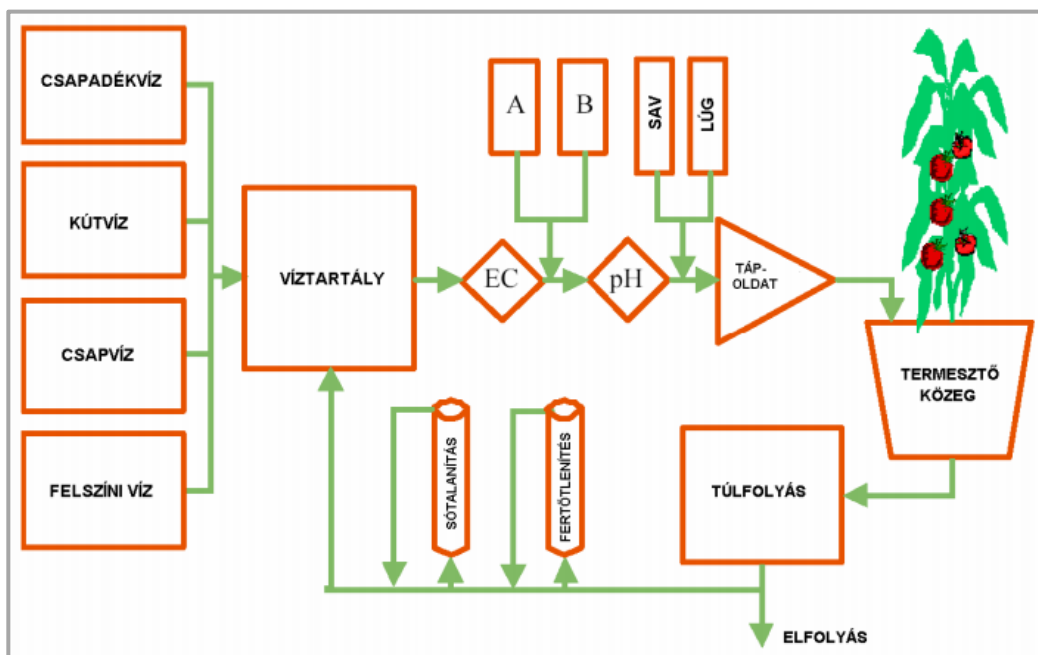
Az ökoteknikai (talajművelést leszámítva), fitoteknikai eljárások ugyan jelen vannak a hidroponikus termesztésnél is, azonban magasabb fokú üzemeltetési képességek és anyagi befektetés szükségesek a sikeres üzemeltetéséhez, mégis előnyösebb, mint a talajkultúrák termesztés. A talajkultúrák termesztés sok régióban az intenzív monokultúrák termesztés következtében jelenlévő talajeredetű betegségek, a talaj vegyszeres szennyezettsége, elsősodása, kimerültsége miatt nem alkalmazható gazdaságosan (Jensen, 1999; Lin és Saltveit, 2012; Asaduzzaman *et al.*, 2015). Igaz, lehetséges a talajok metil-bromiddal (ami azonban nem engedélyezett beltéri használatra) vagy gőzzel való fertőtlenítése (ami igen drága eljárás), de biztonsági és gazdasági okok miatt ezek használata kiszorul (Bosland és Votava, 2012) és egyre inkább a hidroponikus rendszerek nyernek majd teret.

2.3.2. Hidroponikus/talajmentes rendszerek

2012-es becslések szerint az melegházban termesztett paprikák 80%-át talajmentes rendszerben termesztették és valószínűleg tíz éven belül ez az arány eléri a 100%-ot. Hollandiában már az összes melegházban termesztett, kereskedelmi eladásra szánt paprikát kertészeti kőzetgyapotban nevelik (Bosland és Votava, 2012).

A hidroponikus technológia gyakorlatilag a növények tápoldatban/tal (víz és műtrágyák) való termesztését jelenti, ahol a gyökerek mechanikai stabilitásának biztosítására használhatnak olyan (természetes és/vagy mesterséges) termeszto közegeket, mint a kőzetgyapot, vermikulit, zeolit, perlit, homok, szalma, tőzegmoha, kókuszrost, fűrészpor, PVC-rácsok, stb. (Balázs, 1994; Jensen, 1999; Lin és Saltveit, 2012). A termeszto közeget nélkülöző rendszerek, másnéven a folyadékos/vizes közeget alkalmazó rendszerek három fő eljárási módja ismeretes: a mély-vizes eljárás (angol szakirodalomban: DFH - Deep Flow Hydroponics), a csörgedezettető módszer (angol szakirodalomban: NFT – Nutrient Film Technique) és az aeropónikus eljárás (Jensen, 1999). Az étkezési paprika esetében a természetes szervesetlen termeszto közegek, azon belül is a kőzetgyapot (kőgyapot) használata terjedt el, amelynek főbb előnyei, hogy steril, inert, könnyű és térfogatának 97%-ban képes vizet tartani, miközben még mindig képes megfelelő mennyiségű levegőt is visszatartani (Bosland és Votava, 2012). Általában már a magokat kis kőzetgyapot

kockákba ültetik, majd a megfelelő méret elérése után nagyobb nevelőkockába rakják át, amelyek ha elérik a megfelelő palánta méretet, akkor beleillesztik őket a melegház zárt vagy nyitott hidroponikus rendszerébe. Ott csepegtetési módszerrel, direkt a gyökérhez juttatják a tápoldatot. Mivel bizonyos sók (ionos formában) térben és időben változó arányban a gyökérszónában felhalmozódhatnak, ezzel gátolhatják a növény megfelelő növekedését és akár gyökérrothadást is okozhatnak, így szükséges a fölös tápoldat (úgynevezett drénvíz) eltávolítása. Nemrégiben még nagyobb mértékben használatosak voltak a nyitott rendszerek, ahol a drénvizet a környezetbe engedték, ezzel jelentős környezeti terhelést és költségtöbbletet okozva. Manapság azonban a zárt rendszerek használatának irányába mutatnak az alkalmazási tendenciák, ahol a drénvizet részben vagy teljes mértékben újrahasznosítják, miután valamilyen módon (hőkezelés, kémiai fertőtlenítőszeres adagolása, mikroszűrés) csírátlantítják azt (Jensen, 1999; Nemes, 2007; Savvas *et al.*, 2007; Lin és Saltveit, 2012). A **3. ábrán** látható egy ilyen zárt hidroponikus rendszer. A rendszer a tiszta vizet 4 különböző forrásokból kaphatja, amelyet egy víztartályba vezetnek a megfelelő hőmérséklet (kerülendő a túl hideg víz használata) elérése végett, majd a víz sótartalmát az elektromos vezetőképességének (EC – electric conductivity) mérésével állapítják meg. A víz sótartalmának ismeretében, valamint az időjárás és a növény vegetációs szakaszától függően adagolják hozzá a folyékony műtrágyákat (A-B tartályok), amit az oldat kémhatásának mérése és - ha szükséges - beállítása követ, mert a növények csak a megfelelő pH-jú oldatból képesek optimálisan felvenni a tápanyagokat. Az elkészült tápoldatot itt is többletben adagolják, akár csak a nyitott rendszereknél, hogy a felhalmozódott sókat kimoshassák a rendszerből.



3. ábra. A zárt hidroponikus rendszerek általános vázlata (Nemes, 2007).

A termesztő közegből a drénvíz a túlfolyó tartályba kerül, ahonnan a környezetbe, vagy fertőtlenítést és bizonyos mértékű sótalanítást követően visszakerül a víztartályba. Manapság természetesen az ilyen rendszereket számítógépek irányítják több bemeneti paraméter alapján, hogy precízen fenntartsák a legmegfelelőbb termesztési körülményeket, mert ellentétben a nyitott hidroponikus és még inkább a talajkultúrás termesztéssel, itt a változásokra jóval érzékenyebbek a növények. Ezért igen fontos az adagolt tápoldat mennyisége, EC értéke, valamint kémhatása (Jensen, 1999; Nemes, 2007; Lin és Saltveit, 2012; Asaduzzaman *et al.*, 2015).

2.4. Endofita baktériumok

Ugyanúgy, mint ahogyan az állatok vagy az ember is asszociációban él baktériumokkal, valószínűleg az összes vad és termesztett növényben is élnek endofita baktériumok.

2.4.1. Definíciójuk és rövid jellemzésük

Az endofita baktériumokra számos definíció található a szakirodalomban, de legtöbbjük alapján úgy határozza meg őket, mint a növények belső szöveteiben élő, betegségekre utaló tüneteket nem okozó szimbiotákat. A gazdanövénygel neutrális, mutualista vagy kommenzalista viszonyban élhetnek (Bacon és Hinton, 2007), de főként a mutualista, a gazdanövény számára kedvező élettani hatásokat hangsúlyozzák (Lodewyckx *et al.*, 2002; Bacon és Hinton, 2007; Ryser *et al.*, 2009; Compant *et al.*, 2010; Reinhold-Hurek és Hurek, 2011). Igaz az is, hogy teljesen egységes meghatározásuk nem létezik, mivel az első definíciójuk („bármilyen szervezet, amely a növényi szövetekben előfordul” De Barry, 1866) óta különböző kutatók különbözőképpen, főként saját perspektívájukkal és kutatási kontextusukkal kapcsolatban határozták meg őket (Berg *et al.*, 2014).

Kedvező hatásuk főként az általuk termelt fitohormonoknak tulajdonítható biostimulációban, az általuk nagyobb mennyiségben elérhetővé váló tápanyagok révén a bio-trágyázásban, valamint az antibakteriális anyagok és a sziderofórok termelése révén a fitopatogénekkal szembeni védelemben (biokontrollban) rejlik (Gaiero *et al.*, 2013). Biostimulációra képes baktériumok közül leírtak például több *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus* fajt és *Pseudomonas putida* törzseket is, míg bio-trágyázásban például az *Azospirillum* fajok és a *Pantoea agglomerans*, *Achromobacter xiloxidans*, *Bacillus pumilus* törzsek lehetnek kitűnő példák (Gaiero *et al.*, 2013). Biokontroll törzsek pedig több esetben a *Streptomyces*, *Bacillus* vagy *Pseudomonas* nemzetségek tagjai közül kerültek leírásra, mint például a *P. fluorescens* Pf-5 és *P. fluorescens* Q2-87 is (Bloemberg és Lugtenberg, 2001; Gaiero *et al.*, 2013).

Az általánosan elterjedt definíciójukon szűkít Rosenblueth és Martinez-Romero (2006) meghatározása, amely szerint csak azon baktériumok tekinthetők valódi endofita baktériumoknak, amelyek felületileg fertőtlenített növényi szövetekből származnak és a belső növényi szövetekben való jelenlétük vizuálisan, mikroszkópos technikákkal is igazolható. Azon baktériumokra, amelyekre az utóbbi kritérium nem teljesül, a feltételezett vagy vélhetően endofita megnevezés ajánlott. Továbbá, a napjainkban végzett molekuláris vizsgálatok alátámasztják a nem tenyészthető endofiták nagy mennyiségben való előfordulását is (Gaiero *et al.*, 2013). Erre a jelenségre két magyarázat ismeretes eddig (Muller és Ruppel, 2014). Egyikük az élő de nem tenyészthető (angol rövidítése: VBNC) állapotban lévő endofita baktériumok, vagyis olyan, akár hosszú távon is nyugvó fázisban lévő baktériumok, amelyek alacsony metabolikus aktivitást mutatnak és nem osztódnak, viszont megfelelő körülmények között képesek feléledni ebből az állapotból (Muller és Ruppel, 2014; Podolich *et al.*, 2014). Ebbe az állapotba való átmenetüket indukálhatják különböző kedvezőtlen környezeti körülmények, mint például a növényi immunválasz is, amelyet ezzel a stratégiával elcsendesíthetnek vagy elkerülhetnek (Muller és Ruppel, 2014; Podolich *et al.*, 2014; Mercado-Blanco, 2015). Ilyen képességgel rendelkező törzsekkel írtak már le endofitaként a következő nemzetségekből: *Methylobacterium*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Oceanobacillus*, *Bacillus*, *Brachy bacterium*, *Brevibacterium*, *Kocuria*, *Tetrasphaera* (Thomas *et al.*, 2008). A második eshetőség a nem megfelelő tápközeg és tenyésztési körülmények alkalmazása, amit az is alátámaszt, hogy az ismert, környezetben élő bakteriális törzsek több mint felének vannak nem tenyészthető képviselői (Muller és Ruppel, 2014).

Érdekes módon megfigyelték, hogy sok bakteriális endofita sajátosságosan képes a növényi sejteken belül is megélni, sejtfal mentes, azaz az úgynevezett L-formában is (Kamoun *et al.*, 1998; White *et al.*, 2014). Azt is megfigyelték, hogy egyes gomba és bakteriális endofiták képesek mutualista életmódból parazita életmódba is átváltani (Senthilkumar *et al.*, 2011; Gaiero *et al.*, 2013). Továbbá, érdemes még azt is megemlíteni, hogy Ryser és munkatársai (2009) szerint vannak olyan élelmiszer eredetű humánpatogén baktériumok (*Salmonella*, *E. coli* O157:H7), amelyek az előbbieken ismertetett kritériumoknak megfelelnek, tehát a meghatározások szó szerinti értelmezése alapján ők is endofitáknak, fakultatív vagy passzív humánpatogén endofitáknak tekinthetők.

Figyelembe véve és összegezve tehát az előbbi definíciókat, megfigyeléseket, úgy határozhatók meg a feltételezett (vélhetően, potenciálisan) endofita baktériumok, mint felületileg fertőtlenített, tünetmentes, vagyis mikroszkóposan észlelhető tüneteket nem produkáló, növények belső

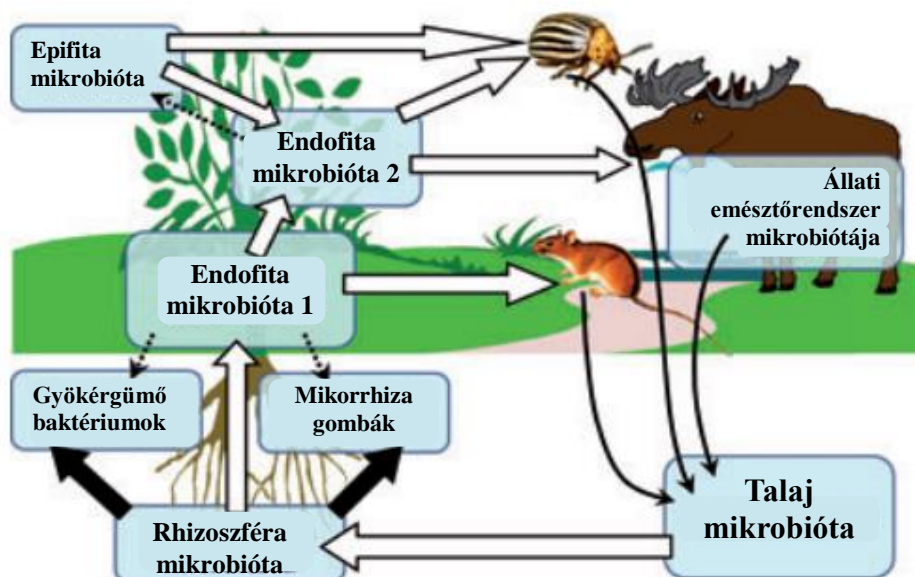
szöveiteiből detektált mikroorganizmusok, függetlenül a kimutatási technikától (hagyományos tenyésztéses vagy molekuláris technikák). A valódi endofita megnevezés odaítéléséhez pedig az előbbieken túl mikroszkópos bizonyítékok is szükségesek a belső növényi szövetekben való lokalizációjukat illetően.

Életmódjukat tekintve három fő csoportba sorolhatók az endofita baktériumok. Első csoportot képezik az obligát endofiták, amelyek már annyira alkalmazkodtak a belső növényi környezethez, hogy a belső növényi szöveteken kívül máshol már nem életképesek és feltételezhetően az új növénybe való átjutásuk is a magokon keresztül (vertikálisan), nem pedig a környezetből (horizontálisan) történik. A második csoportba a fakultatív endofiták tartoznak, amelyek a környezetben (főként talajban, rhizoszférában, de akár a föld feletti szervek felületén) élő baktériumok, de alkalomadtán képesek koordinált fertőzés révén kolonizálni a belső növényi szöveteket is. A harmadik csoportot alkotó passzív endofiták nem törekszenek aktívan a belső szövetek kolonizálására, azonban ha véletlenszerű események, mint a növények biológiai és/vagy fizikai sérülése folytán lehetőségük nyílik erre, akkor kolonizálják azt. Az így bejutott baktériumok azonban nagy valószínűséggel kevésbé képesek versengeni a belső szövetek kolonizációjában, mert nem birtokolják az ehhez szükséges celluláris mechanizmusokat és ezáltal talán kevésbé járulhatnak hozzá a növényi növekedés serkentéséhez (Gaiero *et al.*, 2013).

2.4.2. Az endofita baktériumok növénybe való bejutása és vándorlása

A **4. ábra** jól szemlélteti a mezőgazdaságilag fontos növényekkel kapcsolatos mikroorganizmusok körforgását az ökoszisztémában, amelyen látszanak az endofita mikrobák, azon belül a baktériumok lehetséges forrásai, összetételbeli különbségei, valamint főbb migrációs útvonalai a növényben és a környezetben.

Az endofita baktériumok növénybe való bejutása egyaránt történhet a növény föld feletti és föld alatti részein keresztül, azonban leggyakoribbnak, elsődlegesnek (Lodewyckx *et al.*, 2002; Hardoim *et al.*, 2008) és a legnagyobb mértékűnek a gyökereken keresztül történő behatolást tartják, mert legtöbbjük jobbára a rhizoszférából származik (Compant *et al.*, 2010). Továbbá, a legtöbb növény esetében a gyökerekben található meg nagyobb számban az endofita baktériumok (Rosenblueth és Martinez-Romero, 2006), így először a gyökereken keresztül történő kolonizálást részletezem.

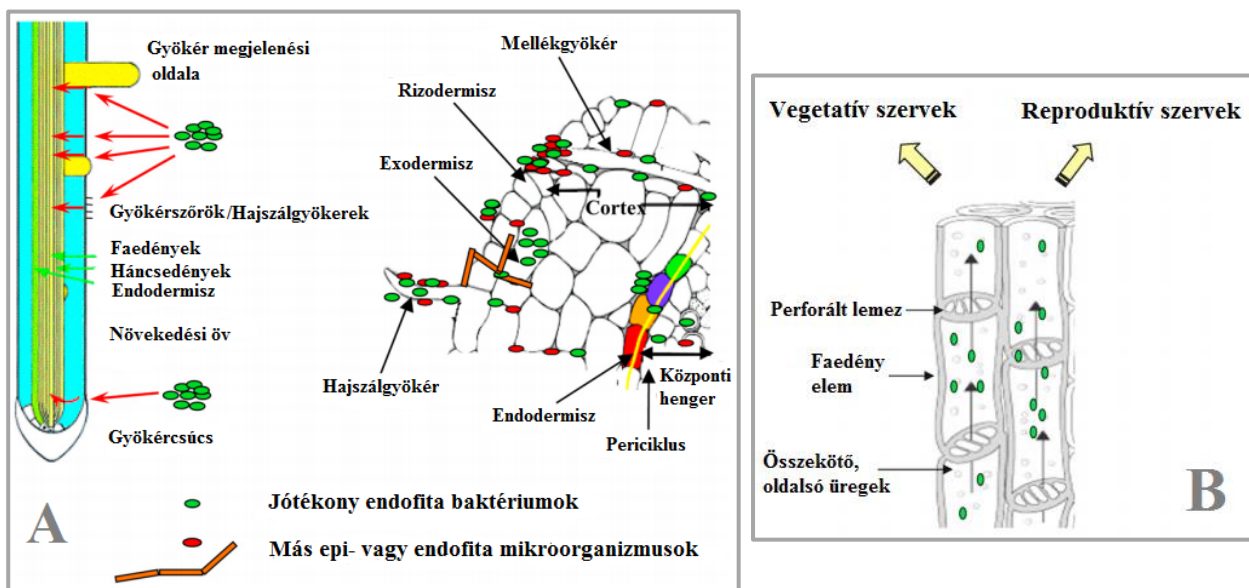


4. ábra. Mezőgazdaságilag fontos mikroorganizmusok körforgása az ökoszisztémában
(Tikhonovich és Provorov, 2011)

Vastag nyilak – mikrobiális migrációk főbb útvonalai (fehér nyilak – különböző fajta mikrobiális közösségek átalakulása; fekete nyilak – közösségek specializációja kétrészes/kétoldalú szimbiózisokba); pontozott nyilak – mikrobiális migrációk feltételezett útvonalai; görbe nyilak – mikrobiális közösségek talajba kerülése állatokból. Az endofita mikrobióta egyrészt a gyökér/szár (1), másrészt a levelek (2) mikrobiótájára van felosztva, mivel eltérő összetételűek és forrásúak.

A rhizoszféra és a rhizoplán benépesítését követően egyes talaj eredetű baktériumok bejuthatnak a gyökerek belsejébe és ott általában 10^5 - 10^7 TKE/gramm koncentrációban elszaporodhatnak, amihez természetesen specifikus tulajdonságokkal (flagellumok, Nod gének, sejtfaldegradáló enzimek, méregtelenítő mechanizmusok, IV-es típusú pílusok, szilárd felületen való mozgás képessége, LPS) kell rendelkezniük (Compant *et al.*, 2010). Azt is megfigyelték, hogy a különböző tápanyagokat tartalmazó növény - talaj felület kitűnő helyszíne a plazmidok által közvetített horizontális géntranszfer folyamatoknak, amelyek hozzájárulhatnak a baktériumok alkalmazkodásához és evolúciójához (Berg *et al.*, 2014). Ez a tény nagyban hozzájárulhat a rhizoszférában élő baktérium (rhizobaktériumok) vagy akár fito-, esetleg humánpatogén baktériumok endofita voltának kialakulásához is. A behatolási folyamatok nem feltétlenül aktív mechanizmussal történnek, ezért várhatóan bármelyik rhizobaktérium lehet endofita valamelyik életszakaszában. Az ilyen passzív penetrációs bejutási pontok lehetnek az új gyökerek megjelenési oldalain keletkezett repedések és a gyökércsúcsok, vagy éppenséggel káros mikrobák, rovarok okozta repedések, sérülések (5/A. ábra). Ezzel szemben bizonyos baktériumok aktív penetrációval jutnak be, mint például a gümőképző baktériumok (mint például az *Azorhizobium caulinodans*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia phymatum*, *Cupriavidus taiwanensis* és *Frankia* spp. törzsei), amelyek specifikusan alkalmazkodtak a

gyökérrendszerbe való bejutáshoz (Compant *et al.*, 2010). Ebben az esetben a gümőképző baktériumok a hajszálgököken keresztül jutnak be a gyökérszövetekbe, amelyet követően indukálják a gümőknek nevezett, specializálódott növényi szervek létrejöttét. Ez a speciális folyamat szükséges a baktériumok szimbiotikus életviteléhez, ami a jelenlegi ismeretek alapján a növény által kiválasztott flavonoidok, vagyis vegyi ingerek és mikrobiális jelzések, mint a nod faktorok, közvetítésével történik. Továbbá, az aktív penetrációt és a növényen belüli mozgást szintén befolyásolják a flagellumok, pílusok, mobilitási képesség, a sejtfaldegradáló enzimek kiválasztása, amit például az *Azoarcus* sp. BH72 törzs genomvizsgálatai is alátámasztanak, valamint számos különféle metabolikus útvonalért (mint pl. növényi poliszacharidok, fotoszintetikus termékek metabolizmusáért), transzport rendszerekért felelős gének is, amelyeket endofita *Klebsiella pneumoniae* Kp342 törzsön végzett genom vizsgálatok igazolnak (Compant *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2016). Az endofita baktériumok tehát aktív, illetve passzív módon is bejuthatnak a belső gyökérszövetekbe, amiket megfigyelésekkel is alátámasztottak. Mihelyt a baktériumok túljutva az exodermiszén bejutnak a gyökér elsődleges kérgébe (cortex), az első gát számukra az endodermisz sejtrétege, amelyen csak néhány olyan endofita baktérium tud túljutni, amely képes sejtfaldegradáló enzimek szekréciójára (5/A. ábra).



5. ábra. (A) Az endofita baktériumok bejutási pontjai a gyökéren keresztül és **(B)** továbbterjedésük a faedényeken át a növény föld feletti részeibe (Compant *et al.*, 2010)

Igaz, egyes baktériumok passzív módon is bejuthatnak, mivel például a periciklusból induló mellékgökök növekedése során, vagy valamely káros baktérium, rovar, nematóda aktivitásának folytán az endodermisz sejtrétege megszakadhat és szabaddá válik az út a központi hengerbe (5/A. ábra). A központi hengeren belül a faedényekbe való bejutás a következő cél, aminek elérését kimutatták már rizsben a *Herbaspirillum seropedicae* Z67, valamint szőlőtőben

a *Burkholderia phytofirmans* PsJN törzsre. Onnan pedig a növény bármely szervébe eljuthatnak (Compant *et al.*, 2010).

A belső gyökérszövetekbe, aktív penetrációval bejutott endofiták indukálja a növény védelmi mechanizmusait, minek hatására a növény megerősítheti a sejtfalait vagy különböző anyagokat, mint például gumit termelhet a kéregben vagy a faedényekben (Rosenblueth és Martinez-Romero, 2006). Mások azonban azt is megfigyelték, hogy ellentétben a növénypatogénekkal szembeni növényi reakciókkal, az endofiták esetében csak néhány védelmi mechanizmus figyelhető meg, amelynek okai valószínűleg a más fajta metabolitok termelésében és a termelés mennyiségében rejlik. Továbbá arról is beszámoltak már, hogy a növények védelmi reakcióikkal az endofita kolonizációt szabályozzák (Compant *et al.*, 2010).

A gyökérből történő rendszerszintű endofita vándorlás során a szárba és levelekbe elérhetik a 10^4 - 10^5 TKE/gramm friss növényi szövet sűrűséget is, valamint vándorlásuk kétféle módon történhet: egyrészt a tápanyagban gazdag sejt közötti tereken, másrészt a faedények lumenjén keresztül (**5/B. ábra**). A legtöbb megfigyelés ez utóbbi útvonalról számol be, valószínűleg azért, mert a faedények nyitott vezetékek, ahol szabadabban vándorolhatnak, mint a sejt közötti terekben, ahol sejtfaldegradáló enzimek szekréciója is szükséges a migrációhoz. Amint az **5/B. ábrán** is jól látszik, az erre képes néhány endofita baktérium könnyen áthaladhat a faedény elemek közti perforált lemezekben. Ebben segítségükre lehetnek a flagellumok és/vagy a növény párologtatási áramlata (Compant *et al.*, 2010).

Csak kevés tanulmányban figyelték meg a magok, virágok és termések talaj eredetű endofiták általi benépesítését, továbbá természetes körülmények között egyáltalán nem, vagy kis mennyiségben (10^2 - 10^3 TKE/gramm friss növényi szövet) mutattak ki idáig endofitákat virágokból és termésekből. Ezt a tényt alátámasztani látszanak az előbbieken is leírt megfigyelések, amelyek azt sugallják, hogy csak kevés talajból származó endofita és mindenképpen csakis specializálódott törzsek képesek kolonizálni a növényi szaporító szerveket, valamint azokban túlélni. Ennek ellenére helyszíni vizsgálatok kimutatták, hogy még természetes körülmények között is van néhány talajlakó endofita, amely képes az egész növényben szétterjedni és végül a virágokat és a termést is belakni (Senthilkumar *et al.*, 2011), valamint kis koncentrációjuk is elégséges a vertikális transzmissziójukhoz (Compant *et al.*, 2010).

Érdeemes szót ejteni még az igencsak fontos kolonizációs felületeket biztosító és endofita baktérium forrásaként szolgáló filoszférről is. A szár, levél, virág és gyümölcs felületein keresztül is bejuthatnak az endoszférába az ott élő epifita baktériumok (Compant *et al.*, 2010). Ezen epifita baktériumok lehetnek talaj, levegő vagy rovar eredetűek (Tikhonovich és Provorov, 2011) is, így akár humánpatogének (*Salmonella*, *E. coli* O157:H7) is internalizálódhatnak

(Beczner és Bata-Vidács, 2009; Ryser *et al.*, 2009; Teplitski *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2010; Ongeng *et al.*, 2011; Deering *et al.*, 2012; Martínez-Vaz *et al.*, 2014). Itt is fontos megemlíteni az abiotikus vagy biotikus faktorok okozta szöveti sérüléseket, sebhelyeket, amelyek azon túl, hogy bejutási útvonalat biztosítanak, a kiszivárgó növényi váladékok táplálékként is szolgálnak a baktériumoknak (Senthilkumar *et al.*, 2011). A mesterséges nyílásokon túl (sebek) a természetes növényi nyílásokon keresztül is elérhetik a belső szöveteket, szállító edényeket az endofiták és a patogének. Ilyen természetes nyílások a leveleken lévő sztómák vagy a száron lévő lenticellák. A termésekbe való bejutás a virágokon keresztül is ismeretes, továbbá egy teljesen más bejutási forma lehet a rovarok közvetítésével történő penetráció is (Lodewyckx *et al.*, 2002; Senthilkumar *et al.*, 2011; Tikhonovich és Provorov, 2011).

2.4.3. Növénnyel való együttélésük és a növényre gyakorolt jótékony hatásuk

A legelterjedtebb szemléletek alapján az endofita – növény kapcsolatok mutualista jellegűek (Lodewyckx *et al.*, 2002; Bacon és Hinton, 2007; Ryser *et al.*, 2009; Compant *et al.*, 2010; Reinhold-Hurek és Hurek, 2011), ahol mindkét partner az egymásnak szolgáltatott előnyök alapján pozitív módon kerül kiválasztásra (Hardoim *et al.*, 2008). A baktériumok a nagy mennyiségben rendelkezésre álló tápanyagokból (Hardoim *et al.*, 2008), az extrém környezeti hatásokkal (hőmérséklet, ozmotikus potenciál, ultraibolya sugárzás) szemben védelmező és a többnyire uniform környezetből profitálhatnak (Lodewyckx *et al.*, 2002), míg a növények növekedésük serkentése vagy különböző stressz hatásokkal szembeni ellenálló képesség terén szerezhetnek előnyöket (Hardoim *et al.*, 2008).

Az endofiták oldaláról megközelítve ezt az együttélést érdemes megemlíteni, hogy a belső növényi szövetekben (endoszférában) az etilén szintjének baktériumok általi szabályozása kulcsfontosságú stratégia a növény viselkedésének irányításában, mivel bármilyen hatás, amely befolyásolja a növény ezen stressz jelzéséért is felelős molekulájának mennyiségét, jelentős (pozitív vagy negatív) hatással lehet a baktériumok túlélésére. Az egyik kulcsfontosságú kérdés tehát, hogy képesek-e a baktériumok szabályozni a növény etilén koncentrációját, és ez által kedvező módon befolyásolni endofita életmódjukat (Hardoim *et al.*, 2008). Az előbbiekre is alapozva Hardoim és munkatársai (2008) leírása alapján a kompetens endofiták csak azon baktériumok lehetnek, amelyek birtokolják az endoszféra kolonizációjához és az abban való megmaradáshoz szükséges kulcs sejtmechanizmusok genetikai hátterét.

A növény oldaláról nézve ezt az asszociációt elmondható, hogy az endofita baktériumok jelentős hatással lehetnek a növény növekedésére, egészségére, a növény pedig a benne elszaporodó baktériumok okozta kihívásokat molekuláris mechanizmusok kifejlesztésével oldja meg. Ezt az

utóbbi megállapítást látszik alátámasztani, hogy több ismert (*shr5i* – növény és az endofita interakciók kialakulásakor, a szignál transzdukcióban résztvevő egyik fehérjét kódoló gén; etilén jelátvitelért felelős gének) és ismeretlen funkciójú, kandidátus gének expressziója másképpen történik a növény – endofita baktérium együttélése során. Ebből pedig arra lehet következtetni, hogy a növény aktívan nyomon követheti az endofita kolonizáció kezdeti lépéseit és valószínűleg segíti, vagy éppenséggel gátolja a baktériumok szaporodását, attól függően, hogy az adott baktérium számára hasznos-e vagy sem (Hardoim *et al.*, 2008).

Attól függően, hogy az endofita baktériumok milyen módon fejtik ki kedvező hatásukat a növényre, két csoportba oszthatók: a növények növekedését, magok csírázását, termés hozam növelését direkt módon, és az ugyanezt indirekt módon befolyásoló, úgynevezett biokontroll baktériumokra (Taurian *et al.*, 2012).

Növényi növekedés serkentése direkt módon:

Az egyik legfontosabb növekedést serkentő mód az úgynevezett fito-hormonszerű molekulák, mint az auxinok, citokininek, gibberelinek, abszcizinsav, indol-3-ecetsav, jazmonátok termelése és az etilén szintjének szabályozása (Taurian *et al.*, 2012; Gaiero *et al.*, 2013). Az etilént a növény különböző biotikus és abiotikus stressz hatásokra válaszként termel és ami nagy mennyiségben előfordulva gátolja a DNS szintézist, növeli a növény öregedését, a levelek, virágok, termés vagy a magok elhullását (Lodewyckx *et al.*, 2002; Taurian *et al.*, 2012; Gaiero *et al.*, 2013). Kis mennyiségben azonban éppenséggel serkenti számos növényi faj növekedését. Az etilén szintjének szabályozásában igen fontos az ACK-deamináz nevű enzim termelése, ami az ACK-nak nevezett, etilén prekursor molekula bontása révén serkenti a növény növekedését (Tyler és Triplett, 2008; Taurian *et al.*, 2012). Megfigyelték továbbá azt is, hogy ez a hatás egy másik bakteriális mechanizmussal is lehetséges, mégpedig az etilén bioszintézisében résztvevő ACK-szintáz és/vagy beta-cisztationáz inhibíciója révén (Taurian *et al.*, 2012).

A növények növekedése a különböző tápanyagok elérhetőségének növelése révén is serkenthető, melyek közül a nitrogén, foszfor és a vas az egyik legfontosabbak. Ezen tápanyagok elérhetőségének növelésében számos NSEB-t írtak már le (Taurian *et al.*, 2012), mint például a foszfor szolubilizációra és mineralizációra képes *Achromobacter xiloxidans*, *Bacillus pumilus* fajba tartozó napraforgó izolátumok (Gaiero *et al.*, 2013). A biológiai nitrogén kötésben, pedig a gümőképző baktériumok, a diaztoróf *Pantoea agglomerans* és több *Azospirillum*, *Azoarcus* faj is szerepet játszik (Gaiero *et al.*, 2013). Végül pedig a vas elérhetőségének, felvételének növelésében szerepet játszhatnak az olyan NSEB-k, amelyek képesek sziderofórokat (pl. piokelin, szalicilsav) termelni, aminek révén nagy affinitással kötődnek a vashoz, ezáltal a patogén mikrobák számára elérhetetlenné téve azt, ugyanakkor mobilizálva a növény vagy

éppenséggel az NSEB-k számára (Lodewyckx *et al.*, 2002; Taurian *et al.*, 2012; Gaiero *et al.*, 2013)

Növényi növekedés serkentése indirekt módon:

Az endofita baktériumok, úgy tűnik, képesek megelőzni vagy csökkenteni a növénypatogén szervezetek (gombák, nematódák, baktériumok, vírusok és rovarok), toxikus anyagok okozta káros hatásokat, és e képességük révén indirekt módon hozzájárulhatnak a növények növekedéséhez (Lodewyckx *et al.*, 2002; Tikhonovich és Provorov, 2011). Ezen endofiták biológiai kontroll tevékenysége a tápanyagokért folytatott versengésben, az antibiózisban, a parazitizmusban, a növény rendszerszintű rezisztenciájának indukciójában (RRI) és a növény méregtelenítésében nyilvánulhat meg (Tikhonovich és Provorov, 2011; Taurian *et al.*, 2012).

2.5. Nyers növényi élelmiszerekkel terjedő humánpatogén baktériumok

A friss zöldségek, gyümölcsök igencsak fontos összetevői az egészséges étrendnek, valamint számos betegség elleni védelemben nyújthatnak segítséget. Ennek okán sok ország egészségügyi szervezete ösztönzi fogyasztásukat, azonban a nyersen fogyasztott zöldségekről és gyümölcsökről bebizonyították, hogy hordozói lehetnek olyan humánpatogén baktériumoknak, amelyeket eddig az állati eredetű élelmiszerekkel hoztak összefüggésbe (Berger *et al.*, 2010). Sajnos az egyre nagyobb szállítási távolságok és az ezáltal megnövekedett szállítási idő, valamint a megnövekedett kereslet következtében eddig még nem művelt, vagy az állattenyésztő telepek közelében létesülő zöldség- és gyümölcsstermelő területek igencsak befolyásolják a termékek fertőzésének kockázatát (Deering *et al.*, 2012). Ezt látszik alátámasztani, hogy 2007-ben az Európai Unióban vizsgált nyers termékek 0,3%-ában találtak szalmonellát. A nyers termékek okozta megbetegedések száma 0,7%-ról (1970-es évek) 6%-ra nőtt az USA-ban az 1990-es évekre, ami a nyers termékek fertőzésének valós növekedését tükrözi. A fertőzési ágensek tekintetében a járványok 60%-áért bakteriális patogének voltak felelősek (Berger *et al.*, 2010): a járványok majdnem feléért valamilyen *Salmonella* szerotípus volt felelős (Berger *et al.*, 2010), azonban az *E. coli* O157, *Shigella* fajok is jelentős mértékben, míg a *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus* vagy a *Listeria* fajok ritkábban fordultak elő ilyen járványok okozóiként (Beczner és Bata-Vidács, 2009). Vivant és munkatársai (2013) leírása alapján azonban a genom és posztgenomikus vizsgálatok alátámasztani látszanak a *L. monocytogenes* talajhoz való adaptációs folyamatait, valamint nagyon sok talajmintából sikerült izolálni ezt a baktériumot, ami ezen kórokozó friss zöldségekkel, gyümölcsökkel kapcsolatos egyre gyakoribb jövőbeni előfordulását sejteti.

Azt is megfigyelték, hogy az endofiták szoros rokonsági kapcsolatban lehetnek humánpatogén baktériumokkal, vagy éppenséggel maguk is humanpatogének vagy opportunistáknak. Ezekre kiváló példa több endofita *Salmonella*, *E. coli* O157, *Klebsiella pneumoniae* törzs, valamint az opportunistáknak *Burkholderia cepacia* (Rosenblueth és Martinez-Romero, 2006; Mendes *et al.*, 2013). Az sem meglepő továbbá, hogy bizonyos növénybetegségekben effektív biokontroll fajok, mint a *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea agglomerans* vagy *Burkholderia cepacia* olyan opportunistáknak, amelyek kitűnően versengenek a tápanyagokért, termelhetnek antimikrobás metabolitokat és antibiotikumokra is rezisztensek lehetnek. Ráadásul megfigyelték már olyan endofitákat is, amelyekben a patogének virulenciájához szükséges gének is jelen voltak, ami könnyen magyarázhatja azt, hogy egyes környezeti és klinikai *Klebsiella variicola*, *Pseudomonas* spp. izolátumokat nem tudták egymástól elkülöníteni. Joggal feltételezhető tehát, hogy az ilyen tulajdonságokkal felvértezett, a növény védelmi reakcióit is túlélő endofiták akár az emberi immunválaszokkal szemben is rezisztensek lehetnek (Rosenblueth és Martinez-Romero, 2006).

2.5.1. Epifita humánpatogén baktériumok

Bizonyítottan sok humánpatogén baktérium adaptálódott a talajban és vízben való túléléshez, és sokáig képesek fennmaradni a kicsírázott magokon, a gyökerek, levelek és termések felszínén az ott élő mutualista, kommenzalista jellegű természetes mikrobiótával együtt. Amennyiben sikerül kötődniük a felületekhez, biofilmet hozhatnak létre. Ez a felülethez hozzátapadó, exopolimerekből álló mátrix, amelyben beágyazódva a mikrobák aggregátumokat hoznak létre. A biofilmben lévő baktériumok poliszacharidok és fehérjék termelése révén tovább fokozzák kötődésüket a növényi felületekhez és egyre jobban kolonizálják azt. A frissen fogyasztott zöldségek, gyümölcsök felületén lévő biofilmek ideális menedékként szolgálnak a patogén baktériumok számára, mivel a baktériumok mosás hatására nehezebben lesznek eltávolíthatók és a fertőtlenítőszer hatékonysága is csökken (Beczner és Bata-Vidács, 2009; Ryser *et al.*, 2009). Ezáltal tehát jelentősen megnövekszik az ilyen jellegű élelmiszerek élelmiszerbiztonsági kockázata.

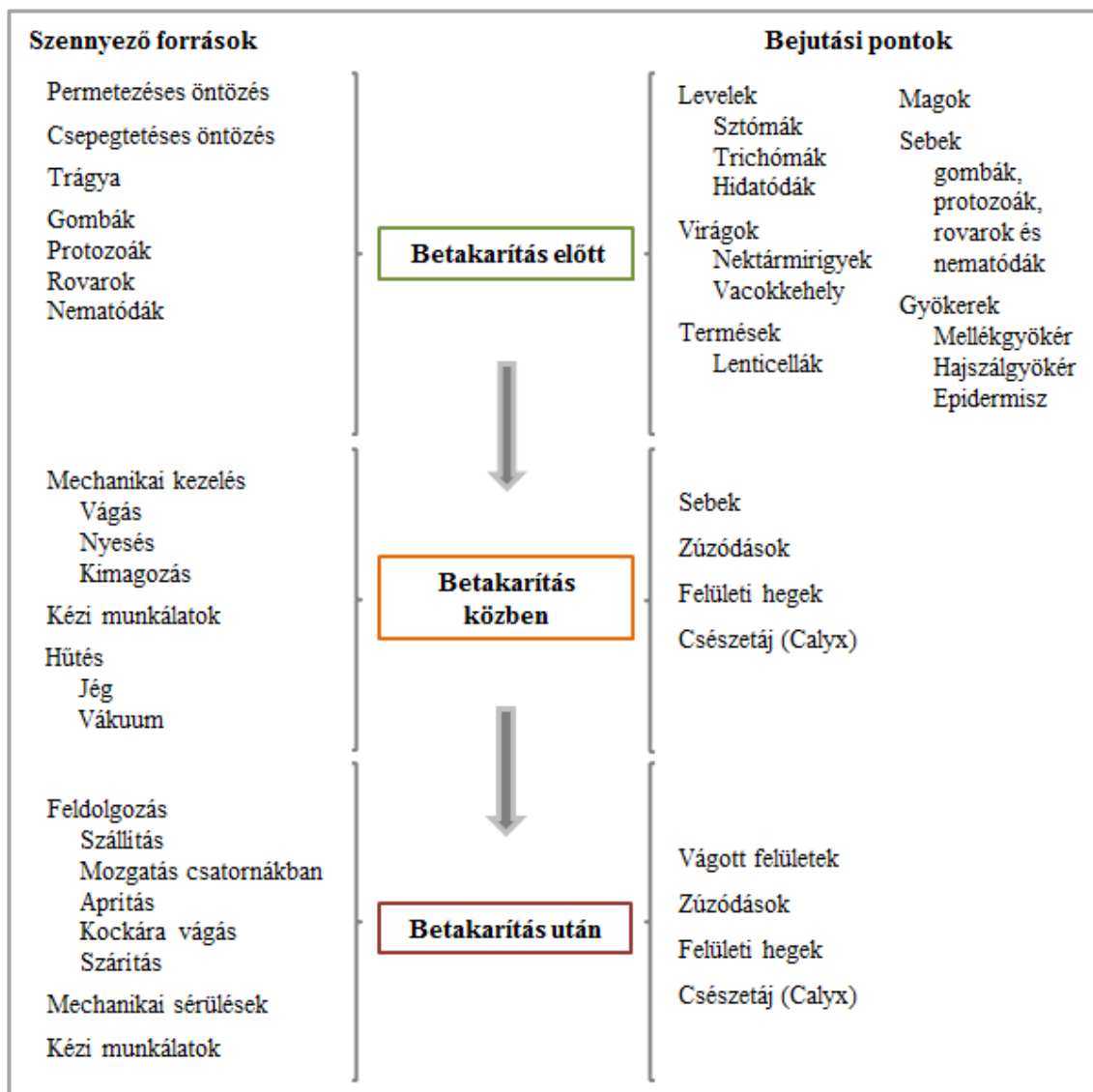
2.5.2. Endofita humánpatogén baktériumok

Amint az **6. ábrán** is látható, a termés gyakorlatilag a szántóföldtől egészen az asztalig ki van téve a mikrobás szennyezettségnek.

A patogének főbb forrásaiként szolgálhatnak maguk a magok, a föld, a trágya és az öntözővíz is. Az öntözővizet szennyezhetik az áradások, esetleg állattenyésztő telepeken keresztül haladó folyók, és az öntözővíz újrahasznosítása is lehet a szennyezés oka. A betakarítás után pedig

főként a mosóvíz, esetleg a különböző manuális vagy gépi kezelési lépések szolgálhatnak fertőző forrásaként (Ryser *et al.*, 2009).

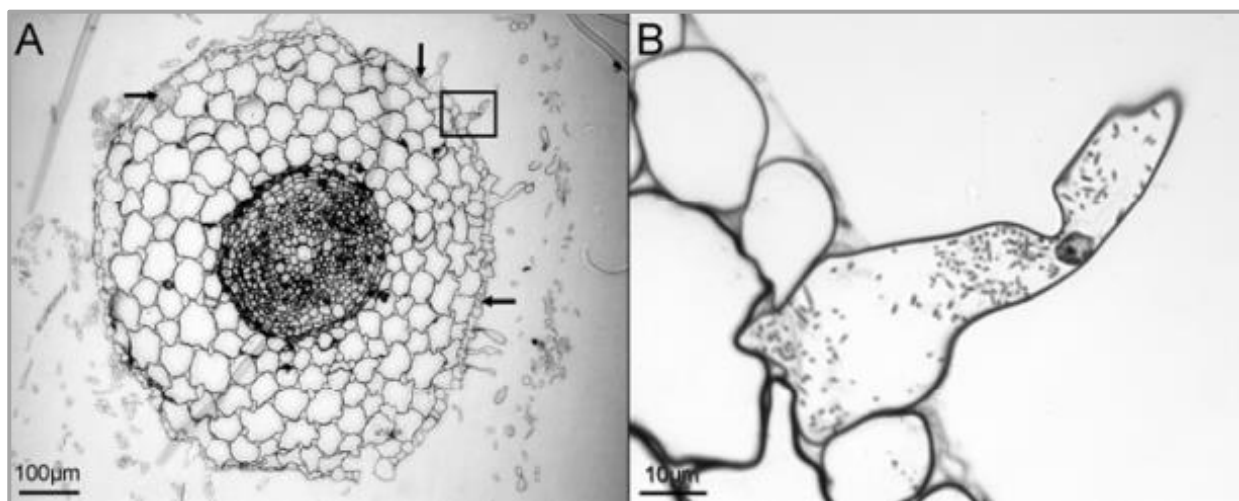
A növénybe való bejutási pontok (6. ábra) gyakorlatilag megegyeznek az endofita baktériumok esetében (részletesen lásd a 2.4.2. alfejezetben) felmerülőkkel, azonban a leggyakoribbak a következők: mellékgyökerek, csírázó gyököcske, sztómák, lenticellák, trichómák, sebek, zúzódások, hegek, virág csészetája és a vacokkehely (Ryser *et al.*, 2009).



6. ábra. Humánpatogén baktériumok transzmissziójának módozatai, valamint bejutási pontjai zöldségekbe és gyümölcsökbe (Ryser *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2013)

A betakarítás előtt gyakori jelenség a patogének hajszálgyökereken, epidermisz sejteken keresztül történő bejutása (7. ábra), amit az edényrendszerbe való behatolás és transzport követ. A filloszférában jelenlévő külső viaszréteg gát a bakteriális penetrációval szemben, mert betölti a lenticellákat, lefedi a kisebb sérüléseket, viszont a komolyabb fizikai sérülések, kártevők okozta

sebek a kutikulán már könnyen a patogének internalizációjához vezethetnek (Ryser *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2013).



7. ábra. Fénymikroszkóppal készült felvételek *E. coli* (Sakai)-val fertőzött spenót gyökérmetszetekről, a fertőzést követő 10. napon; A – fertőzött epidermális sejtek (nyíllal jelöltek); B – fertőzött hajszálgöyökér (Wright *et al.*, 2013)

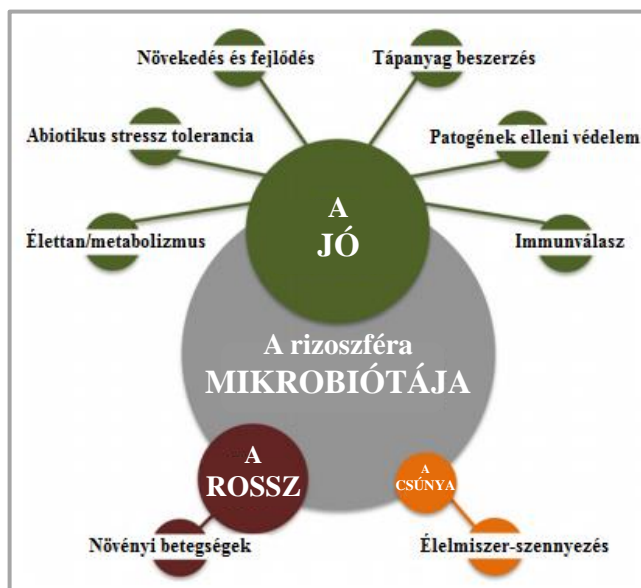
A **6. ábrán** szemléltetett betakarítás közben és azt követően felmerülő bejutási pontokon túl fontos megemlíteni a termények mosás során történő bakteriális infiltrációját. A jelenség a termény és a mosóvíz közti nagy hőmérséklet különbségből adódhat, amelynek következtében a termény hőmérsékletének csökkenése lehetővé teszi a felületi hidrosztatikus, az atmoszférikus erők és a belső nyomás kiegyenlítését, ezáltal előmozdítva a víz és a benne lévő baktériumok terménybe való behatolását (Ryser *et al.*, 2009; Deering *et al.*, 2012).

A patogének bejutásával kapcsolatban megemlítendő az is, hogy a stressznek (szárazságnak, extrém hőmérsékletnek, rovarfertőzöttségnek és más egyéb kedvezőtlen növekedési/környezeti tényezőknek) kitett növények fogékonyabbak mind a növény, mind a humánpatogének okozta fertőzésekre (Ryser *et al.*, 2009).

A belső növényi szövetekbe történő behatolásukat követően a mikroba sejtek vagy lokalizáltan maradnak, vagy az edényrendszeren keresztül elterjednek az egész növényben. Ez utóbbi jelenséget figyelték meg a lúdfüvet fertőző, opportunista humánpatogén *Pseudomonas aeruginosa* PA14 törzs esetén, de ugyanezt tapasztalták *Salmonella enterica* és *E. coli* O157:H7-tel való, aszeptikusan kezelt növények fertőzése során is (Ryser *et al.*, 2009). Mennyiségi szempontból Teplitski és munkatársai (2009) leírása alapján a talajkultúrák növényekben az endofita szalmonella populációk elérhetik a 10^2 - 10^5 TKE/g-ot is. A hidroponikus, laboratóriumi körülmények között nevelt növények belsejében az enterális baktérium populációk elérhetik akár a 10^3 - 10^6 TKE/g-ot is (Teplitski *et al.*, 2009).

2.6. Növényel asszociált baktériumok kölcsönhatásai a növényi endoszférában

A növényekben élő baktériumok kölcsönhatásairól kevés információ található a szakirodalomban, és főként az epifiták viszonylatában vizsgáldták csak ez idáig. Ha viszont a jobban tanulmányozott rhizoszférával kapcsolatos megfigyeléseket vesszük alapul, talán közelebb kerülünk a növényi endoszféra valóságához is. Ezek alapján pedig feltételezhetjük, hogy hasonlóképpen, mint a rhizoszférában, a növényi endoszférában is megjelenhetnek a jótékony hatású (mutualista endofiták), a fitopatogén és a humánpatogén mikrobák, valamint hatásuk és befolyásuk mértéke is hasonló lehet a **8. ábrán** láthatóakkal. Többen megfigyelték már, hogy a fitopatogének, mint a *Pectobacterium carotovorum*, a *Wausteria paucula* és az *Erwinia carotovora* a növényi sejtfal degradációja révén szén- és nitrogénforráshoz juttathatják az olyan humánpatogéneket, mint a *Salmonella* spp. és az *E. coli* O157:H7, ezáltal kedvező környezetet teremtve számukra a fennmaradáshoz, szaporodáshoz és az internalizációhoz is (Ryser *et al.*, 2009; Teplitski *et al.*, 2009; Deering *et al.*, 2012; Kwan *et al.*, 2013). Ezt azonban nem lehet univerzálisan minden fitopatogén baktériumról elmondani, továbbá egy bevásárlóközpontban tett megfigyelés arra világít rá, hogy a fitopatogének okozta terménypuhulásoknál kétszer több esetben mutattak ki szalmonellát, mint az egészséges termények esetében, és a populációk nagysága is ezekben az esetekben volt a legnagyobb (Teplitski *et al.*, 2009). Ezen túlmenően Kwan és munkatársai (2013) olyan érdekességet is leírtak, hogy a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* növekedését csökkentette és a környezetet elsavasította az adott terményen elszaporodó *S. enterica* (ami azonban az *E. coli* O157:H7-nél nem volt megfigyelhető) és ezáltal csökkentette a terménypuhulás tüneteit. Ez a jelenség azért lehet érdekes, mert a terménypuhulás az egyik jele lehet az élelmiszerbiztonsági kockázatnak, azonban ha ezek a tünetek csökkennek, a vásárlók egészségesnek látszó terméket fogyaszthatnak, holott a termény esetleg patogénnel fertőzött.



8. ábra. A rhizoszféra kedvező hatású „A JÓ”, növénypatogén „A ROSSZ”, valamint humánpatogén „A CSÚNYA” mikrobáinak funkciója és befolyása a növényre (Mendes *et al.*, 2013).

A jótékony hatású baktériumok (mutualista bakteriális endofiták) - amint a 2.4.3-as alfejezetben már említésre került - valószínűleg inkább gátolják, mint sem serkentik a humán-, illetve fitopatogének növekedését. Ezt az általuk termelt antibakteriális metabolitok, a növény rendszerszintű rezisztencia-indukciója, vagy az egyes tápanyagokért folyó versengés által fejthetik ki. Ezzel kapcsolatosan főként *Enterobacter* (*E. asburiae*, *E. cloacae*) és *Pseudomonas* (*P. fluorescens*) fajok esetében számoltak már be a versengés által *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 és *L. monocytogenes* sejtekre kifejtett inhibícióról (Tyler és Triplett, 2008; Ryser *et al.*, 2009; Deering *et al.*, 2012).

2.7. Endofita baktériumok kimutatására és izolálására alkalmas módszerek

Az endofiták kimutatására alkalmas módszereket két fő csoportba lehetne sorolni. Egyik csoport a tradíciókkal bíró, baktériumok kitenyésztésén alapuló, míg a másik a tenyésztéstől független, molekuláris biológiai vagy szerológiai vizsgálatokon alapuló módszerek. Azonban függetlenül attól, hogy milyen módszerrel vizsgálják az endofitákat, szinte elengedhetetlen a növények felületi fertőtlenítése abból a célból, hogy a növények felületén lévő epifita és más mikrobákat eliminálhassuk. A leggyakrabban alkalmazott fertőtlenítőszer között ismeretes a NaOCl (2-10%), etanol (70-90%), H₂O₂ (3%), perecetsav (0,03%) és a HgCl₂ (0,1%) is, amelyekből kettőt vagy többet alkalmaznak kombinációban (Ryser *et al.*, 2009). Ezen kemikáliák hatásának növelésére gyakran használnak detergenset (Tween 20 vagy 80) is. A fertőtlenítőszer 10 másodperc – 10 percig tartó (kemikáliáktól függően) alkalmazását követően a mintákat többször átöblítik steril vízzel vagy pufferrel a maradék kemikáliák eltávolítása céljából. Ideálisan ezen fertőtlenítő eljárások eliminálják az összes epifita mikrobát és a teljes endofita populáció élő és visszanyerhető állapotban marad, azonban a gyakorlatban ez az állapot ritkán vagy talán soha nem érhető el, mert bizonyos mértékben az epifiták is túlélnek és az endofiták is elpusztulnak (Ryser *et al.*, 2009). A felületi fertőtlenítésre alternatívaként ismeretesek még a nyomáson (Scholander nyomás bomba) vagy vákuumon alapuló extrakciós technikák, amelyek a növények edényrendszeréből képesek kinyerni/izolálni a mikrobákat a felületfertőtlenítés alkalmazása nélkül is (Ryser *et al.*, 2009).

2.7.1. Hagyományos, tenyésztésen alapuló módszerek

Az endofiták kvantitatív vizsgálatára a felületileg fertőtlenített növényi szöveteket puffer oldatban manuálisan (mozsárban) vagy gépileg (turmixgépben, sztomacherben) macerálják/homogenizálják, majd hígítási sort készítenek belőle és ezekből szélesztenek a megfelelő táptalajra (Ryser *et al.*, 2009).

A felületi fertőtlenítés utáni centrifugálás is alkalmazott módszer, amely viszont csak a sejtközötti folyadék összegyűjtésére alkalmas puha növényi szövetek esetében (Ryser *et al.*, 2009).

Használatos eljárás továbbá az úgynevezett direkt szöveti lenyomatozás is, amely során a fertőtlenített, különböző vastagságra szeletelt növényi metszeteket a megfelelő táptalaj felületére helyezik, rányomják rövid időre (kb. 10 perc), majd azt követően inkubálják (Ryser *et al.*, 2009).

Ismeretes még az izolált bakteriális endofiták ismételt bejutásának igazolására egy antibiotikum rezisztencián alapuló, tenyésztéses vizsgálat is. Ebben az esetben az adott vad törzs legalább két vagy több antibiotikumra rezisztens telepeit (mutánsait) választják ki, majd demonstrálják az eredeti törzssel való fenotípusos hasonlóságait, és végül bejuttatják az adott növénybe. Utolsó lépésként megpróbálják újra izolálni a megfelelő antibiotikumokat tartalmazó tápközegben (Ryser *et al.*, 2009).

2.7.2. Tenyésztéstől független módszerek

Ezen módszerek között elsőként a PCR-alapú vizsgálatokat érdemes megemlíteni, amelyekkel legtöbbször a növényből kivont, genomiális DNS-ből szaporítják fel a 16S rRNS gén egy darabját specifikus primerekkel. Ezek a primerek nem vagy kismértékben amplifikálják a kloroplasztisz DNS-t, valamint nem vagy más méretben, azaz elkülöníthető módon amplifikálják a mitokondriális DNS-t. Az amplifikálás után a PCR termékeket megszevenálják (Shakya *et al.*, 2013). A felszaporított 16S rRNS gén fragmentumok denaturáló gradiens gélelektroforézissel (DGGE) (Ryser *et al.*, 2009; West *et al.*, 2010; Haroim *et al.*, 2012b), terminális restrikciós fragment hossz polimorfizmussal (T-RFLP) (Reiter *et al.*, 2002; Sessitsch *et al.*, 2002; Ferrando *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2014) való vizsgálata is alkalmasnak bizonyult az ismert endofiták növényben való jelenlétének igazolására. Továbbá alkalmazott még a felszaporított 16S rRNS gén fragmentumok klónozását követő szekvenálás is (Sessitsch *et al.*, 2002; Ferrando *et al.*, 2012; Govindasamy *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2014).

Alternatív módszer lehet a szerológiai technikák alkalmazása. A technika lényegében a teljes bakteriális sejt vagy a sejtfal fehérjekomponensei ellen termeltetett antitestek kötődésén alapszik, amelyet fluoroforos vagy kolloidális arannyal való jelölés követ, ami már fluoreszcens vagy elektronmikroszkópiás detektálással láthatóvá teszi a baktériumsejteket (Gamalerlo *et al.*, 2009; Ryser *et al.*, 2009).

A glükuronidáz (GUS) egy másik hasznos marker lehet a baktériumok növényből való kimutatásához. Ebben az esetben bejuttatják a baktériumsejtekbe a β -glükuronidáz enzim génjét, ami aktívan expresszálódik a legtöbb szervezetben. A megtermelt enzim egy kromogén

szubsztrátot hasít, ami kék vagy zöld precipitátumként figyelhető meg a baktérium sejtben (Herd *et al.*, 1997; Ryser *et al.*, 2009).

Az autoradiográfiás vizsgálatok is alkalmasak lehetnek növény-baktérium kölcsönhatások vizsgálatára. Ebben az esetben az endofita baktériumokat ^{14}C , ^{15}N vagy ^{32}P izotóppal kiegészített tápvelesben tenyésztik, majd beoltják velük a növényeket és később autoradiográfiásan próbálják detektálni őket (Ryser *et al.*, 2009).

Manapság igen gyakran használt egyéb riporter gének az úgynevezett „GFP” gének, amelyek zöld, piros, sárga, esetleg más színben fluoreszkáló fehérjéket (GFP, RFP, YFP) expresszálnak. Ezen fehérjék konfokális pásztázó lézermikroszkópiával (CLSM) való detektálása akár direkt *in vivo* módon is láthatóvá teszi az adott baktériumot (Ryser *et al.*, 2009; Cardinale, 2014). A módszer igen praktikus; előnye az *in vivo* vizsgálati lehetőségben és az eléggé erős jelintenzitásban rejlik, míg hátrányaként említhető meg a génbevitel körülményessége és ennek következtében az esetlegesen bekövetkező fenotípusos tulajdonságok megváltozása.

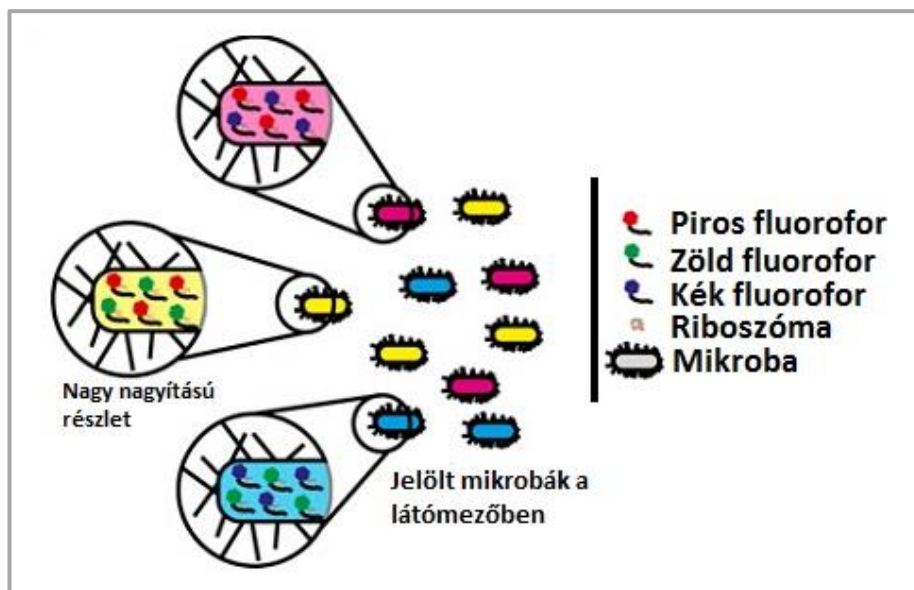
A GFP génkaszettás eljárás alternatívájaként ismeretes (Thomas és Reddy, 2013; Cardinale, 2014) és egyre gyakrabban alkalmazott eljárás a Fluoreszcens *In Situ* Hibridizáció (FISH) és a CLSM technikák együttes használata (Compant *et al.*, 2011; Valm *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2015). Az eljáráshoz szükséges a vizsgálni kívánt baktérium 16S rRNS génszekvenciájának legalább részleges ismerete, és sajnos nem alkalmas *in vivo* vizsgálatokra, azonban kevésbé körülményes az előkészítése (nincs szükség génbevitelre), nem jár az adott baktérium fenotípusos tulajdonságainak megváltozásával és *in situ* vizsgálódást tesz lehetővé.

2.7.2.1. A FISH technika

A technika a komplementer nukleinsav szekvenciák teljesen permeabilizált sejtekben történő specifikus hibridizációján alapul (Bisha, 2009), ahol a célszekvenciához kötődő kis, 15 – 25 nukleotid hosszúságú szekvencia (az úgynevezett oligonukleotid próba vagy csak próba) fluoreszcensen jelölt, tehát fluoreszcens mikroszkópiával vagy áramlásos citometriával detektálható (Wagner *et al.*, 2003).

A cél szekvencia sok esetben az rRNS, amely genetikailag stabil, erősen konzervált és variábilis régiókat is tartalmaz, valamint nagy kópiaszámban van jelen minden célsejtben. A konzervált és variábilis régióknak köszönhetően lehetséges olyan próbák tervezése, amelyek képesek rendszertani szinten differenciálni a célsejteket. Mind az 5S, 16S és 23S rRNS használható diagnosztikai célokra, de a FISH próbatervezéseknek leggyakoribb célpontja a 16S rRNS, mert ezen szekvenciákból léteznek a specifikus próbák tervezéséhez elengedhetetlen legnagyobb adatbázisok (Bisha, 2009).

A próbákat *in silico* tervezik, gyakorlatilag az adatbázisokban lévő ismert célszekvenciákhoz való illesztéssel, tervezési (Probe design) és összeillesztési eszközöket (Probe match) használva az olyan programokban, mint például az ARB[©] (Ludwig *et al.*, 2004; Bisha, 2009). A próbák fluoreszcens jelölésekor leggyakrabban direkt kémiai úton jelölik a próbákat az 5' végen egy amino-linker segítségével, azonban ritkábban a 3' végen is jelölik terminális transzferáz alkalmazásával. Tipikus fluoroforok a rodamin (Texas Red), a cianin festékek (mint Cy5, Cy3, Cy7), vagy valamilyen fluoreszcein származékok (6-FAM, FITC), amelyek általában erősebb jelintenzitást eredményeznek. A fluoreszcensen jelölt próbák alkalmazásának számos előnye van, amelyből az egyik igen fontos a különböző gerjesztési és emittálási spektrumú fluoreszcens festékek (fluoroforok) egyidejű használatának lehetősége, amit ha a különböző baktériumokra specifikus próbákkal kombinálunk, akkor lehetségessé válik több célsejt detektálása egy mintában (Bisha, 2009). Ezen túlmenően pedig, ha egy sejten belül egynél több cél szekvenciához hibridizálunk különböző fluoroforos jelölésű próbákat, akkor lehetségessé válik az úgynevezett kombinatorikus jelölés, amelynek sematikus vázlata a **9. ábrán** látható.



9. ábra. A FISH során alkalmazott kombinatorikus jelölés sematikus vázlata (Valm *et al.*, 2011)

A FISH alapú vizsgálatok általában a következő öt lépésből állnak: 1. fixálás, 2. előkészítés, 3. hibridizálás, 4. mosás és 5. mikroszkópos vizsgálat. A fixálásnak két célja van. Az egyik a sejtek átjárhatóvá tétele a próbák számára, a másik pedig a nukleinsavak degradációjának megakadályozása. A fixáló anyagok egyik típusa a keresztkötéseket létrehozó formaldehid, paraformaldehid (főként Gram-negatívok esetében), alkalmazhatók még precipitáló anyagok is fixálásra, mint az etanol vagy a metanol (főként Gram-pozitívok esetében), de ezek egymást követően is használhatók. Az előkészítés során (ha szükséges) a Gram-pozitív sejtek

permeabilizáltságát lizozimes kezeléssel növelik, majd a mintákat dehidratálják (általában etanol sorba való merítéssel) és szárítják. Ezt követi a hibridizálás, ami a próbák célszekvenciához való kötődését jelenti szoros körülmények között (sztringens – nagyfokú homológia a próba és cél szekvencia között), amelyet a formamid koncentráció, hőmérséklet és a só koncentráció változtatásával lehet beállítani. A nem kötődött próbákat egy mosási lépéssel távolítják el (Bisha, 2009), végül az elkészült preparátumokat fakulás gátló ágensek hozzáadásával vizsgálják áramlásos citometriával, epifluoreszcens mikroszkóppal vagy CLSM-mel (Wagner *et al.*, 2003). Ez utóbbinak előnye, hogy képes külön síkokban, fényszórás nélkül is a jó minőségű képalkotásra, továbbá háromdimenziós képek készítése is lehetséges a külön síkokban előállított felvételek összeillesztésével.

2.7.2.2. PCR – primer tervezési és ellenőrzési módszerek

A PCR reakciók esetében általában két külön primer szükségeltetik, amelyekkel meghatározható az amplifikálandó szakasz két vége. A működő képes és specifikus PCR reakció érdekében pedig körültekintően kell megtervezni ezen primereket, amelyekhez a DNS polimeráz enzimnek elengedhetetlenül szüksége van ahhoz, hogy folytatni tudja a templát szállal komplementer, új DNS szál szintézisét. A primerek tervezése általában a következő fő lépéseket tartalmazza:

- i. a primerek helyének kiválasztása
- ii. a kötődési hőmérséklet (olvadási hőmérséklet, T_m) beállítása
- iii. önmagukkal vagy más primerekkel való kettős szálú szerkezetek kialakulásának vizsgálata (Abd-Elsalam, 2003; Chen *et al.*, 2002; Hyndman és Mitsuhashi, 2003; Suchi *et al.*, 2013).

Az említett lépések kacsán pedig érdemes figyelembe venni néhány megfigyelést. Mindenekelőtt ismerni kell legalább annak a DNS szakasznak a szekvenciáját, ahová a primereket el szeretnénk helyezni. Továbbá, ha az adott fajra specifikus primerek tervezése a cél, akkor rokon fajok szekvenciáit is figyelembe kell venni a primerek elhelyezésekor, aminek kivitelezéséhez egy szekvencia adatbázist érdemes létrehozni. Célszerű két konzerválódott régiót kiválasztani, amelyek között a távolság általában 100-1000 bp. Az alsó határ alatti távolságot a keletkezett ampliconok vizualizálási nehézsége miatt, míg a felső határ felett az amplifikációs nehézségek miatt nem érdemes tervezni (Hyndman és Mitsuhashi, 2003).

A primerek hossza legalább részben befolyásolja kötődés hőmérsékletét, idejét és specifikusságát, ezért ezen jellemzőjük igen fontos. Általában 15-30 bp hosszúakra tervezik, mert 15 bp alatt nagyobb valószínűséggel hibridizálnak a másodlagos kötőhelyekhez is, valamint 30 bp felett nagy eséllyel alkotnak kettős szálú szerkezeteket önmagukkal (Abd-Elsalam, 2003).

A kötődési hőmérsékletre még a primer szekvenciája, a só koncentráció, a primer koncentráció és a denaturáló szerek jelenléte lehet hatással (Chen *et al.*, 2002). A primer szekvencia tekintetében elmondható, hogy minél nagyobb a GC tartalom (GC%), annál magasabb a kötődési hőmérséklet, ezért általában 50-60% közötti GC tartalmú primereket terveznek (Chen *et al.*, 2002; Kumar és Chordia, 2015). Az optimális kötődési hőmérséklet általában 52-65°C mozog, de nem ismeretlen 65-80°C közötti tartomány használata sem, továbbá célszerű még, hogy a két primer olvadási hőmérséklete nagyjából megegyezzen (1-3, maximum 8°C-os eltéréssel) (Chen *et al.*, 2002; Suchi *et al.*, 2013).

Igen fontos a guanin vagy citozin 4 vagy ennél többszöri, egymás utáni ismétlődésének elkerülése a primerekben, mivel ez elősegítheti az önmagukkal formált úgynevezett hajtú szerkezetek kialakulását. Két teljesen egyforma primer is kötődhet egymással (homodimer szerkezetek) ha megfelelő komplementer bázissorrendeket tartalmaznak, továbbá az egyazon reakcióban alkalmazott két különböző primer közötti komplementer régiók folytán is létrejöhet kettős szálú szerkezet (heterodimer). Mind a három szerkezeti lehetőség kialakulását célszerű minimalizálni (Chen *et al.*, 2002; Hyndman és Mitsuhashi, 2003).

A fentiekben említett lépések és megfigyelések alapján saját magunk által vagy különböző bioinformatikai programok segítségével is megtervezhetők a kívánt primerek. Azonban a magunk végezte tervezés esetén is szinte elengedhetetlen egy olyan bioinformatikai program, mint például a MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013), amellyel az illesztett szekvenciákat, egymáshoz hasonlíthatjuk és kiválaszthatjuk a primerek megfelelő helyét. A szekvenciák illesztését a MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) program ClustalW vagy MUSCLE (előnyösebb) algoritmusával (Hall, 2013), a Guidance nevű (<http://guidance.tau.ac.il/>) internet alapú program öt féle (köztük a ClustalW és MUSCLE) algoritmusával (Hall, 2013), vagy más programok segítségével is elvégezhető. Ez utóbbi program előnye, hogy az öt fajta illesztés minőségét ki is értékeli a program és így kiválasztható legmegfelelőbb. Vannak azonban komplexebb és egyszerűbb bioinformatikai programok is, amelyek a primertervezés munkásabb részeit megkönnyítik vagy nagyrészt el is végzik. Ilyenek például a Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), Primer3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>) vagy a PrimerQuest (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) (Kumar és Chordia, 2015). Továbbá mind a magunk, mind a programok tervezte primerek alkalmazhatóságát (T_m , másodlagos szerkezetek kialakulásának esélye, specifikusságuk) ellenőrizni kell *in silico*. Erre a célra kitűnően alkalmazható például az IDT SciTools (Owczarzy *et al.*, 2008) egyik online eszköze, az OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Ennek segítségével még a primerrel homológ szekvenciák is kikereshetők a GeneBank-ból, mivel beépített BLAST (Altschul *et al.*,

1990) funkcióval is rendelkezik. Hasonlóan alkalmazható a NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) program is (Chen *et al.*, 2002; Kumar és Chordia, 2015). Végül pedig az *in silico* vizsgálatok alapján legmegfelelőbbnek tűnő primerek cél szekvenciákhoz való specifikus kötődésének reakció körülményeit a gyakorlatban célszerű optimalizálni. A specifikusságot pedig más rokon és nem rokon fajból származó, nem cél szekvenciák felhasználásával is érdemes leellenőrizni.

2.8. Filogenetikai analízisek – törzsfák szerkesztési szempontjai és az alkalmazható bioinformatikai módszerek

Élővilágunk egységes rendszerezésére, osztályozására, az élőlények fenotípusos tulajdonságai alapján már Arisztoteléstől kezdődően többen tettek próbálkozást (Ari, 2012), azonban a legtöbb élőlény, de különösen a prokarióták, nem rendelkeznek elegendő fenotípusos karakterrel a hatékony összehasonlító elemzések elvégzéséhez (Sleator, 2011). A molekuláris alapú filogenetikai rendszerezés, amely ezt a korlátozást hatékonyan fel tudja oldani, az 1980-as években kezdett fellendülni, amikor a statisztikai és valószínűségelméleti megközelítéseken alapuló algoritmusok fejlesztése elindult (Sleator, 2011; Ari, 2012). Ezek a módszerek a modern DNS szekvenálási technikák fejlődésének köszönhetően már DNS, RNS és fehérje szekvenciákkal dolgoznak és a biológiai fajok, organizmusok, gének vagy fehérjék evolúciós kapcsolatait próbálják megmutatni számunkra filogenetikai törzsfák szerkesztése és analízise révén (Sleator, 2011; Ari, 2012; Sleator, 2013). Megjegyzendő azonban, hogy az analízisek eredményeként kapott, az evolúciót rekonstruáló törzsfák helyessége sohasem bizonyítható teljes mértékben, mivel jelenleg nem létezik olyan algoritmus, amely minden fajra és szekvenciára tökéletesen illene (Ari, 2012), ezért a készíthető törzsfák csak megközelítéseknek tekinthetők.

Ahhoz, hogy különböző fajok rokonsági kapcsolatait vizsgálhassuk, először is szükségünk van a vizsgálandó fajok genomjának részleges vagy teljes nukleotid szekvenciáira. Az analízishez kiválasztott szekvenciák pedig evolúciós rokonsági viszonyban kell álljanak egymással, azaz közös őssel kell rendelkezniük és az ilyen szekvenciákból álló géneket, fehérjéket, illetve szabályozó vagy nem kódoló DNS szakaszokat pedig homológoknak nevezik (Sipiczki, 2004; Ari, 2012). Tehát, több faj evolúciós viszonyának felderítésében homológ szekvenciákra van szükség és ezek főként a vizsgált fajok egyedi, meghatározott génjének vagy akár génjeinek (multigén) szekvenciáit (RNS-t, fehérjét vagy aminosavat kódoló gének) jelentik, de manapság már a fajok teljes genomi szekvenciáit is egyre gyakrabban felhasználják (Sleator, 2011; Ari, 2012). Természetesen az is igaz, hogy nem csak ezen, hanem számtalan más molekuláris adat felhasználásával is levonhatók a fajok rokonsági kapcsolatait illető következtetések (Ari, 2012). A teljes genom szekvencián alapuló törzsfakészítés megbízhatóbb eredménnyel szolgál, mint az

egy vagy több génen alapuló konstrukciók, mivel az egyes gének a különböző fajokban nem mindig egyformán konzerváltak, azonban a teljes genom alapú filogenetikai analízisek jóval idő és pénzigényesebbek (Sipiczki, 2004). Ezért, még napjainkban is az erősen konzervált géneknek megfelelő szekvenciák (filogenetikai markerek) elemzésére alapoznak, mint például az rRNS-t kódoló génszekvenciák, mivel ezek minden élő szervezetben megtalálhatóak, valamint azonos a szerkezetük és funkciójuk (Sipiczki, 2004; Deák, 2006). Prokarióták esetében az rRNS kisebb alegységét, a 16S rRNS-t kódoló gén használható kitűnően, mint filogenetikai marker (Ludwig és Klenk, 2005).

Ha rendelkezünk homológ gén vagy gének szekvenciáival, akkor a helyes törzsfa elkészítéséhez a második fontos lépés a megfelelő szekvencia illesztés, ami akkor jó, ha a homológ szekvenciák egyes pozíciói is homológok, vagyis a hézagok (gap-ek) megfelelő helyen vannak (Ari, 2012). Az illesztési metódusok közül a többszörös szekvencia illesztés (angolul: multiple sequence alignment) gyakoribb az evolúciós kapcsolatok levezetésében, szemben a páronkénti szekvencia illesztéssel (angolul: pairwise sequence alignment). Ez azzal magyarázható, hogy vannak olyan biológiai szempontból fontos mintázatok/motívumok, amelyek két szekvencia összehasonlításával nem fedhetők fel, azonban több rokon szekvencia egyidejű összehasonlítása során igen (Gusfield, 1997). A többszörös szekvencia illesztésre, többféle algoritmus alapján működő, többféle program is létezik, amelyek közül érdemes megemlíteni a gyakran használt ClustalW-t (Thompson *et al.*, 1994) és MUSCLE-t (Edgar, 2004), amelyek többféle gén szekvencia illesztésére is alkalmasak. Továbbá ajánlott többféle programmal is illeszteni az adott szekvencia gyűjteményt, majd a különböző illesztéseket egyesíteni az úgynevezett meta-illesztőkkel (mint pl. a MCOFFE) annak érdekében, hogy megbízhatóbb illesztést kapjunk (Posada, 2009). Ilyen, akár öt különböző módszerrel való illesztésre van lehetőség a Guidance nevű (<http://guidance.tau.ac.il/>) internet alapú program segítségével, amely ki is értékeli az illesztések minőségét (Hall, 2013). Vannak azonban csak bizonyos génekre specializálódott, pontos és nagyteljesítményű illesztő programok is, mint a SINA (Pruesse *et al.*, 2012) online program is (<http://www.arb-silva.de/aligner/>), amely az rRNS gének illesztésére kitűnően alkalmas.

Harmadik lépésként a törzsfaszerkesztési módszert kell megválasztani, amelyek többsége a fenetikus (más néven, algoritmikus vagy távolság alapú) és a kladsztikus (karakter-alapú vagy törzsfa-kereső vagy filogenetikus) módszerek osztályába sorolhatók (Sridhar *et al.*, 2006). A fő törzsfakészítési módszerek tekintetében az előbbi osztályba a Neighbor-joining, az UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages), míg utóbbiba a Maximális Parszimónia (Maximum Parsimony), a Maximális Valószínűség (Maximum Likelihood)

módszerek és a Bayes-statisztikán alapuló eljárás (Bayesian) tartoznak (Korsós, 2003; Rizzo és Rouchka, 2007; Sleator, 2011; Ari, 2012; Sleator, 2013). Vizsgálataimhoz csak a Maximális Valószínűség módszert (Felsenstein, 1981) alkalmaztam, ezért csak ez kerül rövid részletezésre a továbbiakban.

A Maximális Valószínűség módszer egy valószínűségi modellen alapuló, karakter alapú törzsfakereső módszer, melynek a következő paraméterei vannak: törzsfa topológiája és ághosszai, valamint a nukleotid szubsztitúciós modell paraméterei. Ezen módszer alkalmazása esetén első lépésként célszerű meghatározni a használandó nukleotid szubsztitúciós modellt, aminek gyakorlatilag az adott szekvencia adatokhoz a lehető legjobban kell illeszkednie és azokból becsülhető. A becslés úgy zajlik, hogy a használt bioinformatikai program minden szubsztitúciós modellel és a más paraméterek minden kombinációjával elkészít egy-egy törzsfát, majd többféle modellszelekciós kritériumot alkalmazva, mindegyikre meghatároz egy pontszámot (Rizzo és Rouchka, 2007; Posada, 2009; Ari, 2012). Megjegyezendő, hogy a különböző modellszelekciós kritériumok különbözőképpen súlyozhatnak. Célszerű ezért azt a szubsztitúciós modellt választani, amelynek a legkisebb a BIC (**B**ayesian **I**nformation **C**riterion) pontszáma, mert ez megfelel annak a modellnek, amelynek maximális az utólagos valószínűsége, ha mindegyik modellszelekciós kritériumnak egyforma a súlyozása (Posada, 2009). Végül a kiválasztott modellel kell elkészíteni a végleges törzsfát, amihez a visszatevéses újra-mintavételezéses (bootstrap) analízist is célszerű végezni, mert így vizsgálható az elkészült törzsfa szerkezeti megbízhatósága, reprodukálhatósága (Hall, 2013). Általában 100-1000 közötti ismétlést alkalmaznak és a 70% megbízhatóság alatti elágazásokat már nem szokták figyelembe venni (Hall, 2013).

A filogenetikai törzsfák elkészítéséhez több ingyenes használható bioinformatikai program is létezik, mint a PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) online program (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>), amely a Maximális Likelihood módszerrel dolgozik, vagy a MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) program, amely a fentebb említett módszerek közül a Bayesian kivételével mindegyikkel és a Minimum-Evolution módszerrel is képes dolgozni. Ez utóbbi program filogenetikai törzsfakészítési célból történő használatát részletesen Hall (2013) írta le.

2.9. A paprika bakteriális endofitáival kapcsolatos eddigi tudományos vizsgálatok és ezek konklúziói

Ebben a fejezetben csakis felületileg fertőtlenített paprika növényből származó endofita baktériumokkal kapcsolatos tudományos közlemények kerülnek tárgyalásra.

Rasche és munkatársai (2006) a hűtési hőmérséklet (6 majd 4°C) hatását vizsgálták *in vitro* két melegkedvelő paprika fajta (Milder Spiral és Ziegenhorn Bello) tenyésztendő endofita baktériumaira. A baktériumokat a szárból izolálták tenyésztési módszerrel és strukturális diverzitásukat 16S rRNS alapú T-RFLP-vel, továbbá a T-RFLP profilok domináns közösségi tagjainak meghatározását 16S rRNS génkönyvtárak létrehozásával végezték. A vizsgálatok alapján a hűtés hatására nagy heterogenitást figyeltek meg a közösségek összetételében, valamint tovább látszott igazolódni a fajta-specifikus közösségek létezése. A Milder Spiral fajtából származó izolátumok többsége a nagy GC tartalmú baktériumok (*Microbacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Rhodococcus* sp.) és a Firmicutes (*Staphylococcus* sp.) törzsből kerültek ki, míg a Ziegenhorn Bello fajtából izoláltak 93%-a *Staphylococcus aureus* és *Bacillus* sp. (Firmicutes) voltak.

Kang és munkatársai (2007) 25 különböző helyszínről, 150 különböző telepmorfológiájú feltehetően endofita baktériumot izolált tenyésztési módszerrel paprika szárból. Ezekből 23 domináns és egyben reprezentatív izolátum került kiválasztásra, valamint fenotípusos jellemzés és rRNS gén alapú azonosításra. Ezen izolátumok a *Ochrobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Janthinobacterium*, *Ralstonia*, *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Sporosarcina*, *Acidovorax* és *Brevundimonas* nemzetségekbe tartoztak. A 10^6 - 10^7 TKE/g koncentrációban kolonizálni képes *Pseudomonas rhodesiae* PS4 és *Pantoea ananatis* PS27 törzsek szignifikánsan serkentették a palánták növekedését, 73,9% illetve 41,5%-kal növelték a gyökerek frissen mért tömegét, valamint kiváltották a növény RRI-jét a *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* növénypatogénnal szemben.

Sziderics és munkatársai (2007) öt darab Ziegenhorn Bello paprika fajtából tenyésztési módszerrel izolált ACK-deamináz aktivitást mutató törzs hatását vizsgálták enyhe ozmotikus stressznek kitett és kontroll Ziegenhorn Bello paprikákban *in vitro*. A vizsgált törzsek közül négy termelt indol-ecetsavat és ez a négy serkentette a növények növekedését, továbbá az *Arthrobacter* sp. EZB4 és *Bacillus* sp. EZB8 törzsek csökkentették az abiotikus stressz hatását a növényekben. Ez utóbbi megfigyelést két paprika gén (*CaACCO* - ACK oxidáz gén, *CaLTPI* – nem specifikus lipid transzfer fehérje gén) felül vagy éppenséggel alulregulációjával érték el a törzsek.

Marasco és munkatársai (2012) tradicionális egyiptomi farmon termelt paprikák gyökér-endoszférájának, rhizoszférájának és a gyökerek közvetlen közelében lévő talaj baktérium közösségeit vizsgálták, vízhiányos termesztési körülmények között és összehasonlították a műveletlen talaj baktérium közösségeivel. A DGGE vizsgálatok alapján a baktérium közösségek szerkezete és diverzitása eltért a különböző mikro-élőhelyeken, felhívva a figyelmet arra, hogy a

növény által meghatározott, szelektív nyomás nehezedik az egyes baktériumközösségekre. Ehhez hasonlóan a tenyészthető baktérium nemzetségek tekintetében is szintén eltérő eloszlást tapasztaltak a különböző gyökérrendszeri frakciókban. Megfigyelték, hogy a *Bacillus* fajok döntő többsége az endoszférából származott (az endoszféra izolátumok 68%-át tette ki), míg a rhizoszférát és a gyökér közvetlen közelében lévő talajt *Klebsiella* fajok uralták (61%, illetve 44%). Az endoszférában a *Bacillus* fajokon kívül még *Paenibacillus* (30%) és *Lysinibacillus* (3%) fajok fordultak elő. Az összes izolátum 95%-a növényi növekedést és stressz rezisztencia serkentő tulajdonságot mutatott, különös tekintettel a *Bacillus* és rhizoszféra törzsekre. Végül azt is megfigyelték, hogy sivatagos környezetben természetesen a paprika gyarapította a benne és a környezetében lévő növényi növekedést serkentő baktérium populációkat.

Paul és munkatársai (2013) Chili paprika gyökeréből, szárából és leveléből összesen 283 baktériumot izolált, amelyek 44 telep morfológiai csoportba voltak sorolhatók, valamint az izolátumok aránya 50%, 45% és 5% volt az előbb említett szervek között. A 44 morfológiai csoportot 14 genotípusba sorolták rRNS génszekvencia vizsgálatok alapján, amelyek közül a legtöbb a *Pseudomonas*, majd a *Bacillus* és a *Burkholderia* nemzetségekbe tartozott, de igen sokszínű volt a más nemzetségek palettája is (*Actinobacter*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Kitasatospora*, *Pandoraea*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Ralstonia*, *Paenibacillus*, *Serratia*). Megvizsgálták az izolátumok patogén gombákkal (*Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* és *Phytophthora capsici*) szembeni aktivitását. Az eredmények alapján 22 izolátum gátolt legalább egy gombát, továbbá a *Bacillus tequilensis* (CNU082075), *Burkholderia cepacia* (CNU082111), valamint a *Pseudomonas aeruginosa* (CNU082137 és CNU082142) törzsek mind az öt patogén gombát gátolták.

Xia és munkatársai (2015) a kukorica, paradicsom, sárgadinnye és a paprika növény tenyészthető bakteriális endofitáinak diverzitását vizsgálták a manapság szokványos/konvencionálisan és szigorúan biogazdálkodási termesztési technikák vonatkozásában, valamint vizsgálták az izolátumok növényi növekedést serkentő hatását paradicsom magok beoltásával. A baktériumokat felületileg fertőtlenített gyökér, hajtás (szár és levél), valamint magokból izolálták hagyományos tenyésztési módszerrel, majd rRNS génszekvencia adatok alapján azonosították őket. Összesen 336 bakteriális izolátumot azonosítottak a négyféle növényből, amelyek 5 törzsbe, 58 különböző genotípusba és 32 fajba voltak sorolhatók, továbbá az 5 törzs közül a Firmicutes (55%) adta az izolátumok többségét. A Shannon-féle diverzitási index alapján összességében a gyökerekből és a hajtásokból hasonló, míg a magokból származó baktériumokra a legkisebb értékeket kapták. Kiemelendő, hogy a biogazdálkodási technikákkal nevelt növényekből több (239) és magasabb fokú diverzitást mutató, míg a konvencionálisan

termesztett növényekből kevesebb (97) és alacsony diverzitást mutató baktériumokat sikerült izolálniuk, ami potenciálisan jelezheti a biogazdálkodási gyakorlat endofita baktériumok mennyiségére és diverzitására gyakorolt pozitív hatását. A paprikából származó izolátumok relatív gyakorisága a hajtásokban (0,02 konvencionális – 0,04 biogazdálkodás) volt a legnagyobb, ezzel szemben a gyökerekben és a magokban hasonló és jóval kisebb volt a gyakoriságuk (0 konvencionális – 0,01 biogazdálkodás). Összességében, a biogazdálkodási gyakorlattal termesztett paprikákból háromszor nagyobb (0,02 konvencionális – 0,06 biogazdálkodás) volt a baktériumok relatív gyakorisága, valamint a Shannon-féle diverzitási index is majdnem kétszer akkora értéket (1,24 konvencionális – 2,34 biogazdálkodás) mutatott. Az 58 genotípus paradicsom magra kifejtett hatása alapján 61% serkentette (legnagyobb mértékben három *Bacillus*, egy *Brevibacillus* és egy *Burkholderia* törzs) a növény növekedését és 50-64%-uk növelte a biomassza akkumulációt.

Wang (2015) doktori munkája során a sávos és a műanyag talajtakarásos talajművelést értékelte szabadföldön, konvencionális és bio, valamint jó és korlátozott víz-ellátottságú étkezési paprika termesztésben két éven keresztül (2011 és 2012), továbbá vizsgálta a növények bakteriális endofita populációit. Majd 2013-ban az izolált endofita baktériumok közül két *Pseudomonas* és egy *Bacillus thioeparans* törzssel újra beoltotta az üvegházban, jó és korlátozott víz-ellátottsággal nevelt paprikákat, hogy felmérje a növények növekedésére gyakorolt hatásukat. A két évben összesen 160 baktériumot izolált, amelyek 57 egyedi fajba és 125 törzsbe tartoztak, valamint az alábbi nyolc fajt mindkét évben sikerült izolálni: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus cereus* és *Bacillus aryabhatai*. Az izolátumok több mint 50%-a a Firmicutes törzsbe tartozott, melyet a Proteobacteria 30% és az Actinobacteria törzs követett 10% részesedéssel. A leggyakrabban előforduló három nemzetség a *Bacillus*, *Pseudomonas* és *Enterobacter* volt, 68, 18 és 15 darab izolátummal. Az eredmények továbbá azt sugallják, hogy a mezőgazdasági gyakorlat (konvencionális vagy bio) évről évre, valamint a növények kis elhelyezkedésbeli változásai szignifikánsan befolyásolják az endofita populációkat. A környezeti tényezők tekintetében pedig elmondható, hogy a mezőgazdasági gyakorlat, a talajművelés és a többi környezeti változó is jelentősen befolyásolhatja a bakteriális endofita populációkat. Ez azt sugallja, hogy habár a különböző termesztési rendszerekben nevelt növények endofita populációinak egy időben (egy termesztési évben) való felmérése hasznos lehet, az adott növény endofita diverzitásának felmérése azonban kevésbé lehet hatékony az egyik rendszer másikkal viszonyított erősségének megállapításában. A vízellátottság tekintetében fontos lehet, hogy milyen körülmények között értékelik az endofitákat, mert relatíve kevés olyan törzset találtak, amelyek mind a normális,

mind a hiányos víz-ellátottságú körülmények között serkentették a növényi növekedést. Ennek ellenére csakis ezen törzsek lehetnek potenciális jelöltek a szabadföldi alkalmazásra, mivel ott a körülmények igen változóak.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A baktériumok izolálásához felhasznált paprika minták

Az endofita baktériumok izolálása talajkultúrásan és hidroponikusan termesztett édes étkezési paprika (*Capsicum annuum* var. *grossum*) Kárpia F1 és Hó F1 hibrid fajtákból, valamint a termesztéshez használt magokból történt. A paprika növényeket a Szent István Egyetem Kertészettudományi Karához tartozó Soroksári Kísérleti Üzem és Tangazdaság termesztette 2012-ben.

3.2. A kísérletekben használt baktérium törzsek

A kísérletek során a paprikából származó baktérium izolátumokon kívül az alábbiak baktériumtörzseket használtam: *C. antarticum* F1445/3 (sertéskaraj eredetű), *E. coli* ATCC 8739 (humán széklet eredetű), *E. coli* SE/2-2/I (baromfihús eredetű), *E. coli* SE/14-2/I (tőkehús eredetű), *E. coli* SE/4-2/II (baromfihús eredetű), *L. grayi* CCM 4029^T, *L. innocua* 1010 (élelmiszer eredetű), *L. monocytogenes* CCM 4699, *P. fluorescens* CCM 2115^T, *P. mendocina* CCM 3590^T

3.3. Alkalmazott tápközegek

- PGES (*N és/vagy *V) agar:

| | |
|----------------------------|---------|
| <i>Pepton</i> | 5 g/l |
| <i>Glükóz</i> | 1 g/l |
| <i>Élesztőkivonat</i> | 2,5 g/l |
| <i>NaCl</i> | 5 g/l |
| <i>Bakteriológiai agar</i> | 15 g/l |
| <i>*Nisztatin</i> | 0,1 g/l |
| <i>*Vitamin oldat</i> | 1 ml/l |

*- esetenként autoklávozás és 50 °C-ra való visszahűtés után a tápközeghez adagolva

- WL (Wallerstein Laboratory) (*V) nutrient agar (Atlas, 2010):

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| <i>Élesztőkivonat</i> | 4 g/l |
| <i>Pepton</i> | 5 g/l |
| <i>Glükóz</i> | 50 g/l |
| <i>KH₂PO₄</i> | 0,55 g/l |
| <i>KCl</i> | 0,425 g/l |
| <i>CaCl₂</i> | 0,125 g/l |

| | |
|----------------------------|-------------------|
| <i>MgSO₄</i> | <i>0,125 g/l</i> |
| <i>FeCl₃</i> | <i>0,0025 g/l</i> |
| <i>MnSO₄</i> | <i>0,0025 g/l</i> |
| <i>Brómkrezolzöld</i> | <i>0,022 g/l</i> |
| <i>Bakteriológiai agar</i> | <i>15 g/l</i> |
| <i>*Vitamin oldat</i> | <i>1 ml/l</i> |

*- esetenként autoklávozás és 50 °C-ra való visszahűtés után adagolva

- VRBL (Violet Red Bile Lactose) agar: kólifformok kimutatására alkalmas szelektív táptalaj (Biokar Diagnostics - Solabia group, Franciaország)
- ALOA kromogén agar: *L. monocytogenes* kimutatására alkalmas, szelektív differenciáló táptalaj (Microgen Bioproducts Ltd., Egyesült Királyság)
- Chromocult® kólifform agar: kólifformok és *E. coli* kimutatására alkalmas szelektív differenciáló táptalaj (Merck KGaA, Németország)

3.4. Alkalmazott oldatok

- Nisztatin oldat:

Nisztatin *25 mg/ml*

Oldószer - DMSO

Csíramentesítés - szűrés 0,22 µm pórusátmérőjű szűrőn

- Vitamin oldat:

Folsav *0,002 g/l*

Biotin *0,002 g/l*

Ca-pantotenát *0,4 g/l*

Inozit *2 g/l*

Nikotinsav *0,4 g/l*

p-amino-benzoésav *0,2 mg/l*

Piridoxin HCl *0,4 mg/l*

Tiamin HCl *0,4 mg/l*

Riboflavin *0,2 mg/l*

Oldószer - desztillált víz

Csíramentesítés - szűrés 0,22 µm pórusátmérőjű szűrőn

- Tris-EDTA (TE) puffer [pH 8]:

Tris-HCl 10 mM

Na₂-EDTA 1 mM

Oldószer - desztillált víz

- 10x Tris-Bórsav-EDTA (TBE) puffer [pH 8]:

Tris base 108 g/l

Bórsav 55 g/l

Na₂-EDTA (0,5 M) 40 ml

Oldószer - desztillált víz

- Lizozim oldat:

Lizozim enzim (Sigma-Aldrich, USA) 3,5U/μl

Oldószer - Lizozim puffer

- Lizozim puffer [pH 8]:

Tris-HCl 50 mM

Na₂-EDTA 10 mM

Oldószer - desztillált víz

- Etídium-bromid törzsoldat:

Etídium-bromid (Carl Roth GmbH + Co., Németország) 10 mg/ml

Oldószer - 96%-os etanol és desztillált víz 1:1 arányú keveréke

- Fixáló oldat (növényi minták fixálásához): 4% (v/v) formaldehid 1x PBS pufferben oldatban

- 10x PBS puffer [pH 7,4]:

NaCl 80 g/l

KCl 2 g/l

Na₂HPO₄ 14,4 g/l

KH₂PO₄ 2,4 g/l

Oldószer - desztillált víz

- Formamid oldat: molekuláris biológiai minőségű, tisztasága $\geq 99,5\%$, (Sigma-Aldrich, USA)

- Formaldehid oldat: 35% (w/v) metanollal stabilizált (Acros Organics BVBA, Belgium)

3.5. Egyéb anyagok

- Agaróz gélek:

A szükséges mennyiségű agarózhoz (SeaKem, Lonza Rockland Inc., USA) hozzáadtam a megfelelő mennyiségű 0,5x TBE oldatot, majd teljes oldódásig tartó melegítést alkalmaztam és etidium-bromid hozzáadását követően tálcába öntöttem.

- Molekula méret markerek agaróz gélelektroforézishez:

→ DNA Molecular Weight Marker VI. - RAPD-PCR analízishez (F. Hoffmann–La Roche Ltd., Svájc)

→ 100 bázisos molekulalétra - PCR analízishez (New England Biolabs® Inc., USA)

- Futtató festék gélelektroforézishez (10 ml-re megadva):

Szacharóz 5 g

Na₂-EDTA (50 mM, pH 8) 1 ml

Brómfenolkék indikátor 10 mg

SDS (10%) 10 µl

Desztillált víz 10 ml-ig

- Csíráztató papír: 120 g/m² (Ko-Sza Papír Bt., Magyarország)

- DNS izoláló kit tiszta tenyészetekhez:

Master Pure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre Technologies Corp., USA)

- PCR termék tisztító kit:

PCR-Advanced™ PCR Clean Up System (Viogene BioTek Corp., Tajvan)

- PCR termék gélből való kivonására alkalmas kit:

Gel Advanced™ Gel Extraction System (Viogene BioTek Corp., Tajvan)

- Bakteriális DNS izoláló kit növényi szövetből történő kivonáshoz:

PowerSoil® Pro DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., USA)

- Fakulást gátló oldat fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz:

Citifluor AF1 (Citifluor Ltd., Egyesült Királyság)

3.6. Módszerek

3.6.1. Mintavétel és a feltehetően endofita baktériumok izolálása

A palántákból, növényekből és az ültetéshez használt magokból a mintavétel a **8. táblázatban** látható időpontokban történt felületi fertőtlenítést követően. A táblázatban a növények vegetációs szakasza és pontos kora is látható. Minden palántázáshoz használt magfajtából és paprika növényfajtából, illetve mindegyik növényi szervből (gyökér, szár, levél, termés) két párhuzamos mintavétel történt. A felületi fertőtlenítés és a baktériumok izolálása (a továbbiakban „izolátumok”) az alábbiak szerint valósult meg.

A magok és a növényi szervek (külön a gyökerek és külön a zöld szövetek) fertőtlenítésének menete:

- a. minta fertőtlenítése 70% etanolban, 1 percig tartó rázogatózás mellett,
- b. a minta fertőtlenítése nátrium-hipoklorit oldatban (3,4% nátrium-hipoklorit, 0,1% Tween 80) 10 percig tartó keverés/rázogatózás mellett,
- c. a minta újabb fertőtlenítése 70% etanolban 1 percig történő rázogatózás mellett,
- d. a minta öblítése steril csapvízzel, öt alkalommal.

A fertőtlenített magok aszeptikus körülmények közötti félbevágását, valamint a különböző növényi szervekből való kis darabok levágását követően a baktériumok tenyésztése 3 ml, nisztatinnal (0,1 g/l) kiegészített steril PGES táplevesben (PGESN) történt 25±1 °C-os kémcsőforgató készülékben (ROTOMIX Type 2114, MTA KUTESZ) 7 napig aerob körülmények között. A szaporodást mutató kémcsővekből egy kacsnyi került kiszélesztésre PGES táptalajokra, amelyekről a 25 °C-on 3 napig történő tenyésztést követően a különböző telepmorfológiát mutató telepek kerültek izolálásra. Az egyedi telepekből készített tiszta tenyészetek PGES ferde agarra kerültek átoltásra, amelyek tárolása a vizsgálatok megkezdéséig steril parafin olajjal lefedve 4 °C-on történt. Az izolátumok hosszú távú fenntartása 20% glicerint tartalmazó PGES levesben valósult meg -80 °C-on.

3.6.2. Az izolátumok fenotípusos jellemzése

Az izolátumok jellemzésére polifázikus megközelítést alkalmaztam, amely során minden vizsgálatot 24 órás, PGES agaron aerob körülmények között felszaporított tenyészetekkel

végeztem. A fenotípusos jellemzés során a makro-morfológiai tulajdonságok megfigyeléséhez a WL Nutrient (Atlas, 2010) és PGES agarokra kiszélesztett izolátumokat 25 °C-on 1-3 napig inkubáltam, majd értékeltem. A gyengén szaporodó izolátumok esetében a táptalajokat kiegészítettem vitaminoldattal is (lásd 3.3.), így ezek esetében PGESV és WLV táptalajokat alkalmaztam. A következő lépésben megvizsgáltam valamennyi izolátum szaporodási képességét kóliform szelektív VRBL agaron 37 °C-os 2 napig tartó inkubálást követően. A mikro-morfológiai jellemvonások vizsgálatához fénymikroszkópot és metilénkékes festést alkalmaztam, míg a Gram-pozitív izolátumok spórázási képességét fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltam (BH2-RFCA, Olympus), minimum 3 napos tenyészetből. A Gram-szerinti differenciálást a KOH oldatos sejtfal lízis módszerével végeztem (Carlone *et al.*, 1982). Az eredmények összehasonlítása előtt az izolátumokat a Gram-szerinti differenciálás alapján Gram-pozitív és Gram-negatív csoportba rendeztem. Ezt követően az eredményeket számszerűsítettem és a STATISTICA 10 (StatSoft Inc., USA) program klaszteranalízisének alkalmazásával összehasonlítottam. Az eredményként kapott fenogramokon az izolátumok egymáshoz viszonyított rokonsági kapcsolatai kerültek bemutatásra.

3.6.3. Általános molekuláris módszerek

A polimeráz láncreakciók során alkalmazott összes primer és primerpár a **2. táblázatban**, míg a specifikus PCR reakciók leírásai a **3. táblázatban** láthatóak.

2. táblázat. A munka során alkalmazott oligonukleotid primerek listája

| Alkalmazás | Primer | Primer szekvenciája 5' → 3' | Amplikon méret (bp) | Referenciák |
|---|----------------|---|---------------------|--|
| RAPD-PCR | M13 | GAGGGTGGNGGNTCT | változó | (Vassart <i>et al.</i> , 1987) |
| | D8635 | GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC | változó | (Andrighetto <i>et al.</i> , 2001) |
| <i>Pseudomonas</i> nemzetség specifikus PCR | Ps-f Ps-r | ACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAC CCACTGGTGTTCCTTCTTATATC | kb. 450 | (Belák <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>rpoB</i> gén PCR <i>Pseudomonas</i> spp. esetében | Laps Laps27 | TGGCCGAGAACCAGTTCGCGT CGGCTTCGTCCAGCTTGTTTCAG | 1247 | (Ait Tayeb <i>et al.</i> , 2005) |
| 16S rRNS gén PCR bármely baktérium esetében | 27f 1492r | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TACGGYTACCTTGTTACGACTT | 1467 | (Edwards <i>et al.</i> , 1989; Eden <i>et al.</i> , 1991; Weisburg <i>et al.</i> , 1991) |
| 16S rRNS gén PCR bármely baktérium esetében | 1070f 1492r | TCAGCTCGTGTGTGARA TACGGYTACCTTGTTACGACTT | 448 | (Shakya <i>et al.</i> , 2013) (Edwards <i>et al.</i> , 1989; Eden <i>et al.</i> , 1991; |

| | | | | |
|--|--------------------|--|---|--------------------------------------|
| | | | | Weisburg <i>et al.</i> , 1991) |
| 27f/1492r-el amplifikált 16S rRNS gén teljes szekvenálásához használt primerek, bármely baktérium esetében | 519f | CAGCAGCCGCGGTAATAC | szekvencia és szekvenálás minőségétől függően 1200-1467 | (Nordentoft <i>et al.</i> , 2011) |
| | 926r | CCGTCAATTCCTTTGAGTTT | | |
| <i>C. hispalense</i> FPBSKK1specifikus PCR (célgén: 16S rRNS) | Chr22F Chr818R | TGCGTGTCTTGAGTGAGGTTGA TACGGTCACCGACTTCAGGTAC | 797 | Jelen dolgozatban tervezve |
| <i>P. sp.</i> HPBBIK3 specifikus PCR (célgén: 16S rRNS) | Pse393F Pse618R | GCCGTTGGGTACCTTGAGTA GCAGCACCTGTGTCTGAGTT | 226 | Jelen dolgozatban tervezve |
| <i>L. spp.</i> specifikus PCR, kivéve <i>L. grayi</i> (célgén: 16S rRNS) | 27f Lis659R | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG CACTCCAGTCTTCCAGTTTC | 659 | Lis659R jelen dolgozatban tervezve |
| <i>E. coli/ Shigella</i> specifikus PCR (célgén: 16S rRNS) | 27f Ec/Sh473R | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG AAAGGTATTAACCTTACTCCCT | 466 | Ec/Sh473R jelen dolgozatban tervezve |

A piros színnel jelölt nukleotid a degeneráltságot mutatja.

3. táblázat. A PCR reakciók során alkalmazott primerpárok, komponensek és reakció körülmények

| Primerpár | Reakciók körülményei | | | | | Reakciók komponensei | | | |
|----------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|----------------------|---------|---------|----------------|
| | Kezdő Denat. | Denat. | Prkötés | Lánch. | Végső lánch. | Mg. | dNTP | Pr. | Taq/ Puffer |
| Ps-f Ps-r | 95 °C/ 5 p | 25 ciklus | | | 72 °C/ 3 p | 0,7 mM | 0,1 mM | 0,25 µM | 0,6 U/ 1x |
| Laps Laps27 | | 35 ciklus | | | | | | | |
| 27f 1492r | 95 °C/ 4 p | 95 °C/ 30 mp | 65 °C/ 30 mp | 72 °C/ 30 mp | | | | | |
| | | 35 ciklus | | | 72 °C/ 1 p | | | | |
| | | 95 °C/ 30 mp | 58 °C/ 1 p | 72 °C/ 1 p | | | 0,25 µM | | |

Jelmagyarázat: **Kezdő Denat.** – kezdő denaturálás; **Denat.** – denaturálás; **Prkötés.** – primerkötődés; **Lánch.** – lánchosszabbítás; **Végső lánch.** – végső lánchosszabbítás; **Mg.** – MgCl₂; **dNTP** – dNTP; **Pr.** – primer mennyisége primerenként; **Taq** – Taq polimeráz (New England Biolabs® Inc., USA); **Puffer** – DNS polimeráz puffer (New England Biolabs® Inc., USA); p – perc; mp – másodperc.

Mindhárom esetben 50 ng templát DNS-t használtam és a keletkezett PCR termékek kimutatását gélelektroforézissel 1% agaróz gélben végeztem. A kapott amplikonok méretbeli összehasonlítása érdekében 100 bázispáros molekula méretmarkert alkalmaztam.

3.6.3.1. A baktérium izolátumok genomiális DNS-ének kivonása

A genomiális DNS kivonása során 24 órás, PGES agaron 25 °C-on felszaporított, steril desztillált vízzel átmosott tenyészetekkel dolgoztam a „Master Pure™ Complete DNA and RNA Purification Kit”-et felhasználva a gyártó által leírt protokoll szerint. A Gram-pozitív izolátumok esetében a protokollt kiegészítettem egy kezdő, lizozim enzimmel történő kezeléssel, amelynek során a sejteket 300 µl lizozim oldatban (lásd 3.4.) 37 °C-on, 1 órán át inkubáltam. A kivont DNS-t 30 µl steril TE pufferben oldottam fel és felhasználásig -20 °C-on tároltam.

3.6.3.2. Az izolátumok molekuláris tipizálása RAPD-PCR módszerrel

Az M13 (Vassart *et al.*, 1987) és a D8635 (Andrighetto *et al.*, 2001) RAPD primereket (lásd **2. táblázat**) a minták molekuláris tipizálásához alkalmaztam. A PCR reakció elegy (25 µl) a következőket tartalmazta: 1x DNS-polimeráz puffer (New England Biolabs® Inc., USA); 0,8 mM MgCl₂, 0,3 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 µM RAPD primer, 0,75 U *Taq* DNS polimeráz (New England Biolabs® Inc., USA) és 50 ng templát DNS. A PCR reakció körülményei a következők voltak: kezdő denaturálás 95 °C-on 5 percig, majd 35 cikluson keresztül: 95 °C 30 másodpercig, primerkötés 37 °C-on (M13) vagy 43 °C-on (D8635) 30 másodpercig, és lánchosszabbítás 72 °C-on 2 percig. A végső lánchosszabbítás 72 °C-on történt 5 percig. A felszaporítást követően keletkezett PCR termékek elválasztását és kimutatását gélelektroforézissel, 1,5%-os agaróz gélben végeztem. A kapott mintázatok összehasonlításának érdekében „DNA Molecular Weight Marker VI.” molekulalétrát is futtattam a gélen, és a kapott mintázatok összehasonlítása a GelCompar® II (Applied Maths NV, Belgium) szoftver segítségével történt.

3.6.3.3. A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó izolátumok detektálása

A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó izolátumok elkülönítését a *Pseudomonas* nemzetségre specifikus PCR alkalmazásával (Belák *et al.*, 2014) végeztem, amelynek során a **3. táblázatban** szereplő Ps-f/Ps-r primerpárt, az ahhoz tartozó reakció komponenseket és reakciókörülményeket használtam.

3.6.3.4. A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó izolátumok *rpoB* génjének felszaporítása

Az *rpoB* gén felszaporítását az *rpoB* gén PCR alkalmazásával végeztem, a **3. táblázatban** szereplő Laps/Laps27 primerpár, reakció komponensek és reakciókörülmények felhasználásával.

3.6.3.5. Az izolátumok 16S rRNS génjének felszaporítása

Az összes izolátum 16S rRNS-t kódoló rDNS génjét a 16S rRNS gén PCR alkalmazásával végeztem, amelynek során a **3. táblázatban** szereplő 27f/1492r primerpárt, reakció komponenseket és reakciókörülményeket használtam.

3.6.3.6. Az *rpoB* és a 16S rRNS gének szekvenálása

Mind az *rpoB* gén (1247 bp), mind a 16S rRNS gén (1467 bp) amplikonjait a PCR-Advanced™ Clean Up System nevű PCR termék tisztító kit segítségével tisztítottam meg. Az *rpoB* gén esetében az amplikonok szekvenálása egy irányból történt, a reverz (Laps27) primer alkalmazásával. Ugyanígy, a reverz (1492r) primer segítségével történt a 16S rRNS gén esetében is, azonban egyes esetekben két irányból is megtörtént a nukleotid sorrend meghatározása, belülről kifelé irányuló primerek alkalmazásával (519f és 926r primerekkel, **2. táblázat**). Ezen utóbbi módszerrel majdnem a teljes 16S rRNS gén szekvenciája leolvasható (amplikon és szekvenálás minőségétől függően 1200-1467 bp). Az elektroferogramok kiértékelésében, valamint a szekvenciák összerendezésében a MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) program volt segítségemre. A meghatározott bázissorrendű szekvenciákat az *rpoB* gén esetében a BLAST program segítségével (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) hasonlítottam, a „Nucleotide collection (nr/nt)” nevű adatbázisában lévő összes törzshöz, majd pedig csak a típus-törzsek szekvenciájához („Sequences from type material” opció bejelölésével). Ez azért volt fontos, hogy a GeneBank-ban típus-törzsként még nem deponált típus-törzseket is figyelembe vehessem. A 16S rRNS gén esetében viszont az EzTaxon server (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) adatbázisában lévő (Kim *et al.*, 2012), tenyészthető típus-törzsek szekvenciáival történt az összehasonlítás.

3.6.4. Filogenetikai vizsgálatok

Első lépésként a 16S rRNS gén nukleotid szekvenciákat a SILVA rRNS adatbázis honlapján (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) található SINA online illesztő program segítségével illesztettem (Pruesse *et al.*, 2012), majd a továbbiakban a MEGA6 program (Tamura *et al.*, 2013) segítségével dolgoztam. A nukleotid szekvenciák páronkénti távolságának meghatározásával azonosíthattam a megegyező szekvenciákat. Az azonos szekvenciákkal rendelkező törzsek KTE-eket alkottak, amelyekből egy-egy (a leghosszabb szekvenciával rendelkező) reprezentatív törzset választottam ki a további lépésekhez. Ezt követően a szekvencia-gyűjtemény mindkét végéről töröltem az adott végen legrövidebb szekvencián túli nukleotidokat, majd a szekvencia-gyűjteményhez legjobban illeszkedő nukleotid szubsztitúciós modellt választottam a MEGA6 program kalkulációja alapján. A kapott pontszámok alapján, a

legkisebb BIC (Bayesian Information Criterion) pontszámmal rendelkező szubsztitúciós modellt választottam, amely esetemben a Kimura 2-parameter + Gamma distribution + invariable (K2+G+I) modell volt. Következő lépésként ezen modell és a Maximum Likelihood statisztikai módszer (Felsenstein, 1981) alkalmazásával elkészítettem a filogenetikai törzsfát. A törzsfaszerkezeti megbízhatóságának elemzését az újra-mintavételezés (bootstrap) módszerével végeztem el, 200 ismétlést alkalmazva.

3.6.5. FISH próbák tervezése és számítógépes értékelése

A FISH technikához szükséges oligonukleotid próbák tervezése során elsősorban az ARB[®] 6.0.2 program csomag (Ludwig *et al.*, 2004) próba tervezési (Probe design) és illesztési (Probe match) eszközeit használtam. A próbákat a kiválasztott törzsek, valamint a munka során szekvenálásra került összes törzs 16S rRNS szekvenciája alapján, és az akkori SILVA adatbázisban (Quast *et al.*, 2013) szereplő összes 16S rRNS szekvencia figyelembe vételével terveztem.

4. táblázat. A munka során alkalmazott oligonukleotid próbák és fluoroforos jelölésük

| Cél mikroba/csoport (lefedettség) | Próba név (Referenciában szereplő név) | Próba szekvenciája 5' → 3' | Fluorofor jelölés 5' végen | Referenciák |
|---|--|--|----------------------------|-------------------------------|
| Baktériumok (90%) | EUB338 I | GCTGCCCTCCCGTAGGAGT | 6-FAM/Cy3 | (Amann <i>et al.</i> , 1990) |
| <i>Planctomycetales</i> (69%) | EUB338 II | GCAGCCACCCGTAGGTGT | 6-FAM/Cy3 | (Daims <i>et al.</i> , 1999) |
| <i>Verrucomicrobiales</i> (93%) | EUB338 III | GCTGCCACCCGTAGGTGT | 6-FAM/Cy3 | (Daims <i>et al.</i> , 1999) |
| A legtöbb baktérium (általános próba mix) | EUB mix | EUB338 I, EUB338II és EUB338 III próbák ekvimoláris keveréke | 6-FAM/Cy3 | (Bathe és Hausner, 2006) |
| <i>L. spp.</i> , kivéve <i>L. grayi</i> | Lis-637 | CACTCCAGTCTTCCAGTTTCC | 6-FAM | (Schmid <i>et al.</i> , 2003) |
| <i>L. versengő</i> | Lis-comp | CACTCCAGTCTCCAGTTTCC | nincs jelölés | Jelen munka során tervezve |
| <i>E. coli/Shigella</i> | Ec/Sh_453 (ECOLI) | GCAAAGGTATTAACCTTTACTCCC | 6-FAM | (Jansen <i>et al.</i> , 2000) |
| <i>C. hispalense</i> FPBSKK1 | Chryseo_643 | TCAACCTCACTCAAGACACGCA | Cy3 | Jelen munka során tervezve |
| <i>P. sp.</i> HPBBIK3 | Pseudo_828 | GTACTCAAGGTACCCAACGGC | Cy3 | Jelen munka során tervezve |

Jelmagyarázat: Cy3 – Cyber 3; 6-FAM vagy 6-karboxifluorescein (FLUOS).

A potenciálisan új próbák specifikusságát a probeCheck webservice-en is leellenőriztem (Loy *et al.*, 2008), valamint gyakorlati alkalmazhatóságukat (hibridizációs hatékonyságukat, a Gibbs szabad energiájukban bekövetkező változását és a formamid görbéjüket) a mathFISH (Yilmaz *et al.*, 2011) webes eszközzel értékeltem (<http://mathfish.cee.wisc.edu/>). Az adott körülmények között optimálisnak bizonyult új próbák és valamennyi, a vizsgálatok során használt, mások által tervezett oligonukleotidok szekvenciája a **4. táblázatban** látható.

3.6.6. A FISH lépései, új próbák gyakorlati értékelése és specifikusságuk vizsgálata

3.6.6.1. A FISH lépései és a mikroszkópos vizsgálatra való előkészítés

A FISH lépései munkám során mindig a következők voltak:

- 1) minta előkészítés;
- 2) minta szárítása áramló levegőn vagy 46 °C-os hűtő-fűtő termosztátban;
- 3) minta dehidratálása a tárgylemezek 50%, 80%, majd 96%-os etanolba merítésével, egyenként 3 percig mindegyik oldatban;
- 4) szárítás 46 °C-os hűtő-fűtő termosztátban vagy szobahőmérsékleten;
- 5) 1 ml hibridizációs puffer oldat összemérése az **5. táblázat** alapján;
- 6) a próbák kiolvasztása sötétben és felhasználásig jégen való tárolása;
- 7) 1:10 arányban az oligonukleotid próba munkaoldat és az adott hibridizációs puffer összekeverése, majd a tárgylemezen lévő mintára való felvitele;
- 8) egy kisebb darab labor papírtörülő 50 ml-es centrifugacsőbe való elhelyezése és a maradék hibridizációs puffer ráöntése;
- 9) a tárgylemez vízszintes elhelyezése a centrifuga csőben, a cső lezárása és 46 °C-on, sötétben, vízszintes, stabil helyzetben való termosztatálása minimum 2 órán keresztül;
- 10) 50 ml lemosó puffer összemérése a **6. táblázat** alapján, majd előmelegítése 48 °C-ra vízfürdőben;
- 11) az inkubáció letelte után a tárgylemez lemosó-oldatba való helyezése és 48 °C-on való inkubálása 10-15 percig;
- 12) a tárgylemez 2-3 másodpercig jéghideg ddH₂O-ba való merítése, majd sűrített levegőn való gyors szárítása;
- 13) -20 °C-on való tárolás sötétben, a mikroszkópos vizsgálatához való előkészítésig;

14) a mikroszkópos vizsgálat előtt a mintákat gyorsan megszáritottam, Citifluor AF1 fakulást gátló oldatot cseppentetem a látómezőkre, majd fedőlemezzel lefedtem.

Mivel az alkalmazott két fluorofor festék jelintenzitása különbözik, ezért munkám során mindegyik hibridizációt a próbának megfelelő munkaoldattal végeztem az azonos jelintenzitás elérése érdekében. A Cy3-mal jelölt próbák esetében így 5 pM/μl, míg a 6-FAM-mal („6-karboxifluorescein” vagy „fluorescein”) jelölt próbáknál 8,3 pM/μl koncentrációjú munkaoldatot használtam.

5. táblázat. A különböző formamid koncentrációjú hibridizációs pufferek összetétele 1 ml-re vonatkoztatva

| FA koncentráció | 0% | 5% | 10% | 15% | 20% | 25% | 30% | 35% | 40% |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 5 M NaCl | 180 μl | 180 μl | 180 μl | 180 μl | 180 μl | 180 μl | 180 μl | 180 μl | 180 μl |
| 1 M Tris-HCl | 20 μl | 20 μl | 20 μl | 20 μl | 20 μl | 20 μl | 20 μl | 20 μl | 20 μl |
| dd H ₂ O | 799 μl | 749 μl | 699 μl | 649 μl | 599 μl | 549 μl | 499 μl | 449 μl | 399 μl |
| FA (100%) | - | 50 μl | 100 μl | 150 μl | 200 μl | 250 μl | 300 μl | 350 μl | 400 μl |
| 10% SDS | 1 μl | 1 μl | 1 μl | 1 μl | 1 μl | 1 μl | 1 μl | 1 μl | 1 μl |

Jelmagyarázat: FA – formamid

6. táblázat. A különböző lemosó-puffer oldatok összetétele. Az első sor a különböző formamid koncentrációjú hibridizációs puffernek megfelelő lemosó-puffert jelöli

| FA koncentrációhoz tartozó lemosó puffer | 0% | 5% | 10% | 15% | 20% | 25% | 30% | 35% | 40% |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 5 M NaCl | 9 ml | 6,3 ml | 4,5 ml | 3,18 ml | 2,15 ml | 1,49 ml | 1,02 ml | 0,7 ml | 0,46 ml |
| 1 M Tris-HCl | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| 0,5 M EDTA | - | - | - | - | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
| dd H ₂ O | 50 ml-ig | 50 ml-ig | 50 ml-ig | 50 ml-ig | 50 ml-ig | 50 ml-ig | 50 ml-ig | 50 ml-ig | 50 ml-ig |

Jelmagyarázat: FA – formamid

3.6.6.2. Az új oligonukleotid próbák gyakorlati értékelése

A két, újonnan tervezett oligonukleotid próba (Chryseo_643 és Pseudo_828) esetében az optimális hibridizáció körülményeit, vagyis azt a formamid koncentrációt kellett meghatároznom, ahol a legspecifikusabban kötődnek a cél baktérium 16S rRNS-einek meghatározott szakaszához. Az új próbák kötődését 10%, 20%, 30% és 40% (v/v) formamidot tartalmazó hibridizációs puffer alkalmazásával vizsgáltam meg, az előzetesen meghatározott formamid görbék alapján (lásd a 3.6.5. fejezetben). A versengő próba (Lis-comp) működőképességét is megvizsgáltam a *Listeria* nemzetségre specifikus (Lis-637) próbával

együttesen alkalmazva a Schmid és munkatársai (2003) által leírt optimális, 35% formamid koncentrációjú hibridizációs pufferben. A versengő próba használata azért indokolt, mert a Lis-637 próba több *Paenibacillus* és *Bacillus* nemzetségbe tartozó faj és egyéb, nem tenyészthető baktérium szekvenciájával is szinte teljes homológiát és nagy hibridizációs hajlandóságot mutatott. Az ebből fakadó esetleges téves pozitív jel kiküszöbölése érdekében az érintett nukleotid cseréjével és a fluoroforos jelölés elhagyásával olyan, úgynevezett „versengő” próbát sikerült tervezni, amely teljes homológiát és még nagyobb hibridizációs hajlandóságot mutatott az előbb említett szekvenciákkal (és mivel nem tartalmaz fluoroforos jelölést, így nem tud téves pozitív jelet adni). Az Ec/Sh_453 próba alkalmazhatósága is kipróbálásra került a mathFISH webes eszközzel kapott (lásd 3.6.5.), optimális 15% formamid koncentráción.

A próbák értékelését 24 órás *C. hispalense* FPBSKK1, *P. sp.* HPBBIK3, *L. monocytogenes* CCM 4699, *L. grayi* CCM 4029^T, *L. innocua* 1010 és *E. coli* ATCC 8739 törzsekkel végeztem, amelyeket PGES agaron, 25 °C-on tenyésztettem. A baktériumokból egy kacsnyit felszuszpendáltam 1 ml steril ddH₂O-ban, majd ebből pipettáztam 10 µl-t a tárgyilemez látómezőire. A 3.6.6.3. fejezettől eltekintve a mikroszkópos vizsgálatok az MTA, TTK, Enzimológia Intézetében lévő Zeiss LSM 710 típusú (Carl Zeiss AG, Németország) konfokális pásztázó lézermikroszkóppal valósultak meg. A formázásokat a ZEISS ZEN 2 lite (Carl Zeiss AG, Németország), ingyenes elérhető programmal készítettem.

3.6.6.3. Az új oligonukleotid próbák specifikusságának vizsgálata

Az előző alfejezetben megállapított optimális formamid koncentrációkat alkalmazva mindegyik próba specifikusságát megvizsgáltam a következő baktérium törzsekkel: *E. coli* ATCC 8739, *C. hispalense* FPBSKK1, *P. sp.* HPBBIK3, *L. monocytogenes* CCM 4699, *P. mendocina* CCM 3590^T és *P. fluorescens* CCM 2115^T. A baktériumtörzsek felszaporítása és a minta előkészítése az előző alfejezetben (3.6.6.2) leírtak alapján történt.

A mikroszkópos preparátumokat ebben az esetben a Bécsi Egyetem Mikrobiológiai és Ökoszisztéma-tudományi Tanszékén lévő Leica TCS SP8 X típusú (Leica Microsystems GmbH, Németország) konfokális pásztázó lézermikroszkóppal vizsgáltam, és az elkészült fényképeket a LAS AF Lite (Leica Microsystems GmbH, Németország) programmal formáztam.

3.6.7. Primerek tervezése, *in silico* és gyakorlati értékelése

Az oligonukleotid primerek tervezése a cél baktérium törzsek 16S rDNS szekvenciája alapján történt, azonban az összes KTE reprezentatív törzs és néhány, az adott nemzetséghez tartozó faj típus-törzsének szekvenciáját is figyelembe vettem annak érdekében, hogy specifikus primereket vagy primer párokat tervezhessek. A tervezést magam végeztem a szekvenciák specifikus/egyedi

és konzervatív régióinak keresésével, a szekvenciák illesztését követően. Ehhez a MEGA6 programot (Tamura *et al.*, 2013), valamint az illesztéshez a programon belül a ClustalW algoritmust használtam. Továbbá a specifikus oligonukleotid próbák által lefedett régiókat és a már létező primereket is felhasználtam annak érdekében, hogy alkalmazható, specifikus primerpárokat lehessen tervezni.

A potenciális primerek alkalmazhatóságát *in silico* is megvizsgáltam, ami egyrészt az olvadási hőmérsékletük, GC tartalmuk, a kettős szálú szerkezet (hajtú és homo, illetve hetero-dimer szerkezetek) kialakítására való hajlamosságuk vizsgálatából állt. Ezen vizsgálatokat az IDT SciTools (Owczarzy *et al.*, 2008) egyik online eszközével, az OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) végeztem. Másrészt a primerek specifikusságát is megpróbáltam leellenőrizni a teljesen vagy részben homológ szekvenciákra való rákereséssel, amiben a programban beépített BLAST funkció volt segítségemre. Ez a funkció gyakorlatilag az NCBI Nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) eszközt (Altschul *et al.*, 1990) használva keresi az említett szekvenciákat a Nucleotide collection (nr/nt) adatbázisból, a blastn algoritmus segítségével.

A primerpárok gyakorlati értékelése az optimális primerkötődési hőmérséklet vizsgálatával kezdődött, 45-68 °C közötti hőmérséklettartományban a 27f/1492r primerpár esetén alkalmazott PCR kondíciók (lásd **3. táblázat**, kivétel a primerkötési hőmérséklet) alkalmazásával, valamint a cél törzsek genomiális DNS-ének felhasználásával. A primerpárok (lásd **2. táblázat**) specifikusságát az optimális primerkötődési hőmérsékleten az alábbi törzsek DNS-ével ellenőriztem le: Chr22F/ Chr818R – *C. hispalense* FPBSKK1, *E. coli* ATCC 8739, *L. innocua* 1010, *P. sp.* HPBBIK3, *C. antarticum* F1445/3; Pse393F/ Pse618R – *P. sp.* HPBBIK3, *P. fluorescens* CCM 2115^T, *P. mendocina* CCM 3590^T, *E. coli* ATCC 8739, *L. innocua* 1010, *C. hispalense* FPBSKK1; 27f/ Lis659R – *L. innocua* 1010, *L. monocytogenes* CCM 4699, *L. grayi* CCM 4029^T, *P. sp.* HPBBIK3, *C. hispalense* FPBSKK1, *E. coli* ATCC 8739; 27f/ Ec/Sh 473R – *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* SE/2-2/I, *E. coli* SE/14-2/I, *E. coli* SE/4-2/II, *P. sp.* HPBBIK3, *C. hispalense* FPBSKK1, *L. innocua* 1010.

3.6.8. A baktérium izolátumok paprikamag csírázásra gyakorolt hatásának vizsgálata

Szuszpenziókat készítettem a baktériumok 24 órás, PGES agaron 25 °C-on inkubált tenyészeiből steril csapvíz felhasználásával. A Nanodrop 2000 típusú UV-Vis spektrofotométerrel (Thermo Fischer Scientific Inc., USA) 600 nm hullámhosszon történt mérések alapján (előzetesen készített kalibrációs görbe segítségével) a sejtkoncentrációt 10⁸

TKE/ml-re állítottam be, majd a sterilizált karboxi-metil-cellulóz (CMC) hozzáadását követően (végkoncentráció: 2 g/l) ötven darab, a 3.6.1-es alfejezetben leírtak alapján felületileg fertőtlenített paprikamagot adtam a szuszpenzióhoz. A kémcsöveket 25 ± 1 °C-on inkubáltam hat órán keresztül kémcsőforgatóval a baktériumok maghoz való tapadása érdekében (Niranjan Raj *et al.*, 2003). Az inkubálást követően a magokat lamináris fülkében szárítottam, majd a steril csapvízzel előre benedvesített, kétrétegű, 120 g/m^2 -es csíráztató papírba (MN 651/120; Macherey-Nagel, Németország) csomagoltam, és steril polietilén zacskókba helyeztem. A csíráztatás 25 °C-on történt 10 napon keresztül három párhuzamosban, majd meghatároztam a kicsírázott magok számát. A CMC-vel kiegészített steril csapvízben inkubált magokat használtam nem-fertőzött kontrollként (ISTA, 2003; Niranjan Raj *et al.*, 2003; Chandrashekhara *et al.*, 2007).

3.6.9. Palántanevelési kísérlet

A baktériumok növényi szövetekbe való bejuttatását a paprikamagok baktériumokkal való megfertőzésével a 3.6.8. fejezetben leírt módszer kiegészítésével szimuláltam. A paprikamagokat a Szent István Egyetem Kertésztudományi Karának Kísérleti Üzem és Tangazdaságából vásárolt, érett Kárpia paprikákból nyertük ki. A magokat 30 °C-on egy-két éjszakán át szárítottuk, majd felhasználásukig száraz, sötét, hűvös helyen tároltam őket. A vizsgálatok során öt különböző baktérium törzs (*C. hispalense* FPBSKK1 és *P. sp.* HPBBIK3 mint potenciális endofiták, és *L. innocua* 1010, *E. coli* ATCC 8739 és *L. monocytogenes* CCM 4699 mint patogén modellek és patogén) hatását vizsgáltam a palánták fejlődésére, és ennek mérésére két kontrollt (steril és nem steril kontrollt) is felhasználtam. Összesen 140 darab (7x20) magot használtam fel, amelyekből 120 (6x20) darab paprikamagot az öt baktériummal való fertőzéshez és a steril kontrollhoz a 3.6.1. fejezetben leírtak alapján felületileg fertőtlenítettem, míg a maradék 20 magot nem steril kontrollként használtam fel. A fertőtlenített magokból 100 darabot (5x20-at) a fent említett baktérium törzsekből készített szuszpenziókkal oltottam be külön-külön, míg a maradék 20 darabot steril kontrollként használtam fel. A magok csíráztatását a 3.6.8. fejezetben leírt módon végeztem azzal a különbséggel, hogy a csíráztató papírokat ebben az esetben $0,6 \text{ g/l}$ koncentrációjú, sterilre szűrt ($0,22 \text{ }\mu\text{m}$ pórusátmérőjű szűrőn) Ferticare™ I (Yara Hungária Kft., Magyarország) komplex műtrágyaoldattal itattam át. A nem-steril kontrollnak szánt 20 magot is hasonlóképpen csíráztattam a fertőtlenítéstől eltekintve. A csírázási idő leteltével mind a hét mintából (5 baktériummal beoltott és 2 kontroll) 9 darab két sziklevelű növényt választottam ki, és három részre osztva, három párhuzamot alkottam. Mindegyik párhuzamot egy sterilizált, kőzetgyapot kockát tartalmazó, celofánnal lefedett főzőpohárba ültettem át. A beültetett növények esetén a hézagok kitöltésére autoklávozott vermikulitot (jó víz

és levegőtartó, természetes eredetű szilikát-ásvány) használtam. Az ültetést követően a kőzetgyapot kockák teljes átnedvesedését a növények táplálása céljából Ferticare™ I (Yara Hungária Kft., Magyarország) műtrágya 1,2 g/l-es koncentrációjú, steril oldatával biztosítottam. A következő öntözéseket (körülbelül két-három hetenként) ugyanígy, ugyanezen műtrágya oldat 2,2 g/l-es, töményebb változatával végeztem. A palánták megfelelő fényellátását a Phytolite Agro Grow-Bloom HPS (400W) lámpa (PHT Trading SA, Svájc) használatával biztosítottam. A növények az első héten 8 órán, a második héten 9 órán, majd a hátralevő időben napi 10 órán át kaptak megfelelő fényellátást. A palántákat 35-40 napos növekedési stádiumig neveltem, majd ezután dogoztam fel őket.

3.6.9.1. A palánták feldolgozása, valamint tárolása a vizsgálatok megkezdéséig

Mindegyik mintából, mind a három párhuzamot (összesen 9 növényt) a 3.6.1. alfejezetben leírtak alapján felületileg fertőtlenítettem, majd a gyökeret a föld feletti hajtásról lemetszettem.

Első párhuzam feldolgozása: Ezen palántákat klasszikus tenyésztéses vizsgálatok céljából kisebb darabokra való (5-10 mm hosszúságú) kereszt és hosszanti irányú szeletelést követően azonnal kihelyeztem az előkészített táptalajok (a potenciálisan endofita törzsekkel beoltott, illetve kontroll palántákat PGESNV, míg a patogén és patogént modellezőket Chromocult® kóliform szelektív vagy ALOA *Listeria* szelektív kromogén táptalajok) felületére, külön a gyökér és külön a földfeletti zöld szöveteket.

Második párhuzam feldolgozása: Ezen palántákat PCR-alapú vizsgálatok céljából 15 ml-es steril centrifugacsövekben 1x PBS pufferben pépesítettem IKA Ultra Turrax® (IKA® - Werke GmbH & Co. KG, Németország) T25B típusú mechanikus homogenizátorral, majd -20 °C-on tároltam a vizsgálatok megkezdéséig. Külön pépesítettem a gyökér és a földfeletti zöld szöveteket. A minták között a homogenizátort a következő módon tisztítottam, fertőtlenítettem: öblítés steril csapvízzel, majd öblítés 70% etanolban, öblítés a 3.6.1. fejezetben leírt nátrium-hipoklorit oldatban, és végül kétszeri öblítés steril csapvízzel.

Harmadik párhuzam feldolgozása: A 10-15 mm hosszúságú darabokra szeletelt gyökeret, illetve hajtás részeket (külön-külön) 50 ml-es centrifuga csövekben lévő 10 ml 4 °C-os fixáló oldatba (lásd 3.4.) helyeztem, majd 4 °C-on inkubáltam egy éjszakán keresztül (Compant *et al.*, 2011). Következő lépésként leöntöttem a fixáló folyadékot és 1x PBS pufferrel háromszor átöblítettem minden mintát a felesleges formaldehid eltávolítása céljából. Végül 5 ml 1x PBS-t és 5 ml 96% etanolt adtam a mintákhoz, majd -20 °C-on tároltam a metszetkészítés elkezdéséig.

3.6.9.2. Potenciálisan endofita baktériumok kitenyésztése mesterségesen fertőzött palántákból, csoportosításuk és molekuláris analízisük

Potenciálisan endofita baktériumok izolálása és morfológiai csoportosítása: A *C. hispalense* FPBSKK1-gyel és a *P. sp.* HPBBIK3-mal beoltott, valamint a kontroll palántákat PGESNV agarra helyeztem és 25 °C-on inkubáltam 2-3 napig. Egy Petri-csészére egyfajta baktériumtörzssel fertőzött mintát vagy kontroll mintát helyeztem. A kifejlődött baktérium telepekből tiszta tenyészetet készítettem WLW nutrient agaron, vagy amennyiben az adott izolátum nem mutatott növekedést WLW-n, a tiszta tenyészet készítéshez PGESV tápagart alkalmaztam. A lemezek inkubálása 25 °C-on három napig történt. A telepmorfológiák összehasonlításával csoportokba rendeztem az izolált baktériumokat, majd mindegyik csoportból kiválasztottam egy reprezentatív izolátumot és a továbbiakban azzal dolgoztam. Ezen izolátumok, valamint a beoltáshoz használt törzsek szaporodását és telepmorfológiai jellemzőjét megvizsgáltam ALOA táptalajon is 37 °C-on 48 órás inkubálás mellett.

DNS kivonás és PCR-es vizsgálat: Az izolátumokból DNS-t vontam ki a 3.6.3.1-es fejezetben leírtak alapján. Ezen DNS-eket és a paprikamagok beoltásához használt potenciális endofita baktériumtörzsek (*C. hispalense* FPBSKK1, *P. sp.* HPBBIK3/ lásd 3.6.9) DNS-ét (mint pozitív kontrollok) megpróbáltam felszaporítani a 3.6.9.4-es alfejezetben szereplő Chr22F/Chr818R és Pse393F/Pse618R specifikus primerpárokkal az ott leírt protokollt követve. A megfelelő méretű PCR terméket adó izolátumok 16S rRNS génjét a 3.6.3.5-ös alfejezetben leírtak alapján szaporítottam fel, majd szekvenáltam meg a 3.6.3.6. fejezetben leírtak alapján a reverz primer alkalmazásával. Ezt követően a MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) program segítségével az izolátumok meghatározott nukleotid szekvenciáit összehasonlítottam a beoltáshoz használt törzsek 16S rRNS génszekvenciájával.

Molekuláris tipizálás: Ebben az esetben is az izoláltumokból és a beoltáshoz használt törzsekből származó genomiális DNS-t használtam fel a RAPD-PCR-es tipizáláshoz, amelynek során az M13 és a D8635 primereket alkalmaztam (a 3.6.3.2-ben leírt protokoll alapján). A kapott molekuláris ujjlenyomatok kombinált dendrogramba való rendezését a GelCompar® II (Applied Maths NV, Belgium) szoftver segítségével végeztem el.

3.6.9.3. Patogént modellező és patogén baktériumok kimutatása szelektív táptalajokon mesterségesen fertőzött palántákból

Az *E. coli* ATCC 8739-cel beoltott palántaszöveteket Chromocult® kóliform szelektív táptalajra, míg a *L. innocua* 1010-zel és *L. monocytogenes* CCM 4699-cel beoltott palántaszöveteket ALOA *Listeria* szelektív kromogén táptalajra helyeztem, majd 30 °C-on

inkubáltam őket 5 napig. Egy Petri-csészére egyfajta baktériumtörzssel beoltott mintát helyeztem. A Petri-csészék hat egyforma részre voltak felosztva, amelyből háromra a gyökérdarabokat és háromra a földfeletti hajtásokat helyeztem, így három párhuzamost képezve mindegyik mintából.

3.6.9.4. A palántából kivont DNS vizsgálata PCR módszerrel

A pépesített gyökerekből, valamint a földfeletti hajtásokból a baktérium DNS kivonását a PowerSoil[®] Pro DNA Isolation Kit segítségével a gyártó által leírt protokoll alkalmazásával végeztem.

A vizsgált mintákból a potenciális endofita, a patogént modellező és a patogén törzseket a megfelelő primerpárok alkalmazásával (lásd **2. táblázat**) mutattam ki. A PCR reakció körülményei megegyeztek a 3.6.3.5-ös alfejezetben leírtakkal, csupán a primerek és a primerkötési hőmérsékletek (68 °C minden primer esetében) változtak.

Azon minták, amelyek a *C. hispalense* FPBSKK1 törzsre specifikus primerpárral (Chr22F/Chr818R) megfelelő méretű (797 bp) PCR terméket adtak, szekvenálásra kerültek a reverz primerrel (Chr818R). Ezt követően a minták meghatározott nukleotid szekvenciáit összehasonlítottam a *C. hispalense* FPBSKK1 törzs 16S rRNS génszekvenciájával a MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) program segítségével. Végül az EzTaxon server (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) segítségével (Kim *et al.*, 2012) az adatbázisban szereplő szekvenciákkal is összevettem az eredményeket.

Azon minták, amelyek a *P. sp.* HPBBIK3 törzsre specifikus primerpárral (Pse393F/Pse618R) adtak megfelelő hosszúságú (226 bp) PCR terméket, tovább lettek vizsgálva a bakteriális rDNS-re specifikus 1070F (Shakya *et al.*, 2013) és 1492R (lásd **2. táblázat**) primerpárral. A PCR reakció körülményei megegyeztek a 3.6.3.5-ös alfejezetben leírtakkal, csupán a primerek és a primerkötési hőmérséklet (52 °C) változott. A gélelektroforézist követően a minták esetében kapott két amplikon közül a kisebbet (448 bp) a Gel Advanced[™] Gel Extraction System kittel megtisztítottam és szekvenáltattam. A szekvenálás itt is a reverz primerrel történt, majd a meghatározott szekvenciákat összehasonlítottam a *P. sp.* HPBBIK3 törzs 16S rRNS génszekvenciájával (MEGA6 program, Tamura és munkatársai (2013)), majd az EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) segítségével (Kim *et al.*, 2012) az adatbázisban szereplő szekvenciákkal is.

3.6.9.5. Baktériumok kimutatása növényi szövetekből FISH technikával

Minták előkészítése: A feldolgozott mintákat a Microm HM 505 NP típusú Cryostat Microtome (MICROM International GmbH, Németország) -23 °C-os légterében rögzítettem és ágyaztam be a Shandon™ Cryomatrix™ (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) beágyazó folyadék segítségével, majd a teljes fagyást követően 10-20 µm vastagságú metszeteket készítettem. A mintákból az első 30 metszetet nem használtam fel, hogy biztosan belső, érintetlen szöveteket vizsgáljak, majd ezt követően a megfelelő metszeteket 70% etanollal fertőtlenített tárgylemezre helyeztem és a FISH elkezdéséig -5 és -20 °C között tároltam.

7. táblázat. A palántanevelési kísérlet mintáihoz használt próbák, jelölésük és a hibridizáció körülményei általános és specifikus próbák egyidejű alkalmazása során

| Minta megnevezése | Általános próba: próbanév → jelölés | Specifikus próba: próbanév → jelölés | FA koncentráció (%) |
|---|--|---|------------------------|
| <i>C. hispalense</i> FPBSKK1 – gyel beoltott palánta | EUB mix → 6-FAM | Chryseo_643 → Cy3 | 25% |
| <i>P. sp.</i> HPBBIK3 – mal beoltott palánta | EUB mix → 6-FAM | Pseudo_828 → Cy3 | 30% |
| <i>L. innocua</i> 1010 – zel beoltott palánta | EUB mix → Cy3 | Lis-637 → 6-FAM Lis-comp → nincs | 35% |
| <i>L. monocytogenes</i> CCM 4699 – cel beoltott palánta | EUB mix → Cy3 | Lis-637 → 6-FAM Lis-comp → nincs | 35% |
| <i>E. coli</i> ATCC 8739 – cel beoltott palánta | EUB mix → Cy3 | Ec/sh_453 → 6-FAM | 15% |
| Steril kontroll palánta | EUB mix → 6-FAM | Chryseo_643 → Cy3 | 25% |
| | EUB mix → 6-FAM | Pseudo_828 → Cy3 | 30% |
| | EUB mix → Cy3 | Lis-637 → 6-FAM Lis-comp → nincs | 35% |
| | EUB mix → Cy3 | Ec/sh_453 → 6-FAM | 15% |
| Nem steril kontroll palánta | EUB mix → 6-FAM | Chryseo_643 → Cy3 | 25% |
| | EUB mix → 6-FAM | Pseudo_828 → Cy3 | 30% |
| | EUB mix → Cy3 | Lis-637 → 6-FAM Lis-comp → nincs | 35% |
| | EUB mix → Cy3 | Ec/sh_453 → 6-FAM | 15% |

A FISH lépései a 3.6.6.1-ben leírtak alapján történtek, míg a vizsgálatokhoz használt próbák, jelöléseik és a hibridizációs körülmények a **7. táblázatban** láthatók.

3.6.10. A kiválasztott endofita baktériumok patogén és patogént modellező baktériumokra gyakorolt hatásának vizsgálata

A vizsgálatok során a kiválasztott két endofita törzs (*C. hispalense* FPBSSK1 és *P. sp.* HPBBIK3) interakcióját vizsgáltam külön-külön egy humánpatogén törzs (*L. monocytogenes* CCM 4699), egy opportunista humánpatogén törzs (*E. coli* ATCC 8739) és egy nem patogén, csupán a patogén modelljeként használatos törzsszel (*L. innocua* 1010) szemben.

Törzsek felszaporítása és koncentrációjuk meghatározása: Mind az öt törzsből 24 órás, 25 °C-on termosztált tenyészeteket készítettem PGES agaron, majd 1x PBS pufferben 0,5-ös OD értékre állítottam a koncentrációjukat 600 nm-en, ami az előzetes kalibrációs görbék alapján $1-3 \times 10^8$ TKE/ml-nek felelt meg.

Az endofita baktériumokat a késői exponenciális/korai stationer szaporodási szakaszukban szerettem volna vizsgálni, ezért a szuszpenziókból beoltottam külön-külön egy-egy 50 ml-es, centrifugacsőben lévő 30 ml PGES levest úgy, hogy a baktériumok koncentrációja $1-3 \times 10^6$ TKE/ml legyen. Ezt követően a centrifuga csöveket az RTS-1 típusú valós idejű szaporodásmérő készülékbe (Biosan Ltd., Lettország) helyeztem, majd a következő paramétereket állítottam be: hőmérséklet 25 °C, OD mérése 15 percnként, keverési sebesség 2000 RPM és a keverés irányváltása 1 percnként. A baktériumokat a késői exponenciális vagy korai stationer szakaszig tenyésztettem, majd a szuszpenziókat két részre osztottam.

A kontakt baktérium inhibíciós vizsgálatokhoz 5 ml szuszpenziót mértem ki mindkét törzsből steril centrifugacsőbe, míg a lyukdiffúziós vizsgálatokhoz a 0,45 µm pórusátmérőjű szűrőn szűrt fermentleveket alkalmaztam.

3.6.10.1. Kontakt baktérium inhibíciós vizsgálatok

Masszív oltás: A patogént modellező (*L. innocua* 1010), a patogén (*L. monocytogenes* CCM 4699) és az opportunista patogén (*E. coli* ATCC 8739) törzsből $1-3 \times 10^4$ TKE/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettem. Mindegyikből 1 – 1 ml-t vittem fel négy PGES agarra, amelyeket négy különböző hőmérsékleten (20, 25, 30 és 37 °C) inkubáltam. A szuszpenziókat eloszlattam egyenletesen a táptalajok felületén, majd a felesleget lepipettáztam.

Endofita törzsek felcseppentése: Az 5 - 5 ml endofita baktérium szuszpenziót 14000 rpm-en 5 percig centrifugáltam, a felülúszót leöntöttem, majd a sejteket 5 - 5 ml 1x PBS pufferrel átmostam, és végül 0,5-ös OD értékig hígítottam 1x PBS pufferrel. A szuszpenziókból kétagú, decimális hígítással $1-3 \times 10^6$ TKE/ml koncentrációjú szuszpenziókat kaptam és ezekből cseppentettem három-három, 10 µl térfogatú cseppet a masszív oltással előkészített PGES

agarokra. A Petri-csészéket 20, 25, 30 és 37 °C-ra helyeztem, majd a szaporodásuk mértékétől függően 1-től 3 napig inkubáltam.

3.6.10.2. Lyukdiffúziós vizsgálatok

Masszív oltás és lyukasztás: Az előző alfejezetben leírtakkal megegyezően készítettem a masszív oltásokat, majd a lelángolt dugó fúróval mindegyik Petri-csészébe 3 darab 7 mm átmérőjű lyukat készítettem.

Endofita törzsekből készült felülúszók felvitele: A sterilre szűrt felülúszókból 100 – 100 µl-t pipettáztam a masszív oltással előkészített táptalajokban lévő lyukakba, majd egy éjszakára 4 °C-ra helyeztem a felülúszók agarba való bediffundálása érdekében. Másnap reggel a Petri-csészéket 20, 25, 30 és 37 °C-ra helyeztem, majd 1-től 3 napig inkubáltam.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Feltehetően endofita baktériumok izolálása

Munkám során két jól ismert és széles körben fogyasztott étkezési csemegepaprika fajta (Hó és Kárpia) magjaiból, valamint két, eltérő termesztési körülmények között (talajban és hidroponikusan) nevelt palántáiból és kifejlett növényeiből vettem mintákat annak érdekében, hogy minél teljesebb képet kapjak a vizsgált paprikákban élő és kitenyészthető endofita baktériumok biodiverzitásáról, megoszlásáról. A két paprikafajta főbb jellegzetességei az **M2.** mellékletben, míg a növények termesztési körülményei a **M3.** mellékletben olvashatók.

Összesen 170 darab feltehetően endofita baktériumot sikerült izolálnom. Az izolátumok jelölése, eredete és számszerűsített összegzése a **8. táblázatban** látható.

8. táblázat. A talaj és a hidroponikus termesztésű Hó és Kárpia paprikamagokból, palántákból és a kifejlett növények különböző szöveteiből izolált, feltételezhetően endofita baktériumok számszerű összegzése

| Jelölési Kód | Izolátumok száma | Növényi szervek | Fajta | Termesztési körülmény (Vetés* - Mintavételezés dátuma) | Vegetációs szakasz (Növény kora) |
|---------------|------------------|-----------------|--------|--|--|
| SHS1 | 1 | Mag | Hó | 2012.03.20. | Ültetéshez használt magok |
| SKS1 - 3/2 | 4 | | Kárpia | | |
| SEPRH1 - 5/1 | 5 | Gyökerek | Hó | Hidroponikus (2012.02.24 - 04.11.) | Palánták (Hidroponikus 47 napos, Talajkultúrás 51 napos) |
| SEPRH5/2 - 22 | 18 | | | | |
| SEPRH1K | 1 | | | | |
| SELH1 - 2 | 2 | Föld feletti | Kárpia | Hidroponikus (2012.02.24 - 04.11.) | Palánták (Hidroponikus 47 napos, Talajkultúrás 51 napos) |
| SELH4 - 8 | 5 | zöld szervek | | | |
| SEPRK1 - 27 | 27 | Gyökerek | Kárpia | Hidroponikus (2012.02.24 - 04.11.) | Palánták (Hidroponikus 47 napos, Talajkultúrás 51 napos) |
| SEPRK29 | 1 | | | | |
| SESRK1 - 14 | 14 | | | | |
| SESRK16 - 17 | 2 | Föld feletti | Kárpia | Hidroponikus (2012.02.24 - 04.11.) | Palánták (Hidroponikus 47 napos, Talajkultúrás 51 napos) |
| SESRK1K - 7K | 7 | | | | |
| SESK1 - 2 | 2 | zöld szövetek | Kárpia | Hidroponikus (2012.02.24 - 04.11.) | Palánták (Hidroponikus 47 napos, Talajkultúrás 51 napos) |
| SELK1 - 4 | 4 | | | | |
| SEFPRH7 - 13 | 7 | Gyökerek | Hó | Talajkultúrás (2012.03.20 - 05.10.) | Palánták (Hidroponikus 47 napos, Talajkultúrás 51 napos) |
| SEFPRH1V - 2V | 2 | | | | |
| SEFSRH1 | 1 | | | | |
| SEFSH1 - 2 | 2 | Föld feletti | Hó | Talajkultúrás (2012.03.20 - 05.10.) | Palánták (Hidroponikus 47 napos, Talajkultúrás 51 napos) |
| SEFSH4 - 5 | 2 | zöld szövetek | | | |

| | | | | | |
|-----------------|------------|---------------|--------|-------------------------------------|---|
| SEFSH7 | 1 | | | | |
| SEFLH1 - 4 | 4 | | | | |
| SEFPRK1 - 8 | 8 | Gyökerek | Kárpia | | |
| SEFPRK10 | 1 | | | | |
| SEFPRK12 - 18 | 7 | | | | |
| SEFSRK1 - 5 | 5 | | | | |
| SEFLK1 | 1 | Föld feletti | | | |
| SEFSK1 - 13 | 13 | zöld szövetek | | | |
| HPBBIH1 - 2 | 2 | Termés | Hó | Hidroponikus (2012.02.24 - 08.22.) | |
| HPBBIH4 | 1 | | | | |
| HPBBIH6 | 1 | | | | |
| HPBSKH1 - 2 | 2 | | | | |
| HPBBIK1 - 4 | 4 | Termés | Kárpia | | |
| FPBTIH1 | 1 | Termés | Hó | | Kifejlett növények (Hidroponikus 180 napos, Talajkultúrás 155 napos) |
| FPBBIH2 - 3 | 2 | | | | |
| FPBTIK1 | 1 | Termés | Kárpia | Talajkultúrás (2012.03.20 - 08.22.) | |
| FPBTIK1a | 1 | | | | |
| FPBTIK2 | 1 | | | | |
| FPBBIK1 - 2 | 2 | | | | |
| FPBBIK4 | 1 | | | | |
| FPBBIK6 | 1 | | | | |
| FPBSKK1 - 3 | 3 | | | | |
| Összesen | 170 | | | | |

Jelölési kód rövidítésének magyarázata: FPBSKK1-3 = FP-BSK-K-1, FP-BSK-K-2, FP-BSK-K-3; SHS1 = S-H-S-1; SKS1-3/2 = S-K-S-1, S-K-S-2, S-K-S-3/1, S-K-S-3/2

Jelölési kód magyarázata (balról jobbra haladva): SEF és FP – talajkultúrás, SE és HP – hidroponikus; PR – főgyökér, SR – mellégyökér, S – szár, L – levél, BBI – termés szivacsos állománya, BTI – termés hús, BSK – termés hús és héj; K – Kárpia fajtájú paprika, H – Hó fajtájú paprika; SHS1 – ültetéshez használt Hó fajta, SKS1 – ültetéshez használt Kárpia fajta paprikamag.

A táblázat alapján elmondható, hogy a magokból kevés izolátumot sikerült kinyerni (1 darabot a Hó és 4 darabot a Kárpia fajtából). Ezzel ellentétben a palántákból 142 izolátumot tenyésztett ki: 50 a Hó, míg 92 a Kárpia fajtából. A kifejlett növényekből szintén kevés baktériumot sikerült izolálni: 9 darabot a Hó és 14 darabot a Kárpia fajtából. Összességében tehát a paprika fajták tekintetében majdnem fele annyi izolátum (60) származott a Hó fajtából, mint a Kárpiából (110). A termesztési körülményeket és a paprika fejlettségét figyelembe véve megállapítható, hogy míg 88 izolátum származott a hidroponikus és 54 a talajban nevelt palántákból, addig a kifejlett növények esetében ez az arány fordított volt, mivel 10 izolátum származott a hidroponikus és 13

a talajkultúrás növényekből. Összességében tehát több izolátum került kitenyésztésre a hidroponikus (98), mint a talajkultúrás (67) termesztésű növényekből.

4.2. A potenciális endofita izolátumok fenotípusos jellemzése

Az izolátumok fenotípusos jellemvonásait a 3.6.2-es alfejezetben leírtak alapján vizsgáltam, és a részletes eredményeket az **M4.** mellékletben tüntettem fel. A makro-morfológiai tulajdonságok alapján történő differenciálásra a WL táptalaj sokkal alkalmasabbnak bizonyult, ezért a mellékletben a táblázat nagy terjedelme miatt főként ez az eredmény szerepel, csupán olyan esetekben tüntettem fel a PGES agaron mutatott jellemvonásokat, ahol az adott izolátum nem szaporodott WL táptalajon.

Az izolátumok vizsgált fenotípusos jellemvonásait a STATISTICA 10 nevű program alkalmazásával hasonlítottam össze (lásd 3.6.2-es alfejezet), amelynek eredményeképpen úgynevezett fenogramokat készítettem. A fenogramokon az azonos fenotípusos tulajdonságokat mutató izolátumok egy csoportba vagy klaszterba rendeződtek, és a csoportok rokonsági viszonya is leolvasható.

Az izolátumok nagy száma és a könnyebb kezelhetőség miatt külön fenogramot készítettem a Gram-pozitív és a Gram-negatív izolátumokból, amelyek a **M5.** mellékletben (a Gram-pozitív izolátumok fenogramja) és a **M6.** mellékletben (a Gram-negatívoké) láthatók. Ebben a felosztásban a 69 Gram-pozitív izolátum 56 klaszterbe, míg a 101 Gram-negatív baktérium 82 klaszterbe volt csoportosítható. A két vagy kettőnél több izolátumot tartalmazó klasztereknél - két Gram pozitív klaszter kivételével - egyfajta növényi szervből származtak a baktériumok, ami arra utal, hogy ezek az azonos klaszterbe tartozó izolátumok valószínűleg azonos törzsekhez tartoznak. A további vizsgálatokhoz mindegyik klaszterből egy reprezentatív izolátum került kiválasztásra a további vizsgálatba bevont izolátumok számának csökkentése érdekében. Az azonos izolátumok kiszűrése azért is fontos, hogy a teljes mikrobapopuláció kvantitatív diverzitásának eredményeit ne torzítsák el.

A vizsgált fenotípusos tulajdonságok alapján az izolátumok csoportokba rendezését követően a további vizsgálatokba vont baktériumok számát lényegesen lecsökkentettem (több mint 18%-kal). Ez azért volt lehetséges, mert feltételezhető, hogy a megegyező fenotípusos tulajdonsággal bíró izolátumok ugyanahhoz a törzshöz tartoznak, így minden csoportból egy reprezentatív izolátum kiválasztásával nem változnak meg a teljes mikrobapopuláció diverzitásáról levonható következtetések.

4.3. Az izolátumok tipizálása RAPD-PCR módszerrel

Az előzetes vizsgálatok alapján a két vizsgált primer közül az M13 miniszatellit bizonyult alkalmasabbnak a Gram-negatív izolátumok tipizálására. A Gram-pozitívok vizsgálatánál azonban sok esetben nem, vagy nagyon kevés amplikon keletkezett ezzel a primerrel a PCR során, ezért a Gram-pozitív izolátumok tipizálására a D8635-ös primert alkalmaztam. Ez az oligonukleotid azonban a Gram-negatív izolátumok tipizálására is használhatónak bizonyult. Annak ellenére, hogy a D8635 primer alkalmasabbnak bizonyult a Gram-pozitívok izolátumok tipizálására, megfigyelhető volt, hogy egyes Gram-pozitív izolátumok (SEFSK9, SKS3/1, SEFSK3, SEFSK4, SEFSK1, SKS3/2) esetében még így is kevés amplikon keletkezett.

Az eltérő primerekkel kapott mintázatokat, az úgynevezett „molekuláris ujjlenyomatokat” a GelCompar II szoftver segítségével hasonlósági csoportokba rendeztem, és az eredményeket az **M7.** és **M8.** mellékletben szemléltetem. Az 56 Gram-pozitív reprezentatív izolátum 45 klaszterbe, míg a 82 Gram-negatív baktérium 55 klaszterbe csoportosult, így a fenotípus alapján elkülönített összesen 138 reprezentatív izolátum 100 RAPD típusba volt sorolható.

Hasonlóképpen, mint a fenogramok értékelésénél, itt is megfigyelhető volt, hogy a kettőnél több izolátumot magába foglaló klaszterek majdnem mind ugyanolyan növényi szövetből származó izolátumokat foglaltak magukba, kivételekre csupán két-két példa volt a Gram-pozitív és Gram-negatív izolátumok dendrogramjain.

Itt is, mint az előző alfejezetben, valamennyi klaszterből egy reprezentatív izolátum lett kiválasztva a további vizsgálatokhoz, amelyek törzsnek tekinthetők.

Összegezve az eredményeket elmondható, hogy a fenotípusos csoportosítás alapján kiválasztott reprezentatív izolátumok tovább csoportosíthatók (tipizálhatók) törzs szinten a RAPD-PCR módszerrel, megjegyezve azonban, hogy a Gram-pozitívok vizsgálatához nem sikerült megfelelő amplikonszámú mintázatot adó (ideálisan alkalmazható) primert találnom. A Gram-pozitív, egyedi fenotípusú izolátumok száma több mint 19%-kal, míg a Gram-negatívoké ennél is nagyobb mértékben, több mint 32%-kal csökkent a genotipizálásnak köszönhetően. Így összesen 100 törzssel dolgoztam az identifikálási munkamenetben.

4.4. A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzsek detektálása

A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó izolátumok detektálására használt Ps-f és Ps-r nemzetség-specifikus PCR primerpárt (Belák *et al.*, 2014) a 3.6.3.3. alfejezetben leírtak alapján alkalmaztam. Mind az 55 Gram-negatív törzssel elvégeztem a PCR reakciót, és azon esetekben, ahol keletkezett a megközelítőleg 450 bázispár hosszúságú termék, az adott törzset a *Pseudomonas* nemzetségbe soroltam.

Az eredmények alapján 17 törzs (a vizsgált izolátumok 31%-a, **9. táblázat**) esetében keletkezett a megfelelő méretű PCR termék. Ezen izolátumok faji azonosítása az *rpoB* és a 16S rRNS gének nukleotid sorrendjének meghatározása alapján történt.

4.5. Az *rpoB* és a 16S rRNS gének PCR-es amplifikálása és szekvenálása

Az előző fejezetben detektált *Pseudomonas* törzsek *rpoB* génjének felszaporítása szekvenálás céljából a 3.6.3.4.-es alfejezetben leírtak alapján zajlottak, amelyek eredményeként mind a 17 törzs esetében sikerült felszaporítani a megfelelő hosszúságú DNS darabokat. A szekvenálás során kapott és az a NCBI adatbázisba bevitt génszekvencia adatok (reprezentatív törzsek esetében) a **M9.** mellékletben és a **9.**, illetve **10.** táblázatokban is megadott GBN alapján érhető el. A többi adat a törzsszámok és a génnev feltüntetésével az **M9.** mellékletben látható.

A 16S rRNS gén felszaporítását valamennyi törzs (45 Gram-pozitív és 55 Gram-negatív) esetében elvégeztem a 3.6.3.5-ös alfejezetben leírt protokoll alapján. A szekvenálás első lépésben részlegesen történt a reverz primerrel, majd azon esetekben, ahol ezen információk alapján nem volt lehetséges a pontos faj szintű azonosítás, a teljes gén szekvenálására is sor került. A szekvenálás során kapott és az a NCBI adatbázisba bevitt génszekvencia adatok (reprezentatív törzsek esetében) a **M9.** mellékletben és a **9.**, illetve **10.** táblázatokban is megadott GBN alapján érhető el. A többi adat a törzsszámok és a génnev feltüntetésével az **M9.** mellékletben látható.

Az *rpoB* gén felszaporítására azért került sor, mert a *Pseudomonas* nemzetség tagjainak faj szinten történő azonosításához a 16S rRNS gén önmagában nem nyújt elég információt. Ez azzal magyarázható, hogy a magas fokú konzervált 16S rRNS gén, a pszeudomonászok esetében viszonylag kisszámú informatív és ráadásul heterogén szekvencia résszel rendelkezik, ami gyakran nem teszi lehetővé a pontos filogenetikai hovatartozásuk megállapítását. Az *rpoB* gén szintén egy erősen konzervált háztartási gén, azonban jelentősebb diszkriminációs tulajdonságú, így ennek köszönhetően nagyobb filogenetikai felbontást tehet lehetővé (Ait Tayeb *et al.*, 2005). Azonban sok esetben nem elégséges csupán az *rpoB* gén vizsgálata mert, ahogy Bennisar és munkatársai (2010) és Mulet és munkatársai (2010) megállapításai is alátámasztják, egyre több más háztartási gén (mint pl. a *gyrB*, *rpoD*, stb.) és specifikus gén (mint például a katekol-1,2-dioxigenáz, *nosZ*) szekvencia információja is szükséges a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzsek pontos faji azonosításához.

Amint a **9. táblázatból** kiderül, azon törzsek faji azonosítása, amelyek a *Pseudomonas* nemzetségbe sorolhatók, nehéznek bizonyult, még annak ellenére is, hogy az *rpoB* génszekvenciákat is figyelembe vettem.

9. táblázat. A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzsek 16S rRNS és *rpoB*

génszekvenálás alapján kapott identifikálási eredmények az EzTaxon és NCBI adatbázis alapján

| Sz. | Törzs kód (16S rRNS gén - GBN/ <i>rpoB</i> gén - GBN) | Azonosítás 16S rRNS génszekvenciák alapján az EzTaxon adatbázist használva | | | Azonosítás <i>rpoB</i> génszekvenciák alapján az NCBI adatbázist használva | | |
|-----|---|---|----------|-----------|---|------------|-----------|
| | | Név (javasolt nemzetség/fajnév) | GBN | Has. % | Név (javasolt nemzetség/fajnév) | GBN | Has. % |
| 1. | SEFPRK8 (KU605699/ KX958158) | <i>Pseudomonas corrugata</i> ATCC 29736 ^T (<i>Pseudomonas corrugata</i>) | D84012 | 99,9 | <i>Pseudomonas corrugata</i> LMG 2172 ^T (<i>Pseudomonas corrugata</i>) | AJ717487.1 | 100 |
| 2. | SESK2 (KU605698/ KX958159) | <i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T (<i>Pseudomonas protegens</i>) | CP003190 | 100 | <i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T (<i>Pseudomonas protegens</i>) | CP003190.1 | 100 |
| 3. | SELH1 | <i>Pseudomonas grimontii</i> CFML 97-514 ^T (<i>Pseudomonas grimontii</i>) | AF268029 | 100 | <i>Pseudomonas grimontii</i> CIP 106645 ^T (<i>Pseudomonas grimontii</i>) | AJ717439.1 | 99 |
| 4. | SEPRK16 | | | 100 | | | 99 |
| 5. | SEPRK15 (KU605704/ KX958162) | | | 100 | | | 99 |
| 6. | SEPRH1K (KU605681/ KX958163) | <i>Pseudomonas extremorientalis</i> KMM 3447 (<i>Pseudomonas</i> sp.) | AF405328 | 100 | <i>Pseudomonas azotoformans</i> CIP 106744 ^T (<i>Pseudomonas sp.</i>) | AJ717458.1 | 97 |
| 7. | SEPRH2 | <i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 (<i>Pseudomonas</i> sp.) | AF468452 | 100 | <i>Pseudomonas prosekii</i> strain AN/28/1 (<i>Pseudomonas</i> sp.) | JN814370.1 | 96 |
| 8. | SEPRK29 (KU605700/ KX958165) | | | 100 | <i>Pseudomonas baetica</i> CECT 7720 ^T (<i>Pseudomonas</i> sp.) | HE800504.1 | 98 |
| 9. | HPBBIK3 (KU605701/ KX958166) | <i>Pseudomonas alcalophila</i> AL15-21 (<i>Pseudomonas sp.</i>) | AB030583 | 98,42 | <i>Pseudomonas mendocina</i> strain ATCC 25411 (<i>Pseudomonas</i> sp.) | KF029437.1 | 95 |
| 10. | SEPRH4 (KU605743/ KX958167) | <i>Pseudomonas soli</i> F- 279,208 ^T (<i>Pseudomonas sp.</i>) | HF930598 | 100 | <i>Pseudomonas alkylphenolia</i> KL28 (<i>Pseudomonas</i> sp.) | CP009048.1 | 94 |
| 11. | SEPRH1 | <i>Pseudomonas vranovens</i> CCM 7279 (<i>Pseudomonas sp.</i>) | AY970951 | 98,27 | <i>Pseudomonas alkylphenolia</i> KL28 (<i>Pseudomonas</i> sp.) | CP009048.1 | 95 |
| 12. | SEPRK6 (KU605705/ KX958169) | | | 99,02 | <i>Pseudomonas alkylphenolia</i> KL28 (<i>Pseudomonas</i> sp.) | | 93 |
| 13. | SEFPRK2 (KU605677/ KX958170) | <i>Pseudomonas cichorii</i> LMG 2162 ^T (<i>Pseudomonas sp.</i>) | Z76658 | 99,12 | <i>Pseudomonas alkylphenolia</i> KL28 (<i>Pseudomonas</i> sp.) | CP009048.1 | 94 |
| 14. | SEFPRK15 (KU605741/ KX958171) | <i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neourantiaca</i> CIP 109457 (<i>Pseudomonas</i> sp.) | EU391388 | 99,9 | <i>Pseudomonas chlororaphis</i> LMG 1245 ^T (<i>Pseudomonas</i> sp.) | AJ717426.1 | 95 |
| 15. | SEPRH18 | <i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 (<i>Pseudomonas</i> sp.) | AF468452 | 99,71 | <i>Pseudomonas vancouverensis</i> CIP 106707 ^T (<i>Pseudomonas sp.</i>) | AJ717473.1 | 96 |
| 16. | SEPRK23 (KU605702/ KX958173) | | | 99,8 | <i>Pseudomonas granadensis</i> F-278,770 ^T (<i>Pseudomonas</i> sp.) | HG764747.1 | 96 |
| 17. | SEPRK19 (KU605703/ KX958174) | <i>Pseudomonas hunanensis</i> LV (<i>Pseudomonas</i> sp.) | JX545210 | 100 | <i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164 (<i>Pseudomonas</i> sp.) | AP013070.1 | 97 |

Jelmagyarázat: GBN – GenBank accession number; Has. - Hasonlóság

Számszerűleg értékelve az eredményeket elmondható, hogy a kétféle génből (*rpoB* és 16S rRNS gén) származó szekvencia információk alapján csupán 5 esetben (9. táblázat első öt törzsére)

kaptam egybehangzó eredményt a 17 törzs közül. Ez azt jelenti, hogy ezen törzsek megközelítőleg 30%-a volt csak faj szinten azonosítható nagy biztonsággal. A pontos azonosítás kismértékű megvalósulásának egyik oka az, hogy csupán a 16S rRNS és *rpoB* génszekvenciák ismerete nem elégséges, további univerzális és specifikus gének szekvenciájának ismeretére is szükség lenne. Amennyiben több gén szekvencia adata is rendelkezésünkre állna, a *Pseudomonas*-ok azonosítására kifejlesztett PseudoMLSA (<http://www.uib.es/microbiologiaBD/Welcome.html>) adatbázisban meg lehetne kísérelni a faji azonosítást. Azonban még ha rendelkeznénk is a hiányzó szekvencia információkkal, valószínűleg akkor sem lenne lehetséges minden kérdéses törzset faj szinten pontosan azonosítani, mert a PseudoMLSA adatbázis nem rendelkezik az összes elfogadott, azonosított faj típusára vonatkozó génszekvencia információkkal. Végül pedig ezen törzsek között lehetnek új, még le nem írt fajba tartozók is, amelyek szintén magyarázhatják az adott törzsek sikertelen faj szintű azonosítását.

A felhasznált szekvencia adatok alapján, faj szinten nem azonosított törzsek esetében (**9. táblázat**) csak a *Pseudomonas* nemzetség van feltüntetve, mint javasolt nemzetség/fajnév. Továbbá, az rRNS génszekvenciák esetében, a szekvencia azonosító számok (GBN) az adott törzshöz legjobban hasonlósító típusú törzseket azonosítják, míg az *rpoB* génszekvenciák esetében az első három legjobban hasonlító típusú törzs valamelyikét. Ez azzal magyarázható, hogy egyes esetekben a 16S rRNS génszekvencia alapján legnagyobb hasonlóságot mutató típusú törzsnek nem volt fellelhető az *rpoB* génszekvenciája.

A faj szinten azonosított *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzsek közül érdemes megemlíteni a *P. grimontii* fajba tartozókat, amelyeket már leírtak, mint különböző felületileg fertőtlenített növényi szövetekből izolált potenciális endofita baktériumokat (Dalton *et al.*, 2004). A *P. corrugata* fajt olyan növénypatogénként írták le, amely egyébként más növénypatogén baktériumokkal és gombákkal szemben antagonista hatást mutatott (Catara, 2007), továbbá megemlítették, mint burgonya endofitát is, szintén kihangsúlyozva növénypatogén gombákkal szembeni antagonista hatását (Berg és Hallmann, 2006). A *P. protegens* faj CHA0^T törzse is antimikrobiális anyagokat (2,4-diacetil floroglucinol, pioluteorin) termelő rhizobaktériumként ismeretes, de endofita voltát is feltételezik (Hardoim *et al.*, 2012a).

A nem-*Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzsek azonosításának eredményei a **10. táblázatban** láthatók. Amint megfigyelhető, a törzsek csupán 57,83 %-át (a táblázat első 48 törzse a 83-ból) sikerült faj szinten is azonosítani. A felhasznált szekvencia adatok alapján, faj szinten nem azonosított törzsek esetében a táblázatban csak az adott nemzetség van feltüntetve, mint javasolt nemzetség/fajnév, mert ezen esetekben a törzsek vagy több faj típusú törzseivel is teljes/majdnem

teljes hasonlóságot mutattak vagy a típustörzsek szekvenciájától már akkora mértékű bázispár eltérést mutattak, hogy a faj szintű azonosság kérdéses vagy kizárt. Ez utóbbi esetekben az új, még le nem írt fajokról is szó lehet. Továbbá az is elmondható, hogy ezek a törzsek főként olyan nemzetségek (*Bacillus*, *Rhizobium*, *Microbacterium*) tagjai, amelyek nagyon gazdag faji diverzitással rendelkeznek, és azonosításukhoz nem elégségesek csupán a riboszómális RNS-t kódoló génszekvenciák meghatározása, hanem további fenotípusos, genotípusos vagy más egyéb jellemzők ismerete is szükséges (Logan, 2002; Young *et al.*, 2004; Daffonchio *et al.*, 2006; Evtushenko és Takeuchi, 2006).

A faj szinten azonosított nem-*Pseudomonas* törzsek között vannak olyanok, amelyeket korábban már leírtak, mint potenciális vagy valódi endofitát. Ilyenek például az antibakteriális aktivitással rendelkező *Staphylococcus warneri* és a *Pantoea vagans* (Smits *et al.*, 2010; de Oliveira Costa *et al.*, 2012) törzsek, amelyek közül a *S. warneri* warnericin és nukacin nevű bakteriocinek termelése révén fejti ki antibakteriális hatását (Sashihara *et al.*, 2000; Verdon *et al.*, 2008).

10. táblázat. A nem-*Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzsek azonosítása a 16S rRNS génszekvenálás alapján kapott azonosítási eredmények és az EzTaxon adatbázis alapján

| Sz. | Törzs kód (GBN) | Azonosítás 16S rRNS génszekvenciák alapján | | |
|-----|---------------------|---|--------------|--------|
| | | Név (javasolt nemzetség/fajnév) | GBN | Has. % |
| 1. | SESRK2 | <i>Brevibacillus centrosporus</i> DSM 8445 ^T (<i>Brevibacillus centrosporus</i>) | AB112719.1 | 100 |
| 2. | SESRK13 | | | 100 |
| 3. | SEPRK13 | | | 100 |
| 4. | SESRK14 (KU605727) | | | 100 |
| 5. | FPBSKK1 (KU605691) | <i>Chryseobacterium hispalense</i> DSM 25574 ^T (<i>Chryseobacterium hispalense</i>) | JARQ01000004 | 100 |
| 6. | FPBTIK2 (KU605718) | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>phaseoli</i> LPPA 982 ^T (<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>phaseoli</i>) | HE608962 | 99,93 |
| 7. | SESRK17 (KU605694) | <i>Cohnella ginsengisoli</i> GR21-5 (<i>Cohnella ginsengisoli</i>) | EF368010 | 100 |
| 8. | SEPRH20 (KU605673) | <i>Cupriavidus campinensis</i> WS2 (<i>Cupriavidus campinensis</i>) | AF312020 | 100 |
| 9. | FPBBIK4 | <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> LMG 3645 ^T (<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>) | AJ312209 | 100 |
| 10. | FPBBIK2 (KU605725) | | | 100 |
| 11. | SEPRK12 | <i>Delftia lacustris</i> 332 (<i>Delftia lacustris</i>) | EU888308 | 100 |
| 12. | SEFPRK12 (KU605675) | <i>Leclercia adecarboxylata</i> GTC 1267 (<i>Leclercia adecarboxylata</i>) | AB273740 | 100 |
| 13. | SEFPRK7 (KU605675) | | | 100 |
| 14. | SEFPRH10 (KU605675) | | | 100 |
| 15. | HPBBIH4 (KU605688) | <i>Enterobacter cancerogenus</i> LMG 2693 (<i>Enterobacter cancerogenus</i>) | Z96078 | 99,93 |
| 16. | SESRK7K | <i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 ^T (<i>Kocuria palustris</i>) | Y16263 | 100 |
| 17. | SESRK6K (KU605716) | | | 100 |
| 18. | SEFSRK2 (KU605708) | <i>Leifsonia lichenia</i> 2Sb (<i>Leifsonia lichenia</i>) | AB278552 | 99,93 |
| 19. | HPBSKH1 (KU605723) | <i>Leucobacter tardus</i> DSM 19811 ^T (<i>Leucobacter tardus</i>) | AM940158 | 100 |
| 20. | SELK5 (KU605726) | <i>Microbacterium esteraromaticum</i> DSM 8609 (<i>Microbacterium esteraromaticum</i>) | Y17231 | 99,87 |
| 21. | HPBBIK4 (KU605720) | <i>Microbacterium paraoxydans</i> CF36 (<i>Microbacterium paraoxydans</i>) | AJ491806 | 99,93 |
| 22. | FPBTIK1A (KU605765) | <i>Microbacterium testaceum</i> DSM 20166 (<i>Microbacterium testaceum</i>) | X77445 | 100 |
| 23. | FPBTIK1 | | | 100 |
| 24. | SESRK2K (KU605717) | <i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 (<i>Micrococcus yunnanensis</i>) | FJ214355 | 100 |
| 25. | SESRK1K | | | 100 |

| | | | | |
|-----|---------------------|--|--------------|-------|
| 26. | SESRK4K | | | 100 |
| 27. | SEFSK6 | | | 100 |
| 28. | SEFSRK4 (KU605679) | <i>Paenibacillus glycanilyticus</i> DS-1 (<i>Paenibacillus glycanilyticus</i>) | AB042938 | 99,73 |
| 29. | SEFSRK1 (KU605696) | <i>Paenibacillus taichungensis</i> BCRC 17757 (<i>Paenibacillus taichungensis</i>) | EU179327 | 99,84 |
| 30. | SEFSH4 (KU605721) | <i>Paenibacillus tundrae</i> A10b (<i>Paenibacillus tundrae</i>) | EU558284 | 100 |
| 31. | FPBBIH3 (KU605692) | <i>Pantoea brenneri</i> LMG 5343 (<i>Pantoea brenneri</i>) | EU216735 | 100 |
| 32. | FPBBIH2 (KU605690) | <i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 (<i>Pantoea vagans</i>) | EF688012 | 99,84 |
| 33. | SEFLH4 (KU605684) | <i>Rhizobium alamii</i> GBV016 ^T (<i>Rhizobium alamii</i>) | AM931436 | 100 |
| 34. | SEPRH21 (KU605687) | <i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358 (<i>Rhizobium radiobacter</i>) | AJ389904 | 100 |
| 35. | FPBSKK2 | | | 100 |
| 36. | FPBSKK3 | | | 100 |
| 37. | SELH5 | | | 100 |
| 38. | SEFPRK18 | | | 100 |
| 39. | SEFSK10 (KU605695) | <i>Rothia amarae</i> JCM 11375 (<i>Rothia amarae</i>) | AY043359 | 99,85 |
| 40. | SEFSK2 (KU605729) | <i>Rothia terrae</i> L-143 (<i>Rothia terrae</i>) | DQ822568 | 100 |
| 41. | SKS1 (KU605728) | <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) | L37605 | 100 |
| 42. | SEFSK12 (KU605709) | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 29970 (<i>Staphylococcus haemolyticus</i>) | L37600 | 100 |
| 43. | SKS3/2 | <i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 (<i>Staphylococcus warneri</i>) | L37603 | 100 |
| 44. | SELK3 (KU605724) | | | 100 |
| 45. | SEFSK7 | | | 100 |
| 46. | SESRK16 (KU605678) | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> DSM 14405 (<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>) | CP007597 | 100 |
| 47. | SEPRH6 | | | 100 |
| 48. | SEPRH11 | | | 100 |
| 49. | SEPRH9 (KU605682) | <i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232 (<i>Acidovorax</i> sp.) | AJ007013 | 97,57 |
| 50. | SEFLK1 (KU605719) | <i>Bacillus marisflavi</i> TF-11 (<i>Bacillus</i> sp.) | AF483624 | 100 |
| 51. | SESRK5 | <i>Bacillus frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T (<i>Bacillus</i> sp.) | AM747813 | 100 |
| 52. | SESRK8 (KU605763) | | | 100 |
| 53. | SESRK3 | | | 100 |
| 54. | SEPRH8 | | | 100 |
| 55. | SKS2 (KU605707) | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42 (<i>Bacillus</i> sp.) | CP000560 | 100 |
| 56. | SEFLH1 (KU605706) | <i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 (<i>Bacillus</i> sp.) | ABRX01000007 | 99,87 |
| 57. | SELK1 (KU605710) | <i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061 (<i>Bacillus</i> sp.) | ABRX01000007 | 99,88 |
| 58. | SEPRK24 | <i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 (<i>Bacillus</i> sp.) | EF114313 | 100 |
| 59. | SEPRK7 | | | 100 |
| 60. | SEPRK27 | | | 100 |
| 61. | SEPRH5/1 (KU605769) | | | 100 |
| 62. | FPBTIH1 (KU605683) | <i>Brevundimonas nasdae</i> GTC 1043 (<i>Brevundimonas</i> sp.) | AB071954 | 99,7 |
| 63. | SEFSH2 (KU605713) | <i>Curtobacterium herbarum</i> P 420/07 (<i>Curtobacterium</i> sp.) | AJ310413 | 99,31 |
| 64. | SEFSRH1 (KU605715) | <i>Deinococcus radiopugnans</i> ATCC 19172 ^T (<i>Deinococcus</i> sp.) | Y11334 | 99,56 |
| 65. | SEFPRK4 (KU605731) | <i>Enterobacter asburiae</i> JCM6051 (<i>Enterobacter</i> sp.) | AB004744 | 99,68 |
| 66. | SEFPRK16 (KU605674) | <i>Enterobacter cancerogenus</i> LMG 2693 (<i>Enterobacter</i> sp.) | Z96078 | 99,71 |
| 67. | SESRK10 (KU605714) | <i>Lysinibacillus composti</i> NCCP-36 (<i>Lysinibacillus</i> sp.) | AB547124 | 99,5 |
| 68. | SEFSH7 (KU605711) | <i>Microbacterium hydrothermale</i> 0704C9-2 (<i>Microbacterium</i> sp.) | HM222660 | 99,34 |
| 69. | SEFSH5 | | | 99,34 |
| 70. | SEFPRH9 | <i>Microbacterium phyllosphaerae</i> DSM 13468 (<i>Microbacterium</i> sp.) | AJ277840 | 99,49 |
| 71. | SELH2 | | | 99,49 |
| 72. | HPBSKH2 (KU605730) | | | 99,49 |
| 73. | FPBBIK6 (KU605689) | <i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188 (<i>Ochrobactrum</i> sp.) | CP000758 | 100 |
| 74. | SESRK5K (KU605685) | <i>Paenibacillus endophyticus</i> PECAE04 (<i>Paenibacillus</i> sp.) | KC447384 | 99,71 |
| 75. | SESRK1 (KU605697) | <i>Paenibacillus chondroitinus</i> DSMZ5051 ^T (<i>Paenibacillus</i> sp.) | D82064 | 99,61 |
| 76. | SEFSRK3 (KU605693) | <i>Rhizobium freirei</i> PRF 81 (<i>Rhizobium</i> sp.) | AQHN01000056 | 98,86 |
| 77. | SEFSRK5 (KU605712) | <i>Rhizobium tibeticum</i> CCBAU 85039 (<i>Rhizobium</i> sp.) | EU256404 | 99,39 |
| 78. | SEFPRH13 | <i>Rhizobium massiliae</i> 90A (<i>Rhizobium</i> sp.) | AF531767 | 99,69 |

| | | | | |
|-----|---------------------|--|--------------|-------|
| 79. | SEFPRH8 | | | 99,69 |
| 80. | HPBBIH6 | | | 99,69 |
| 81. | SEFPRH12 (KU605722) | | | 99,69 |
| 82. | SEPRK11 (KU605686) | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> MTCC 434 (<i>Stenotrophomonas</i> sp.) | JALV01000036 | 99,01 |
| 83. | SEPRK9 (KU605680) | <i>Stenotrophomonas terrae</i> R-32768 ^T (<i>Stenotrophomonas</i> sp.) | AM403589 | 99,18 |

Jelmagyarázat: GBN – GenBank accession number; Has. – Hasonlóság

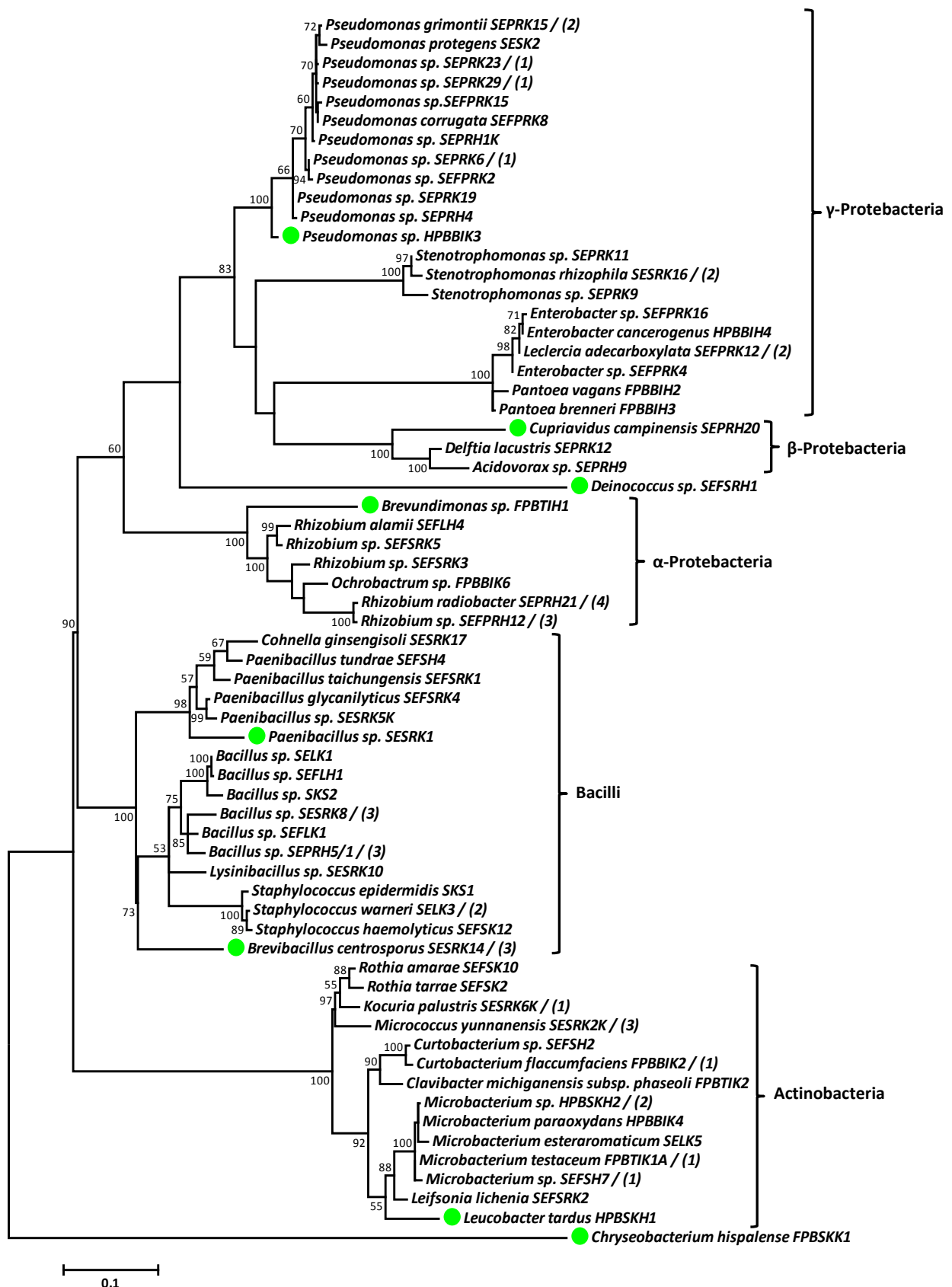
Érdekes módon a *P. vagans* C9-1 törzset már regisztrálták, mint BlightBan C9-1nevű biokontrol ágenszt (Nufarms America Inc., Burr Ridge, IL) (Smits *et al.*, 2010), holott csak 2013-ban írták le, mint endofita baktériumot (Sérgio Balbino Miguel *et al.*, 2013). Szintén fontos hatás az antifungális aktivitás, amivel a *Microbacterium testaceum* (Smits *et al.*, 2010; de Oliveira Costa *et al.*, 2012) törzsek is rendelkezhetnek. A fitohormonok (pl. indol-3-ecetsav, auxin) termelése révén kifejtett PGP (plant growth promotion) hatású *C. hispalense* (Montero-Calasanz *et al.*, 2013a; Montero-Calasanz *et al.*, 2013b) fajba tartozó törzset is sikerült izolálni, igaz endofita voltukat még eddig nem írták le.

Összegezve a molekuláris identifikálási eredményeket elmondható, hogy az általam vizsgált gének alapján, a 100 darab szekvenálásra került törzs több mint 50%-át (53 darabot) sikerült faj szinten is azonosítanom, a többit csak nemzetség szinten. Azonban ha csak a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó törzseket tekintjük, akkor ez az arány 29%-ra csökken. Esetemben tehát szekvenálással elsősorban a nemzetség szintű meghatározás volt lehetséges a pseudomonaszok esetében, illetve néhány további olyan izolátumnál, amelyek széles faji diverzitással rendelkeznek vagy esetlegesen még le nem írt fajok.

4.6. A filogenetikai vizsgálatok eredményei

A 100 darab törzs 16S rRNS génszekvenciáit összehasonlítottam a megegyező szekvenciák azonosítása céljából (lásd 3.6.4). Az azonos szekvenciák, vagyis az egy KTE-be (kezelhető taxonómiai egység) tartozó törzsek a **9. és 10. táblázatban** láthatóak, amely táblázatokban a további vizsgálatokra kiválasztott reprezentatív törzseket zöld háttérrel jelöltem. Összesen 64 darab különböző KTE-t sikerült azonosítani, köztük 12 *Pseudomonas* és 52 nem-*Pseudomonas* KTE-t. A 64 KTE reprezentatív törzs felhasználásával készített filogenetikai törzsfá segítségével analizáltam a törzsek rokonsági kapcsolatait és biodiverzitását.

A **10. ábrán** látható törzsfát a két fajta (Hó és Kárpia) és két termesztési körülmény között nevelt (hidroponikus és talajkultúrás) paprikákból származó összes KTE felhasználásával készítettem.



10. ábra. Az összes reprezentatív, feltételezett endofita törzs felhasználásával készült

filogenetikai törzsfá, amely 64 különböző KTE-be sorolja a törzseket

A törzsfán csak ≥ 50 bootstrap érték van feltüntetve. A per jel (/) után zárójelben lévő szám az adott KTE-hez tartozó más törzsek számát jelzi. A zöld körrel jelölt törzsek rokonsági szempontból a többitől távolabb állnak.

Kiemelendők az ábrán zöld körrel jelölt, KTE-ket képviselő törzsek (*P. sp.* HPBBIK3, *Cupriavidus campinensis* SEPRH20, *Deinococcus sp.* SEFSRH1, *Brevundimonas sp.* FPBTIH1, *Paenibacillus sp.* SESRK1, *Brevibacillus centrosporus* SESRK14, *Leucobacter tardus* HPBSKH1, *C. hispalense* FBBSKK1), amelyek rokonsági szempontból eléggé távol állnak a többi törzstől, és amelyek alapján lehetővé vált azon törzsek kiválasztása, amelyekre nagy valószínűséggel specifikus oligonukleotid próbák tervezhetők a FISH vizsgálatok kivitelezéséhez. Ez azzal indokolható, hogy ha egy adott törzs rokonsági szempontból kellően távol esik az összes olyan törzstől, amely már előfordult a vizsgált paprikákban, akkor feltehetően nagyobb valószínűséggel lehet rá specifikus FISH próbát tervezni. Ez az állítás abban az esetben helytálló, ha csak az általam izolált 64 reprezentatív baktérium törzs szekvenciáját veszem figyelembe, de szintén nagy az esély specifikus próbák tervezésére abban az esetben is, ha az átfogó SILVA adatbázis összes 16S rRNS szekvenciáját veszem figyelembe.

A paprikákból származó teljes, feltételezhetően endofita populációval kapcsolatos filogenetikai vizsgálatok (lásd **10. ábra**) alapján megállapítható a magas fokú diverzitás, amit a 100 törzs 64 KTE-be való tartozása támaszt alá. A KTE-k nagytöbbsége három nagyobb taxonómia egységbe, törzsbe sorolható, nevezetesen a Proteobacteria, Firmicutes és az Actinobacteria törzsekbe. Kivételt csupán a *C. hispalense* FPBSKK1 és a *Deinococcus sp.* SEFSRH1 képez, melyek a Bacteroidetes (Flavobacteriia osztálya) és a Deinococcus-Thermus (Deinococci osztálya) törzsekbe tartoznak.

A γ -Proteobacteria volt a legnépesebb osztály 21 KTE-vel (33%), amelyet a DNS-ben alacsony GC tartalmú Gram-pozitív Bacilli osztály (17 KTE, 27%) és a magas GC tartalmú Gram-pozitív Actinobacteria osztály (14 KTE, 22%) követ a sorban. Továbbá hét KTE (11%) tartozott az α -Proteobacteria, míg végül a legkisebb β -Proteobacteria osztály 3 KTE-vel (5%) képviseltette magát.

A KTE-k filogenetikai törzsfán való eloszlása alapján megállapítható, hogy a *Pseudomonas* KTE-k voltak a dominánsok (12 KTE, 19%) nem csak γ -Proteobacteria osztályban, hanem az összes osztály között. A γ -Proteobacteria osztály megmaradó fő klaszterje magába foglalja az *Enterobacter* és *Stenotrophomonas*-t (3-3 KTE-vel, 5-5%) valamint a három fenmaradó KTE, 2:1 arányban oszlik meg a *Pantoea* és a *Leclercia* között. A β -Proteobacteria osztály 1-1 *Delftia*, *Acidovorax* és *Cupriavidus* KTE-vel volt képviselve. Az 5 *Rhizobium* KTE a legnagyobb hányadát (71%-át) képviselte az α -Proteobacteria osztálynak, míg a fenmaradó 29% egy-egy *Brevimundimonas* és *Ochrobactrum* KTE-vel volt képviselve. A Bacilli osztály szinte teljes egészét három nemzetség teszi ki, nevezetesen a *Bacillus* (6 KTE, 9%), *Paenibacillus* (5 KTE, 8%) és a *Staphylococcus* (3 KTE, 5%). Végül pedig az Actinobacteria osztály volt a

legheterogénebb, mivel csak a *Microbacterium* (5 KTE, 8%), a *Curtobacterium* (2 KTE, 3%) és a *Rothia* nemzetségek képviselték magukat egynél több KTE-val.

4.7. A feltehetően endofita törzsek megoszlása a paprikákban

A két termesztési körülmény között nevelt, két paprikafajtából izolált 100 darab feltehetően endofita törzs izolálási helye, növényben való megoszlása és a rendszertani besorolása a **11. táblázatban** látható. Az izolálás különböző vegetációs szakaszban lévő növényekből (ültetéshez használt magok, palánták és kifejlett növények) és különböző növényi szervekből (magok, gyökerek, szárak, levelek és termések) történt.

Összehasonlítva a különböző vegetációs szakaszban lévő növényekből származó törzsek arányát elmondható, hogy a palántákból (gyökereiből és földfeletti zöld szerveiből) származott a legtöbb törzs (79), míg a kifejlett növények terméseiből csupán 18, valamint a növények ültetéséhez használt magokból még kevesebb, összesen 3 törzs származott. Részletesebben vizsgálva az izolátumok arányát, a termesztési körülmények tekintetében megállapítható, hogy összességében több törzs (54) származott a hidroponikus növényekből, mint a talajkultúrákból (43), ami még inkább igaz, ha a palántákra szűkítjük a kört (48 törzs a hidro- és 31 a talajkultúrák palántákból). Az előbbiekkal ellentétben, a termések esetében ez az arány fordított és még nagyobb mértékű (kétszer több talajkultúra, mint hidroponikus törzs) volt. Továbbá, összegezve a növényi szervekből származó törzseket, a legtöbb (61) - amint várható volt - a gyökerekből származott, míg a zöld szervek és a termések esetében kevesebb, mint a harmadát, 18-18 törzset, valamint a magokból a legkevesebbet (3) sikerült izolálni. Végül a termesztési fajtákat vizsgálva, összességében közel kétszer több (66) törzs származott a Kárpiából, mint a Hó fajtából (34). Ennél részletesebben is szemügyre véve megfigyelhető, hogy általában több törzset tenyésztettünk ki a Kárpiából, mint a Hóból, azonban a hidroponikus termésekből származó izolátumok kivételt képeznek ezalól.

A hidroponikus paprikák esetében a *Pseudomonas* (14) és a *Bacillus* (9) nemzetség, míg a talajkultúrák paprikáknál a *Rhizobium* (9) és a *Microbacterium* (5) nemzetség képviseltette magát a legnagyobb számban, azonban mind a négy nemzetség jelen volt mindkét termesztési körülmény esetében. Kisebb számban, de szintén jelen voltak mindkét termesztésű paprikában a *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus* és *Enterobacter* nemzetségekbe tartozó törzsek is. A kizárólag hidroponikus paprikákban előforduló nemzetségek a *Cupriavidus*, *Delftia*, *Acidovorax*, *Stenotrophomonas*, *Leucobacter*, *Kocuria*, *Cohnella*, *Brevibacillus* és *Lysinibacillus* voltak, míg a *Pantoea*, *Leclercia*, *Deinococcus*, *Brevundimonas*, *Ochrobactrum*, *Curtobacterium*, *Clavibacter* és *Leifsonia* nemzetségek tagjai csak talajkultúrák paprikákból voltak izolálhatók.

A Hó és Kárpia fajtákból származó törzsek nagy számban a *Pseudomonas* és *Rhizobium* nemzetségekből kerültek ki, továbbá a Hó fajta esetében a *Microbacterium*, míg Kárpiánál a *Bacillus* nemzetségbe tartozó törzsek fordultak elő nagyobb számban. Kisebb mennyiségben, azonban mindkét fajtából izolálható voltak a következő nemzetségek tagjai: *Enterobacter*, *Leclercia*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Curtobacterium*. Az egyedien előforduló nemzetségek tekintetében a Hó fajta esetében kevesebb (*Pantoea*, *Cupriavidus*, *Acidovorax*, *Deinococcus*, *Leucobacter*), míg a Kárpia esetében több (*Delftia*, *Brevundimonas*, *Ochrobactrum*, *Cohnella*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, *Rothia*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Clavibacter*, *Leifsonia*, *Staphylococcus*) nemzetséghez tartozó törzs volt izolálható.

Sok esetben tapasztalható volt, hogy egyes nemzetségekhez vagy fajokhoz tartozó törzseket főként vagy kizárólagosan a hidroponikus palánták gyökereiből (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Brevibacillus centrosporus*, *Micrococcus yunnanensis*, *Kocuria palustris*), míg másokat éppen ellenkezőleg, a talajkultúrákból (*Rhizobium* spp. és a *Leclercia adecarboxylata*) sikerült izolálni. Érdekesség képen megemlítendő, hogy Stock és munkatársai (2004), valamint Keren és munkatársai (2014) leírása és a DSMZ törzsgyűtemény osztályozása alapján is, ez utóbbi faj (*Leclercia adecarboxylata*) opportunista humánpatogén baktérium, amelyből három törzset (SEFPRK12, SEFPRK7, SEFPRH10) is sikerült izolálni. Visszatérve az eredeti gondolatmenethez elmondható, hogy volt olyan eset is, mikor mindkét rendszerben nevelt palánták gyökereiben előfordultak az adott fajok (*Peanaibacillus* spp.). A *Microbacterium*, *Rhizobium* nemzetség tagjai szinte mindenütt előfordultak, csupán a magokból nem sikerült kitenyészteni, nem úgy a *Bacillus* fajokat, amelyek a magokban is előfordultak, viszont a termésben már nem. A *Staphylococcus* fajok szintén jelen voltak a magokban és a palánták föld feletti zöld szerveiben. Itt szintén eltérve az eredeti gondolatviteltől, megemlíteném a magból származó *Staphylococcus epidermidis* SKS1, és a szárból származó *Staphylococcus haemolyticus* SEFSK12 törzseket, amelyek Otto (2009), Takeuchi és munkatársai (2005) leírása és a DSMZ törzsgyűtemény osztályozása alapján is opportunista humánpatogén fajok. Voltak olyan talajkultúrás paprikákból izolált fajok, amelyek csak a zöld szervekben (*Rothia* spp.), voltak olyanok, amelyek csak a termésekben (*Pantoea* spp.), és voltak olyanok, amelyek mindkét szervben (*Curtobacterium* spp.) előfordultak. Továbbá volt több egyedileg előforduló faj is (*Acidovorax* sp., *Brevundimonas* sp., *C. hispalense*, *Cupriavidus campinensis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *phaseoli*, *Cohnella ginsengisoli*, *Deinococcus* sp., *Delftia lacustris*, *Leucobacter tardus*, *Lysinibacillus* sp., *Ochrobactrum* sp.), amelyek a paprikák gyökereiből vagy terméseiből kerültek kitenyésztésre. A termés tekintetében pedig ami élelmiszerbiztonsági szempontból a legfontosabb, az *Enterobacter cancerogenus* (Abbott és Janda, 1997; Garazzino *et al.*, 2005) és a *Pantoea brenneri* opportunista humánpatogénként leírt fajokba (Brady *et al.*, 2010) tartozó törzseket (HPBBIH4 és FPBBIH3) is sikerült izolálni.

4.8. A különböző KTE-kbe tartozó, feltehetően endofita törzsek paprikamag csírázására gyakorolt hatása

Mint ahogyan a 2.4.1-es alfejezetben már említésre került, ahhoz hogy a valódi endofitákat megkülönböztethessem a feltételezett endofitáktól szükséges igazolnom vizuálisan a sejtek jelenlétét (kolonizációt) a belső növényi szövetekben. Azonban ezt a feltételt nehéz lett volna teljesítenem mind a 64 KTE-t reprezentáló törzsrre, ezért egy új módszert használtam a nem endofita (pl. a felületi fertőtlenítést túlélő vagy véletlen folytán internalizálódott) törzsek

kiszűrésére és egyben a csírázást direkt módon serkentő, mutualista endofita jellegek felderítésére. Ez a módszer azon az általánosan elfogadott endofita meghatározáson alapszik, amely szerint ezek nem lehetnek károsak a növényre és képesek mutualista kapcsolatban élni a növényvel.

Munkám során egy paprikamag csírázási tesztet használtam, amely az ISTA (2003); Niranjan Raj és munkatársai (2003); Chandrashekhara és munkatársai (2007) által már leírt, növényi növekedést serkentő hatás vizsgálat módszerén alapszik, azonban egyszerűsítéseket tartalmaz, és azt feltételezi, hogy csak azon paprikából izolált baktériumok tekinthetők feltételezett, kommenzalista vagy mutualista endofitáknak, amelyek nem gátolják a gazdanövény csírázását. Igaz nem törvényszerű, csupán feltételezés, hogy egy későbbi fejlődési fázisban, egy eltérő szövetben mutualista faj a csírázást is segítse, azonban ha gátolja azt, akkor valószínűleg nem mutualista endofita.

A vizsgálat során minden törzs szuszpenziójában 6 órán át inkubáltam a fertőtlenített magokat, ezt követően 10 napig hagytam csírázni azokat, majd a továbbiakban csupán azokat tekintettem vélhetően endofita baktérium törzseknek, amelyek a kontrollhoz képest minimálisan 90%-os paprikamag csírázási arányt indukáltak. Valamennyi törzs hatását három párhuzamban vizsgáltam, és a kapott eredményeket a **11. ábrán** szemléltettem. A baktériumok hatását a paprikamagok csírázására öt kategóriába soroltam. Azon törzsek, amelyek 70% alatti csírázást indukáltak, erősen gátlóknak, míg a 70-90%-os csírázást előidézőket enyhén gátlóknak tekintettem. A 90-110%-ban csírázást eredményező törzseket neutrális, míg az e felett teljesítőket gyengén stimulálóknak tekintettem. Csupán egy törzs indukálta a magok csírázását 130% felett, amelyet ezért az erősen stimuláló kategóriába soroltam. A **11. ábrán** megfigyelhető, hogy a törzsek 10,9%-a nagymértékben, míg 9,4%-a enyhén gátolta a magok csírázását. A törzsek többsége (közel 64,1%-a) a semleges kategóriába tartozik és hasonlóképpen a gátló törzsekhez, csak kevés számú törzs, mintegy 15,6%-uk volt képes lényeges stimulálásra.

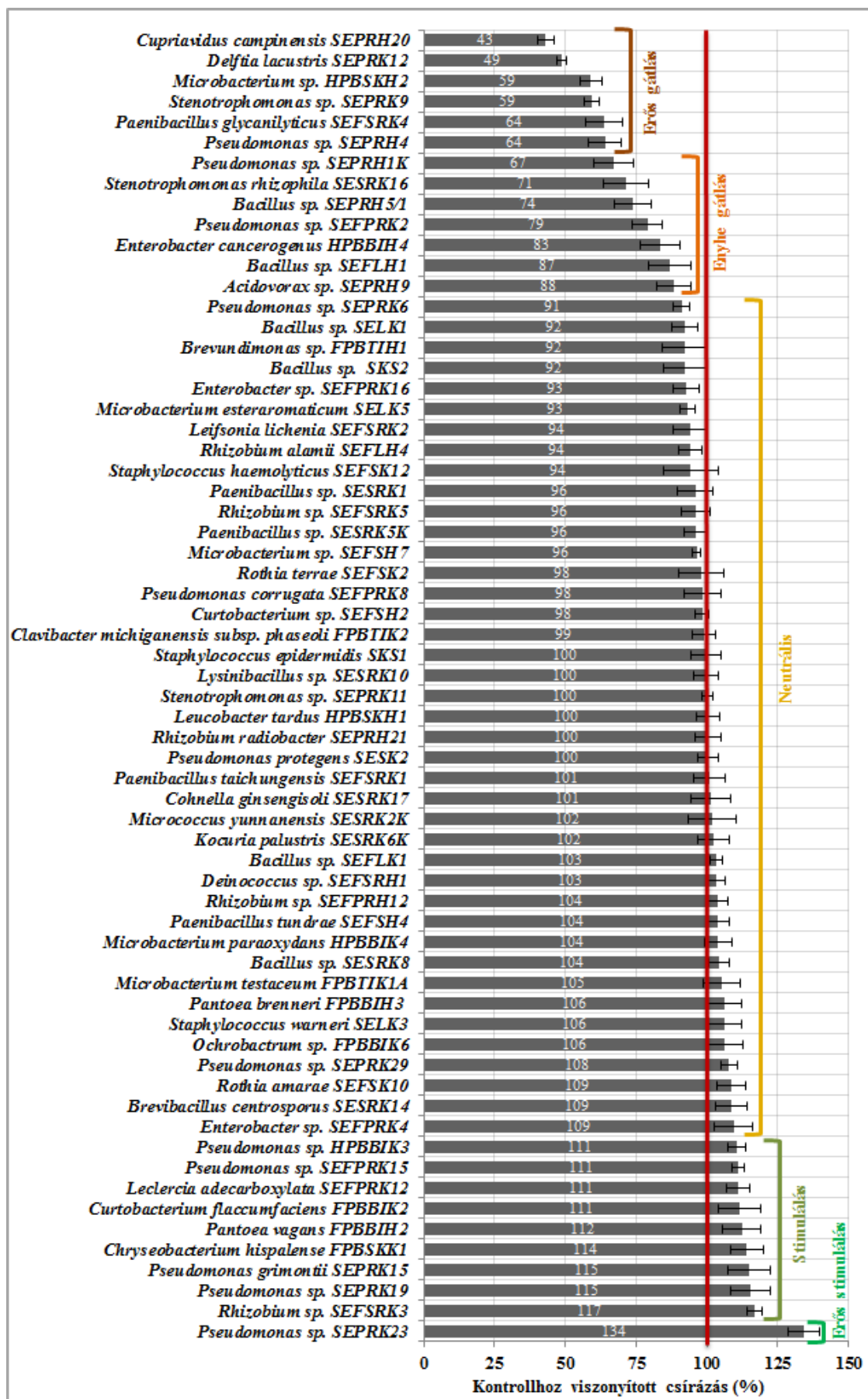
A mérések szórásából arra lehet következtetni, hogy a módszernek van egy kisebb mértékű bizonytalansága. A nagyszámú neutrális hatású törzs miatt felállítottam egy stimulációs határértéket, és a továbbiakban csak az ennek megfelelő törzsekkel dolgoztam tovább. Ebbe a csoportba csak a 110 %-nál nagyobb átlagos csírázást serkentő törzsek tartoznak. Ezen törzsek (10 darab) fele a *Pseudomonas*, a többi törzs a *Leclercia*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Chryseobacterium* és a *Rhizobium* nemzetségek tagjai. A legnagyobb serkentést elősegítő *Pseudomonas* sp. SEPRK23 törzset sajnos faji szinten nem sikerült azonosítanom.

Összevetve a serkentő hatású 10 törzset a filogenetikai vizsgálatok alapján a FISH vizsgálatokhoz alkalmazandó próbák tervezésére alkalmasnak tűnő 8 törzsszel (**10. ábra**), a

baktériumok száma két törzsre csökkent. Ezek egyike a *P. sp.* HPBBIK3, amelyet faji szinten nem sikerült azonosítanom, azonban a szakirodalomban több *Pseudomonas* faj is leírtak már endofitaként (Prieto és Mercado-Blanco, 2008; Andreote *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2012), ezért potenciális jelöltnek tekintetem. A másik, az FPBSKK1 jelölésű törzs *C. hispalense*-ként lett azonosítva, amely faj egyik törzsét leírták már növényi növekedést serkentő baktériumként (Montero-Calasanz *et al.*, 2013a), tehát az általam izolált törzs jó eséllyel lehet valódi endofita (életmódját tekintve pedig valószínűleg fakultatív endofita, mivel az NNSB-k többsége ilyen (Gaiero *et al.*, 2013). A továbbiakban – a filogenetikai kapcsolatoktól eltekintve – azonban mind a tíz törzset felhasználtam a FISH próbák tervezéséhez.

Összességében tehát sikerült egy olyan új módszert alkalmaznom, amellyel nagy valószínűséggel kizárhatók a felületi fertőtlenítést túlélő, jó eséllyel nem valódi endofita baktériumok.

A módszer eredményei alapján megfigyelhető, hogy a vizsgált törzsek nagy többsége (64,1% semleges + 15,6% stimuláló = 79,7%) nem gátolta, sőt egy részük serkentette (15,6%) a magok csírázását, tehát ezen izolátumok között valódi endofiták is lehetnek. A vizsgálati eredmények alapján a stimuláló hatású (min. 110%-os csírázás serkentésű) törzsek szelektálásával sikerült minimalizálnom a további vizsgálatokra szánt törzsek számát.



11. ábra. A 64 különböző KTE-be tartozó, vélhetően endofita törzs paprikamagok csírázására gyakorolt hatása

4.9. Oligonukleotid próbák tervezése és specifikusságuk vizsgálata

A csírázásra gyakorolt stimuláló hatásuk alapján kiválasztott, **11. ábrán** bemutatott 10 törzsrre próbáltam specifikus oligonukleotid próbákat tervezni, mert a FISH-CLSM technika (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - Confocal Laser Scanning Microscopy) alkalmazásával szerettem volna megvizsgálni, hogy a felületileg fertőtlenített magok inokulálását követően ezen törzsek képesek-e kolonizálni a növényi endoszfért és ott hosszú távon túlélni. A próbatervezés során a 10 törzs, valamint a munka során még szekvenálásra került 90 törzs és a SILVA adatbázisban (Quast *et al.*, 2013) lévő összes törzs 16S rRNS génszekvenciájának felhasználásával dolgoztam. Ennek eredményeképpen a 3.6.5. alfejezetben leírt *in silico* vizsgálatok alapján csupán a *P. sp.* HPBBIK3 és a *C. hispalense* FPBSSK1 törzsekre sikerült eléggé specifikus és a gyakorlatban is alkalmazhatónak tűnő próbákat tervezni. Ez a két törzs már az 4.6. és 4.8. alfejezetek eredményeit összevetve is a legalkalmasabbnak tűnt az oligonukleotid próbák tervezése szempontjából. A két tervezett próba a Pseudo_828 és a Chryseo_643 jelölést kapták, és szekvenciájuk, fluoroforos jelölésük a **4. táblázatban** látható.

Mivel a későbbi vizsgálatokban *E. coli*, *L. innocua* és *L. monocytogenes* törzsek növénybe való bejutását is szerettem volna megvizsgálni, ezért az irodalomban erre a három fajra már leírt próbákat vizsgáltam meg *in silico* analízissel. Az általam megvizsgált próbák közül az Ec/Sh_453 és a Lis-637 próbák (**4. táblázat**) bizonyultak a legalkalmasabbnak, annak ellenére, hogy az *E. coli* kimutatására szánt Ec/Sh_453 próba az *Escherichia* nemzetség legtöbb tagján kívül a *Shigella* nemzetségbe tartozó több törzshöz is kiválóan kötődik, valamint a Lis-637-es próba a *L. grayi*-től eltekintve az összes *Listeria* fajhoz hibridizálhat. Ez utóbbi próba néhány esetben gyenge, hibás párosodás következtében bekötődhet olyan *Paenibacillus* és *Bacillus* nemzetségekbe tartozó törzsekhez is, amelyekhez hasonló törzseket én is izoláltam a paprikákból. A téves pozitív eredmények elkerülése céljából egy versengő próbát (Lis-comp néven, **3. táblázat**) is terveztem. A versengő próbák ismerve, hogy nincsenek jelölve fluoroforral vagy fluoroforokkal, és jobban kötődnek a kimutatni nem kívánt, azonban az adott jelölt próbával nagy hibridizációs hajlandóságot mutató mikroorganizmushoz, mint a kimutatni kívánt mikrobához, így csökkentik a téves detektálás lehetőségét.

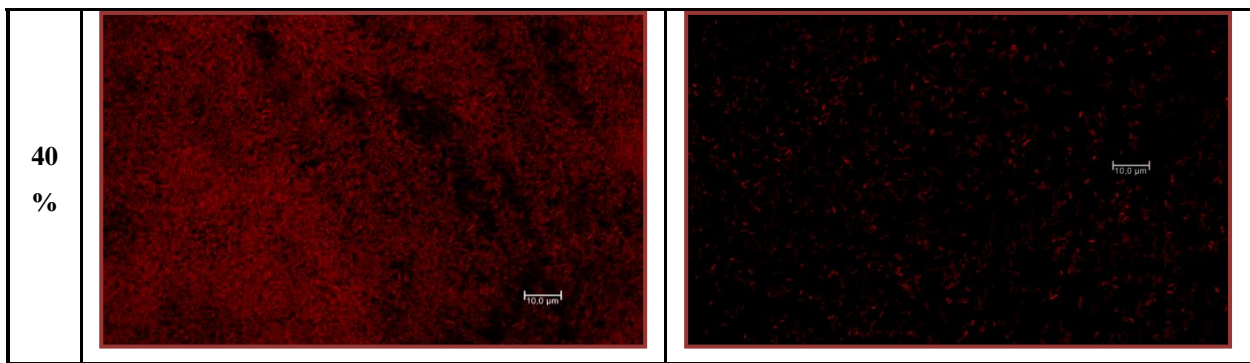
A mintákban esetlegesen jelenlévő más baktériumok kimutatásához az EUB mix elnevezésű (**4. táblázat**) általános baktérium próbakeveréket használtam különböző specifikus próbákkal egyidejűleg, a specifikus próbától eltérő fluoroforos jelöléssel. Mivel az EUB mix a legtöbb baktériumhoz kötődik, ezért a kimutatni kívánt baktériumokhoz is hibridizál, így a mikroszkópos detektálás során a specifikus próbával egyidejűleg detektálható és ennek okán a kimutatni kívánt baktérium sejtek egy harmadik (esetemben sárga) színnel jellemezhetők, míg az összes többi

piros vagy adott esetben zöld színben. Ez az úgynevezett kombinatorikus jelölés, amelynek elvére 2.7.2.1. alfejezet a **9. ábrája** szolgál sematikus magyarázattal.

4.9.1. Az oligonukleotid próbák alkalmazhatóságának értékelése

Az újonnan tervezett, fluoroforral jelölt próbák gyakorlati értékelése az optimális hibridizációs körülmények megállapításából állt tiszta baktériumtenyészetek felhasználásával. Az *in silico* vizsgálatok alapján mindkét próba a 20-30% formamidot tartalmazó hibridizációs pufferben kötődött a legszorosabban a cél baktériumokhoz, de mivel új próbákról volt szó, a gyakorlatban szélesebb tartományban vizsgáltam őket, konkrétan 10-40% formamidot tartalmazó pufferekben.

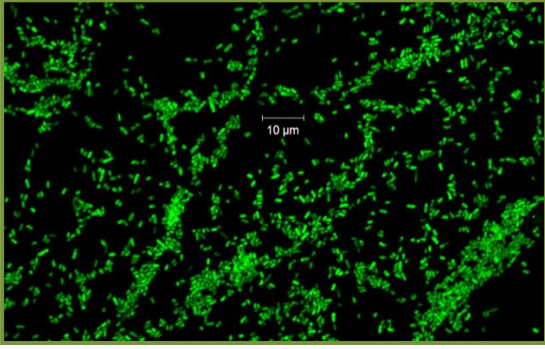
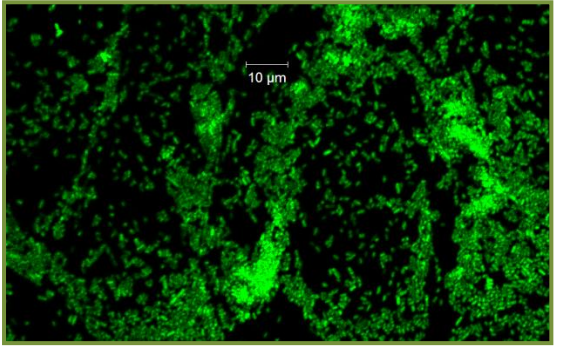
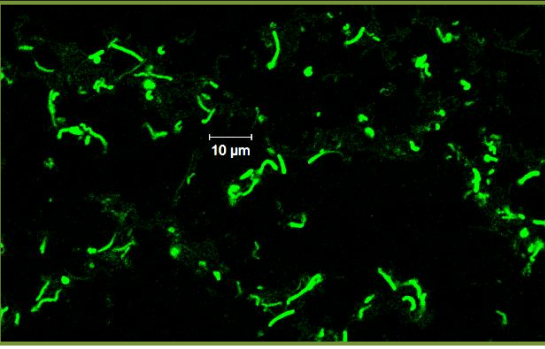
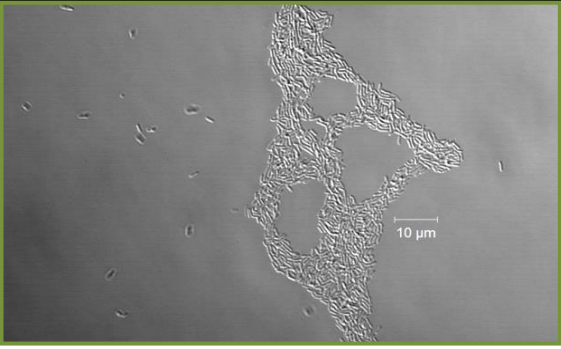
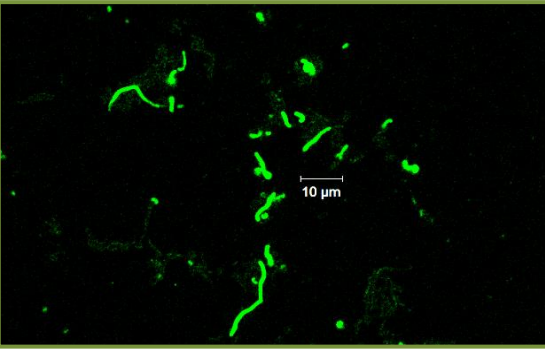
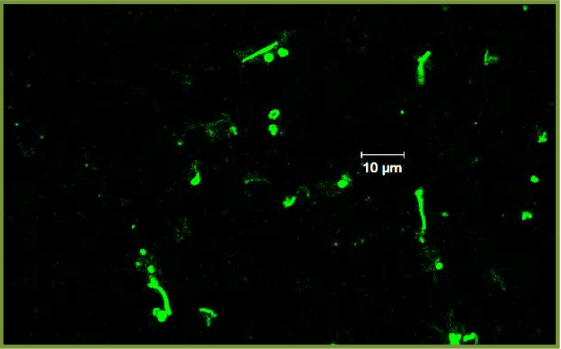
| FA | Mikroba: <i>P. sp.</i> HPBBIK3 Pseudo_828 → Cy3 | Mikroba: <i>C. hispalense</i> FPBSKK1 Chryseo_643 → Cy3 |
|------|--|--|
| 10 % | | |
| 20 % | | |
| 30 % | | |



12. ábra. A két újonnan tervezett oligonukleotid próbák (Pseudo_828 és Chryseo_643) jelintenzitásai különböző formamid koncentrációk alkalmazása esetén. Alkalmazott próbák leírása: próba neve → jelölése.

Az értékelésnél figyelembe kell venni, hogy a legjobb formamid koncentráció az a legmagasabb koncentráció, amelynél a kapott fluoreszcens jel még mindig elég erős a cél sejtek esetében, azonban lehetővé teszi a más, nem cél sejtektől való elkülönítést (Schmid *et al.*, 2003). A kapott eredmények a **12. ábrán** láthatók, amelyek alapján feltételeztem, hogy a Pseudo_828 próba 30%, míg a Chryseo_643 próba 25% formamid koncentráció mellett kötődik a legspecifikusabban a cél baktérium törzs sejtjeihez. Ezen feltételezésemet a későbbiekben specifikussági vizsgálatokkal próbáltam alátámasztani.

Az irodalomban már leírt próbák alkalmazhatóságát is ellenőriztem. Az Ec/Sh_453 próba optimális FA koncentrációjára nem találtam adatok az irodalomban, ezért *in silico* vizsgáltam meg a mathFISH webes eszközzel, amelynek eredményei alapján 15% FA koncentráció tűnt optimálisnak. Ezen FA koncentráción kipróbáltam a próbát az *E. coli* ATCC 8739 törzssel, amelyről a mikroszkópos felvételek a **13. ábrán** láthatók. A *Listeria* nemzetségre specifikus próba, valamint a versengő próba együttes alkalmazhatóságát is megvizsgáltam három *Listeria* törzsre (*L. monocytogenes* CCM 4699, *L. grayi* CCM4029^T, *L. innocua* 1010). Látható, hogy az irodalomban leírt körülmények között (35% FA) jól alkalmazhatók a próbák. Az is megfigyelhető, amit Schmid és munkatársai (2003) már leírt, hogy a *L. grayi* törzshöz nem kötődik a próba (**13. ábra**).

| | | |
|------|---|---|
| FA | Mikroba: <i>E. coli</i> ATCC 8739 Ec/Sh_453 → 6-FAM | |
| 15 % |  |  |
| FA | Mikroba: <i>L. monocytogenes</i> CCM 4699 Lis-637 → 6-FAM, Lis-comp → nincs jelölés | Mikroba: <i>L. grayi</i> CCM 4029^T Lis-637 → 6-FAM, Lis-comp → nincs jelölés |
| 35 % |  |  |
| FA | Mikroba: <i>L. innocua</i> 1010 Lis-637 → 6-FAM, Lis-comp → nincs jelölés | |
| 35 % |  |  |

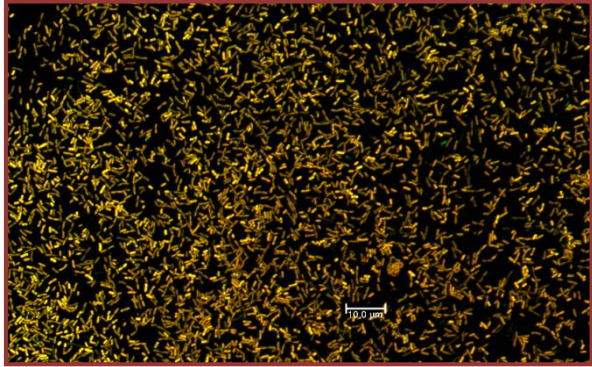
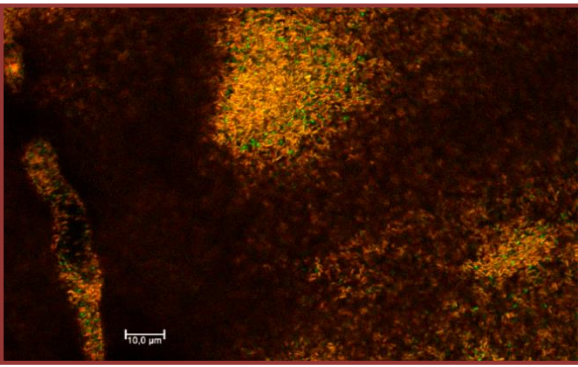
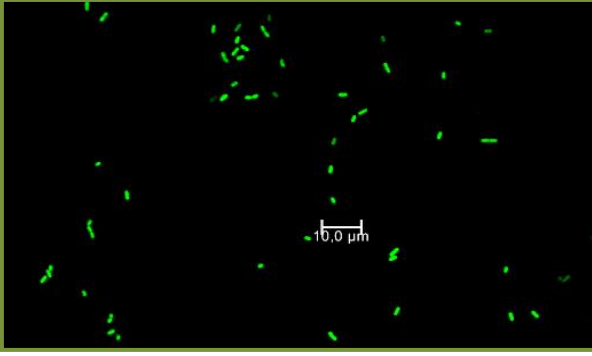
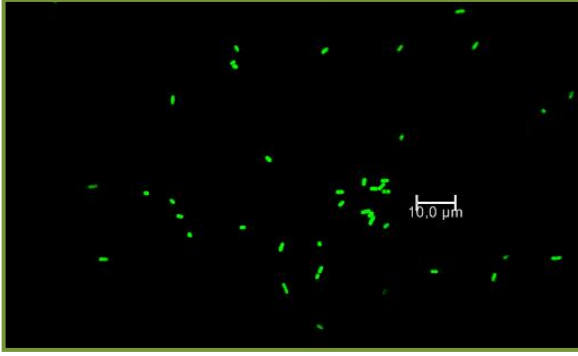
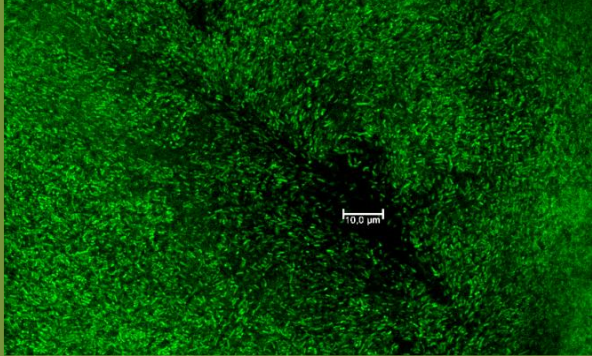
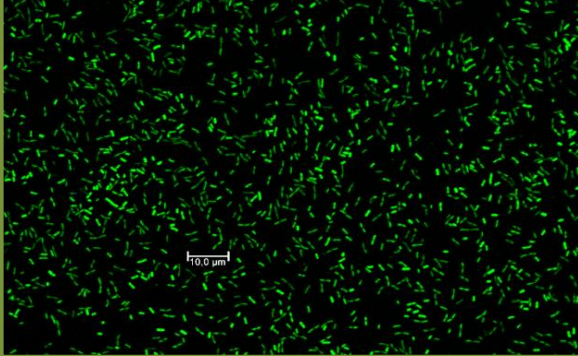
13. ábra. Az *Escherichia* és *Listeria* fajok kimutatására használt oligonukleotid próbák (Ec/Sh_453 és Lis-637, Lis-comp) gyakorlati értékelésének eredményei. Alkalmazott próbák leírása: próba neve → jelölése.

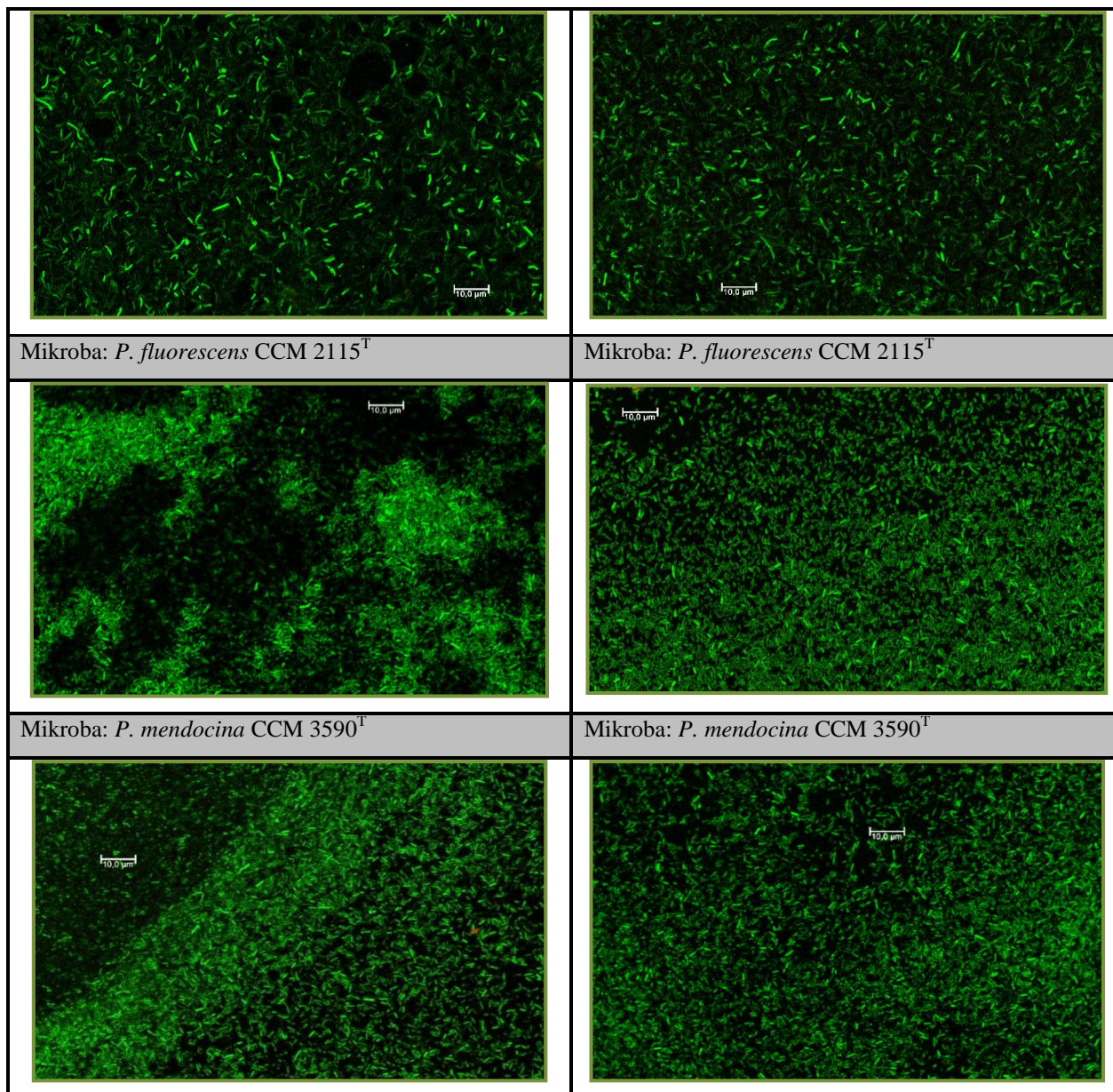
4.9.2. Az újonnan tervezett oligonukleotid próbák specifikusága

Az előző alfejezetben optimálisnak feltételezett FA koncentrációkon megvizsgáltam az új próbák specifikusságát több baktérium törzssel is. A vizsgált törzsek, az alkalmazott próbák, FA koncentrációk és a mikroszkópos fényképek a **14. ábrán** láthatóak. Az EUB mix próbakeverékre (az új próbáktól eltérő fluoroforos jelöléssel) azért volt szükség, hogy kimutathassam azon nem

célsejtek, amelyekhez az új próbák nem kötődnek. Ahol viszont mindkét próba kötődni tudott, sárga színben tudtam detektálni a cél baktérium sejteket.

Amint megfigyelhető a **14. ábrán**, a *C. hispalense* FPBSKK1 és a *P. sp.* HPBBIK3 törzshöz mindkét próba kötődött, viszont a többi törzshöz csak az EUB mix próbakeverékből kötődött az egyik próba, ezzel alátámasztva a két új próba specifikusságát a vizsgált hibridizációs körülmények között és a vizsgált törzsek esetében.

| | |
|---|---|
| <p>Chryseo_643 → Cy3, EUB mix → 6-FAM FA koncentráció: 25% Mikroba: <i>C. hispalense</i> FPBSKK1</p> | <p>Pseudo_828 → Cy3, EUB mix → 6-FAM FA koncentráció: 30% Mikroba: <i>P. sp.</i> HPBBIK3</p> |
|  |  |
| <p>Mikroba: <i>E. coli</i> ATCC 8739</p> | <p>Mikroba: <i>E. coli</i> ATCC 8739</p> |
|  |  |
| <p>Mikroba: <i>P. sp.</i> HPBBIK3</p> | <p>Mikroba: <i>C. hispalense</i> FPBSKK1</p> |
|  |  |
| <p>Mikroba: <i>L. monocytogenes</i> CCM 4699</p> | <p>Mikroba: <i>L. monocytogenes</i> CCM 4699</p> |



14. ábra. A Chryseo_643 és Pseudo_828 próbák specifikusságának vizsgálata. Alkalmazott próbák leírása: próba neve → jelölése.

Összegezve az oligonukleotid próbákkal kapcsolatos eredményeket érdemes kiemelni, hogy az *in silico* vizsgálatok alapján csupán a *P. sp.* HPBBIK3 és a *C. hispalense* FPBSKK1 törzsekre sikerült alkalmazható próbákat terveznem a 10 megvizsgált törzs közül. (Ez a két törzs megegyezik az 4.6 és 4.8 alfejezetek eredményinek összevetése alapján alkalmasnak tűnő törzsekkel.) Az új próbák gyakorlati értékelésének és specifikuság vizsgálatának tekintetében elmondható, hogy mindkét új próbára sikerült megállapítani azt a hibridizációs körülményt, amelyen kellő specifikussággal kötődnek a cél törzsekhez, valamint specifikusságukat más törzsekhez való hibridizációs hajlandóság hiányával is sikerült alátámasztanom. Sikerült továbbá megvizsgálnom és megerősítenem az irodalomban már leírt, *Escherichia* és *Listeria* fajok kimutatására szolgáló próbák és a versengő próba alkalmazhatóságát is.

4.10. Oligonukleotid primerek tervezése és specifikusságuk vizsgálata

Ugyanúgy, mint az 4.9.-es alfejezetben, itt is a *C. hispalense* FPBSKK1, *P. sp.* HPBBIK3, valamint *E. coli* ATCC8739, *L. innocua* 1010 és *L. monocytogenes* CCM 4699 törzsek voltak a primertervezés célpontjai. Felhasználva a specifikus próba szekvencia információkat sikerült specifikus primerpárokat terveznem a két vélhetően endofita törzsre (lásd a Chr22F/ Chr818R és Pse393F/Pse618R nevű primerpárokat a **4. táblázatban**), azonban nem sikerült törzs szinten specifikus primerpárokat terveznem a többi esetben. A két *Listeria* törzsre egy *Listeria* nemzetség specifikus (kivéve a *L. grayi*-t) primert terveztem (lásd Lis659R primert a **4. táblázatban**) a Lis-637 próba alapján, amely a 27f (16S rRNS gén specifikus) primerrel alkot használható, specifikus primerpárt. Az *E. coli* esetében ugyanezt módszert alkalmaztam és sikerült *Escherichia* legtöbb tagjára és néhány *Shigella* törzsre is specifikus primert (lásd Ec/Sh473R primert a **4. táblázatban**) tervezni, amely szintén a 27f primerrel alkot használható primerpárt. A gyakorlatban történő vizsgálatok során 68 °C volt az a legmagasabb primerkötődési hőmérséklet, amelyen mind a négy primerpár még amplifikálta a specifikus PCR termékeket. Végül pedig, ezen a hőmérsékleten egyik primer pár sem amplifikált specifikus PCR termékeket a vizsgált, nem cél törzsek genomiális DNS-éből.





4.11. Mikroóakkal fertózzott paprikamagokból nevelt palánták baktériumbiótájának vizsgálati eredményei

A potenciális endofita törzsekkel, valamint a patogént modellező, opportunista patogén és valódi patogén törzsekkel beoltott paprikamagokat, aszeptikus körülmények között neveltem. Ezen növények különböző növekedési szakaszait demonstrálják a **15. ábrán** látható képek, amelyeket az átültetés előtt/után vagy az öntözésekkor készítettem.

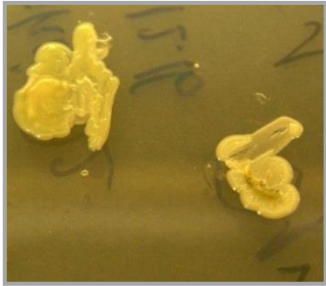





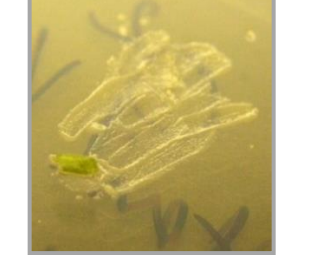



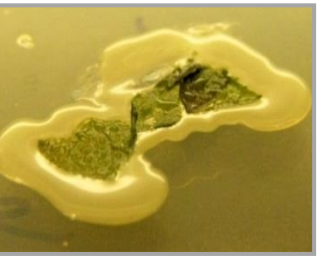

4.11.1. A feltételezett endofita baktériumokkal fertózzott növényekből izolált baktériumok jellemzése morfológiai, 16S rDNS szekvencia és RAPD-PCR tipizálás alapján

A sóval, nisztatinnal és vitaminnal kiegészített általános táptalajra (PGESNV) helyezett növényi szövetekből kinőtt baktériumtelepekből (**16. ábra**) vagy esetenként baktériumpázsitból tiszta tenyészeteket készítettem kromogén-differenciáló táptalajon (WLV nutrient agar), és a morfológiai sajátosságok alapján csoportosítottam őket. Az összesen 89 izolátumot 10 csoportba tudtam sorolni ezen jellemzők alapján. Minden csoportból kiválasztottam egy reprezentatív törzset (amelyek WLV nutrient táptalajon megfigyelt telepmorfológiái a **17. ábrán** láthatók) és a *L. innocua* 1010 törzsszel együtt kioltottam őket ALOA táptalajra is. A **17. ábrán** lévő fényképek alapján jól látható, hogy mind a tíz törzs különböző telepmorfológiát mutatott WLV táptalajon,




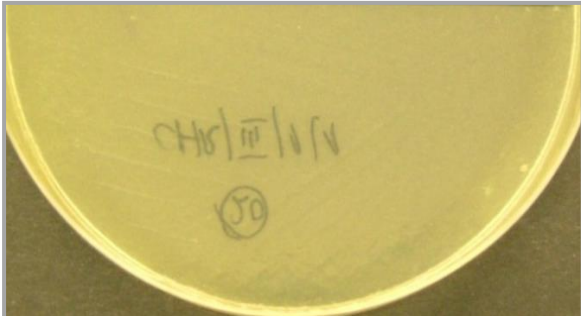

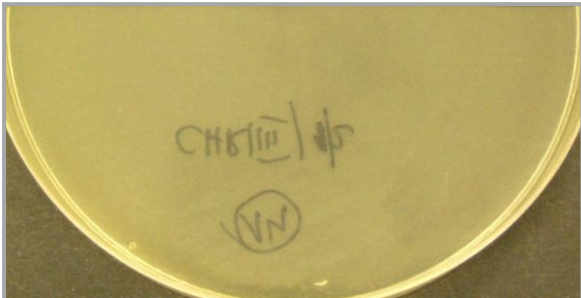

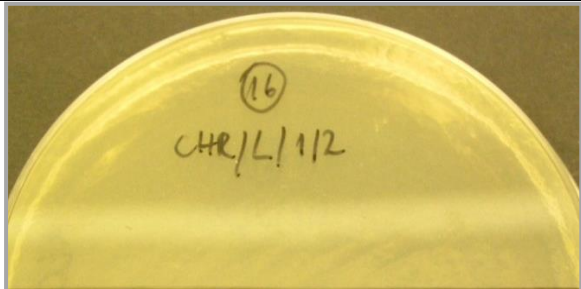

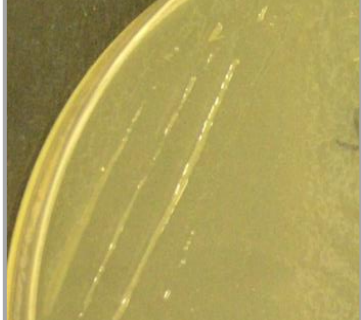
egyik sem szaporodott vagy csak gyengén ALOA táptalajon, valamint semelyik sem mutatta a *Listeria* törzsekre jellemző telepmorfológiai tulajdonságokat (halványkék telepek). Ezen megfigyelés azt sejteti, hogy a kitenyésztett baktériumok egyike sem tartozik a *Listeria* nemzetségbe, függetlenül attól, hogy potenciális endofita baktériummal beoltott vagy kontroll növényből származtak-e a törzsek.

| Növekedési stádium: | 10 napos csíranövénykék | 12 napos palánták |
|---------------------|---|--|
| |  |  |
| Növekedési stádium: | 24 napos palánták | 35 napos palánták |
| |  |  |

15. ábrán. A palántanevelési kísérletben nevelt növények növekedését demonstráló kiragadott példák

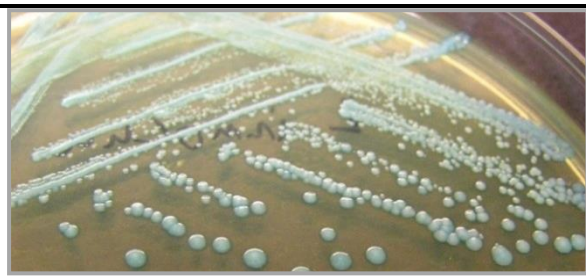
| Szerv | <i>C. hispalense</i> FPBSKK1 | <i>P. sp.</i> HPBBIK3 | Steril kontroll (fertőtlenített magokból származó növény) | Nem steril kontroll (nem fertőtlenített magokból származó növény) |
|--------|---|--|---|---|
| Gyökér |  |  |  |  |
| Szár |  |  |  |  |
| Levél |  |  |  |  |

16. ábra. A feltételezett endofita baktériumokkal beoltott és kontroll növényekből kinőtt baktérium telepekről készült felvételek PGESV táptalajon

| WLV nutrient táptalaj Izolátum kódja: CHRGY11 | ALOA táptalaj Izolátum kódja: CHRGY11 |
|---|--|
|  |  |
| Izolátum kódja: CHRIII11 | Izolátum kódja: CHRIII11 (Nem szaporodott) |
|  |  |
| Izolátum kódja: CHRIII12 | Izolátum kódja: CHRIII12 (Nem szaporodott) |
|  |  |
| Izolátum kódja: CHRL12 | Izolátum kódja: CHRL12 (Nem szaporodott) |
|  |  |
| Izolátum kódja: NSSZ52 | Izolátum kódja: NSSZ52 |
|  |  |
| Izolátum kódja: SGY41 | Izolátum kódja: SGY41 (Nem szaporodott) |

| | |
|--------------------------------|--|
| | |
| <p>Izolátum kódja: SSZ31</p> | <p>Izolátum kódja: SSZ31 (Nem szaporodott)</p> |
| | |
| <p>Izolátum kódja: NSGY21</p> | <p>Izolátum kódja: NSGY21</p> |
| | |
| <p>Izolátum kódja: PSEGY11</p> | <p>Izolátum kódja: PSEGY11</p> |
| | |
| <p>Izolátum kódja: PSEII11</p> | <p>Izolátum kódja: PSEII11</p> |
| | |

Referenciaként használt *L. innocua* 1010 törzs
telepmorfológiája ALOA táptalajon



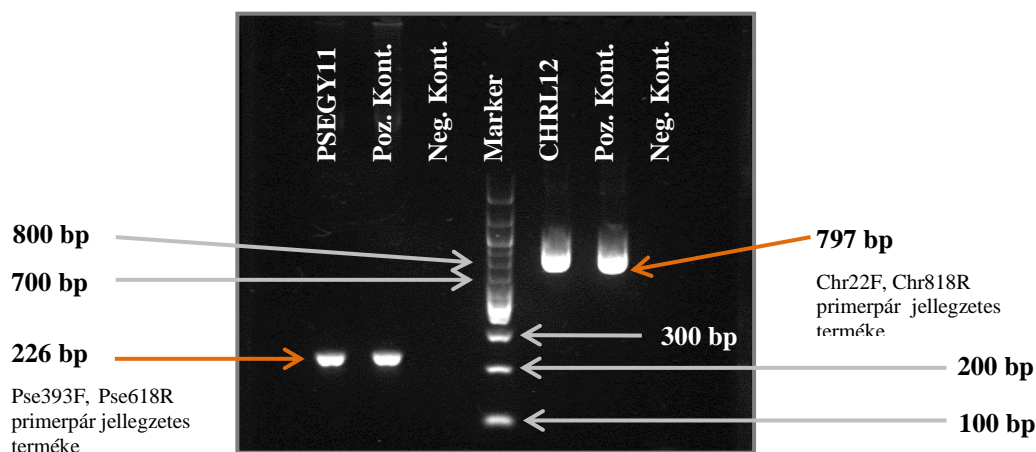
17. ábra. A potenciálisan endofita baktériumokkal beoltott és kontroll növényekből kitenyésztett, 10 morfológiai csoportba sorolható 89 izolátum reprezentatív törzseinek növekedése/telepmorfológiája WLW nutrient és ALOA táptalajokon.

Ezt követően a 10 reprezentatív törzsből genomális DNS-t izoláltam és megpróbáltam felszaporítani őket a 3.6.9.4-es alfejezetben szereplő, megfelelő specifikus primerpárokkal (Pse393F/Pse618R és Chr22F/Chr818R), továbbá ezen vizsgálat során a beoltáshoz használt törzsek DNS-ét is felhasználtam pozitív kontrollként. Az eredmények alapján elmondható, hogy csak két izolátum (PSEGY11 és CHRL12) DNS-éből sikerült felszaporítani azt a jellegzetes hosszúságú szakaszt, amelyet a beoltáshoz használt törzsekre specifikus primerpár generál. Ezt szemléltetik a **18. ábrán** látható reprezentatív eredmények is. Továbbá, az eredmények megerősítése céljából a két izolátum 16S rRNS génjét is felszaporítottam, és az amplikonok egy irányból szekvenálásra is kerültek. A kapott több mint 1000 nukleotid hosszúságú szekvenciákat (lásd **M9.** mellékletben) összehasonlítva a beoltáshoz használt törzsek közel teljes 16S rRNS génszekvenciáival teljes azonosság volt tapasztalható, azonban ez még nem bizonyította a törzs szintű azonosságot.

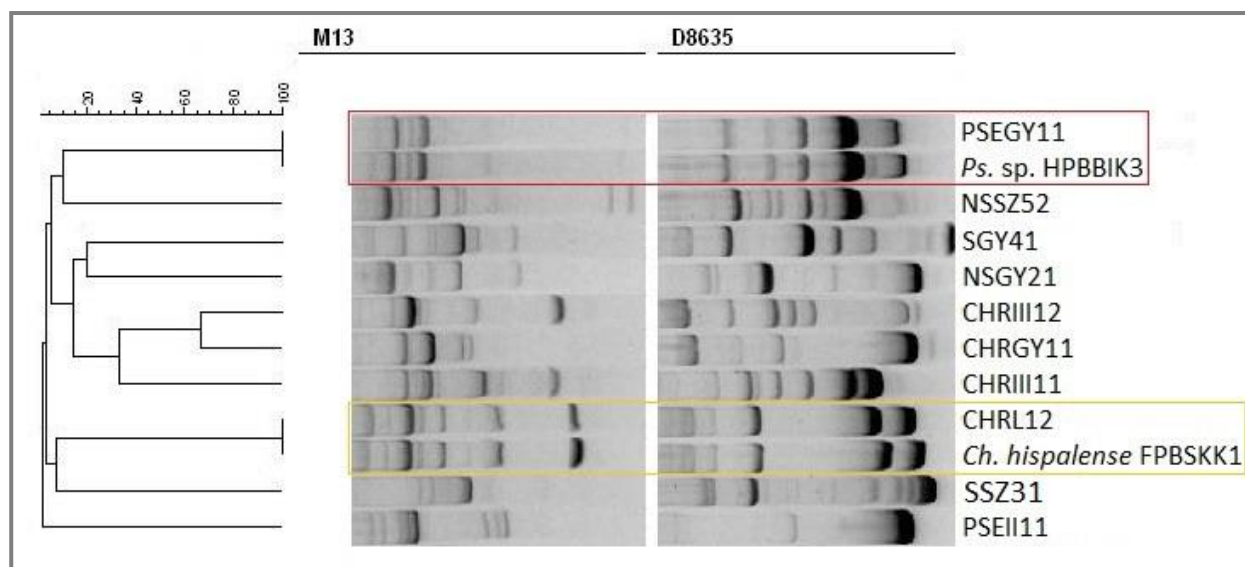
Következő lépésként az M13, valamint a D8635 primerek felhasználásával RAPD-PCR módszerrel tipizáltam a 10 törzset, valamint a beoltáshoz használt törzseket annak érdekében, hogy a RAPD mintázatok összehasonlítása alapján valószínűsíthető legyen a beoltáshoz használt törzsek előfordulása az izolátumok között. A RAPD-PCR-es ujjlenyomatokból készült kombinált dendrogram (**19. ábra**) alapján kiderült, hogy a PSEGY11 kódú, gyökérszövetből származó törzs azonos mintázattal rendelkezik, mint a fertőzésre használt *P. sp.* HPBBIK3 törzs. Hasonló mondható el a CHRL12 kódú, levélszövetből származó törzsről is, amely azonos molekuláris ujjlenyomatokkal rendelkezik, mint az adott növény beoltásához használt *C. hispalense* FPBSKK1 törzs. A dendrogramon színessel jelölt ujjlenyomatok alapján elmondható tehát, hogy nagy valószínűséggel sikerült visszaizolálnom a felületi fertőtlenítést követően azt a két feltételes endofita törzset, amellyel beoltottam az adott növényeket.

Érdeemes még megemlíteni, hogy a fentiekben említett módszerek egyikével sem sikerült kimutatni a beoltáshoz használt potenciális endofita törzseket a kontroll mintákból. Ezen

eredmények pedig kizárják annak a lehetőségét, hogy a palántákban eleve benne élő endofitákat mutattam volna ki.



18. ábra. A beoltáshoz használt potenciális endofita törzsekkel megegyező RAPD-PCR ujjlenyomatot adó, növényből kitenyészített baktérium törzsek kimutatása specifikus PCR-rel. Pozitív kontrollok: beoltáshoz használt *P. sp.* HPBBIK3 és *C. hispalense* FPBSKK1; Negatív kontroll: dd H₂O



19. ábra. A potenciális endofita törzsekkel beoltott növényekből származó izolátumok és a beoltáshoz használt törzsek M13 és D8635 primerekkel készült kombinált RAPD-PCR dendrogramja

Összegezve ezen eredményeket megállapítható tehát, hogy nagy valószínűséggel a beoltáshoz használt *P. sp.* HPBBIK3 és *C. hispalense* FPBSKK1 potenciális endofita baktérium törzsek a magon keresztül sikeresen bejutottak a palánták belső növényi szöveteibe és a felületi fertőtlenítés után lehetséges volt őket újra izolálni.

4.11.2. Beoltáshoz használt patogént modellező és patogén baktériumok jelenlétének vizsgálata szelektív táptalajokon

Az *E. coli* ATCC 8739 törzssel beoltott magból kifejlődött palánták felületileg fertőtlenített gyökér és szár részeit Chromocult® kóliform szelektív táptalajon, míg a *L. monocytogenes* CCM 4699 törzssel beoltottakét ALOA kromogén szelektív táptalajon vizsgáltam. Az inkubációt követően sem a Chromocult®, sem az ALOA táptalajon nem volt tapasztalható a beoltáshoz használt törzsek telep morfológiájával megegyező kolóniák növekedése.

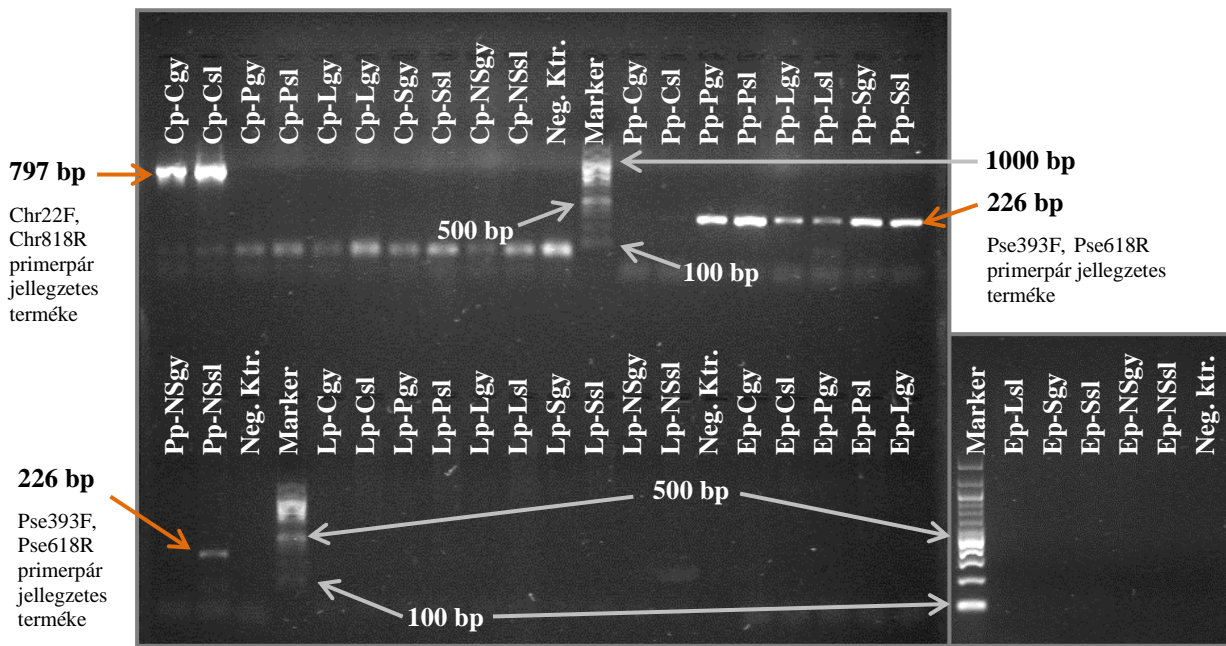
Az eredményekből úgy tűnik, hogy a beoltáshoz használt törzsek - ha be is jutottak a mag szöveteibe - nem éltek túl a palántanevelési időszakot.

4.11.3. A fertőzéshez használt baktériumok közvetlen kimutatása a növényekből izolált DNS PCR-es vizsgálatával

A vizsgált növényi mintákból kivont DNS közvetlen specifikus PCR-es vizsgálatával, a Chr22F/Chr818R; Pse393F/ Pse618R; 27f/ Lis659R és 27f/ Ec/Sh473R primerpárok alkalmazásával is megpróbáltam kimutatni a beoltáshoz használt törzsek jelenlétét a növényi szövetekből.

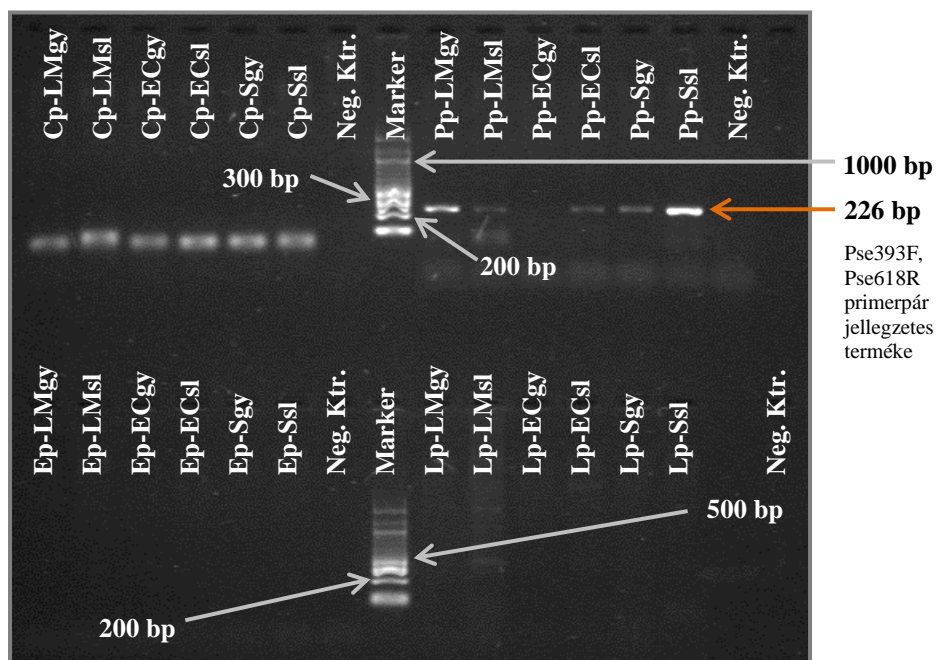
Amint az a **20.** és **21. ábrán** látható, több esetben keletkeztek az adott primerpárokra jellemző PCR termékek. A Chr22F/Chr818R primerpárral a *Chryseobacterium hispalense* FPBSKK1 törzssel fertőzött magból kinőtt növények gyökeréből (Cgy) és hajtásaiból (Csl) izolált DNS-ből sikerült felszaporítani a jellegzetes hosszúságú PCR termékeket. A Pse393F/Pse618R primerpárral nemcsak a *P. sp.* HPBBIK3 törzssel fertőzött növénymintákból, hanem más baktériummal (*L. innocua* 1010, *L. monocytogenes* CCM 4699, *E. coli* ATCC 8739) beoltott, valamint steril kontroll gyökér, steril és nem steril hajtás mintákból származó DNS izolátumok esetén is kaptam jellegzetes PCR termékeket. Ezzel ellentétben a 27f/Lis659R és 27f/Ec/Sh473R primerpárokkal egyik minta esetében sem kaptam PCR terméket.

A Chr22F/Chr818R primerpárral jellegzetes (797 bp) PCR terméket adó két minta esetében a PCR terméket megszekvenáltattam és a kapott szekvenciákat (lásd **M9.** melléklet) összehasonlítottam a beoltáshoz használt törzs szekvenciájával. A kapott eredmények szerint a szekvencia megegyezett a *C. hispalense* FPBSKK1 törzs szekvenciájával.



20. ábra. Beoltáshoz használt baktériumok kimutatása növénymintákból izolált DNS közvetlen specifikus PCR-es vizsgálatával

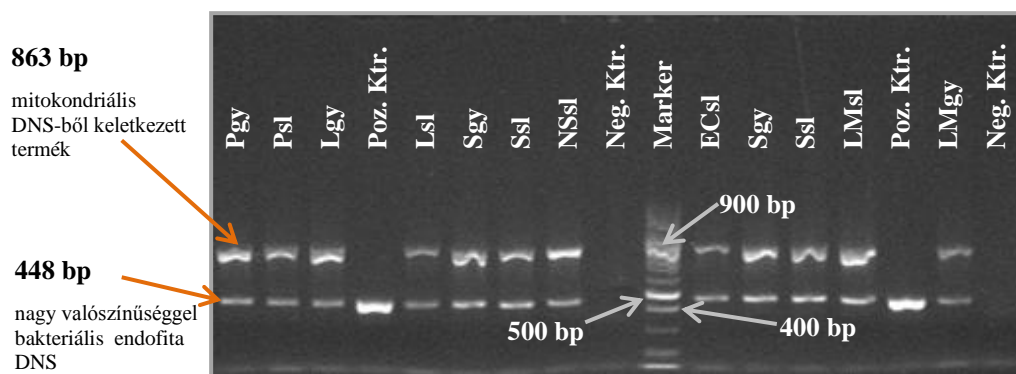
Jelmagyarázat: **Cp** – Chr22F, Chr818R; **Pp** – Pse393F, Pse618R; **Lp** – 27f, Lis659R; **Ep** – 27f, Ec/Sh473R primerpár alkalmazása a PCR során; **C** – *C. hispalense* FPBSKK1; **P** – *P. sp.* HPBBIK3; **L** – *L. innocua* 1010 törzssel beoltott növényből izolált DNS; **S** – Steril kontroll növényből izolált DNS; **NS** – Nem steril kontroll növényből izolált DNS; **gy** – gyökérszövet; **sl** – szár és levélszövet; **Neg. Ktr.** – negatív kontroll.



21. ábra. Beoltáshoz használt baktériumok kimutatása növénymintákból izolált DNS közvetlen specifikus PCR-es vizsgálatával

Jelmagyarázat: **Cp** – Chr22F, Chr818R; **Pp** – Pse393F, Pse618R; **Lp** – 27f, Lis659R; **Ep** – 27f, Ec/Sh473R primerpár alkalmazása a PCR során; **EC** – *E. coli* ATCC 8739 törzssel; **LM** – *L. monocytogens* CCM 4699 törzssel beoltott növényből izolált DNS; **S** – Steril kontroll növényből izolált DNS; **gy** – gyökérszövet; **sl** – szár és levélszövet; **Neg. Ktr.** – negatív kontroll, **Poz. Ktr.** – pozitív kontroll.

A Pse393F/Pse618R primerpárral jellegzetes, 226 bp méretű PCR terméket adó minták esetében a kis ampikonhossz miatt nem szekvenáltam a PCR termékeket, hanem a 16S rRNS génre specifikus 1070f (Shakya *et al.*, 2013) és 1492r (**2. táblázat**) primerpár alkalmazásával próbáltam felszaporítani a bakteriális DNS-t, majd ezt követően történt meg a szekvenálás. A vizsgálat ötleteként szolgáló Shakya és munkatársai (2013) által leírt publikációban a gélből való kivágással és a két primer együttes használatával a növényi eredetű mitokondriális és kloroplasztisz szekvenciák mennyisége 8% körülire csökkenthető. Igaz, ők egy másik növényt vizsgáltak és egy másik, rövidebb (1492R) primerrel dolgoztak. Esetemben azért kellett a hosszabb, 1492R primert alkalmaznom, mert a cikkben leírt primer szekvenciával nem kaptam PCR terméket. Amint a **22. ábrán** is látható, az alkalmazott primerpár a paprika mintákból izolált DNS-ek esetében felszaporít egy nagyobb, 863 bp hosszúságú szakaszt is a mitokondriális DNS-ből, ezért szükséges volt a kisebb (448 bp) hosszúságú terméket kivágnom a gélből, és a PCR termék kivonását követően megszekvenáltam a tisztított ampikonokat. A szekvenálás során kapott szekvenciák az **M9.** mellékletben láthatóak.



22. ábra. Pse393F és Pse618R primerpárral PCR terméket adó minták felszaporítása 16S rRNS génjére specifikus (1070F, 1492R) primerpárral

Jelmagyarázat: **P** – *P. sp.* HPBBIK3 törzssel; **L** – *L. innocua* 1010 törzssel; **EC** – *E. coli* ATCC 8739 törzssel; **LM** – *L. monocytogenes* CCM 4699 törzssel beoltott növényből izolált DNS; **S** – Steril kontroll növényből izolált DNS; **NS** – Nem steril kontroll növényből izolált DNS; **gy** – gyökérszövet; **sl** – szár és levélszövet; **Poz. Ktr.** – *P. sp.* HPBBIK3 törzs DNS-e mint pozitív kontroll; **Neg. Ktr.** – negatív kontroll.

A szekvenálás lényeges eredményeit a **12. táblázatban** összegeztem. Amint látható, a *P. sp.* HPBBIK3 törzssel beoltott magból kinőtt növény gyökeréből (Pgy) és hajtásából (Psl) származó DNS-ből felszaporított 16s rRNS génszekvenciák nagy hasonlóságot mutatnak a *Pseudomonas* fajokkal, köztük a *P. alcaliphila* AL15-21^T (AB030583) törzssel, amellyel a beoltáshoz használt törzs is a legnagyobb hasonlóságot mutatta. Továbbá, ezen szekvenciákat összehasonlítottam a beoltáshoz használt törzs szekvenciájával és teljesen megegyeztek. Az Lsl minta (*L. innocua* 1010-zel fertőzött magból eredő hajtás) esetében az *Enterobacter*, az NSsl minta (steril kontroll

növény hajtása) esetében a *Kosakonia*, míg az Sgy minta (steril kontroll növény gyökérszöve) esetében a *Massilia* nemzetségbe tartozó fajok bakteriális DNS-ét tudtam felszaporítani. Öt másik esetben csak növényi DNS-t sikerült amplifikálni, míg az Lgy (*L. innocua* 1010-zel fertőzött magból eredő gyökér) és LMgy (*L. monocytogenes* CCM 4699-cel beoltott magból eredő gyökér) esetében kétszeri próbálkozás után sem sikerült megfelelő mennyiségű és minőségű PCR terméket generálnom.

12. táblázat. Növényi mintákból 1070f és 1492r primerpár által amplifikált, bakteriális 16S rRNS génszakasz hasonlósági eredményei

| DNS minta neve és eredete | Első három hasonló prokarióta típusörzse | GBN | Has. (%) |
|--|---|--------------|----------|
| Pgy (<i>P. sp.</i> HPBBIK3 fertőzés; gyökér) | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> NBRC 14159 ^T | BATI01000076 | 100 |
| | <i>Pseudomonas alcaliphila</i> AL15-21 ^T | AB030583 | 100 |
| | <i>Pseudomonas toyotomiensis</i> HT-3 ^T | AB453701 | 100 |
| Psl (<i>P. sp.</i> HPBBIK3 fertőzés; szár és levél) | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> NBRC 14159 ^T | BATI01000076 | 100 |
| | <i>Pseudomonas alcaliphila</i> AL15-21 ^T | AB030583 | 100 |
| | <i>Pseudomonas benzenivorans</i> DSM 8628 ^T | FM208263 | 100 |
| Lgy (<i>L. innocua</i> 1010 fertőzés; gyökér) | Sikertelen szekvenálás a kis mennyiségű és gyenge minőségű PCR termék miatt | | |
| Lsl (<i>L. innocua</i> 1010 fertőzés; szár és levél) | <i>Enterobacter ludwigii</i> DSM 16688 ^T | AJ853891 | 99,74 |
| | <i>Enterobacter asburiae</i> JCM 6051 ^T | AB004744 | 99,48 |
| | <i>Enterobacter cancerogenus</i> LMG 2693 ^T | Z96078 | 99,48 |
| Nssl (Steril kontroll növény; szár és levél) | <i>Kosakonia cowanii</i> CIP 107300 ^T | AJ508303 | 99,66 |
| | <i>Kosakonia oryzae</i> Ola 51 ^T | EF488759 | 98,64 |
| | <i>Kosakonia radicincitans</i> D5/23 ^T | AY563134 | 98,64 |
| Sgy (Steril kontroll növény; gyökér) | <i>Massilia suwonensis</i> 5414S-25 ^T | FJ969487 | 99,75 |
| | <i>Massilia haematophila</i> CCUG 38318 ^T | AM774589 | 99,74 |
| | <i>Massilia varians</i> CCUG 35299 ^T | AM774587 | 99,73 |
| LMgy (<i>L. monocytogenes</i> CCM 4699 fertőzés; gyökér) | Értékelhetetlen elektroferogram | | |

Jelmagyarázat: GBN – GenBank accession number; Has. - Hasonlóság

Összességében tehát elmondható, hogy a *P. sp.* HPBBIK3 törzssel beoltott magból kifejlődött növény esetében a vizsgált mintákból kivont DNS közvetlen amplifikálásával kimutatható volt a törzs, míg a steril kontroll növény gyökere, valamint a nem steril kontroll növény szár és levele esetében ez nem volt lehetséges. Továbbá, ahol azonban a baktérium koncentráció a kimutathatósági határ alatt volt (kb. 10^3 sejt/ml, Gorski és Csordas (2010)) ott csak a növényi mitokondriális DNS-t amplifikálta a primerpár. Végül pedig az is megállapítható, hogy a *P. sp.* HPBBIK3 törzsre tervezett Pse393F /Pse618R primerpár az alkalmazott körülmények között

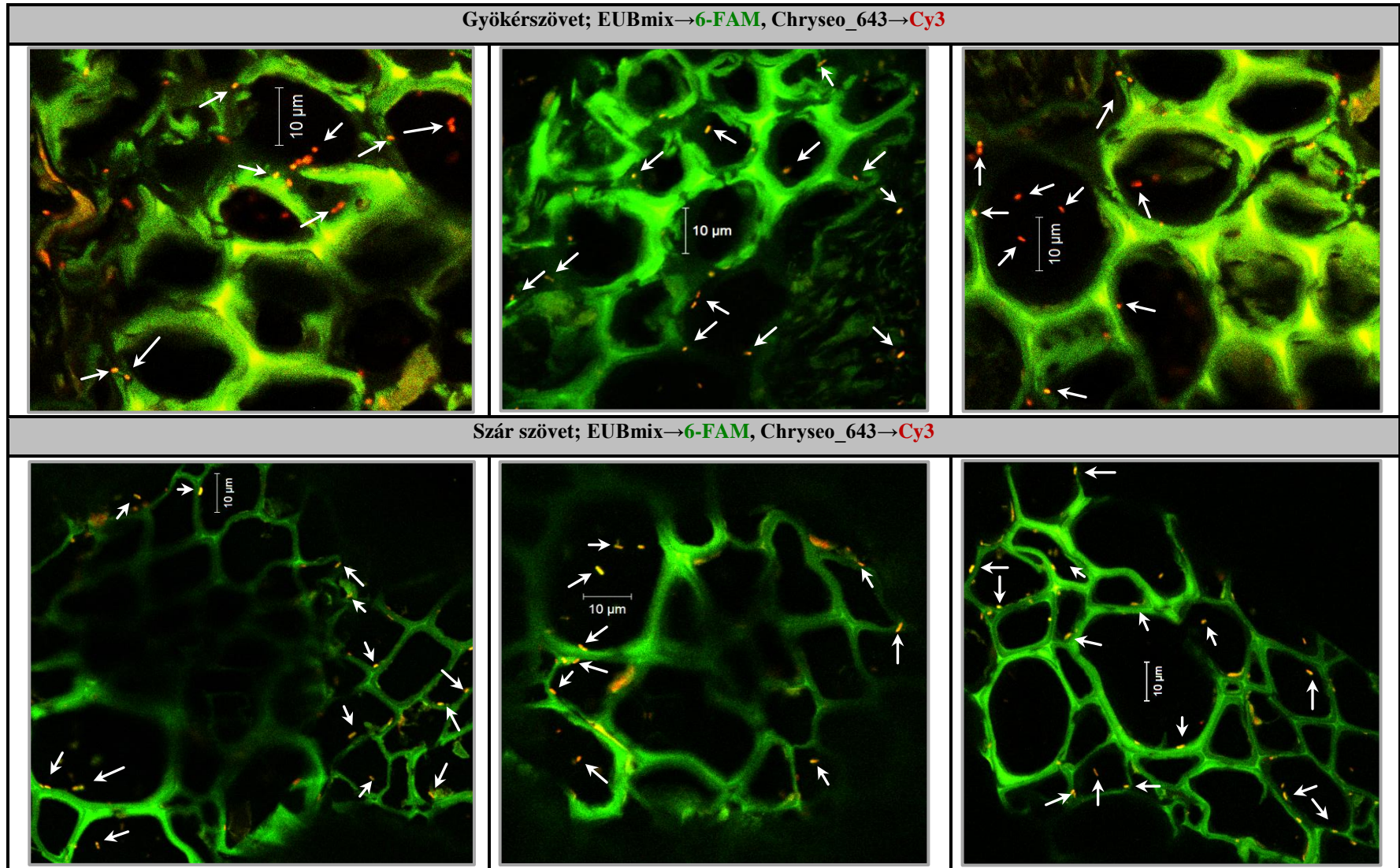
nem bizonyult kellően specifikusnak, mert valószínűsíthető, hogy más baktérium fajok és a növényi DNS esetében is adott PCR terméket.

4.11.4. Baktériumok detektálási eredményei növényi mintákban FISH technikával

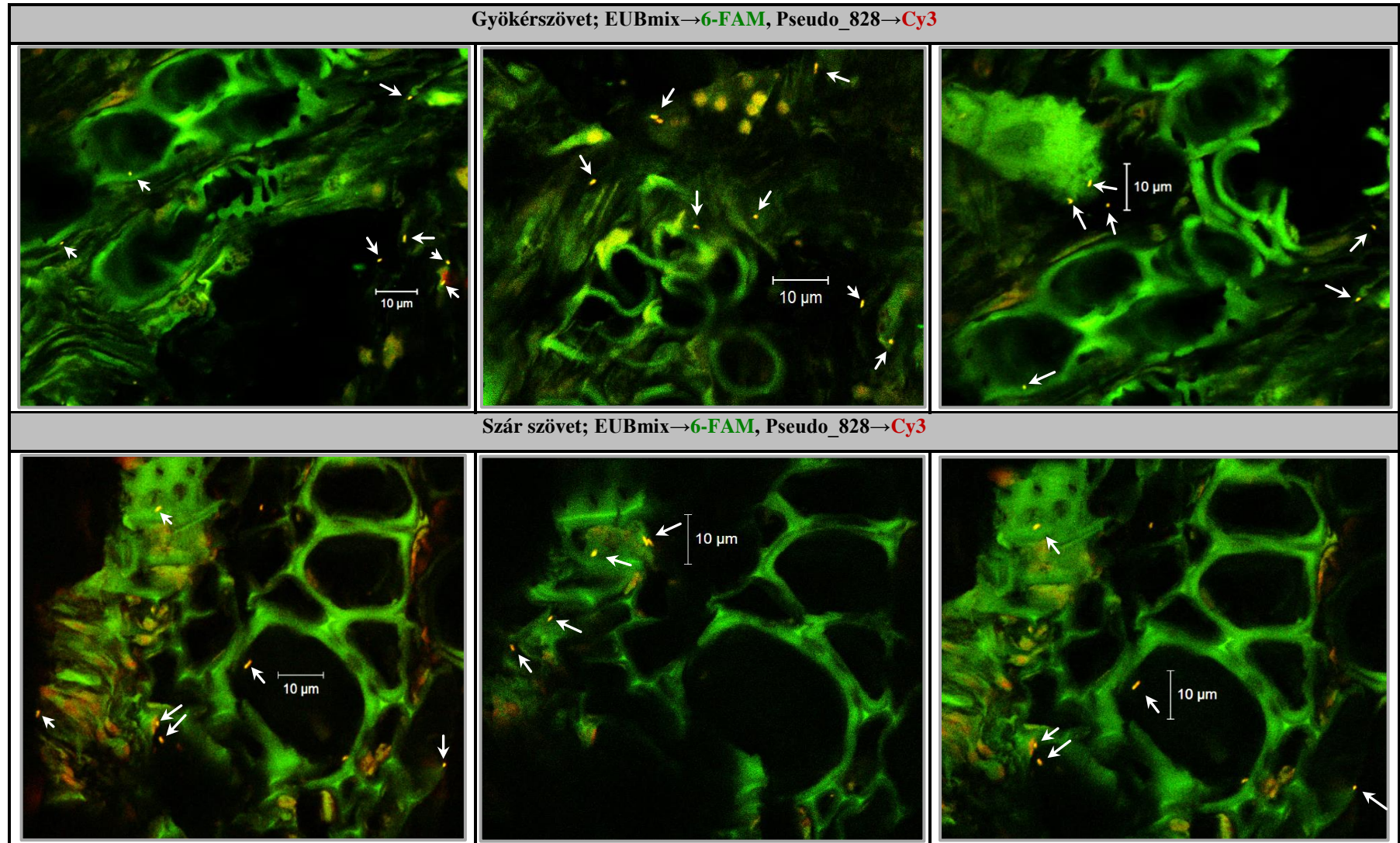
A feldolgozott, fagyasztóban tárolt palánta mintákból a 3.6.9.5-ös alfejezetben leírtak alapján metszeteket készítettem és a FISH technikát alkalmaztam az esetlegesen jelenlévő baktériumok megjelölésére és detektálására. Minden minta esetében alkalmaztam általános próbákat, amelyekkel a legtöbb baktérium kimutatható, és specifikus próbákat is, amelyekkel a beoltáshoz használt baktériumokat próbáltam detektálni. A FISH során az 4.9.1-4.9.2 alfejezetben leírt specifikus próbákra vonatkozó eredmények alapján optimálisnak bizonyuló formamid koncentrációkat használtam, amelyeken az általános próbák is hibridizálnak, mivel 0-50% formamid koncentrációnál kitűnően kötődnek. Az elkészült mikroszkópos preparátumokat konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal (CLSM-mel) vizsgáltam, a készített felvételekből készült reprezentatív összeállításokat a **23-29. ábrákon** mutatom be.

A **23. ábrán** a *C. hispalense* FPBSKK1 törzssel beoltott növény 3 gyökér és 3 szármetszetéről készült felvételeket szemlélteti, amelyeken nyilakkal jelöltem több baktérium sejtet is. A sejtek sárga színben láthatóak, mert az általános próbák fluoroforjai (6-FAM) által emittált jel zöld, míg a specifikus próba fluoroforja (Cy3) által emittált jel narancsos-vörös színű és a két szín együtt sárga, narancssárgás színt adott a detektált jelek intenzitásától függően. Végignézve a felvételeket egyértelműen elmondható, hogy mind a gyökér, mind a szár szövetekben szép számban voltak jelen a *C. hispalense* FPBSKK1 törzs sejtjei, amelyek legtöbb esetben a szöveteken kívül vagy a szövetek belsejében láthatók. A szövetektől távolabbi helyzetekben azonban, a fa és hánccsedények járataiban is megfigyelhetők sejtek, ami az endofita baktériumok migrációjára utal. A baktérium sejtek képeken látható elhelyezkedéséből azonban nem vonhatók le messzemenő következtetések, mert a metszetkészítés és a FISH módszer alkalmazása során az egyes kezelések esetében (különösen a fixálási és mosási lépések hatására) a sejtek tapadása csökkenhet vagy kiszakadhatnak a kötődésből és más helyekre kerülhetnek. A bemutatott képek azonban egyértelműen bizonyítják, hogy a mag fertőzésére használt *C. hispalense* FPBSKK1 törzs sejtjei bejutottak magba, ott elszaporodtak (kolonizálódtak) és onnét a paprika más szerveibe vándoroltak, más szóval internalizálódtak.

Hasonló megfigyelések tehetők a **24. ábrán** látható *P. sp.* HPBBIK3 törzssel beoltott növényekből készült metszetek esetében is, azzal a különbséggel, hogy az itt detektált sejtek sokkal kisebb számban voltak kimutathatók.

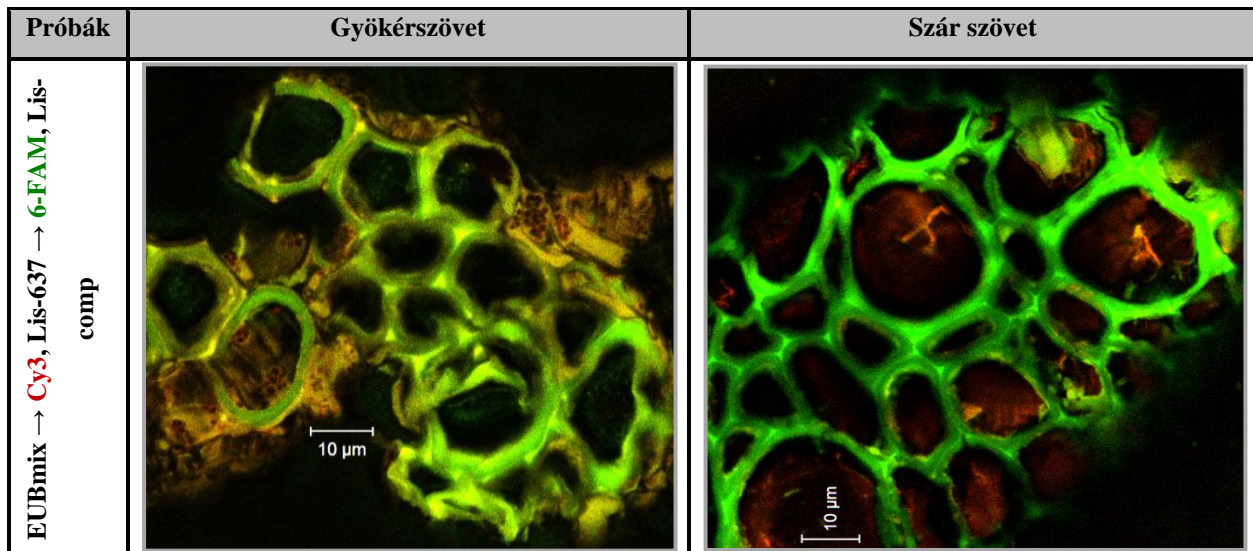


23. ábra. A *C. hispalense* FPBSKK1 törzzsel beoltott növények metszeteiről készült konfokális lézermikroszkópos felvételek a FISH technika alkalmazását követően. Alkalmazott próbák leírása: próba neve → jelölése.



24. ábra. A *P. sp.* HPBBIK3-mal beoltott növények keresztmetszeteiről készült konfokális lézermikroszkópos felvételek a FISH technika alkalmazását követően. Alkalmazott próbák leírása: próba neve → jelölése

A felvételeken sajnos az is megfigyelhető, hogy nem mindig sikerült jó minőségű metszeteket készíteni, vagy valamelyik lépésben a szövetek elmozdultak és nem mindig látszik egyértelműen a rájuk jellemző szöveti szerkezet, azonban ettől eltekintve detektálható volt a baktériumok jelenléte vagy hiánya.

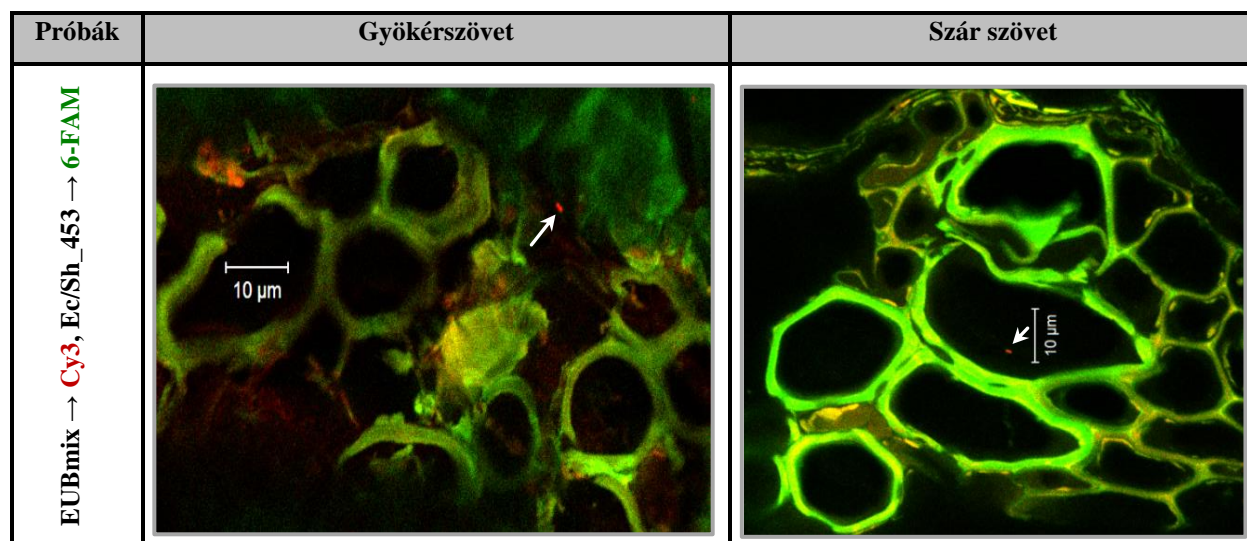


25. ábrán. A *L. innocua* 1010 törzssel beoltott növények keresztmetszeteiről készült konfokális lézermikroszkópos felvételek a FISH technika alkalmazását követően. Alkalmazott próbák leírása: próba neve → jelölése.

A **25. ábrán** látható példa a *L. innocua* 1010 törzssel beoltott növények gyökér és szár szöveteiből készült FISH-CLSM felvételekre, amelyeken azonban nem látható egyetlen baktérium sejt sem. Ugyanez volt tapasztalható az összes vizsgált preparátum esetében is, tehát elmondható, hogy valószínűleg a *L. innocua* 1010 sejtek nem jutottak be a belső növényi szövetekbe, vagy ha igen, akkor nem tudtak olyan hosszú ideig és olyan nagy számban túlélni, hogy ezzel a módszerrel kimutathatók legyenek. A FISH módszernek viszonylag nagy a detektációs küszöbértéke, ugyanis körülbelül 10^3 sejt/ml minta (Wagner *et al.*, 2003) szükséges ahhoz, hogy kimutatható legyen az adott prokarióta.

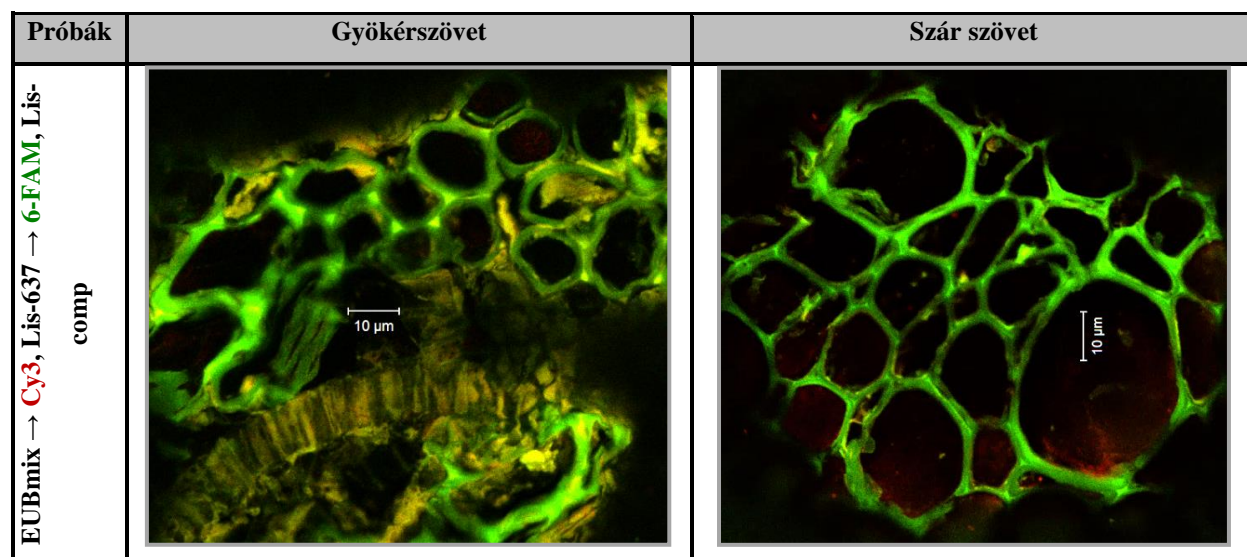
A tenyésztéses vagy PCR-es módszerek eredményeihez hasonlóan a FISH-CLSM technikával sem sikerült kimutatni a beoltáshoz használt *E. coli* ATCC 8739 és *L. monocytogenes* CCM 4699 törzseket a növényi szövetekben, amit a **26.** és **27. ábra** szemléltet. Megjegyzendő, hogy az *E. coli* ATCC 8739-cel beoltott növények gyökér és szár szöveteiben sikerült lencsevégre kapni egy-egy vörös színű sejtet. Ezekhez a sejtekhez azonban nem hibridizált a zöld színű jelölést hordozó specifikus próba (Ec/Sh_453 - 6-FAM), csak az általános próbakeverék egyike (EUBmix - Cy3). Ez nagy valószínűséggel azt jelenti, hogy a mintákban nem az *Escherichia* vagy *Shigella* nemzetségbe tartozó baktérium sejtek láthatók. A sejtek kis száma arra utalhat,

hogy mennyiségük a detekciós határ környékén (10^3 sejt/g) mozoghat, amit a PCR-es vizsgálatok is megerősítenek.



26. ábra. *E. coli* ATCC 8739 törzsszel beoltott növények keresztmetszeteiről készült CLSM felvételek a FISH technika alkalmazását követően. Alkalmazott próbák leírása: próba neve → jelölése

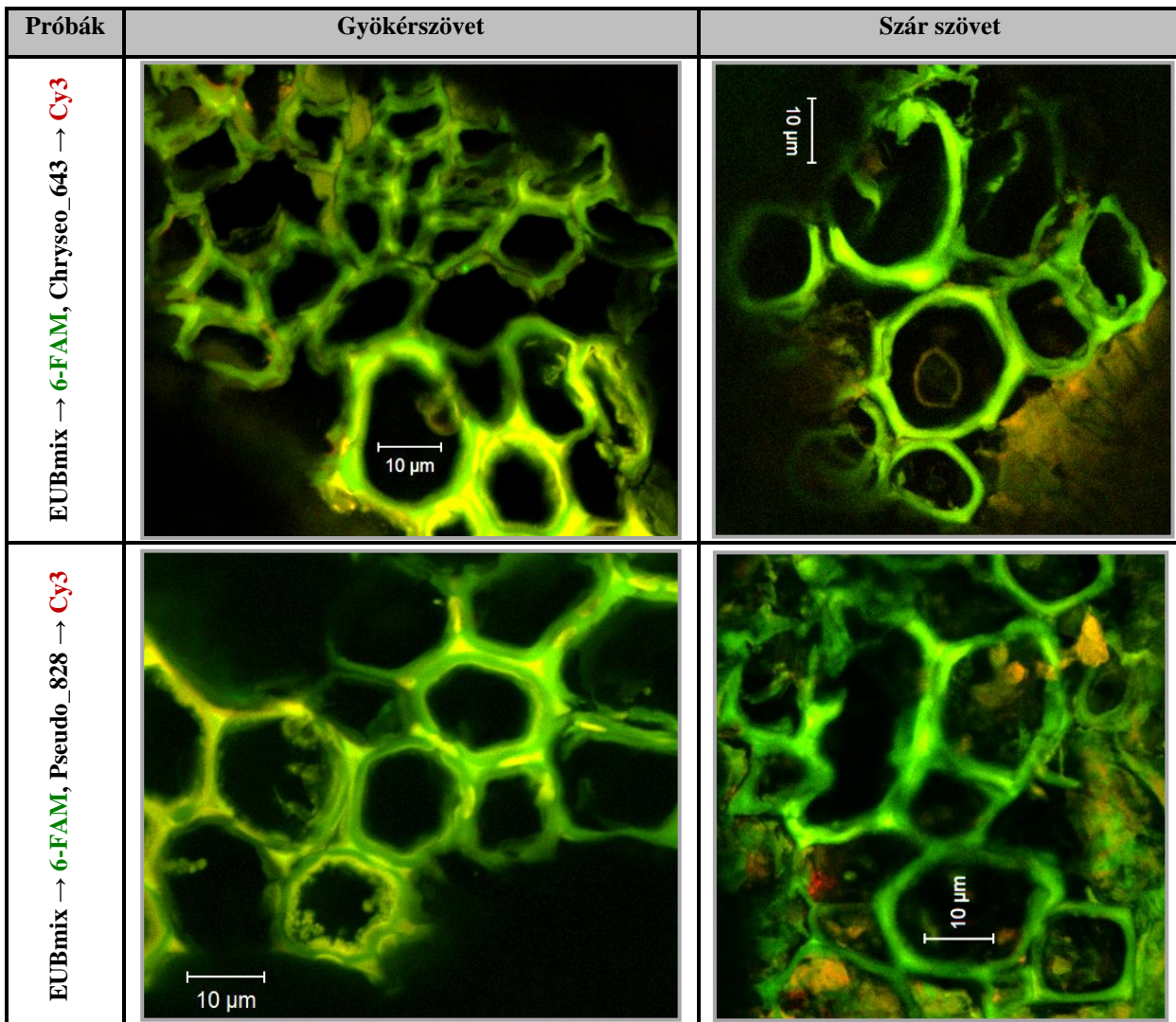
A *L. monocytogenes* CCM 4699-cel beoltott növények szöveteiből sem sikerült egyetlen esetben sem baktérium sejtet detektálni, amit a **31. ábra** is szemléltet.

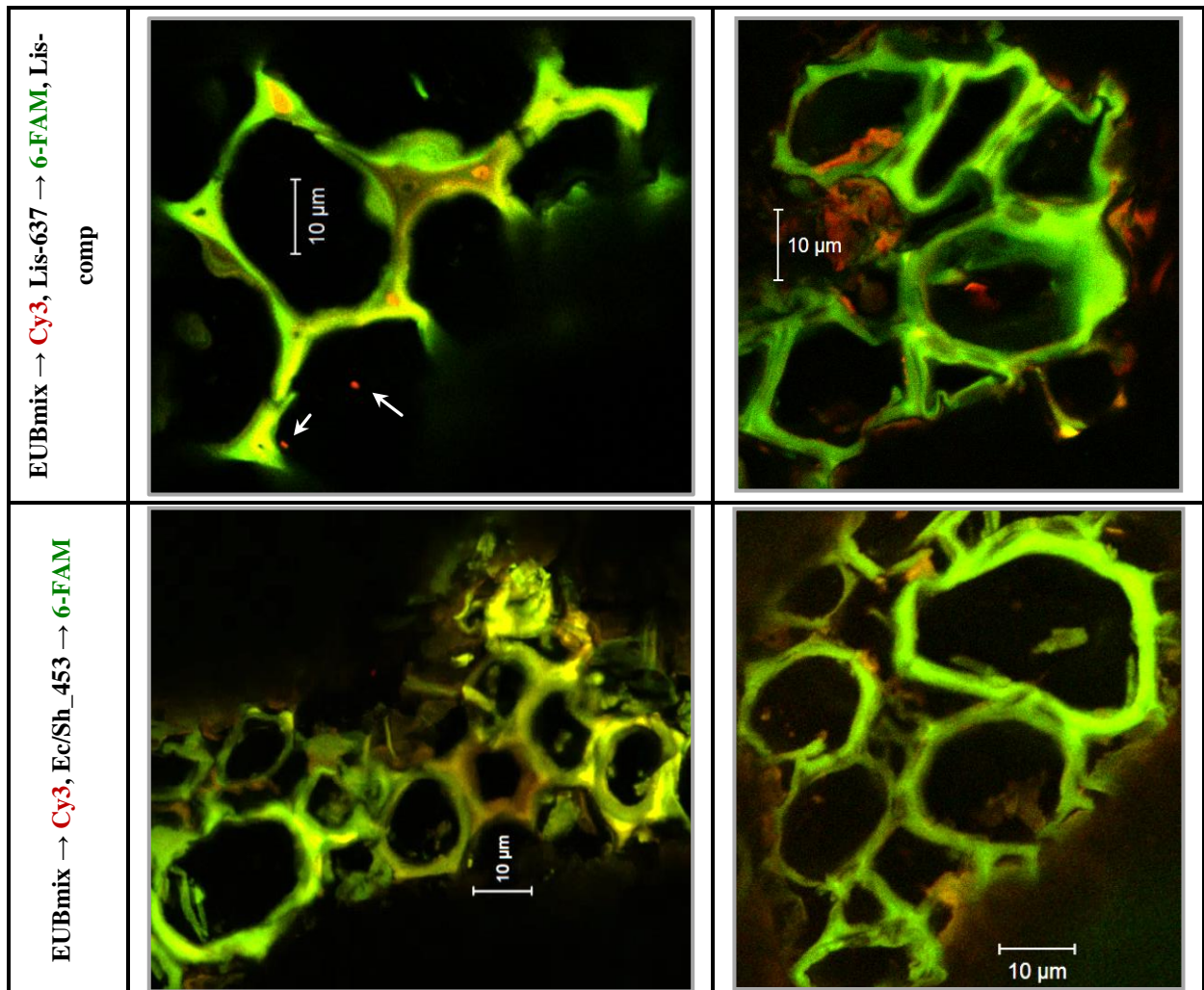


27. ábra. *L. monocytogenes* CCM 4699-cel beoltott növények keresztmetszeteiről készült CLSM felvételek FISH technika alkalmazását követően. Alkalmazott próbák leírása: próba neve → jelölése

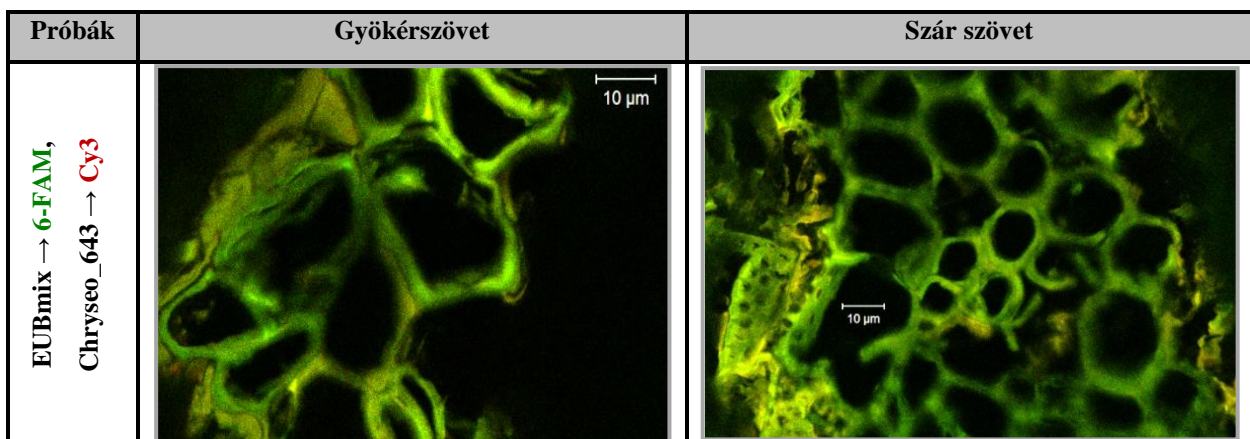
A baktérium sejtek detektálásának hiánya a steril kontroll növények (**28. ábra**) és a nem steril kontroll növények (**29. ábra**) szöveteiből készült felvételekre is jellemző egy esettől eltekintve, amikor is a gyökérszövetben sikerült kimutatni két baktérium sejtet. Mindkét esetben mindegyik specifikus próbával megvizsgáltam a metszeteket, az általános próbák mellett arra számítva,

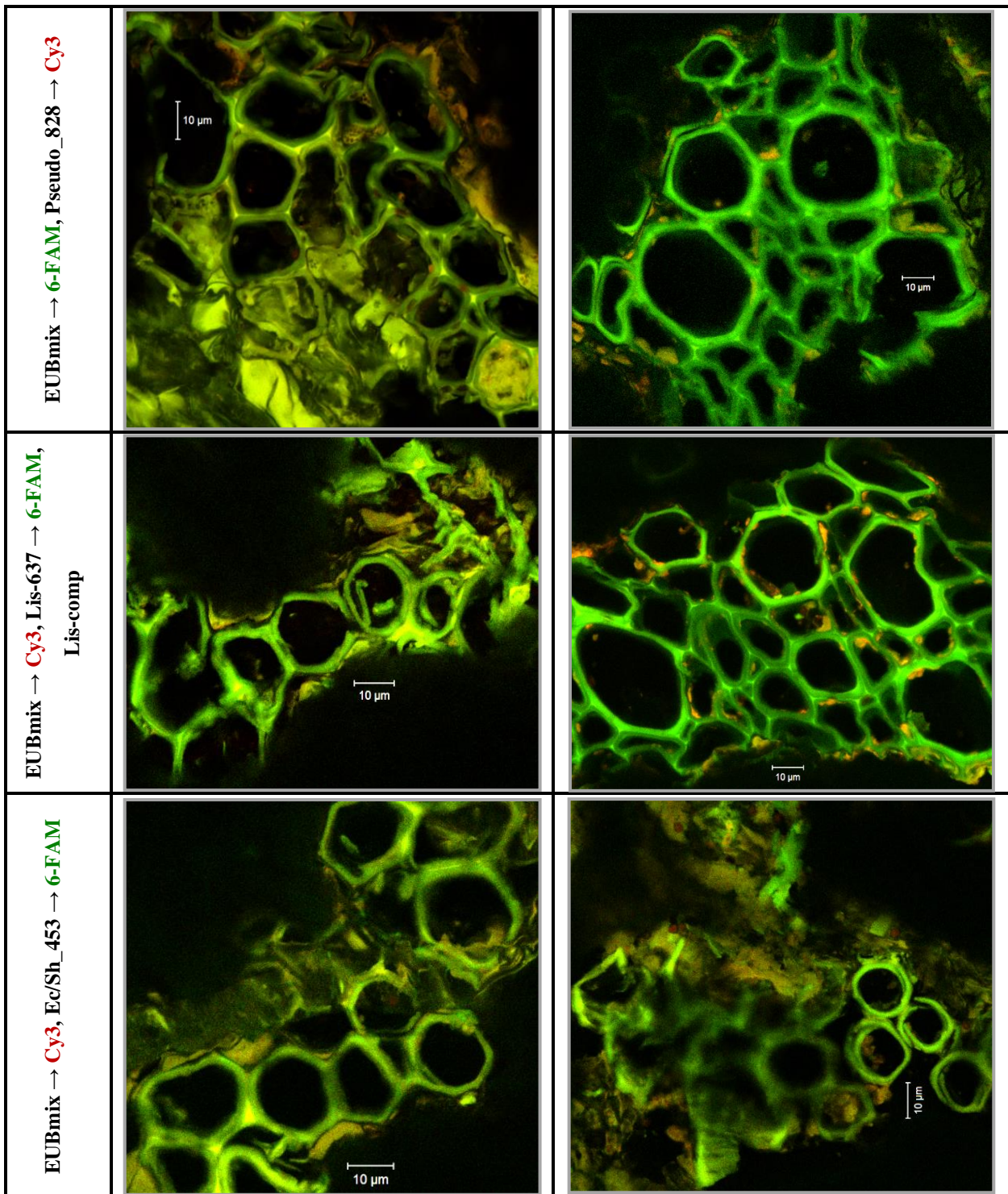
hogy talán természetesen is előfordulhatnak a beoltáshoz használt baktérium fajok, vagy olyan *Listeria*, esetleg *Escherichia* vagy *Shigella* fajok, amelyekkel a specifikus próbák hibridizálnak. Az EUBmix - Cy3, Lis-637 - 6-FAM próbák alkalmazása során, az egyik metszeten az előbb említett két sejthez hibridizált az általános próbakeverékek egyike, tehát itt is valószínűleg ismeretlen baktérium sejteteket sikerült lencsevégre kapni. A sejtek kis számából itt is azt lehet feltételezni, hogy megközelítőleg 10^3 sejt/g szövet koncentrációban lehettek jelen a baktériumok.





28. ábra. Steril kontroll növények keresztmetszeiről készült CLSM felvételek a FISH technika alkalmazását követően. Alkalmazott próbák leírása: próba neve → jelölése





29. ábra. Nem steril kontroll növények keresztmetszeteiről készült CLSM felvételek a FISH technika alkalmazását követően. Alkalmazott próbák leírása: próba neve → jelölése.

Összegezve az eredményeket elmondható, hogy a beoltáshoz használt mindkét potenciális endofita törzset (*C. hispalense* FPBSKK1 és *P. sp.* HPBBIK3) sikerült kimutatnom mind a három alkalmazott módszer felhasználásával:

- Sikerült hagyományos mikrobiológia módszerekkel kitenyésztenem a törzseket belső növényi szövetekből, majd a telepmorfológiai csoportosítást követően specifikus PCR-rel

és a 16S rRNS gén fragmentumok szekvencia egyezésével valószínűsítettem a beoltásra használt és a kitenyésztett törzsek azonosságát. További megerősítésként RAPD-PCR-es tipizálással is alátámasztottam ezen törzsek molekuláris ujjlenyomatainak egyezését.

- A növényből izolált össz-DNS-t használva templátként specifikus PCR-rel és 16S rRNS génszekvencia fragmentumok egyezésével is alátámasztottam a törzsek azonosságát.
- A FISH technika, azon belül az újonnan tervezett próbák és a konfokális szkennelő lézermikroszkópia használatával vizuálisan is igazoltam a két potenciális endofita növényben való jelenlétét, így ezek valódi endofitáknak tekinthetők.

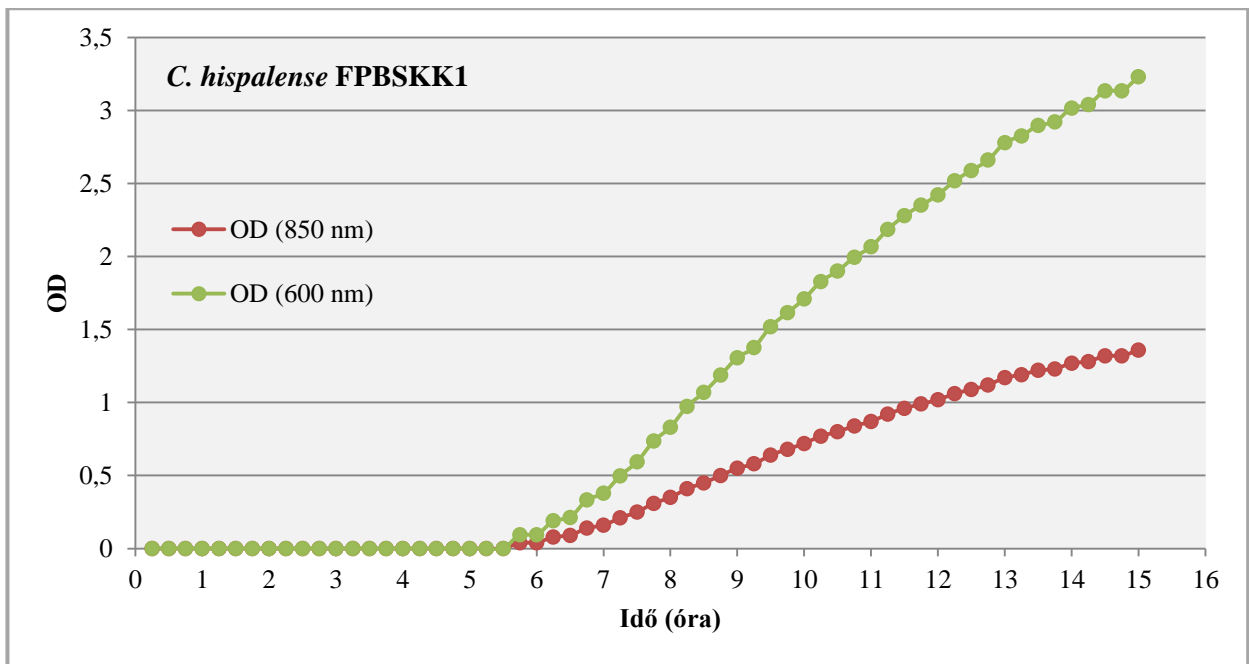
Az is kiemelendő, hogy sem a patogén, sem az opportunista patogén, sem a patogént modellező baktériumokat (*L. monocytogenes*, *E. coli* és *L. innocua*) nem sikerült kimutatnom egyik módszer alkalmazásával sem, ami arra utal, hogy az étkezési paprika magján keresztül nem internalizálódnak a vizsgált baktériumok a növényben.

4.12. A két endofita törzs patogén és patogént modellező baktériumokra gyakorolt hatása

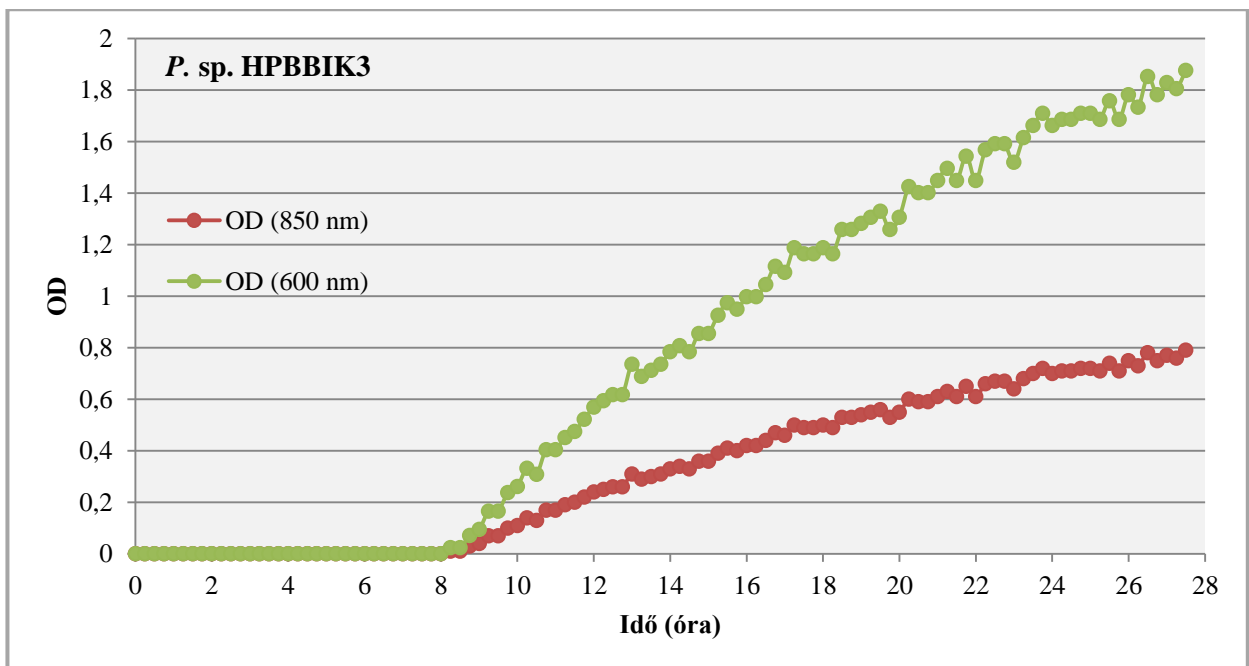
A palántanevelési kísérletekben a paprikamagok beoltásához használt két endofita törzs interakcióját külön-külön megvizsgáltam patogén, opportunista patogén és patogént modellező törzsekkel szemben is. Mivel a baktériumok többsége szekunder metabolitok termelése révén gátolja más mikrobák szaporodását, ezért a vizsgálat során a két tesztelt endofita törzset késői exponenciális, illetve korai stacioner szaporodási szakaszában használtam fel.

A **30. ábrán** a *C. hispalense* FPBSKK1, míg a **31. ábrán** a *P. sp.* HPBBIK3 törzs 850 nm-en mért optikai denzitása alapján mért szaporodási görbéje látható az idő függvényében, amelyekből kiolvasható, hogy mindkét törzs elérte a késői exponenciális szakaszt: míg a *C. hispalense* FPBSKK1 törzs 15 óra alatt ért ebbe a fázisba jóval nagyobb OD érték ($OD_{850\text{ nm}} = 1,36$) elérése mellett, addig a *P. sp.* HPBBIK3 törzs számára több mint 27 óra volt szükséges ezen szakasz eléréséhez jóval kisebb OD érték mellett ($OD_{850\text{ nm}} = 0,79$).

A felszaporított törzsek és sejtmentes fermentlevük patogént modellező, opportunista patogén és patogén törzsre gyakorolt hatását kontakt inhibíciós, valamint lyukdiffúziós módszerrel vizsgáltam, és a kapott eredményeket az 4.12.1-2. alfejezetekben foglaltam össze.



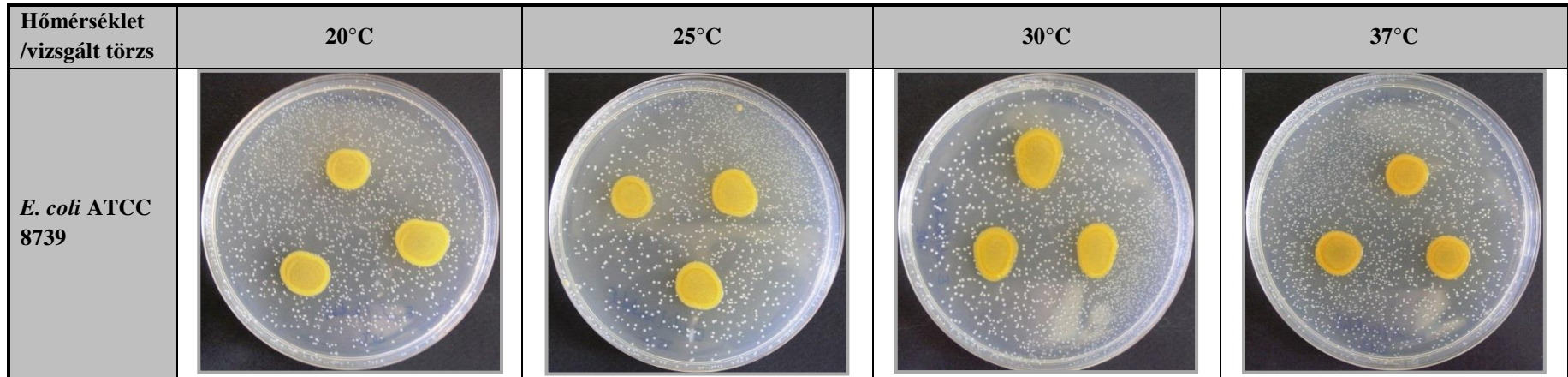
30. ábra. A *C. hispalense* FPBSKK1 szaporodási görbéje



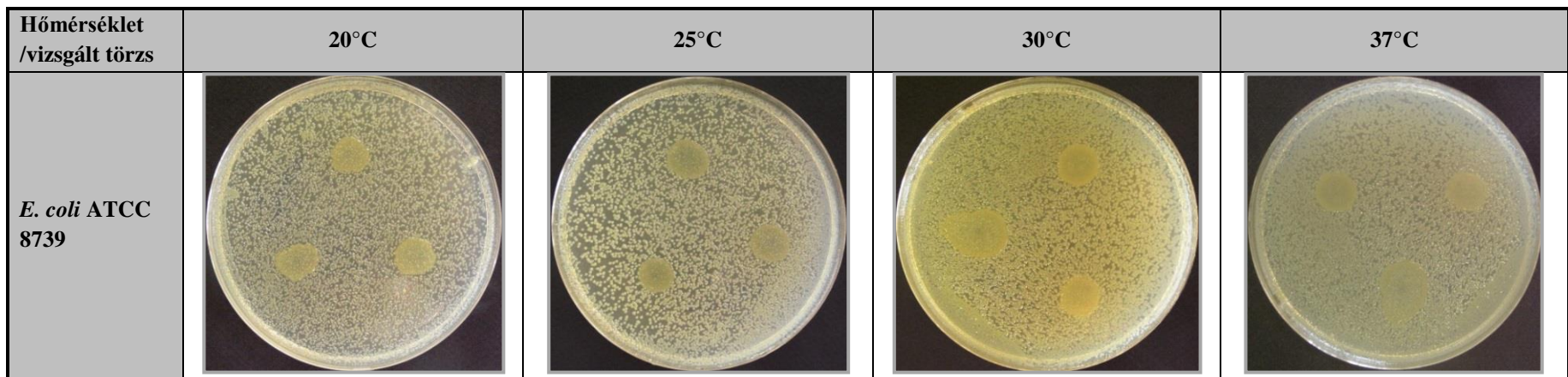
31. ábra. A *P. sp.* HPBBIK3 szaporodási görbéje

4.12.1. A kontakt inhibíciós vizsgálatok eredményei

A 3.6.10.1 alfejezetben leírtak alapján elvégzett vizsgálatokról a **32-33. ábrákon** láthatók példa fényképek. Az előzőleg masszív oltással, Petri-csészére felvitt *E. coli* ATCC 8739 törzsre felcseppentett endofita törzsek hatását szemléltetik a felvételek.



32. ábra. A *C. hispalense* FPBSKK1 törzs sejtszuszpenziójának vizsgálata az *E. coli* ATCC 8739 törzssel szemben különböző hőmérsékleteken



33. ábra. A *P. sp.* HPBBIK3 törzs sejtszuszpenziójának vizsgálata az *E. coli* ATCC 8739 törzssel szemben különböző hőmérsékleteken

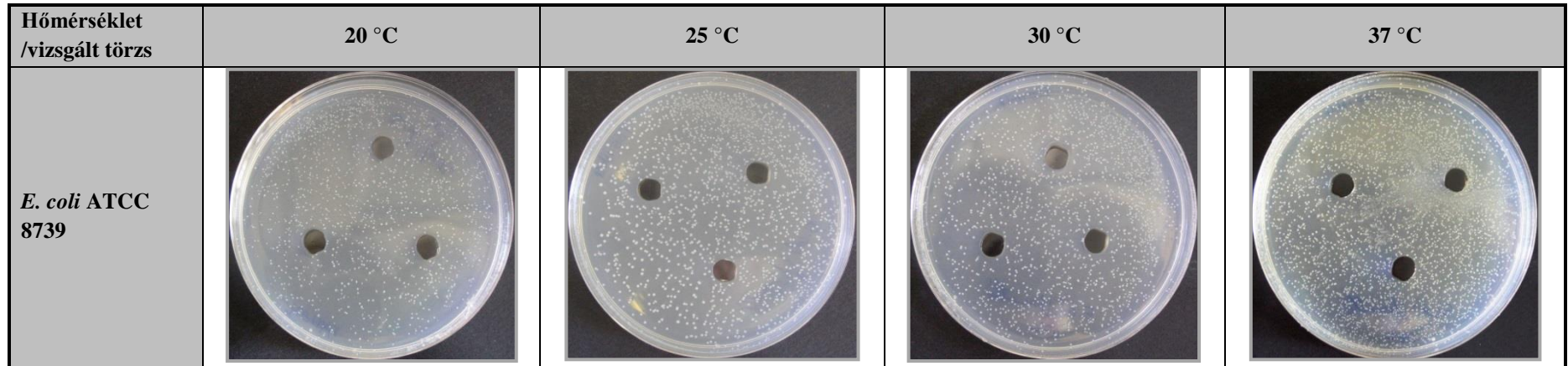
A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az adott vizsgálati körülmények között egyik endofita törzs sem mutatott kontakt inhibíciós vagy kontakt serkentő hatást egyik hőmérsékleten sem a patogén vagy modell törzssel szemben sem.

4.12.2. A lyukdiffúziós vizsgálatok eredményei

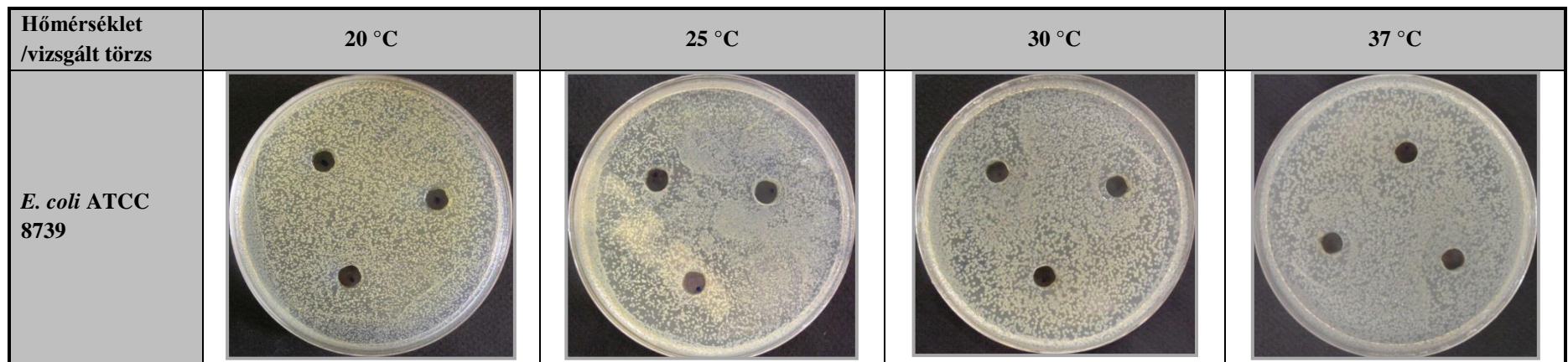
A két endofita törzs sejtmentes fermentlevének az előzőleg masszív oltással a Petri-csészére felvitt patogén, opportunistá patogén és patogént modellező törzsek növekedésére gyakorolt hatását szemléltetik a **34.** és **35. ábrán** lévő példa felvételek.

A kapott eredmények alapján, és amint a példa felvételek (lásd **34.** és **35. ábrán**) is szemléltetik elmondható, hogy akárcsak az előző vizsgálatban, itt sem volt gátló hatás tapasztalható, és serkentés is csak egy esetben volt megfigyelhető. A *P. sp.* HPBBIK3 törzs sejtmentes fermentleve kis mértékben serkentette a *L. innocua* 1010 törzs szaporodását 37 °C-on a lyukak környékén. Megfigyelve a más hőmérsékleten és törzsekkel kapott eredményeket ez egyedi eredménynek tekinthető, mert csak a *L. innocua* 1010 törzs esetében volt megfigyelhető és csak 37 °C-on, míg a *L. monocytogenes* CCM 4699, és az *E. coli* ATCC 8739 esetében ez nem volt tapasztalható.

Összegezve a két endofita törzs patogén, opportunistá patogén és patogént modellező baktériumokra gyakorolt hatását a kontakt inhibíciós és a lyukdiffúziós vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a vizsgált endofita törzsek a tesztelt körülmények között nem gyakoroltak gátló hatást a modell baktériumokra és a serkentő hatás sem volt számottevő.



34. ábra. A *C. hispalense* FPBSKK1 törzs sejtmentes fermentlévének lyukdiffúziós vizsgálata az *E. coli* ATCC 8739 törzssel szemben különböző hőmérsékleteken



35. ábra. A *P. sp.* HPBBIK3 törzs sejtmentes fermentlévének lyukdiffúziós vizsgálata az *E. coli* ATCC 8739 törzssel szemben különböző hőmérsékleteken

4.13. Új tudományos eredmények

1. Elsőként izoláltam talajkultúrás és hidroponikus körülmények között nevelt kétféle étkezési paprika fajtából (Hó és Kárpia) feltételezhetően endofita baktérium törzseket tenyésztési módszerrel.
2. Nemzetközileg elfogadott mag csírázási teszt adaptálásával és továbbfejlesztésével új vizsgálati módszert dolgoztam ki és alkalmaztam az endofitaként izolált baktériumok vizsgálatára abból a célból, hogy a mag csírázására negatív hatást mutatókat kiszűrjem.
3. A paprikamag csírázási eredmények és a filogenetikai vizsgálatok alapján kiválasztott két feltételezeten endofita törzs (*Chryseobacterium hispalense* FPBSKK1 és *Pseudomonas* sp. HPBBIK3) esetében mesterséges paprikamag fertőzéssel vizsgáltam bejutásukat a növénybe. Specifikus oligonukleotid próbák tervezésével a FISH-CLSM technika segítségével kimutattam kolonizációjukat a növények különböző szerveiben, amit a fertőzött növényekből izolált baktériumok és a növényi genomiális DNS molekuláris vizsgálataival is megerősítettem.
4. Paprika mag mesterséges fertőzésével vizsgáltam patogén és ezeket modellező baktériumok (*L. monocytogenes*, *E. coli* és *L. innocua*) növénybe való bejutását és kolonizációját. Tenyésztéssel és új primerpárokkal megvalósított specifikus PCR, valamint a FISH-CLSM technika segítségével nem sikerült ezek egyikét sem kimutatnom a növényből, ami arra utal, hogy az étkezési paprika magján keresztül nem internalizálódnak a vizsgált baktériumok a növényben.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Mivel egyre gyakrabban fordulnak elő nyers növényi élelmiszer okozta enterális megbetegedések, célszerű minél többet megtudni a növények belső szöveteikben élő baktériumokról. Minden növényben található endofita baktérium populációk, ezért az általam kiválasztott két különböző termesztési körülmény között nevelt két paprikafajtából is sikerült nagy számban izolálni őket. Az izolált baktériumok fenotípusos jellemzése alapján történt csoportosítással és a genotipizálással jelentősen le lehet csökkenteni a munkához feltétlen szükséges törzsek számát (170-ről 100 darab izolátumra). A RAPD-PCR-es tipizálással a fenotípusos csoportokból kiválasztott reprezentatív izolátumok tovább csoportosíthatók voltak annak ellenére, hogy az egyik RAPD primer nem volt megfelelően alkalmazható. Mindez megerősíti, hogy a fenotípusos jellemzés nem kellő hatékonyságú, és a genotipizálással való együttes alkalmazás javasolható, mert mindkét módszernek vannak előnyei és korlátai.

A 100 darab izolátum azonosítása tekintetében 53%-ot sikerült faj szinten is azonosítani, ami sejtetheti a potenciálisan új fajok izolálásának tényét. A *Pseudomonas* nemzetségbe tartozó izolátumok esetében ez az arány kevesebb, mint 30% volt annak ellenére, hogy az *rpoB* gén részleges szekvenálására is sor került. Tehát, további gének (univerzális és specifikus) szekvenálása is szükséges a pontos azonosításhoz, valamint ezen túlmenően elengedhetetlen egy olyan adatbázis elkészítése, amelyben megtalálhatók az összes elfogadott, identifikált faj típustörzsére vonatkozó génszekvencia információk.

A 100 izolátum 64 KTE-be való sorolhatósága a nagyfokú diverzitást támasztja alá, a filogenetikai törzsfaszerkesztés pedig egy olyan eszköz, amely kiválóan rámutat azon törzsekre, amelyekre jó eséllyel lehet specifikus oligonukleotid próbákat tervezni a későbbi FISH-sel való detektáláshoz.

Az izolátumok többsége a gyökerekből származott, mivel a rizoszférában és a gyökereket körülvevő talajrétegben nagy számban található olyan baktériumok, amelyek obligát, fakultatív vagy passzív módon képesek az endofita életmódra. A föld feletti zöld szervekből és a termésekből is sikerült számos baktériumot izolálni. Előbbi helyről egy, a *Staphylococcus haemolyticus*, míg utóbbi helyről egy *Enterobacter cancerogenus* és egy *Pantoea brenneri* opportunista patogénként leírt törzset sikerült izolálni. Ezen törzsek jelenléte felhívja a figyelmet arra, hogy immungyenge egyének esetében a termés elfogyasztása akár megbetegedést is okozhat. A termesztési körülmények tekintetében elmondható, hogy összességében több törzs származott a hidroponikus növényekből, mint a talajkultúrákból, ami még inkább igaz a palántákra. Ezzel ellentétben, a termések esetében ez az arány fordított és még nagyobb mértékű volt. Ebből az a következtetés vonható le, hogy a hidroponikus termesztés összességében jobban

hozzájárul az endofita mikrobióta biodiverzitásának növeléséhez, mint a talajkultúrás, ami főként a plántákban előforduló arányokon alapszik, viszont a termések tekintetében éppen fordított helyzet áll fenn. Továbbá a termesztési fajtákat vizsgálva, összességében egy olyan kivételtől eltekintve, ahol a termesztési körülménynek lehetett befolyása, lényegében részleteiben is több törzs származott a Kárpiából, mint a Hó fajtából. Ez arra enged következtetni, hogy az endofiták biodiverzitása sok más tényezőtől kívül nem csak a növények termesztési körülményeitől, hanem a termesztett fajtától és a kettő kombinációjától is függhet.

A paprikamag csírázására gyakorolt hatásuk alapján elmondható, hogy a vizsgált 64 törzs 64,1%-a semleges befolyásolta a magok csírázását, továbbá 15,6%-uk serkentette, ezért ezek feltételezett endofitaként vehetők számba. A baktériumok paprikamag csírázásra gyakorolt hatásának vizsgálata azért lehet hasznos, mert alkalmazásával fény deríthető a felületi fertőtlenítést túlélő, nem endofita törzsekre, valamint esetleges továbbfejlesztésével a növényi növekedést direkt módon serkentő endofiták is kimutathatók lehetnek. Mivel azon törzsek, amelyek serkentik a növények növekedését, nemcsak a kicsírázó magok arányát növelhetik, hanem a kis csíranövény biomassza termelését is, ezért érdemes lenne összehasonlítani a különböző baktériumokkal fertőzött növények fejlettségi szintjét is a csírázás alatt, ezzel detektálni a növényt serkentő endofita baktériumokat.

A különböző baktérium törzsekkel fertőzött magokból nevelt palánták vizsgálata során a patogént modellező és patogén törzsek esetében egyik módszerrel, egyik mintából sem sikerült kimutatni jelenlétüket, amiből arra lehet következtetni, hogy nem jutottak be a növényi endoszféra, vagy ha be is jutottak, nem éltek túl a palántanevelési időszakot. Valószínűsíthető, hogy ezen törzsek nem rendelkeztek a növényi endoszféra való bejutás és az ott való túléléshez szükséges képességekkel, tulajdonságokkal. A jövőben érdemes lenne azt is megvizsgálni, hogy milyen hatása van az endofitákkal kevert tenyészetekben (azonos és különböző arányokban keverve) való fertőzésnek az eddig vizsgált humánpatogén és humánpatogént modellező törzsek növényi endoszféra való bejutására, valamint túlélésére. Ez azért lenne fontos, hogy megvizsgálhassuk, milyen módon hatnak a bizonyítottan endofita törzsek a patogének internalizációjára.

A két bizonyítottan endofita törzs sem kontakt módon, sem extracelluláris metabolitjai (sejtmentes fermentlevek) révén nem fejtett ki sem serkentő, sem gátló hatást a két patogént modellező és a patogén törzsekre. Ez természetesen nem jelenti azt, hogy a 64 reprezentatív törzs közül egyik sem rendelkezik patogén baktériumokkal szemben antagonista hatással. Ezért érdemes lenne a jövőben más törzseket is tovább vizsgálni valódi endofita voltuk igazolására és a humánpatogének növényi internalizációjának csökkentése szempontjából.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az étkezési paprika egy világszinten nagy mennyiségben termelt, táplálkozás-élettani és gazdasági szempontból jelentős zöldségnövény, továbbá a fogyasztók körében nyersen és sült vagy főtt állapotában is közkedvelt élelmiszer.

Manapság a nyersen fogyasztott növényi élelmiszerek által világszinten egyre gyakrabban fordulnak elő baktériumok okozta megbetegedések. A baktériumok tekintetében leggyakrabban állati eredetű humánpatogének, de az opportunistáknak is összefüggésbe hozhatók járványokkal, és egyre inkább világossá válik, hogy ezek a mikrobák a növények belsejében is képesek túlélni. Mivel az étkezési paprika gyakran nyersen kerül fogyasztásra, ezért érdemes mikrobiológiai és élelmiszerbiztonsági szempontból is vizsgálni. A humánpatogének növénybe való bejutásában és túlélésében igen nagy szerepük van a növény–humánpatogén, illetve az endofita–humánpatogén közötti interakcióknak. Annak érdekében, hogy jobban megérthessük e kapcsolatokat és így csökkenthessük az élelmiszerbiztonsági kockázatot, szükséges vizsgálnunk a növényben élő endofita baktériumokat mind minőségi, mind mennyiségi szempontból, továbbá szükséges fényt derítenünk a humánpatogén baktériumokkal való kapcsolatuk jellegére.

A szakirodalomban eddig fellelhető források alapján a paprika endofita baktériumait többen is vizsgálták már kvalitatív és kvantitatív szempontból a különböző környezeti tényezők függvényében, továbbá vizsgálták a növényi növekedésre kifejtett hatásukat, valamint növénypatogén gombákkal, baktériumokkal szembeni antagonista hatásukat is. Azonban eddig még senki nem vizsgálta a manapság szokványos hidroponikus, illetve talajkultúrás körülmények között nevelt Hó és Kárpia fajták bakteriális endofitáit, valamint azok humánpatogénekre kifejtett hatását. Munkám során célul tűztem ki az említett körülmények között nevelt, két étkezési paprikafajtában élő, tenyészthető endofita baktériumok izolálását, azonosítását, mutualista törzsek kiválasztását, azok valódi endofita voltának igazolását és e törzsek humánpatogén, illetve humánpatogént modellező törzsekre gyakorolt hatásának vizsgálatát.

A kétféle módon termesztett, két különböző étkezési paprika fajtából összesen 170 baktériumot sikerült izolálnom, amelyeket a vizsgált fenotípusos jellemzőik alapján 138 fenotípusos csoportba, majd a RAPD-PCR-es tipizálással 100 genotípusba sikerült besorolnom. Ezen izolátumok közül a *Pseudomonas* nemzetségbe tartozókat egy specifikus PCR alkalmazásával detektáltam, majd mind a 100 izolátum azonosítását elvégeztem a 16S rRNS, valamint a *psuedomonaszok* esetében az *rpoB* génszekvencia adatok bevonásával is. Az izolátumok 53%-át sikerült faj szinten azonosítanom, ami sejteti, hogy valószínűleg még korábban le nem írt fajokat is sikerült izolálni. A *psuedomonaszoknak* csak nagyjából 30%-át sikerült azonosítanom

faj szinten annak ellenére, hogy az rpoB génszekvencia adatokat is figyelembe vettem. Ezen arány javítására további génszekvencia információk és a *Pseudomonas* nemzetség összes típusörzsére vonatkozóan egy komplett génszekvencia adatbázisra lenne szükség.

A 16S rRNS génszekvencia adatokkal filogenetikai vizsgálatokat végeztem, amelynek alapján a 100 izolátum 64 KTE-be volt sorolható, ami a magas fokú diverzitást támasztja alá. Az KTE-k nagy többsége a Proteobacteria, Firmicutes és az Actinobacteria törzsbe volt sorolható. A γ -Proteobacteria volt a legnépesebb osztály, amelyet a DNS-ben alacsony GC tartalmú Gram-pozitív Bacilli és a magas GC tartalmú Gram-pozitív Actinobacteria osztály követ a sorban. Az α -Proteobacteria és a β -Proteobacteria osztály kisebb mértékben, míg a Flavobacteria, illetve a Deinococci osztály csak egy-egy KTE-vel képviseltette magát. Az eredményekből megállapítható, hogy a *Pseudomonas* KTE-k voltak a dominánsabbak nemcsak a γ -Proteobacteria osztályban, hanem valamennyi osztály között.

Az izolátumok növényben való eloszlását tekintve megállapítható, hogy többségük a gyökerekből lett izolálva, ami érthető is, mivel a rhizoszférában és a gyökereket körülvevő talajrétegben nagy számban található obligát, fakultatív vagy passzív endofita életmódra képes baktériumok. Továbbá a gyökérből sikerült három opportunista humánpatogén törzset is izolálni, a *Leclercia adecarboxylata* fajból. A föld feletti zöld szervekből és termésekből is származtak izolátumok. Előbbi helyekről egy, a *Staphylococcus haemolyticus* opportunista patogén fajba tartozó törzset is izoláltam. A paprika termésekből egy, az *Enterobacter cancerogenus* és egy, a *Pantoea brenneri* opportunista patogénként leírt fajba tartozó törzset is izoláltam. Ezek a megfigyelések felhívhatják a figyelmet a termény élelmiszerbiztonsági kockázatára, elsősorban immungyenge egyének esetén. A termesztési körülmények tekintetében elmondható, hogy összességében több törzs származott a hidroponikus növényekből, mint a talajkultúrákban, ami még inkább igaz volt a palántákból származó törzsekre. Ezzel ellentétben, a termések esetében ez az arány fordított és még nagyobb mértékű volt. Tehát úgy tűnik, hogy a hidroponikus termesztés összességében jobban hozzájárul az endofita mikrobióta biodiverzitásának növeléséhez, viszont a termések tekintetében éppen fordított helyzet állt fenn. Továbbá a termesztési fajtákat értékelve, a hidroponikusan nevelt termésektől eltekintve, több törzs származott a Kárpiából, mint a Hó fajtából, ami arra utal, hogy a vizsgált endofiták biodiverzitására sok más tényezőkön kívül, nem csak a növénytermesztési körülmények, hanem a termesztett fajta és a kettő kombinációja is hatással lehet.

Megvizsgáltam a KTE-eket reprezentáló 64 törzs paprikamag csírázására gyakorolt hatását, és az eredményekkel szemben támasztott követelmények alapján 79,7%-uk nem csökkentette, sőt e törzsek 15,6%-a kifejezetten stimulálta a magok csírázását. A fennmaradt 20,3% enyhén vagy

erősen csökkentette a csírázási százalékot. Mivel a mutualista endofiták nem gátolják a növények élettevékenységét, ezért ezzel az eljárással kideríthető, hogy melyek azok a törzsek, amelyek esetleg a felületi fertőtlenítést túlélve kerültek izolálásra és/vagy valójában nem mutualista endofiták. Továbbá, mivel ez a módszer alkalmas lehet a csíranövények méretbeli különbségeinek detektálására, ezért a vizsgálati idő megnyújtásával ki lehetne mutatni azon baktérium törzseket, amelyek direkt módon képesek serkenteni a növény növekedését.

A filogenetikai vizsgálatok alapján rokonsági szempontból a többitől távol eső, és a csírázási eredmények alapján stimuláló törzsek összevetésével kiválasztott izolátumok közül a *C. hispalense* FPBSKK1, illetve a *P. sp.* HPBBIK3 törzsre sikerült specifikus oligonukleotid próbákat terveznem a FISH-CLSM technikával való kimutatásukhoz. Ezt követően e két törzssel és egy humánpatogént modellező (*L. innocua* 1010), egy humánpatogén (*L. monocytogenes* CCM 4699), valamint egy opportunistá humánpatogén (*E. coli* ATCC 8739) törzssel fertőztem külön-külön paprikamagokat, majd a felnevelt palántákból tenyésztésem, PCR-es és FISH technikával próbáltam igazolni a baktérium törzsek növényi szövetekbe való internalizációját vagy ennek ellenkezőjét. Mindhárom technikával sikerült igazolni a két feltételezetten endofita törzs növényi endoszférában való jelenlétét, ezzel igazolva valódi endofita voltukat. Ezzel ellentétben sem a humánpatogént modellező, sem az opportunistá humánpatogén, sem a humánpatogén törzset nem tudtam kimutatni egyik mintából sem, bármely technikát is alkalmaztam. A jövőben érdemes lenne a vizsgált endofiták és humánpatogének/ humánpatogént modellező törzsek kevert tenyészteteivel fertőzni a magokat annak érdekében, hogy kiderüljön, vajon az endofiták segítik vagy gátolják a humánpatogének bejutását, túlélését a növényben.

A két bizonyítottan valódi endofita törzs hatását *in vitro* módon vizsgáltam kontakt inhibíciós és lyukdiffúziós módszerrel a humánpatogént modellező, az opportunistá humánpatogén, valamint a humánpatogén törzsre. Az eredmények alapján a két endofita törzs nem csak kontakt módon együtt tenyésztve, hanem sejtmentes fermentlevét használva is neutrálisnak bizonyult a vizsgált törzsekre. Ez természetesen nem jelenti azt, hogy a 64 reprezentatív törzs közül egyik sem rendelkezik patogén baktériumokkal szembeni antagonista hatással, ezért érdemes lenne legalább a csírázó magok arányát növelő, de akár a neutrális hatású törzseket is tovább vizsgálni a valódi endofita voltuk és a humánpatogének növényi internalizációját csökkentő hatásuk igazolása érdekében is.

7. SUMMARY

Sweet pepper is an economically, nutritional-physiologically important vegetable, produced globally in high amounts and it is consumed with predilection by the consumers as a raw or boiled/fried food.

Nowadays plant based foods consumed raw are increasingly associated with human diseases caused by bacteria. In terms of bacteria, outbreaks were most often associated with human pathogens from animal origin and opportunistic human pathogens as well and it is becoming increasingly obvious that these pathogens are able to survive inside the plants. Since sweet pepper is often consumed raw, it is worth investigating this food from microbiological and food safety aspects. Plant – human pathogen and endophyte – human pathogen interactions have an important role in the internalization and survival of the human pathogens. In order to understand these interactions more clearly, and thereby reduce the food safety risk, it is necessary to analyse endophytes in terms of quality, quantity, and furthermore to reveal the nature of their interactions with human pathogenic bacteria.

Based on scientific data found in literature it can be assessed that many scientists have investigated the endophytic bacterial community of the sweet pepper qualitatively and quantitatively in relation to different environmental factors. Furthermore, they have analysed their plant-growth-promoting properties and antagonistic effects against plant pathogenic fungi and bacteria. Nevertheless, none of them has investigated the bacterial endophytes of Hó and Kárpia pepper cultivars grown in hydroponics and soil culture, as well as their effects on human pathogens. During the research work my aims were to isolate and identify culturable endophytic bacteria from the above mentioned cultivars and growing conditions. Furthermore, I aimed to select mutualistic strains, prove their “true” endophytic nature and finally investigate their effects on human pathogen modelling and human pathogenic strains.

From the two cultivars grown in two different conditions totally 170 bacteria were isolated, which were classified into 138 phenotypic groups based on their investigated phenotypic characteristics. By using RAPD-PCR there could be created 100 genotypic clusters from the above mentioned phenotypic groups. *Pseudomonas* isolates were detected by a genus specific PCR, then all 100 isolates (one isolate from each genotypic cluster) were identified by sequencing the 16S rDNA genes. Moreover, in case of *Pseudomonas* isolates *rpoB* genes were additionally analysed. It was possible to identify 53% of the isolates at species level, which suggests that novel bacterial species were isolated as well. Unfortunately, only nearly 30% of the *Pseudomonas* isolates could be identified at species level, even though *rpoB* sequence data were

taken into account. Further gene sequence information and a complete gene sequence database for all *Pseudomonas* type strains would be needed in order to improve this ratio.

Phylogenetic analyses using 16S rDNA sequence data were done. Based on the results the 100 isolates were clustered into 64 OTU which confirms the high level of diversity. Most of the OTUs could be classified into the Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria phyla. γ -Proteobacteria were the most populous class, followed by the Gram-positive Bacilli with low GC-content DNA and the high GC-content Gram-positive Actinobacteria class. α -Proteobacteria and β -Proteobacteria classes were represented in lower extent, while Flavobacteria and Deinococci classes had only one OTU. From the results it can be assessed that *Pseudomonas* OTUs were the most dominant ones not only in γ -Proteobacteria but also among all classes.

Considering the repartition of the isolates in plant it can be concluded that most of them were isolated from the roots, because in rhizosphere and soil-surrounding roots bacteria can be found in large number which are capable for obligate, facultative or passive endophytic lifestyle. Furthermore, it was possible to isolate three opportunistic human pathogen strains from the roots, which are members of *Leclercia adecarboxylata* species. Strains from the above-ground green tissues and fruits were also isolated, furthermore one opportunistic human pathogen, *Staphylococcus haemolyticus* strain was isolated as well. Two strains highly important from food safety aspects were originated from the pepper fruits. These isolates are members of *Enterobacter cancerogenus* and *Pantoea brenneri* species described as opportunistic human pathogens. This observation may draw attention to the food safety risk of this crop, especially in case of immunocompromised individuals. In terms of growing conditions it can be observed that in total more strains were derived from hydroponics than from soil grown plants, which was even truer for the seedlings derived ones. In contrast, this ratio was reversed and even more pronounced for the fruits derived strains. Thus, it appears that in total the hydroponic cultivation contributes to the biodiversity increment of endophytic microbiota, however in respect of the fruits the reverse situation was true. Furthermore, assessing the biodiversity in terms of cultivars, apart from the hydroponics grown fruits, more strains were originated from Kárpia, than from Hó cultivars. This suggests that, apart from many other factors, the biodiversity of analysed endophytes was affected not only by the plant growing conditions, but the cultivars and the combination of these two factors as well.

The effects of the 64 OTU representing strains were investigated on pepper seed germination, and based on the set requirements 79.7% of them were neutral. However, 15.6 % of these neutral strains essentially promoted the seed germination. The remaining 20.3% slightly or strongly reduced the number of germinating seeds. Since mutualistic endophytes are not inhibiting the

plants' life activities, therefore by using this method it is possible to detect strains that could survive surface sterilisation and/or are not mutualistic endophytes. Since this method can be suitable for determination of differences in seedling size, using elongated investigation time those strains could also be detected which have direct plant growth promotion effects.

From strains being at greater distance from the others in terms of phylogenetic relationship and having stimulatory effects on seed germination, *C. hispalense* FPBSKK1 and *P. sp.* HPBBIK3 were selected to design specific oligonucleotide probes for their detection with FISH-CLSM technique. Applying these two strains, two human pathogen modelling (*E. coli* ATCC 8739, *L. innocua* 1010 - foodborne) and one human pathogen (*L. monocytogenes* CCM 4699) strain in monocultures, pepper seeds were infected separately. From the grown seedlings internalization (or even the opposite) of the selected strains was analysed into the plant tissues by cultivation based, PCR and FISH techniques. All three methods confirmed the presence of the two putative endophytic strains in plant endosphere, thus confirming their true endophytic nature. In contrast, neither the two human pathogen modelling strains, nor the human pathogen could be detected from any of the samples by the applied methods. In the future it would be worthwhile to infect seeds with the mixture of these human pathogen modelling/human pathogen and endophytes in order to reveal that endophytes are helping or hindering the internalization and/or survival of human pathogens.

Finally, effects of the two truly endophytic strains were analysed *in vitro* on the pathogen modelling and the pathogenic strain by using contact inhibition and well diffusion methods. Based on the results, the two endophytic strains proved to be neutral for the tested strains not only in a contact way by co-culturing them, but also by using their cell-free supernatant. Of course, this does not mean that none of the 64 representative strains has antagonistic effects against pathogenic bacteria, therefore it would be worth to further analyse at least the seed germination promoting, but even the strains with neutral effects, in order to prove their true endophytic nature and their effects against the internalisation of human pathogens into pepper plants as well.

8. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- ABBOTT, S. L., JANDA, J. M. (1997): *Enterobacter cancerogenus* ("*Enterobacter taylorae*") infections associated with severe trauma or crush injuries. *Am J Clin Pathol*, 107, 359-61. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/107.3.359>
- ABD-ELSALAM, K. A. (2003): Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2, 91-95. Doi: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2003.000-1019>
- AIT TAYEB, L., AGERON, E., GRIMONT, F., GRIMONT, P. A. (2005): Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Res Microbiol*, 156, 763-73. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.009>
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-10. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
- AMANN, R. I., BINDER, B. J., OLSON, R. J., CHISHOLM, S. W., DEVEREUX, R., STAHL, D. A. (1990): Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol*, 56, 1919-25. URL: <http://aem.asm.org/content/56/6/1919.short?rss=1&ssource=mfc>
- ANDREOTE, F. D., DE ARAUJO, W. L., DE AZEVEDO, J. L., VAN ELSAS, J. D., DA ROCHA, U. N., VAN OVERBEEK, L. S. (2009): Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and its effect on associated bacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75, 3396-406. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00491-09>
- ANDRIGHETTO, C., ZAMPESE, L., LOMBARDI, A. (2001): RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Lett Appl Microbiol*, 33, 26-30. Doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00939.x>
- ANONYM. (2008): *Lágy szárú növények. A paradicsom és a paprika* [Online]. Oktatási hivatal (www.sulinet.hu). Available: <http://tudasbazis.sulinet.hu/hu/termesztudomanyok/termesztismeret/ember-a-termeszetben-2-osztaly/lagy-szaru-novenyek/a-paradicsom-es-a-paprika> [Accessed 2016.01.10.]
- ARI, E. (2012): *Molekuláris filogenetikai elemzések egy diszkrét matematikai módszer, a Boole analízis segítségével*. PhD disszertáció, Eötvös Loránd Tudományegyetem. 1, 3, 5, 12-13. URL: http://teo.elte.hu/minosites/ertekezes2012/ari_e.pdf
- ASADUZZAMAN, M., SAIFULLAH, M., MOLLICK, A. S. R., HOSSAIN, M. M., HALIM, G., ASAO, T. (2015): Influence of soilless culture substrate on improvement of yield and produce quality of horticultural crops. In: ASADUZZAMAN, M. (ed.) *Soilless Culture - Use of Substrates for the Production of Quality Horticultural Crops*. InTech. 1-2 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.5772/58679>
- ATLAS, R. M. (2010): *Handbook of microbiological media*, Florida, CRC Press. 2043 p. URL: <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Microbiological-Media-Fourth-Edition/Atlas/9781439804087>
- BACON, C. W., HINTON, D. M. (2007): Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. In: GNANAMANICKAM, S. S. (ed.) *Plant-Associated Bacteria*.

Dordrecht, The Netherlands: Springer 155-157 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7>

- BALÁZS, S. (1994): *Zöldségtermesztők kézikönyve*, Budapest, Magyarország, Mezőgazda Kiadó. 249-252 p. URL: <http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tkt/zoldsegtermesztok/adatok.html>
- BATHE, S., HAUSNER, M. (2006): Design and evaluation of 16S rRNA sequence based oligonucleotide probes for the detection and quantification of *Comamonas testosteroni* in mixed microbial communities. *BMC Microbiology*, 6, 54-54. Doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-6-54>
- BECZNER, J., BATA-VIDÁCS, I. (2009): Microbiology of plant foods and related aspects. *Acta Alimentaria*, 38, 99-115. Doi: <http://dx.doi.org/10.1556/AAlim.38.Suppl.7>
- BELÁK, Á., HÉHER, B., FÜSTÖS, Z., KOVÁCS, M., MARÁZ, A. (2014): Endophytic bacteria from *Capsicum annuum* var. *grossum* cultivars and their inhibitory effects on *Listeria monocytogenes*. *Acta Alimentaria*, 43, 9-20. Doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1556/AAlim.43.2014.Suppl.3>
- BENNASAR, A., MULET, M., LALUCAT, J., GARCIA-VALDES, E. (2010): PseudoMLSA: a database for multigenic sequence analysis of *Pseudomonas* species. *BMC Microbiol*, 10, 118. Doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-118>
- BERG, G., GRUBE, M., SCHLOTTER, M., SMALLA, K. (2014): Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Front Microbiol*, 5, 148. Doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00148>
- BERG, G., HALLMANN, J. (2006): Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes. In: SCHULZ, B., BOYLE, C., SIEBER, T. (eds.) *Microbial Root Endophytes*. Heidelberg, Germany: Springer SBM. 56 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/3-540-33526-9>
- BERGER, C. N., SODHA, S. V., SHAW, R. K., GRIFFIN, P. M., PINK, D., HAND, P., FRANKEL, G. (2010): Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol*, 12, 2385-97. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>
- BISHA, B. (2009): *Fluorescence in situ hybridization-based detection of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes in complex food matrices*. PhD disszertáció, Iowa State University. 32-36 p. URL: <http://lib.dr.iastate.edu/etd/10609>
- BLOEMBERG, G. V., LUGTENBERG, B. J. (2001): Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol*, 4, 343-50. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00183-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00183-7)
- BOSLAND, P. W., VOTAVA, E. J. (2012): *Peppers: Vegetable and Spice Capsicums*, Boston, USA, CAB International. 6-15, 119-139 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1079/9781845938253.0000>
- BRADY, C. L., CLEENWERCK, I., VENTER, S. N., ENGELBEEN, K., DE VOS, P., COUTINHO, T. A. (2010): Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium cypripedii* (Hori 1911) Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 to the genus as *Pantoea cypripedii* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 2430-40. Doi: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.017301-0>

- CARDINALE, M. (2014): Scanning a microhabitat: plant-microbe interactions revealed by confocal laser microscopy. *Front Microbiol*, 5, 94. Doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00094>
- CARDINALE, M., GRUBE, M., ERLACHER, A., QUEHENBERGER, J., BERG, G. (2015): Bacterial networks and co-occurrence relationships in the lettuce root microbiota. *Environ Microbiol*, 17, 239-52. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12686>
- CARLONE, G. M., VALADEZ, M. J., PICKETT, M. J. (1982): Methods for distinguishing gram-positive from gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 16, 1157-1159. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC272558/>
- CATARA, V. (2007): *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource? *Mol Plant Pathol*, 8, 233-44. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00391.x>
- CHANDRASHEKHARA, NIRANJANRAJ, S., DEEPAK, S. A., AMRUTHESH, N. K., SHETTY, P. N., SHETTY, H. S. (2007): Endophytic bacteria from different plant origin enhance growth and induce downy mildew resistance in pearl millet. *Asian J. Plant Pathol.*, 1, 1-11. Doi: <http://dx.doi.org/10.3923/ajppaj.2007.1.11>
- CHEN, B.-Y., JANES, W. H., CHEN, S. (2002): Computer Programs for PCR Primer Design and Analysis. In: CHEN, B.-Y., JANES, W. H. (eds.) *Pcr Cloning Protocols*. 2nd ed. Totowa: Humana Press. 19-21 p. URL: http://download.springer.com/static/pdf/101/bfm%253A978-1-59259-177-0%252F1.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Fbook%2Fbfm%3A978-1-59259-177-0%2F1&token2=exp=1473165827~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F101%2Fbfm%25253A978-1-59259-177-0%252F1.pdf%3ForiginUrl%3Dhttp%253A%252F%252Flink.springer.com%252Fbook%252Fbfm%253A978-1-59259-177-0%252F1*~hmac=4b558769d324880766deee803592a9682f3e7da4adcc1b61634ea602e742cec6
- COMPANT, S., CLÉMENT, C., SESSITSCH, A. (2010): Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 669-678. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- COMPANT, S., MITTER, B., COLLI-MULL, J. G., GANGL, H., SESSITSCH, A. (2011): Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb Ecol*, 62, 188-97. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-011-9883-y>
- DAFFONCHIO, D., RADDADI, N., MERABISHVILI, M., CHERIF, A., CARMAGNOLA, L., BRUSETTI, L., RIZZI, A., CHANISHVILI, N., VISCA, P., SHARP, R., BORIN, S. (2006): Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol*, 72, 1295-301. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.2.1295-1301.2006>
- DAIMS, H., BRUHL, A., AMANN, R., SCHLEIFER, K. H., WAGNER, M. (1999): The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol*, 22, 434-44. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020\(99\)80053-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020(99)80053-8)
- DALTON, D. A., KRAMER, S., AZIOS, N., FUSARO, S., CAHILL, E., KENNEDY, C. (2004): Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus*

- mollis*) from Oregon. *FEMS Microbiol Ecol*, 49, 469-79. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.010>
- DEÁK, T. (2006): *MikroBioDiverzitás*, Budapest, AULA Kiadó. ISBN: 9639585920
- DE OLIVEIRA COSTA, L. E., DE QUEIROZ, M. V., BORGES, A. C., DE MORAES, C. A., DE ARAÚJO, E. F. (2012): Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1562-1575. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838220120004000041>
- DEERING, A. J., MAUER, L. J., PRUITT, R. E. (2012): Internalization of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in plants: A review. *Food Research International*, 45, 567-575. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.058>
- DÉLKERTÉSZ. (2012): TERMÉKLEÍRÁS a „Szentesi paprika” oltalom alatt álló földrajzi jelzés (OFJ) földrajzi árujelző bejegyzése iránti kérelemhez. Szentés, Magyarország: Földművelésügyi Minisztérium Élelmiszerlánc-felügyeletért felelős Államtitkárság. 3-4 p. URL: http://elelmiszerlanc.kormany.hu/download/3/96/50000/Szentesi_paprika_term%C3%A9kle%C3%ADr%C3%A1s_final.pdf
- EDEN, P. A., SCHMIDT, T. M., BLAKEMORE, R. P., PACE, N. R. (1991): Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int J Syst Bacteriol*, 41, 324-5. Doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-41-2-324>
- EDGAR, R. C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32, 1792-7. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- EDWARDS, U., ROGALL, T., BLOCKER, H., EMDE, M., BOTTGER, E. C. (1989): Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 17, 7843-53. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/17.19.7843>
- EVTUSHENKO, I. L., TAKEUCHI, M. (2006): The Family Microbacteriaceae. In: DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K. H., STACKERBRANDT, E. (eds.) *The Prokaryotes*. 3 ed. NY, USA: Springer Science. 1065 p. Doi: http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30743-5_43
- FAOSTAT. (2015): *FAO Statistics* [Online]. USA: FAO. Available: <http://faostat.fao.org> [Accessed 2015. 12. 20 2015].
- FELSENSTEIN, J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol*, 17, 368-76. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01734359>
- FERRANDO, L., FERNANDEZ MANAY, J., FERNANDEZ SCAVINO, A. (2012): Molecular and culture-dependent analyses revealed similarities in the endophytic bacterial community composition of leaves from three rice (*Oryza sativa*) varieties. *FEMS Microbiol Ecol*, 80, 696-708. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01339.x>
- GAIERO, J. R., MCCALL, C. A., THOMPSON, K. A., DAY, N. J., BEST, A. S., DUNFIELD, K. E. (2013): Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *Am J Bot*, 100, 1738-50. Doi: <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1200572>
- GAMALERLO, E., LINGUA, G., BERTA, G., LEMANCEAU, P. (2009): Methods for Studying Root Colonization by Introduced Beneficial Bacteria. In: LICHTFOUSE, E., NAVARETTE, M., DEBAEKE, P., SOUCHÉRE, V., ALBEROLA, C. (eds.) *Sustainable Agriculture*. Dordrecht: Springer SBM. 606-607 p. Doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_37

- GARAZZINO, S., APRATO, A., MAIELLO, A., MASSE, A., BIASIBETTI, A., DE ROSA, F. G., DI PERRI, G. (2005): Osteomyelitis caused by *Enterobacter cancerogenus* infection following a traumatic injury: case report and review of the literature. *J Clin Microbiol*, 43, 1459-61. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.3.1459-1461.2005>
- GORSKI, L., CSORDAS, A. (2010): Molecular Detection: Principles and Methods. In: LIU, D. (ed.) *Molecular detection of foodborne pathogens*. Boca Raton, USA: CRC Press Taylor & Francis Group. 4 p. URL: <https://www.crcpress.com/Molecular-Detection-of-Foodborne-Pathogens/Liu/9781420076431>
- GOVINDASAMY, V., FRANCO, C. M. M., GUPTA, V. V. S. R. (2014): Endophytic Actinobacteria: Diversity and Ecology. In: VERMA, V. C., GANGE, A. C. (eds.) *Advances in Endophytic Research*. New Delhi, India: Springer India. 46-48 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-1575-2>
- GUINDON, S., DUFAYARD, J. F., LEFORT, V., ANISIMOVA, M., HORDIJK, W., GASCUEL, O. (2010): New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*, 59, 307-21. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- GUSFIELD, D. (1997): *Algorithms on Strings, Trees and Sequences: Computer Science and Computational Biology*, Cambridge University Press. ISBN: 9780521585194
- HALL, B. G. (2013): Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol*, 30, 1229-35. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst012>
- HARDOIM, P. R., HARDOIM, C. C., VAN OVERBEEK, L. S., VAN ELSAS, J. D. (2012a): Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PLoS One*, 7, e30438. Doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030438>
- HARDOIM, P. R., HARDOIM, C. C. P., VAN OVERBEEK, L. S., VAN ELSAS, J. D. (2012b): Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PLoS ONE*, 7, e30438. Doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030438>
- HARDOIM, P. R., VAN OVERBEEK, L. S., ELSAS, J. D. (2008): Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol*, 16, 463-71. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- HERD, S., CHRISTENSEN, M. J., SAUNDERS, K., SCOTT, D. B., SCHMID, J. (1997): Quantitative assessment of in planta distribution of metabolic activity and gene expression of an endophytic fungus. *Microbiology*, 143, 267-75. Doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-143-1-267>
- HYNDMAN, L. D., MITSUHASHI, M. (2003): PCR Primer Design. In: BARTLETT, M. S. J., STIRLING, D. (eds.) *PCR protocols*. Humana Press. 81-87 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1385/1592593844>
- ISTA 2003. International rules for seed testing. In: ASSOCIATION, T. I. S. T. (ed.). P.O. Box 308, Basserdorf, CH-Switzerland: The international seed testing Association.
- JANSEN, G. J., MOOIBROEK, M., IDEMA, J., HARMSSEN, H. J., WELLING, G. W., DEGENER, J. E. (2000): Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol*, 38, 814-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86211/>
- JENSEN, M. H. (1999). Hydroponics worldwide. *Acta Hort*, 719-730. Doi: <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.481.87>
- KANG, S. H., CHO, H. S., CHEONG, H., RYU, C. M., KIM, J. F., PARK, S. H. (2007): Two bacterial endophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper

- (*Capsicum annuum* L.). *J Microbiol Biotechnol*, 17, 96-103. Doi: <http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?year=2007&vol=17&num=1&page=96>
- KAMOUN, R., LEPOIVRE, P., BOXUS, P. (1998): Evidence for the occurrence of endophytic prokaryotic contaminants in micropropagated plantlets of *Prunus Cerasus* cv. 'Montmorency'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52, 57-59. Doi: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1005916429542>
- KEREN, Y., KESHET, D., EIDELMAN, M., GEFFEN, Y., RAZ-PASTEUR, A., HUSSEIN, K. (2014): Is *Leclercia adecarboxylata* a new and unfamiliar marine pathogen? *J Clin Microbiol*, 52, 1775-6. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03239-13>
- KIM, O. S., CHO, Y. J., LEE, K., YOON, S. H., KIM, M., NA, H., PARK, S. C., JEON, Y. S., LEE, J. H., YI, H., WON, S., CHUN, J. (2012): Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62, 716-21. Doi: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0>
- KORSÓS, Z. (2003): Fenetikus és kladsztikus osztályozás alapjai. *Állattani közlemények*, 88, 11-36. URL: http://www.mbt-biologia.hu/gen/pro/mod/let/let_fajl_megnyitas.php?i_fajl_azo=183
- KUMAR, A., CHORDIA, N. (2015): *In Silico* PCR Primer Designing and Validation. In: BASU, C. (ed.) *PCR Primer Design*. 2nd ed. New York, USA: Springer SBM. 145 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6>
- KWAN, G., CHARKOWSKI, A. O., BARAK, J. D. (2013): *Salmonella enterica* suppresses *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* population and soft rot progression by acidifying the microaerophilic environment. *MBio*, 4, e00557-12. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00557-12>
- LANTOS, F. 2014. A paprikatermesztés legfontosabb munkafázisai. *Őstermelő - Gazdálkodók lapja*. Április-Május ed., 2-5 p. Nyíregyháza, Magyarország: Primom Tanácsadó és Információs Hálózat. URL: <http://ostermelo.com/rovatok/kert%C3%A9szet/261-a-paprikatermeszt%C3%A9s-legfontosabb-munkaf%C3%A1ziszai>
- LIN, W.-C., SALTVEIT, M. (2012): Greenhouse Production. In: RUSSO, M. V. (ed.) *Peppers Botany, Production and Uses*. Cambridge, USA: CAB International. 61-62. Doi: <http://dx.doi.org/10.1079/9781845937676.0000>
- LODEWYCKX, C., VANGRONSVELD, J., PORTEOUS, F., MOORE, E. R. B., TAGHAVI, S., MEZGEAY, M., DER LELIE, D. V. (2002): Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 583-606. Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/0735-260291044377>
- LOGAN, N. (2002): Modern Methods for Identification. In: BERKELEY, R., HEYNDRICKX, M., LOGAN, N., DE VOS, P. (eds.) *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. 124 p. URL: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470695218.html>
- LOY, A., ARNOLD, R., TISCHLER, P., RATTEI, T., WAGNER, M., HORN, M. (2008): probeCheck – a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity. *Environ Microbiol*, 10, 2894-8. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01706.x>
- LUDWIG, W., KLENK, H.-P. (2005): Overview: A Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Prokaryotic Systematics. In: BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., STALEY, J. T., GARRITY, G. M. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. New York, USA: Springer. 49-65 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/0-387-28021-9>

- LUDWIG, W., STRUNK, O., WESTRAM, R., RICHTER, L., MEIER, H., YADHUKUMAR, BUCHNER, A., LAI, T., STEPPI, S., JOBB, G., FORSTER, W., BRETTSCHE, I., GERBER, S., GINHART, A. W., GROSS, O., GRUMANN, S., HERMANN, S., JOST, R., KONIG, A., LISS, T., LUSSMANN, R., MAY, M., NONHOFF, B., REICHEL, B., STREHLOW, R., STAMATAKIS, A., STUCKMANN, N., VILBIG, A., LENKE, M., LUDWIG, T., BODE, A., SCHLEIFER, K. H. (2004): ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res*, 32, 1363-71. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh293>
- MARASCO, R., ROLLI, E., ETTOUMI, B., VIGANI, G., MAPELLI, F., BORIN, S., ABOU-HADID, A. F., EL-BEHAIRY, U. A., SORLINI, C., CHERIF, A., ZOCCHI, G., DAFFONCHIO, D. (2012): A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS One*, 7, e48479. Doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048479>
- MARTÍNEZ-VAZ, B. M., FINK, R. C., DIEZ-GONZALEZ, F., SADOWSKY, M. J. (2014): Enteric Pathogen-Plant Interactions: Molecular Connections Leading to Colonization and Growth and Implications for Food Safety. *Microbes and Environments*, 29, 123-135. Doi: <http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.ME13139>
- MENDES, R., GARBEVA, P., RAAIJMAKERS, J. M. (2013): The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev*, 37, 634-63. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- MERCADO-BLANCO, J. (2015): Life of Microbes Inside the Plant. In: LUGTENBERG, B. (ed.) *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Cham, Germany: Springer SBM. 28-29 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3>
- MONTERO-CALASANZ, M. C., GOKER, M., ROHDE, M., SPROER, C., SCHUMANN, P., BUSSE, H. J., SCHMID, M., TINDALL, B. J., KLENK, H. P., CAMACHO, M. (2013a): *Chryseobacterium hispalense* sp. nov., a plant-growth-promoting bacterium isolated from a rainwater pond in an olive plant nursery, and emended descriptions of *Chryseobacterium defluvii*, *Chryseobacterium indologenes*, *Chryseobacterium wanjuae* and *Chryseobacterium gregarium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63, 4386-95. Doi: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.052456-0>
- MONTERO-CALASANZ, M. C., SANTAMARÍA, C., ALBAREDA, M., DAZA, A., DUAN, J., GLICK, B. R., CAMACHO, M. (2013b): Alternative rooting induction of semi-hardwood olive cuttings by several auxin-producing bacteria for organic agriculture systems. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11, 146. Doi: <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2013111-2686>
- MULET, M., LALUCAT, J., GARCIA-VALDES, E. (2010): DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol*, 12, 1513-30. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x>
- MULLER, T., RUPPEL, S. (2014): Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS Microbiol Ecol*, 87, 2-17. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12198>
- NIRANJAN RAJ, S., CHALUVARAJU, G., AMRUTHESH, K. N., SHETTY, H. S., REDDY, M. S., KLOEPPER, J. W. (2003): Induction of growth promotion and resistance against downy mildew on pearl millet (*Pennisetum glaucum*) by rhizobacteria. *Plant Disease*, 87, 380-384. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.4.380>
- NEMES, Z. J. (2007): *Öntözövízek minősége a hazai vízkultúrás zöldségtermesztésben*. PhD értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem. 64-68 p. URL: <http://phd.lib.uni-corvinus.hu/26/>
- NORDENTOFT, S., MOLBAK, L., BJERRUM, L., DE VYLDER, J., VAN IMMERSEEL, F., PEDERSEN, K. (2011): The influence of the cage system and colonisation of *Salmonella*

- Enteritidis on the microbial gut flora of laying hens studied by T-RFLP and 454 pyrosequencing. *BMC Microbiol*, 11, 187. Doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-187>
- ONGENG, D., VASQUEZ, G. A., MUYANJA, C., RYCKEBOER, J., GEERAERD, A. H., SPRINGAEL, D. (2011): Transfer and internalisation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cabbage cultivated on contaminated manure-amended soil under tropical field conditions in Sub-Saharan Africa. *Int J Food Microbiol*, 145, 301-10. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.018>
- OTTO, M. (2009): *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7, 555-67. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- OWCZARZY, R., TATAUROV, A. V., WU, Y., MANTHEY, J. A., MCQUISTEN, K. A., ALMABRAZI, H. G., PEDERSEN, K. F., LIN, Y., GARRETSON, J., MCENTAGGART, N. O., SAILOR, C. A., DAWSON, R. B., PEEK, A. S. (2008): IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res*, 36, W163-9. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn198>
- PANDEY, P. K., YADAV, S. K., SINGH, A., SARMA, B. K., MISHRA, A., SINGH, H. B. (2012): Cross-Species Alleviation of Biotic and Abiotic Stresses by the Endophyte *Pseudomonas aeruginosa* PW09. *Journal of Phytopathology*, 160, 532-539. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01941.x>
- PAUL, N. C., JI, S. H., DENG, J. X., YU, S. H. (2013): Assemblages of endophytic bacteria in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) and their antifungal activity against phytopathogens *in vitro*. *Plant Omics*, 6, 441-448. URL: http://www.pomics.com/paul_6-6_2013_441_448.pdf
- PEREIRA, S. I. A., MONTEIRO, C., VEGA, A. L., CASTRO, P. M. L. (2016): Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: Isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities. *Ecological Engineering*, 87, 91-97. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.11.033>
- PODOLICH, O., ARDANOV, P., ZAETS, I., PIRTILÄ, A. M., KOZYROVSKA, N. (2014): Reviving of the endophytic bacterial community as a putative mechanism of plant resistance. *Plant and Soil*, 388, 367-377. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-014-2235-1>
- POSADA, D. (2009): *Bioinformatics for DNA sequence analysis*, New York, USA, Humana Press. 61, 113 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9>
- PRIETO, P., MERCADO-BLANCO, J. (2008): Endophytic colonization of olive roots by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *FEMS Microbiol Ecol*, 64, 297-306. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00450.x>
- PRUESSE, E., PEPLIES, J., GLOCKNER, F. O. (2012): SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28, 1823-9. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts252>
- QUAST, C., PRUESSE, E., YILMAZ, P., GERKEN, J., SCHWEER, T., YARZA, P., PEPLIES, J., GLOCKNER, F. O. (2013): The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41, D590-6. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- RASCHE, F., TRONDL, R., NAGLREITER, C., REICHENAUER, T. G., SESSITSCH, A. (2006): Chilling and cultivar type affect the diversity of bacterial endophytes colonizing sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Can J Microbiol*, 52, 1036-45. Doi: <http://dx.doi.org/10.1139/w06-059>
- REINHOLD-HUREK, B., HUREK, T. (2011): Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol*, 14, 435-43. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.004>

- REITER, B., PFEIFER, U., SCHWAB, H., SESSITSCH, A. (2002): Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2261-2268. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.5.2261-2268.2002>
- RIZZO, J., ROUCHKA, C. E. (2007): Review of Phylogenetic Tree Construction. *Bioinformatics Laboratory Technical Report Series*, TR-ULBL-2007-01, 1-3 p. URL: <http://bioinformatics.louisville.edu/lab/localresources/papers/TR-ULBL-2007-01.pdf>
- ROSENBLUETH, M., MARTINEZ-ROMERO, E. (2006): Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant Microbe Interact*, 19, 827-37. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-19-0827>
- RYSER, T. E., HAO, J., YAN, Z. (2009) Internalization of pathogens in produce. In: FAN, X., NIEMIRA, A. B., DOONA, J. C., FEEHERRY, E. F., GRAVANI, B. R. (eds.) *Microbial safety of fresh produce*. Ames, USA: Wiley-Blackwell. 56 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/9781444319347.ch13>
- SASHIHARA, T., KIMURA, H., HIGUCHI, T., ADACHI, A., MATSUSAKI, H., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A. (2000): A Novel Lantibiotic, Nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: Cloning of the Structural Gene and Identification of the Structure. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64, 2420-2428. Doi: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.64.2420>
- SAVVAS, D., STAMATI, E., TSIROGIANNIS, I. L., MANTZOS, N., BAROUCHAS, P. E., KATSOULAS, N., KITTAS, C. (2007): Interactions between salinity and irrigation frequency in greenhouse pepper grown in closed-cycle hydroponic systems. *Agricultural Water Management*, 91, 102-111. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2007.05.001>
- SCHMID, M., WALCHER, M., BUBERT, A., WAGNER, M., WAGNER, M., SCHLEIFER, K. H. (2003): Nucleic acid-based, cultivation-independent detection of *Listeria* spp. and genotypes of *L. monocytogenes*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 35, 215-25. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00456-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00456-X)
- SENTHILKUMAR, M., ANANDHAM, R., MADHAIYAN, M., VENKATESWARAN, V., SA, T. (2011): Endophytic bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production. In: MAHESHWARI, K. D. (ed.) *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Heidelberg, Germany: Springer SBM. 62-72 p. Doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_3
- SÉRGIO BALBINO MIGUEL, P., CESAR DELVAUX, J., NAGEM VALÉRIO DE OLIVEIRA, M., CASSEMIRO PACHECO MONTEIRO, L., FREITAS, F. D. S., DUTRA COSTA, M., ROGÉRIO TÓTOLA, M., ALENCAR DE MORAES, C., CHAER BORGES, A. (2013): Diversity of endophytic bacteria in the fruits of *Coffea canephora*. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 586-594. Doi: <http://dx.doi.org/10.5897/ajmr12.2036>
- SESSITSCH, A., REITER, B., PFEIFER, U., WILHELM, E. (2002): Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomycetes*-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol*, 39, 23-32. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00903.x>
- SHAKYA, M., GOTTEL, N., CASTRO, H., YANG, Z. K., GUNTER, L., LABBE, J., MUCHERO, W., BONITO, G., VILGALYS, R., TUSKAN, G., PODAR, M., SCHADT, C. W. (2013): A multifactor analysis of fungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature *Populus deltoides* trees. *PLoS One*, 8, e76382. Doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076382>

- SHI, Y. W., ZHANG, X., LOU, K. (2014): Analysis of endophytic bacterial community composition by 16S rDNA clone library in *Achnatherum inebrians*. *Microbiology*, 83, 888-895. Doi: <http://dx.doi.org/10.1134/s0026261714060174>
- SIPICZKI, M. (2004): Fission Yeast Phylogenesis and Evolution. In: EGEL, R. (ed.) *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe : Genetics, Genomics and Beyond*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 431-443 p. Doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-10360-9_29
- SLEATOR, R. D. (2011): Phylogenetics. *Arch Microbiol*, 193, 235-9. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-011-0677-x>
- SLEATOR, R. D. (2013): A beginner's guide to phylogenetics. *Microb Ecol*, 66, 1-4. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-013-0236-x>
- SMITS, T. H., REZZONICO, F., KAMBER, T., GOESMANN, A., ISHIMARU, C. A., STOCKWELL, V. O., FREY, J. E., DUFFY, B. (2010): Genome sequence of the biocontrol agent *Pantoea vagans* strain C9-1. *J Bacteriol*, 192, 6486-7. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01122-10>
- SRIDHAR, S., DHAMDHERE, K., BLELLOCH, G. E., HALPERIN, E., RAVI, R., SCHWARTZ, R. (2006): Simple Reconstruction of Binary Near-Perfect Phylogenetic Trees. In: ALEXANDROV, V. N., VAN ALBADA, G. D., SLOOT, P. M. A., DONGARRA, J. (eds.) *Computational Science – ICCS 2006: 6th International Conference, Reading, UK, May 28-31, 2006. Proceedings, Part II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 799-806 p. Doi: http://dx.doi.org/10.1007/11758525_107
- STOCK, I., BURAK, S., WIEDEMANN, B. (2004): Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical profiles of *Leclercia adecarboxylata* strains. *Clin Microbiol Infect*, 10, 724-33. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00892.x>
- SUCHI, S., KRISHNA, P. S., BASHIR, A. A., SHISHIR, K. G., SHAIENDRA, K. G. (2013): Bioinformatics Tools for Interpretation of Data Used in Molecular Identification. In: DILIP, K. A., SURAJIT, D., MESAPOGU, S. (eds.) *Analyzing Microbes*. Heidelberg, Germany: Springer SBM. 239-241 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-34410-7>
- SZIDERICS, A. H., RASCHE, F., TROGNITZ, F., SESSITSCH, A., WILHELM, E. (2007): Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Can J Microbiol*, 53, 1195-202. Doi: <http://dx.doi.org/10.1139/W07-082>
- TAKEUCHI, F., WATANABE, S., BABA, T., YUZAWA, H., ITO, T., MORIMOTO, Y., KURODA, M., CUI, L., TAKAHASHI, M., ANKAI, A., BABA, S., FUKUI, S., LEE, J. C., HIRAMATSU, K. (2005): Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol*, 187, 7292-308. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.21.7292-7308.2005>
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. (2013): MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30, 2725-9. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- TAURIAN, T., IBÁÑEZ, F., ANGELINI, J., TONELLI, M. L., FABRA, A. (2012): Endophytic Bacteria and Their Role in Legumes Growth Promotion. In: MAHESHWARI, D. K. (ed.) *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics*. Heidelberg: Springer SBM. 141 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-27515-9>
- TEPLITSKI, M., BARAK, J. D., SCHNEIDER, K. R. (2009): Human enteric pathogens in produce: un-answered ecological questions with direct implications for food safety. *Curr Opin Biotechnol*, 20, 166-71. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2009.03.002>

- THOMAS, P., REDDY, K. M. (2013): Microscopic elucidation of abundant endophytic bacteria colonizing the cell wall-plasma membrane peri-space in the shoot-tip tissue of banana. *AoB Plants*, 5, plt011. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/aobpla/plt011>
- THOMAS, P., SWARNA, G. K., ROY, P. K., PATIL, P. (2008): Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93, 55-63. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-008-9341-9>
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22, 4673-80. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- TIKHONOVICH, I. A., PROVOROV, N. A. (2011): Microbiology is the basis of sustainable agriculture: an opinion. *Annals of Applied Biology*, 159, 155-168. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00489.x>
- TYLER, H. L., TRIPLETT, E. W. (2008): Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 46, 53-73. Doi: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.011708.103102>
- VALM, A. M., WELCH, J. L. M., RIEKEN, C. W., HASEGAWA, Y., SOGIN, M. L., OLDENBOURG, R., DEWHIRST, F. E., BORISY, G. G. (2011): Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4152-4157. Doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1101134108>
- VASSART, G., GEORGES, M., MONSIEUR, R., BROCAS, H., LEQUARRE, A. S., CHRISTOPHE, D. (1987): A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science*, 235, 683-4. Doi: <http://dx.doi.org/10.1126/science.2880398>
- VERDON, J., BERJEAUD, J. M., LACOMBE, C., HECHARD, Y. (2008): Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysin I from *Staphylococcus warneri*. *Peptides*, 29, 978-84. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2008.01.017>
- VIVANT, A. L., GARMYN, D., PIVETEAU, P. (2013): *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 87. Doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2013.00087>
- WAGNER, M., HORN, M., DAIMS, H. (2003): Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 302-309. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00054-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00054-7)
- WANG, Z. (2015): *The influence of production practices, tillage, and endophytic bacteria on bell pepper productivity and physiology under different irrigation regimes*. PhD disszertáció, University of Kentucky. 95-114 p. URL: http://uknowledge.uky.edu/pss_etds/55
- WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., LANE, D. J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 173, 697-703. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC207061/pdf/jbacter00092-0291.pdf>
- WEST, E. R., COTHER, E. J., STEEL, C. C., ASH, G. J. (2010): The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Can J Microbiol*, 56, 209-16. Doi: <http://dx.doi.org/10.1139/w10-004>
- WHITE, J. F., JR., TORRES, M. S., SOMU, M. P., JOHNSON, H., IRIZARRY, I., CHEN, Q., ZHANG, N., WALSH, E., TADYCH, M., BERGEN, M. (2014): Hydrogen peroxide staining

to visualize intracellular bacterial infections of seedling root cells. *Microsc Res Tech*, 77, 566-73. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.22375>

WING, Y. L., WON-HEE, K., BYOUNG-CHEORL, K. (2013): Basic Information on Pepper. In: BYOUNG-CHEORL, K., CHITTARANJAN, K. (eds.) *Genetics genomics and breeding of peppers and eggplants*. Boca Raton, USA: CRC Press. 2-12 p. Doi: <http://dx.doi.org/10.1201/b14541-8>

WRIGHT, K. M., CHAPMAN, S., MCGEACHY, K., HUMPHRIS, S., CAMPBELL, E., TOTH, I. K., HOLDEN, N. J. (2013): The endophytic lifestyle of *Escherichia coli* O157:H7: quantification and internal localization in roots. *Phytopathology*, 103, 333-40. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-08-12-0209-FI>

XIA, Y., DEBOLT, S., DREYER, J., SCOTT, D., WILLIAMS, M. A. (2015): Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Front Plant Sci*, 6, 490. Doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00490>

YILMAZ, L. S., PARNERKAR, S., NOGUERA, D. R. (2011): mathFISH, a web tool that uses thermodynamics-based mathematical models for *in silico* evaluation of oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1118-1122. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01733-10>

YOUNG, J. M., PARK, D. C., WEIR, B. S. (2004): Diversity of 16S rDNA sequences of *Rhizobium* spp. implications for species determinations. *FEMS Microbiol Lett*, 238, 125-31. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.026>

M2. A baktériumok izolálásához felhasznált két paprikafajta főbb jellegzetességei

I. Hó fajta:

A fehér töltenivaló (TV) paprikák fajtatípusába tartozik, közepesen vastaghúsú (húsvastagsága 3-4 mm), sárgásfehér, sima felületű, kúpos alakú, 80-110 g bogyótömegű, édes, zamatos ízű és csípmentes termést hoz. Átlagos hossza 60-120 mm, vállszélessége 40-70 mm. Folytonos növekedésű, továbbá jellemző még rá a tömör állag, vékony héj és az intenzív paprika illat (DélkerTÉSZ, 2012).

II. Kárpia fajta:

A Kárpia fajtatípusba tartozik, vastaghúsú (húsvastagsága 4-7 mm), sötétzöldből sötétpirosba-színbe érő, sima felületű, kúpos alakú, 100-120 g bogyótömegű és intenzív édes ízű, csípmentes termést hoz. Hossza 60-120 mm közötti, vállszélessége 40-70 mm, továbbá jellemző még rá a tömör állag, közepesen vastag héj és az örölt paprika illat (DélkerTÉSZ, 2012).

M3. Növénytermesztési körülmények

Az ültetéshez használt magok a Budapesti székhelyű De Ruiter Seeds Vetőmagtermelő Kft-től, illetve a Kecskeméti székhelyű Royal Sluis Magrovet Kft-től kerültek beszerzésre. A növények termesztése a Szent István Egyetem Kertészettudományi Karának Soroksári Kísérleti Üzem és Tangazdaságában (1238 Budapest, Túri István út 2.) valósult meg.

A. Hidroponikus növények nevelése

A paprikamagokat 2012. február 24-én ültették el kis közetgyapot nevelőelemekbe (kockákba), ahol a tápoldat adagolást és a párásítást kézzel végezték. Március 9-én a kis csíranövényeket nagyobb közetgyapot nevelőkockákba ültették át és április 7-ig szintén kézzel gondozták. Április 7-én ültették ki a Filclair típusú (Filclair Serren industry NV, Belgium) klímatisztált sátorba. A növények kiültetése egységes állománysűrűséggel (4,04 tő/m²), ikersoros elrendezésben történt. A hőmérséklet, a fény, a szellőztetés és az árnyékolás szabályozását az ITU MS 10 (Itumic Oy, Finnország) klímaszabályozó berendezéssel valósították meg. A kiültetést követően áttértek az egyedi csepegtetőtestes öntözésre, amelyet a Priva Integro Vega (Priva Building Intelligence GmbH, Austria) típusú számítógép vezérelt. Minden növényhez egyedi 2 l/óra csepegtető gomba és túske tartozott. A Grodan WCM (ROCKWOOL International A/S, Dánia) víztartalom mérő műszerrel pontosan és közvetlenül ellenőrizték a táblák víztartalmát, hőmérsékletét és elektromos vezetőképességét, az úgynevezett EC értékét (az ásványi anyag mennyiségének meghatározásának indirekt

módja) és az adatok figyelembevételével irányították a növények fejlődését. Az 5,5 – 5,8-as cél pH érték beállítása salétromsav alkalmazásával történt. Kizárólag kiváló vízdíszhatóságú műtrágyákat alkalmaztak, amelyekből 500 literes tartályokba törzsoldatot készítettek. Az alkalmazott műtrágyák a következők voltak: kalcium-nitrát, kálium-nitrát, mono-kálium-foszfát, magnézium-nitrát, magnézium-szulfát, Ferticare™ IV (Yara Hungária Kft., Magyarország), Tradecorp AZ Bentley mikroelem keverék (Trade corporation international S.A., Spain). A tápelemek arányát, az alkalmazott EC értéket mindig a növényekhez és az időjáráshoz igazították. A növények egész életükben csak tápoldatot kaptak. A tápoldatozás napi ritmusára jellemző, hogy napkelte után kezdtek öntözni és napnyugta előtt fejezték be. Kizárólag hőségnapokon alkalmaztak éjszakai tápoldatozást is. A kijuttatott folyadék mennyisége a napi 0,5 liter és a 2,5 liter között változott. Egyszerre 1,5 - 2,5 dl-t adagoltak ki, így a napi tápoldatozások száma 4 és 15 között mozgott. Az alkalmazott EC érték 1,9 és 2,3 mS/cm közötti volt. A növénynevelés során csak biológiai növényvédelmet alkalmaztak, amely elsődlegesen a virágtörzsek ellen irányult.

B. Talajkultúrás növények nevelése

A talajkultúrás termesztésre szánt magokat március 20-án vetették el a földbe és április 4-ig kézzel gondozták (öntözés, párasítás) fűtött üvegházban, optimális hőmérséklet és fényviszonyok mellett. Április 4-én tápkockákban tűzdelték a kis csíra növényeket, majd május 10-ig tovább nevelték az előbb említett körülmények között. Május 10-én megtörtént a fűtetlen fólia sátrak alatti földbe történő kiültetés, majd mikor már az átlaghőmérséklet elérte a megfelelő (20-25 °C) szintet, akkor a fóliák is lekerültek. A növények a teljes növekedésük során csak ivóvíz minőségű öntözővízzel lettek táplálva az időjárási viszonyoknak megfelelően, csepegtetési öntözéssel. Az optimális tápanyagmennyiséget a talaj tápanyagtartalmának és a tervezett termésmennyiség függvényében műtrágyázással oldották meg. A kártevők elleni védekezést a szokványos vegyszeres növényvédelmi eljárásokkal végezték.

M4. Az izolátumok részletes fenotípusos tulajdonságai

| S. | Kód | Telepmorfológia PGES és **WL agaron | Mikroszkópos morfológia | KOH teszt | Szaporodás VRBL agaron (i/n) | Spórázás (i/n) |
|----|--------|---|---|-----------|------------------------------|----------------|
| 1 | SKS1 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétkékes-zöldes beütés | közepes kokkuszosok | Gram (+) | n | n |
| 2 | SKS2 | **közepes-nagy, opálos, csipkézett, száraz, bíborkék-pázsitszerű | közepes pálcák | Gram (+) | n | i |
| 3 | SKS3/1 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld kis kék árnyalattal, táptalaj kisárgul | közepes kokkuszosok vagy kokkoidok | Gram (+) | n | n |
| 4 | SKS3/2 | **nagyon kicsi, sima, zöld kis kék árnyalattal, táptalaj kisárgul | közepes kokkuszosok | Gram (+) | n | n |
| 5 | SHS1 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétzöld vagy sötétkékes-zöld | kicsi-közepes kokkuszosok vagy kokkoidok | Gram (+) | n | n |
| 6 | SEPRK1 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld kékes beütéssel, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi kokkuszosok, főként láncban | Gram (-) | i | |
| 7 | SEPRK2 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld kékes beütéssel, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi kokkuszosok, főként láncban | Gram (-) | i | |
| 8 | SEPRK3 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi kokkuszosok, főként kisebb láncban | Gram (-) | n | |
| 9 | SEPRK4 | **kicsi, tükröződő, enyhén csipkézett, sima, középen zöldes kék, karima áttetsző, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi kokkuszosok, láncban | Gram (-) | i | |
| 10 | SEPRK5 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi kokkuszosok, láncban | Gram (-) | i | |
| 11 | SEPRK6 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi kokkuszosok, láncban | Gram (-) | n | |
| 12 | SEPRK7 | **nagy, opálos, kerek, gumiszerű, világoskék, vékony karimával, táptalaj kisárgul | nagy, kövér, közepes pálcák, többnyire gorbék | Gram (+) | n | i |
| 13 | SEPRK8 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi kokkuszosok, láncban | Gram (-) | i | |
| 14 | SEPRK9 | **kicsi, tükröződő, enyhén csipkézett, sima, középen zöldes kék, karima áttetsző, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi kokkuszosok, láncban | Gram (-) | n | |

| | | | | | | |
|----|---------|---|------------------------------------|----------|---|---|
| 15 | SEPRK10 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi kokkuszok, láncban | Gram (-) | i | |
| 16 | SEPRK11 | *kicsi, tükröződő, ép szélű, sima, zöldeskék, áttetsző szegély/karima, táptalaj enyhén kisárgul | nagyon kicsi kokkuszok, láncban | Gram (-) | n | |
| 17 | SEPRK12 | **közepes, kicsi, tükröződő, ép szélű, sima, közepén sötétebb kék, nagy karima világos-fehéres kék | kicsi kokkuszok, láncban főként | Gram (-) | i | |
| 18 | SEPRK13 | **közepes-nagy, kicsi, tükröződő, kerek, sima, magasabb telepek mint az SEPRK1-2, közepén sötétebb kék, nagy karima világos-fehéres kék | nagyon kicsi kokkuszok, láncban is | Gram (-) | n | |
| 19 | SEPRK14 | **kicsi, tükröződő, enyhén csipkézett, sima, közepén zöldes kék, karima áttetsző//vagy világoszöld és kicsit áttetsző telepek | kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 20 | SEPRK15 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, sima, zöld, táptalaj kisárgul | kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | i | |
| 21 | SEPRK16 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, táptalaj kisárgul | vékony pálcák | Gram (-) | n | |
| 22 | SEPRK17 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, táptalaj kisárgul | rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 23 | SEPRK18 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, táptalaj kisárgul | vékony, rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 24 | SEPRK19 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétebb kékes-zöld, táptalaj kisárgul | rövid pálcák | Gram (-) | i | |
| 25 | SEPRK20 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, táptalaj kisárgul | vékony, rövid pálcák | Gram (-) | i | |
| 26 | SEPRK21 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, táptalaj kisárgul | vékony, rövid pálcák | Gram (-) | i | |
| 27 | SEPRK22 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, táptalaj kisárgul | vékony, rövid pálcák | Gram (-) | i | |
| 28 | SEPRK23 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, táptalaj kisárgul | vékony, rövid pálcák | Gram (-) | i | |
| 29 | SEPRK24 | **nagy, tükröződő, ép szélű, elfolyós, fehéres szegély, vastag kék karima, közepén fehér, tápt. kisárgul | vastag, nagy, kokkoid | Gram (+) | n | i |
| 30 | SEPRK25 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld kékes beütéssel, táptalaj kisárgul | vékony, nagyon rövid pálcák | Gram (-) | i | |
| 31 | SEPRK26 | **nagy, opálos, kerek, gumyszerű, világoskék-kék közötti szín, szegély vékony és világos, táptalaj kisárgul, hasonlóság SE-PR-K-7-hez, de nem ugyanaz | vastag, közepes-hosszú pálcák | Gram (+) | n | i |

| | | | | | | |
|----|---------|---|--|----------|---|---|
| 32 | SEPRK27 | **közepes, kerek vagy ép szélű, opálos, elfolyós, szelle világoskék és a közepe fele világosodik, táptalaj erősen kisárgul | vékony, nagyon rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 33 | SEPRK29 | **közepes, tükröződő, ép szélű, gumiszerű, közepén kék (kicsi zöldes beütéssel), karima krémes-tejszerű világoskék, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi pálcák | Gram (-) | n | |
| 34 | SESRK1 | **közepes, tükröződő, csipkézett, gumiszerű/sima, közepén sötétkék, karima világos-fehéres kék | vékony, közepes és hosszú pálcák | Gram (-) | n | |
| 35 | SESRK2 | **közepes, tükröződő/opákos, csipkézett, gumiszerű, közepén világos kék, szegély áttetsző | rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 36 | SESRK3 | **nagyon apró, opálos, kerek, gumiszerű, áttetsző zöldes kék (világos), tápt. enyhén kisárgul | vastag, közepes és hosszú pálcák, láncban is | Gram (+) | n | n |
| 37 | SESRK4 | **nagy, tükröződő, köldökszerű, sima, közepén sötétkék, máshol talán egy kicsit világosabb, táptalaj enyhén kisárgul | kövér, közepes pálcák | Gram (+) | n | i |
| 38 | SESRK5 | **nagyon nagy, vulkányszerű, a kráter sötét tengerkék és tükröződő, a hegy oldala opálos és enyhe kék vagy fehér kékes háttérrel | vastag, közepes és hosszú pálcák | Gram (+) | n | i |
| 39 | SESRK6 | **közepes, tükröződő, ép szélű, sima, sötétkék (kicsi zöld beütéssel), vastag áttetsző-fehéres karima, tápt. enyhén kisárgul | közepes pálcák | Gram (-) | n | |
| 40 | SESRK7 | **kicsi, tükröződő, kerek, elfolyós, közepén sötét, karima világos/fehéres kék, táptalaj kisárgul | közepes pálcák | Gram (-) | n | |
| 41 | SESRK8 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, közepén sötétebb kék (zöldes árnyalattal), a szelle világosabb kék | vékony, közepes és hosszú pálcák | Gram (+) | n | i |
| 42 | SESRK9 | **kicsi-közepes, tükröződő, ép szélű, sima, sötétkék (kicsi zöld beütéssel), vastag áttetsző-fehéres karima, tápt. enyhén kisárgul | közepes pálcák | Gram (-) | n | |
| 43 | SESRK10 | **közepes-kicsi, opálos, csipkézett, sima, világoskék, közepe kicsit sötétebb | bunkó alakú, közepes pálcák | Gram (+) | n | i |
| 44 | SESRK11 | **kicsi-közepes, tükröződő, ép szélű, sima, sötétkék (kicsi zöld beütéssel), vastag áttetsző-fehéres karima, tápt. enyhén kisárgul | közepes pálcák | Gram (-) | n | |
| 45 | SESRK12 | **közepes-kicsi, tükröződő, kerek, elfolyós, közepén fehéres világoskék, szegély világoskék | nagyon kicsi rövid pálcák vagy kokkoidok | Gram (+) | n | n |
| 46 | SESRK13 | **nagyon kicsi, tükröződő/opákos, csipkézett, gumiszerű, közepén világos kék, szegély áttetsző | közepes pálcák | Gram (-) | n | |

| | | | | | | |
|----|---------|---|--|----------|---|---|
| 47 | SESRK14 | **közepes-nagy, opálos, ép szélű, sima/gumiszerű, közepén sötétkék/kék kicsúcsosodó, karima világoskék, nem vagy enyhén sárgul ki | közepes és hosszú pálcák, többüknek a közepe vastagabb, kidomborodik | Gram (-) | n | i |
| 48 | SESRK16 | **közepes, kicsi, tükröződő, ép szélű, gumiszerű, közepén zöldes kék, karima világosabb és sárgás beütésű, táptalaj enyhén kisárgul | kicsi, vékony pálcák | Gram (-) | n | |
| 49 | SESRK17 | **kicsi, tükröződő, kerek, elfolyós, világoskék, | rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 50 | SESK1 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétzöld, áttetsző szegély, táptalaj kisárgul | vékony, rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 51 | SESK2 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétzöld, áttetsző szegély, táptalaj kisárgul | vékony, rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 52 | SELK1 | **közepes-nagy, tükröződő, kerek, gumiszerű, közepén sötétzöldes-kék, nagy karima világosabb, táptalaj kisárgul | közepes- rövid pálcák | Gram (+) | n | i |
| 53 | SELK2 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétkékes-zöld, világosabb szegéllyel, tápt. kisárgul | nagyon kicsi kokkuszok vagy kokkoidok | Gram (+) | n | n |
| 54 | SELK3 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötét vagy sima zöld kékes beütéssel, táptalaj kisárgul | közepes kokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 55 | SELK4 | **közepes, tükröződő, csipkézett, finoman csipkézett, sima, sötétkék, szegély áttetsző, táptalaj kisárgulú | pálcák | Gram (-) | n | |
| 56 | SESRK1K | **nagyon kicsi, opálos, kerek, gumiszerű, világos-(fehéres) kékes-zöldes árnyalatú | közepes-nagy kokkuszok tetrádban | Gram (+) | n | n |
| 57 | SESRK2K | **nagyon kicsi, opálos, kerek, gumiszerű, világos-(fehéres) citromsárgás árnyalatú | nagy kokkuszok tetrádban | Gram (+) | n | n |
| 58 | SESRK3K | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétzöld-zöld, táptalaj kisárgul | közepes kokkuszok, talán kokkoidok is | Gram (+) | n | n |
| 59 | SESRK4K | **nagyon kicsi, opálos, kerek, gumiszerű, citromsárga | nagy kokkuszok tetrádban | Gram (+) | n | n |
| 60 | SESRK5K | közepes, tükröződő, ép szélű, elfolyós, krémszínű | közepes-hosszú pálcák | Gram (-) | n | |

| | | | | | | |
|----|----------|---|---|----------|---|---|
| 61 | SESRK6K | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétzöld-zöld, táptalaj kisárgul | közepes-nagy kokkuszkok, diplokokkuszkok vagy kokkoidok | Gram (+) | n | n |
| 62 | SESRK7K | **nagyon kicsi, opálos, kerek, gumyszerű, világoskék | kövér, pityók alakú kokkoidok vagy kokkuszkok | Gram (+) | n | i |
| 63 | SEPRH1 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöldes kék, karima áttetsző, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi diplokokkuszkok vagy pálcák | Gram (-) | n | |
| 64 | SEPRH2 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétzöld, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi pálcák | Gram (-) | n | |
| 65 | SEPRH3 | **közepes, tükröződő, kerek, sima, világoskék zöldes árnyalattal, táptalaj kisárgul, szegély áttetsző | nagyon kicsi pálcák | Gram (-) | n | |
| 66 | SEPRH4 | **kicsi-közepes, tükröződő, csipkézett, sima, világosabb kék, tápt. enyhén kisárgul | nagyon kicsi pálcák | Gram (-) | n | |
| 67 | SEPRH5/2 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, világoskék (fehéres), nagy zöld karima, vékony áttetsző szegély, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | n | n |
| 68 | SEPRH5/1 | **közepes, tükröződő, kerek, sima, világoskék (világoszöld, kis kékes beütéssel), szegély áttetsző/fehéres, táptalaj kisárgul | közepes, kövér krumplihoz hasonló pálcák, többször lánvban is | Gram (+) | n | i |
| 69 | SEPRH6 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, világosabb-kék a közepe, kifele egyre áttetszőbb, tápt. kisárgul | nagyon kicsi és kicsi pálcák | Gram (-) | n | |
| 70 | SEPRH7 | **közepes, kerek vagy ép szélű, opálos, elfolyós, szelle (világos)kék és a közepe fele világosodik, tápt. erősen kisárgul | nagy, vastag, hosszú-közepes pálcák | Gram (+) | n | i |
| 71 | SEPRH8 | **nagy, tükröződő, köldökszerű, de csipkézett is, sima, középen sötétkék, máshol egy árnyalattal világosabb, táptalaj enyhén kisárgul | közepes-nagy pálcák | Gram (+) | n | i |
| 72 | SEPRH9 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sárgás-kékes zöld | kicsi kokkuszkok | Gram (-) | n | |
| 73 | SEPRH10 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, világosabb-kék | nagyon kicsi pálcák | Gram (-) | n | |
| 74 | SEPRH11 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, világosabb-kék | közepes pálcák | Gram (-) | n | |
| 75 | SEPRH12 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, világosabb-kék | nagyon kicsi pálcák | Gram (-) | n | |
| 76 | SEPRH13 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, kékes árnyalattal, táptalaj | kicsi pálcák | Gram (-) | i | |

| | | | | | | |
|----|---------|---|--|----------|---|---|
| | | kisárgul | | | | |
| 77 | SEPRH14 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sárgás-kékes zöld, táptalaj kisárgul | kicsi pálcák | Gram (-) | i | |
| 78 | SEPRH15 | **közepes, tükröződő, ép szélű, sima, zöldes-sötétkék, táptalaj kisárgul | kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 79 | SEPRH16 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sárgás-kékes zöld, táptalaj kisárgul | kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | i | |
| 80 | SEPRH17 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sárgás-kékes zöld, táptalaj kisárgul | kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 81 | SEPRH18 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sárgás-kékes zöld, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi pálcák | Gram (-) | i | |
| 82 | SEPRH19 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sárgás-kékes zöld, táptalaj kisárgul | kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 83 | SEPRH20 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, halványkék | kokkoid | Gram (-) | n | |
| 84 | SEPRH21 | **ugyanaz mint SE-L-H-6, talánkicsit sötétebb színekkel | kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 85 | SEPRH22 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétzöld kékes árnyalattal, táptalaj kisárgul | kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 86 | SELH1 | **közepes, tükröződő, ép szélű/kerek, sima, krémeskék, táptalaj kisárgul | rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 87 | SELH2 | **nagyon kicsi, kerek, tükröződő, sima, világoskék, de áttetsző, zöldes beütéssel, | nagyon kicsi pálcák vagy kokkoidok | Gram (+) | n | n |
| 88 | SELH4 | **közepes, tükröződő, ép szélű/kerek, sima, krémeskék, táptalaj kisárgul | rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 89 | SELH5 | **közepes-kicsi, tükröződő, kerek, elfolyós, közepén fehéres világoskék, szegély világoskék | nagyon kicsi, rövid pálcák és/vagy kokkoidok | Gram (+) | n | n |
| 90 | SELH6 | **közepes-kicsi, tükröződő, kerek, elfolyós, közepén fehéres világoskék, szegély világoskék | kicsi, rövid plcák és kokkoidok | Gram (+) | n | n |
| 91 | SELH7 | **közepes-kicsi, tükröződő, kerek, elfolyós, közepén fehéres világoskék, szegély világoskék | kicsi, rövid plcák és kokkoidok | Gram (+) | n | n |

| | | | | | | |
|-----|----------|---|---------------------------------|----------|---|---|
| 92 | SELH8 | **közepes-kicsi, tükröződő, kerek, elfolyós, közepén fehéres világoskék, szegély világoskék | közepes kokkuszkok és kokkoidok | Gram (+) | n | n |
| 93 | SEPRH1K | **nagy, tükröződő, ép szélű, gumyszerű, világos kék közepén, a szélle fele halványul, tápt. kisárgul | nagyon kicsi, vékony pálcák | Gram (-) | n | |
| 94 | SEFPRK1 | **közepes, tükröződő, kerek, kicsit elfolyós, fehér kiemelkedő telepek kékes szegéllyel | közepes kokkuszkok | Gram (-) | i | |
| 95 | SEFPRK2 | **közepes, tükröződő, ép szélű, sima, sötétkék zölde árnyalattal | rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 96 | SEFPRK3 | **nagy, tükröződő, ép szélű, elfolyós, sötétzöld | közepes kokkuszkok | Gram (-) | i | |
| 97 | SEFPRK4 | **nagy, tükröződő, kerek, elfolyós, közepén sötétzöld, máshol világosabb, kicsit sötétebb karima | közepes kokkuszkok | Gram (-) | n | |
| 98 | SEFPRK5 | **nagy, tükröződő, kerek, elfolyós, közepén sötétzöld, máshol világosabb, kicsit sötétebb karima | vékony, rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 99 | SEFPRK6 | **nagy-közepes, tükröződő, ép szélű, sima, sötétzöld | vékony pálcák | Gram (-) | i | |
| 100 | SEFPRK7 | közepes, tükröződő, kerek, sima, világoskrémszín-halvány sárga | közepes kokkuszkok | Gram (-) | i | |
| 101 | SEFPRK8 | közepes-kicsi, opálos, ép szélű, gumyszerű, narancssárga-világosbarna közötti szín | közepes pálcák | Gram (-) | n | |
| 102 | SEFPRK10 | **közepes-nagy, tükröződő, ép szélű, köldökös, sötétkékes zöld, közepén világosabb | kokkuszkok vagy kokkoidok | Gram (-) | i | |
| 103 | SEFPRK12 | **kicsi, tükröződő, kerek, zöldekkék, szegélye világosabb | kicsi kokkuszkok vagy kokkoidok | Gram (-) | i | |
| 104 | SEFPRK13 | **közepes, tükröződő, ép szélű, köldökös, sötétkékes zöld, közepén világosabb | kokkuszkok vagy kokkoidok | Gram (-) | i | |
| 105 | SEFPRK14 | **nagy, tükröződő, kerek, elfolyós, fehér kékes háttérrel | kicsi kokkuszkok | Gram (-) | i | |
| 106 | SEFPRK15 | **közepes-nagy, tükröződő, enyhén csipkézett, sima, zöld szegélyű, világoskék karimával, közepén sötétkék | kicsi vékony pálcák | Gram (-) | n | |
| 107 | SEFPRK16 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, átlátszó szegéllyel | kicsi vékony pálcák | Gram (-) | i | |
| 108 | SEFPRK17 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, világoszöld | kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | n | |

| | | | | | | |
|-----|----------|--|--|----------|---|---|
| 109 | SEFPRK18 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, világoskék | rövid, nagyon kicsi-kicsi pálcák | Gram (+) | n | n |
| 110 | SEFSRK1 | **közepes, tükröződő, áttetsző, csipkézett, sima, közepén sötétkék pont, máshol világosabb és áttetsző | közepes-nagy pálcák | Gram (-) | n | |
| 111 | SEFSRK2 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, világos zöldes árnyalatú kék | kicsi, nagyon rövid pálcák | Gram (+) | n | n |
| 112 | SEFSRK3 | kicsi, tükröződő, kerek, elfolyós, világos krémszínű | kokkuszok vagy kokkoidok | Gram (-) | i | |
| 113 | SEFSRK4 | nagy, tükröződő, ép szélű, elfolyós, világos krémszínű | közepes pálcák | Gram (-) | n | |
| 114 | SEFSRK5 | **közepes, tükröződő, kerek, elfolyós, közepén sötétkék, nagy karima világoskék | nagyon kicsi, rövid, vékony pálcák | Gram (+) | n | n |
| 115 | SEFLK1 | **közepes, opálos, szabálytalan alak, gumyszerű, kék, közepén sötétebb | rövid-közepes pálcák | Gram (+) | n | i |
| 116 | SEFSK1 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, közepén zöld, szegély sötétzöld | közepes kokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 117 | SEFSK2 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötét-sötétzöld | nagy kokkuszok tetrádban, diplokokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 118 | SEFSK3 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, szegély sötétzöld, közepe világoskék | közepes kokkuszok, diplokokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 119 | SEFSK4 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, szegély világoskék, közepe sötét-sötétzöld | közepes-nagy kokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 120 | SEFSK5 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, szegély sötétzöld, közepe nagyon kicsit világosabb | kokkoid vagy kicsi, rövid pálcák | Gram (+) | n | n |
| 121 | SEFSK6 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétzöld | közepes-nagy kokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 122 | SEFSK7 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétzöld | közepes diplokokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 123 | SEFSK8 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétzöld | közepes kokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 124 | SEFSK9 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötét-sötétzöld szegély, középrész világoskék | közepes kokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 125 | SEFSK10 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötét-sötétzöld | közepes diplokokkuszok | Gram (-) | n | |

| | | | | | | |
|-----|----------|--|---|----------|---|---|
| 126 | SEFSK11 | **kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötét-sötétzöld szegély, középrész világoskék | közepes kokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 127 | SEFSK12 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, kékes-zöld | közepes-nagy kokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 128 | SEFSK13 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötét-sötétzöld/kékes-zöld | közepes kokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 129 | SEFSH1 | **kicsi-nagyon kicsi, tükröződő, kerek, méregzöld, tápt. kisárgul | közepes kokkuszok láncban is | Gram (+) | n | n |
| 130 | SEFSH2 | **közepes, tükröződő, ép szélű/kerek, sima, sötétzöld, szegély világosabb és áttetszőbb | kokkoid vagy kicsi rövid pálcák | Gram (+) | n | n |
| 131 | SEFSH4 | **közepes, tükröződő, ép szél, szabálytalan alak, gumyszerű, sötétkék fehér szegéllyel és közepén sötét pontal | közepes-hosszú pálcák | Gram (+) | n | i |
| 132 | SEFSH5 | **kicsi, tükröződő, kerek, közepén zöld, karima sárgászöld | nagyon kicsi-kicsi, rövid pálcák | Gram (+) | n | n |
| 133 | SEFSH7 | **közepes-kicsi, tükröződő, kerek, köldökös, sima, sárgászöld | nagyon kicsi pálcák vagy kokkoidok | Gram (+) | n | n |
| 134 | SEFPRH7 | **közepes, tükröződő, ép szélű, sima/elfolyós, világoskék | kicsi, rövid-közepes pálcák | Gram (-) | i | |
| 135 | SEFPRH8 | **közepes, tükröződő, ép szélű, sima/elfolyós, világoskék, átlátszó karimával | nagyon kicsi kokkoidok | Gram (-) | i | |
| 136 | SEFPRH9 | **közepes, tükröződő, ép szélű, sima/elfolyós, karima fehéres-zöld, közepén világos/sárgászöld | nagyon kicsi kokkuszok, diplokokkuszok vagy kokkoidok | Gram (-) | n | |
| 137 | SEFPRH10 | **kicsi, tükröződő/áttetsző, csipkézett, sima, közepén sötétkék pont, máshol világosabb és áttetszőbb | közepes-nagy pálcák | Gram (-) | n | |
| 138 | SEFPRH11 | **közepes-kicsi, tükröződő, kerek, gumyszerű, rücskös felszínű, világoskék | nagyon rövid-rövid pálcák | Gram (-) | i | |
| 139 | SEFPRH12 | **közepes-kicsi, tükröződő, kerek, sima, zöld, szegélye világosabb | nagyon kicsi, nagyon rövid pálcák | Gram (+) | | n |
| 140 | SEFPRH13 | **közepes-kicsi, tükröződő, kerek, gumyszerű, rücskös felszínű, erősen világoskék | kicsi, nagyon rövid pálcák | Gram (-) | i | |
| 141 | SEFLH1 | **közepes, opálos, kerek, gumyszerű, kék | rövid-közepes pálcák | Gram (+) | n | i |

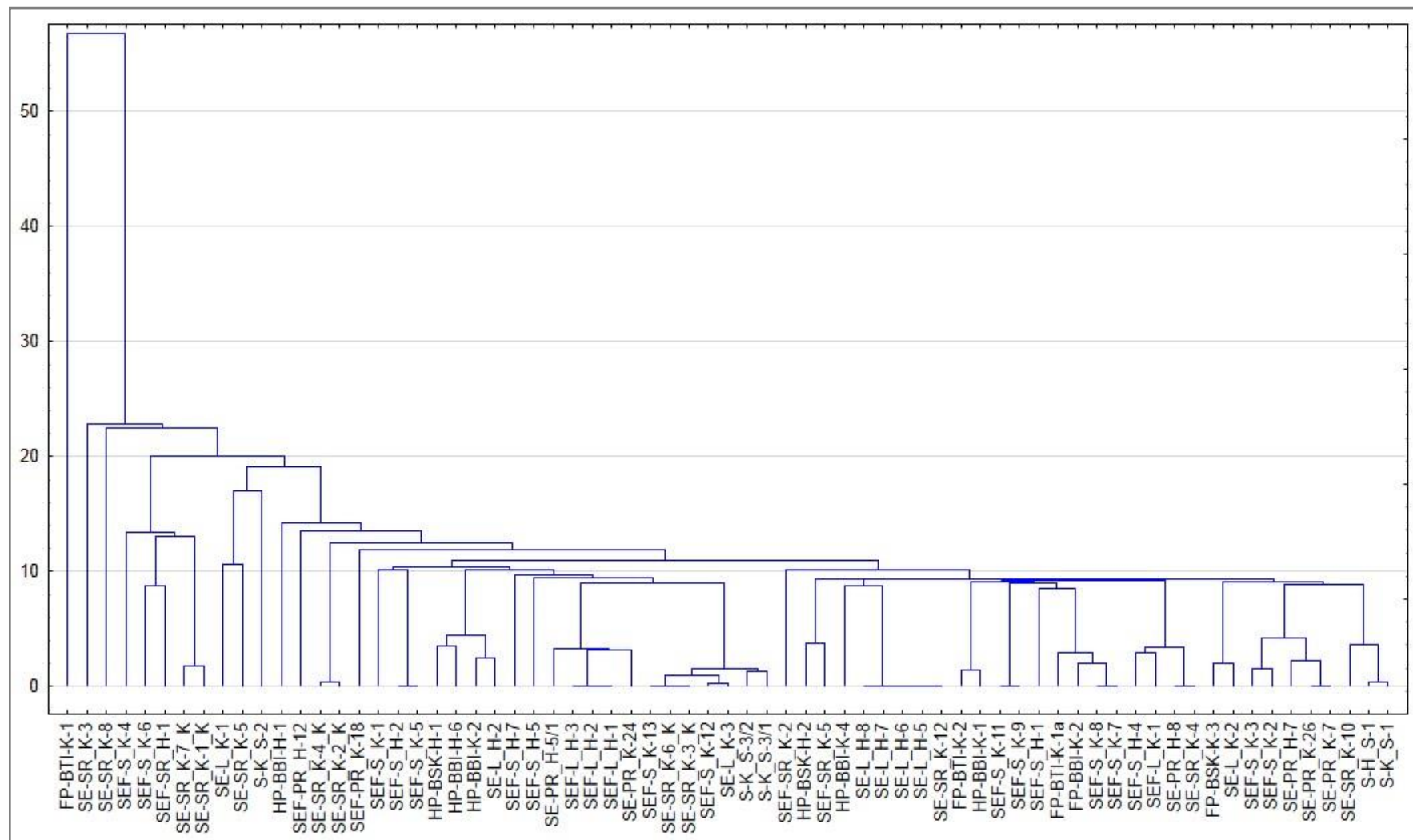
| | | | | | | |
|-----|----------|--|--|----------|---|---|
| 142 | SEFLH2 | **közepes, opálos, kerek, gumyszerű, kék | rövid-közepes pálcák | Gram (+) | n | i |
| 143 | SEFLH3 | közepes, opálos, kerek, gumyszerű, kék | rövid-közepes pálcák | Gram (+) | n | i |
| 144 | SEFLH4 | **nagyon kicsi, tükröződő, kerek, nagyon elfolyós, közepén kék, karima sárgászöld | közepes, vékony pálcák | Gram (-) | n | |
| 145 | SEFSRH1 | **közepes-kicsi, tükröződő, kerek, elfolyós, bordópiros-kék keveréke | közepes kokkuszok | Gram (+) | n | n |
| 146 | SEFPRH1V | **közepes, opálos, kerek, gumyszerű, sötétkék, világoskék karimával | kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 147 | SEFPRH2V | **közepes, opálos, kerek, gumyszerű, sötétkék, világoskék karimával | kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | n | |
| 148 | HPBBIK1 | ** nagyon kicsi-kicsi, tükröződő, kerek, sima, nagyon méregzöld, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi, vékony pálcák | Gram (+) | n | n |
| 149 | HPBBIK2 | nagyon kicsi- <u>kicsi</u> , tükröződő, kerek, sima, fehér áttetszős - világos krémszín | nagyon kicsi, rövid pálcák/ kokkoidok | Gram (+) | n | n |
| 150 | HPBBIK3 | kicsi, tükröződő, kerek, sima, sárgás-krémszínű | nagyon kicsi, vékony pálcák | Gram (-) | i | n |
| 151 | HPBBIK4 | ** nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, közepén sötétzöld pont, karima világos kékes-zöld (áttetsző), táptalaj kisárgul | nagyon kicsi, kokkoidok | Gram (+) | n | n |
| 152 | HPBBIH1 | ** közepes, tükröződő, kerek, nagyon elfolyós, világos-krémeskék, világoskék karima, táptalaj enyhén kisárgul | rövid, nagyon kicsi pálcák esetleg kokkoidok is vannak | Gram (+) | i | n |
| 153 | HPBBIH2 | ** kicsi-közepes, tükröződő, épszélű/kerek, sima, közepén sötétzöld, áttetsző karima, táptalaj kisárgul | nagyon kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | i | n |
| 154 | HPBBIH4 | ** nagy, tükröződő, épszélű, sima, közepén sötétzöld világosabb zöldel keverve (szemcsés), karima világoszöldes kékes beütéssel, táptalaj kisárgul | kicsi kokkoidok | Gram (-) | i | n |
| 155 | HPBBIH6 | ** közepes, tükröződő, épszélű, elfolyós, világos-fehéreskék (szemcsés-ordás), táptalaj nagyon kicsit sárgul | rövid, nagyon kicsi pálcák esetleg kokkoidok is vannak | Gram (+) | i | n |
| 156 | HPBSKH1 | kicsi, tükröződő, kerek, sima, fehér, kidomborodik kicsit | nagyon-nagyon kicsi, rövid pálcák | Gram (+) | n | n |
| 157 | HPBSKH2 | kicsi, tükröződő, kerek, sima, világos citromsárga | nagyon kicsi, rövid pálcák | Gram (+) | n | n |

| | | | | | | |
|-----|----------|---|--|----------|---|---|
| 158 | FPBTIK1 | kicsi-közepes, tükröződő, kerek, sima, krémes (fehéres) világos narancssárga | nagyon kicsi, rövid pálcák | Gram (+) | n | n |
| 159 | FPBTIK1a | **nagy, tükröződő, csipkézett, sima, sötétzöld halvány (áttetsző) világoszöld karimával, táptalaj kisárgul | kicsi, rövid pálcák | Gram (+) | n | n |
| 160 | FPBTIK2 | ** nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, méregzöld, nagyon kicsit sárgul/nem | nagyon kicsi, rövid pálcák | Gram (+) | n | n |
| 161 | FPBBIK1 | ** nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, világoskék-krémes szürkés beütéssel, táptalaj kicsit kisárgul | nagyon kicsi, kokkoidok | Gram (-) | i | n |
| 162 | FPBBIK2 | ** kicsi, tükröződő, kerek, sima, méregzöld, táptalaj enyhén kisárgul | kicsi, rövid pálcák | Gram (+) | n | n |
| 163 | FPBBIK4 | **nagyon kicsi-kicsi, tükröződő, kerek, sima, méregzöld, nagyon vékony áttetsző szegély, táptalaj nagyon enyhén kisárgul | rövid pálcák | Gram (-) | n | n |
| 164 | FPBBIK6 | ** nagyon kicsi - kicsi, tükröződő, kerek, kicsit elfolyós, világoskék (krémes, fehéreskék) | nagyon kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | i | n |
| 165 | FPBSKK1 | ** nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, sötétzöld | kicsi, rövid pálcák | Gram (-) | n | n |
| 166 | FPBSKK2 | ** nagyon nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, világoskék (halványkék) | <u>kicsi</u> -közepes, kokkoidok | Gram (-) | i | n |
| 167 | FPBSKK3 | ** nagyon nagyon kicsi, tükröződő, kerek, sima, világoskék (halványabb kék) | nagyon kicsi, rövid pálcák és/vagy kokkoidok | Gram (+) | i | n |
| 168 | FPBTIH1 | ** közepes, tükröződő, épszélű, rücskös, sötétbarna és sötétzöld közepű, sötétbarna karima | közepes pálcák | Gram (-) | i | n |
| 169 | FPBBIH2 | ** nagy, tükröződő, épszélű, elfolyós, sötétzöld szabálytalan pont, világos sárgászöld karima, táptalaj kisárgul | kicsi, kokkoidok | Gram (-) | i | n |
| 170 | FPBBIH3 | ** nagyon nagy, tükröződő, épszélű, elfolyós, sötétzöld rücskös közepű, vastag krémeszöld karima, zöldeskrémszínű vastag karima (elfolyósabb) | nagyon kicsi, nagyon rövid pálcák | Gram (-) | i | n |

Jelölési kód rövidítésének magyarázata: FPBSKK1 = FP-BSK-K-1; SHS1 = S-H-S-1; SKS1 = S-K-S-1

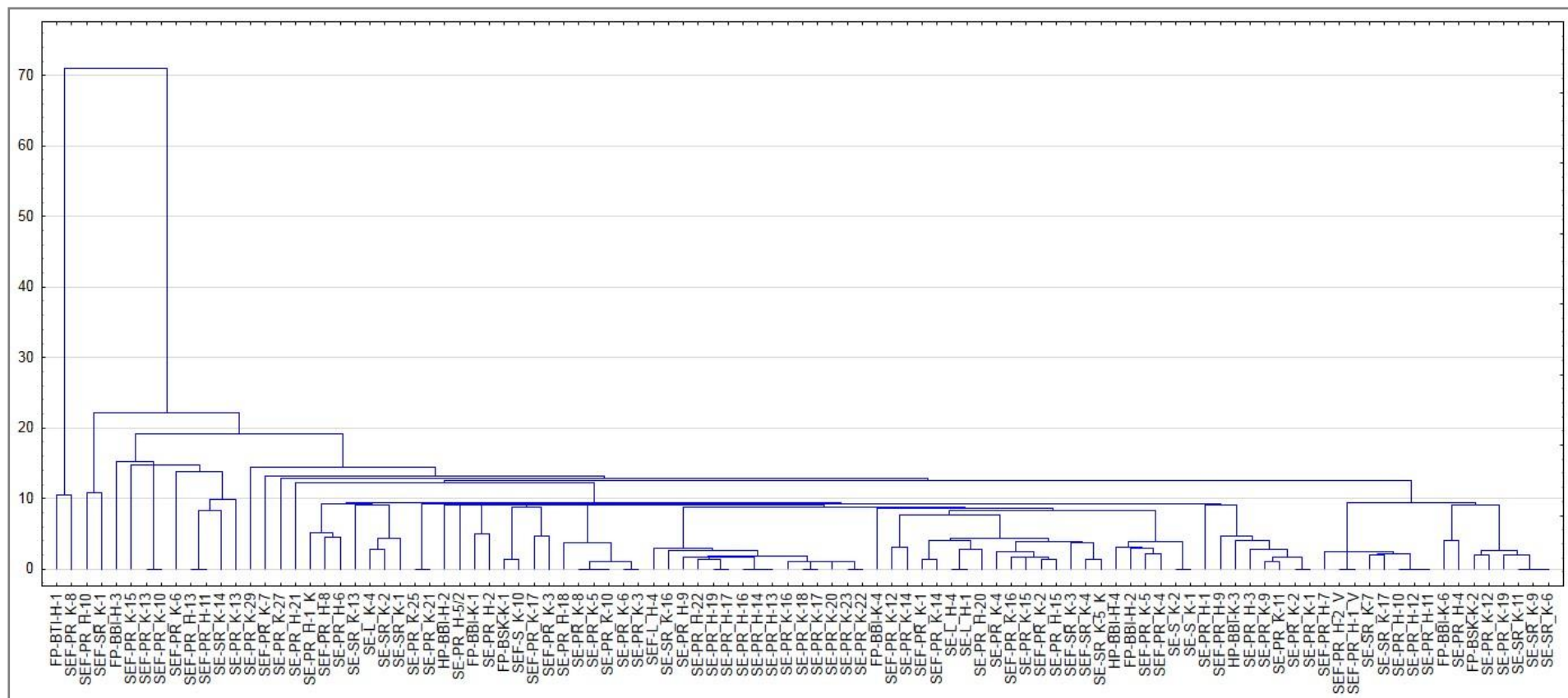
Jelölési kód magyarázata (balról jobbra haladva): SEF és FP – talajkultúrás, SE és HP – hidroponikus; PR – főgyökér, SR – mellékgyökér, S – szár, L – levél, BBI – termés szivacsos állomány, BTI – termés hús, BSK – termés hús és héj; K – Kárpia fajta paprika, H – Hó fajta paprika; SHS1– ültetéshez használt Hó fajta, SKS1 – ültetéshez használt Kárpia fajta paprikamag.

M5. A Gram-pozitív izolátumok fenotípusos tulajdonságai alapján készült fenogram



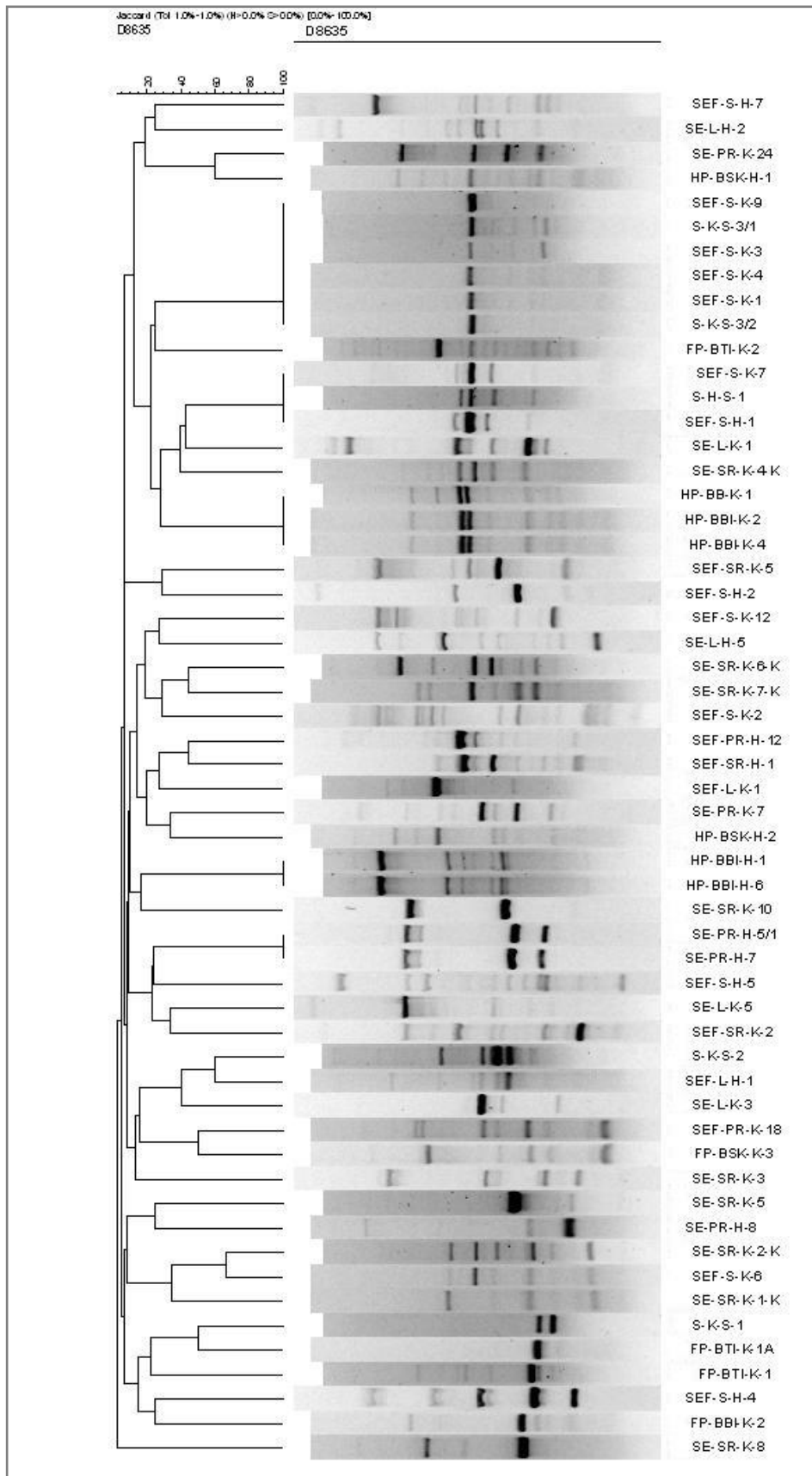
Jelölési kód magyarázata (balról jobbra haladva): SEF és FP – talajkultúras, SE és HP – hidroponikus; PR – főgyökér, SR – mellégyökér, S – szár, L – levél, BBI – termés szivacsos állomány, BTI – termés hús, BSK – termés hús és héj; K – Kárpia fajta paprika, H – Hó fajta paprika; SHS1– ültetéshez használt Hó fajta, SKS1 – ültetéshez használt Kárpia fajta paprikamag.

M6. A Gram-negatív izolátumok fenotípusos tulajdonságai alapján készült fenogram



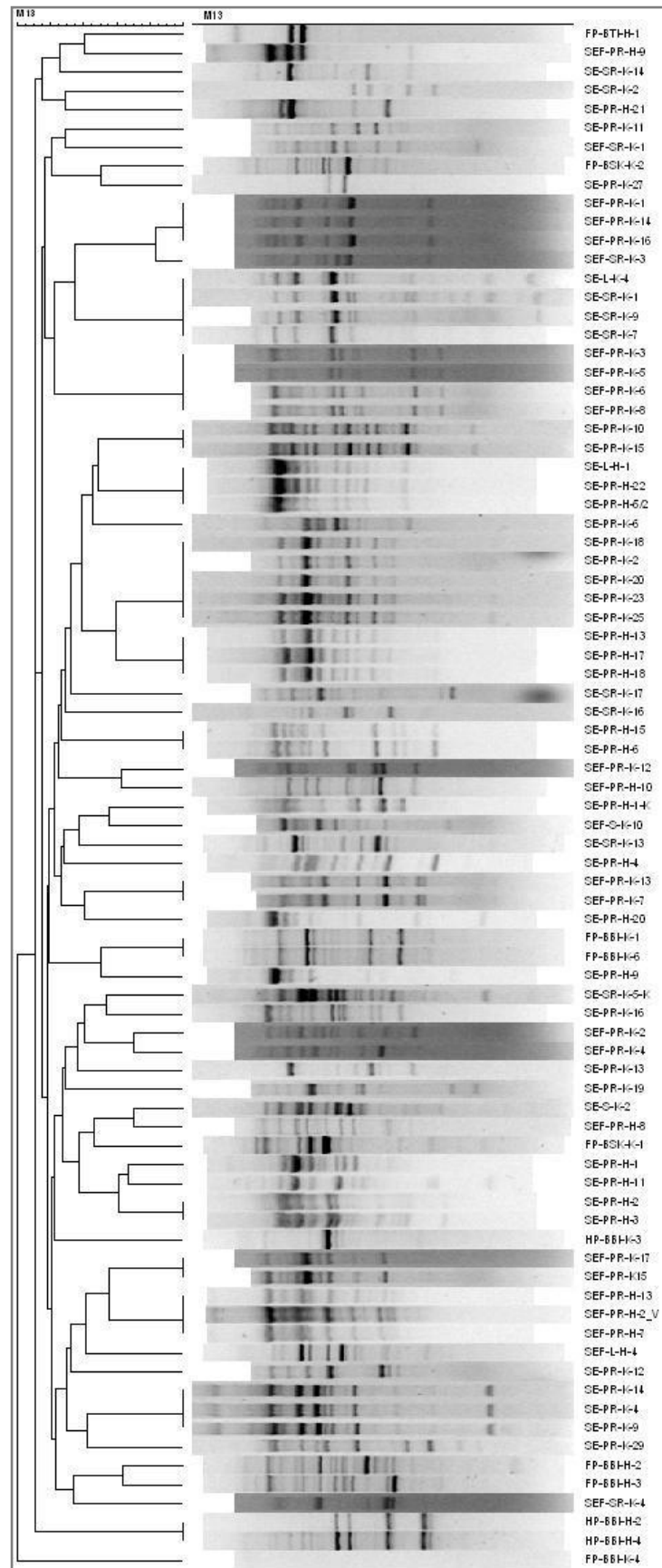
Jelölési kód magyarázata (balról jobbra haladva): SEF és FP – talajkultúra, SE és HP – hidroponikus; PR – főgyökér, SR – mellégyökér, S – szár, L – levél, BBI – termés szivacsos állomány, BTI – termés hús, BSK – termés hús és héj; K – Kárpia fajta paprika, H – Hó fajta paprika; SHS1– ültetéshez használt Hó fajta, SKS1 – ültetéshez használt Kárpia fajta paprikamag.

M7. A Gram-pozitív izolátumok RAPD-PCR mintázatainak dendrogramja (D8635)



Jelölési kód magyarázata (balról jobbra haladva): SEF és FP – talajkultúras, SE és HP – hidroponikus; PR – főgyökér, SR – mellégyökér, S – szár, L – levél, BBI – termés szivacsos állomány, BTI – termés hús, BSK – termés hús és héj; K – Kárpia fajta paprika, H – Hó fajta paprika; SHS1 – ültetéshez használt Hó fajta, SKS1 – ültetéshez használt Kárpia fajta paprikamag.

M8. A Gram-negatív izolátumok RAPD-PCR mintázatainak dendrogramja (M13)



Jelölési kód magyarázata (balról jobbra haladva): SEF és FP – talajkultúrás, SE és HP – hidroponikus; PR – főgyökér, SR – mellégyökér, S – szár, L – levél, BBI – termés szivacsos állomány, BTI – termés hús, BSK – termés hús és héj; K – Kárpia fajta paprika, H – Hó fajta paprika; SHS1 – ültetéshez használt Hó fajta, SKS1 – ültetéshez használt Kárpia fajta paprikamag

M9. A munka során keletkezett génszekvencia adatok

A munkám során keletkezett génszekvencia adatok egy része (lásd az alábbi táblázatot) az NCBI adatbázisában (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) is elérhető a GBN alapján, míg a másik része a táblázat után található meg, a feltüntetett törzskódok és az adott gén alapján.

Továbbá a CD mellékletben megtalálható az összes génszekvencia adat együtt, a törzskódok alapján, az alábbi fájlnev alatt: *Fustos Zoltan_PhD ertekezes_genszekvencia adatai_2016.docx*

| Törzs kód | GBN (szekvencia azonosító szám) | |
|-----------|---------------------------------|----------|
| | 16S rRNS gén | rpoB gén |
| SEFPRK8 | KU605699 | KX958158 |
| SESK2 | KU605698 | KX958159 |
| SEPRK15 | KU605704 | KX958162 |
| SEPRH1K | KU605681 | KX958163 |
| SEPRK29 | KU605700 | KX958165 |
| HPBBIK3 | KU605701 | KX958166 |
| SEPRH4 | KU605743 | KX958167 |
| SEPRK6 | KU605705 | KX958169 |
| SEFPRK2 | KU605677 | KX958170 |
| SEFPRK15 | KU605741 | KX958171 |
| SEPRK23 | KU605702 | KX958173 |
| SEPRK19 | KU605703 | KX958174 |
| SESRK14 | KU605727 | - |
| FPBSKK1 | KU605691 | - |
| FPBTIK2 | KU605718 | - |
| SESRK17 | KU605694 | - |
| SEPRH20 | KU605673 | - |
| FPBBIK2 | KU605725 | - |
| SEFPRK12 | KU605675 | - |
| SEFPRK7 | KU605675 | - |
| SEFPRH10 | KU605675 | - |
| HPBBIH4 | KU605688 | - |
| SESRK6K | KU605716 | - |
| SEFSRK2 | KU605708 | - |
| HPBSKH1 | KU605723 | - |
| SELK5 | KU605726 | - |
| HPBBIK4 | KU605720 | - |
| FPBTIK1A | KU605765 | - |
| SESRK2K | KU605717 | - |
| SEFSRK4 | KU605679 | - |
| SEFSRK1 | KU605696 | - |
| SEFSH4 | KU605721 | - |
| FPBBIH3 | KU605692 | - |
| FPBBIH2 | KU605690 | - |
| SEFLH4 | KU605684 | - |
| SEPRH21 | KU605687 | - |
| SEFSK10 | KU605695 | - |
| SEFSK2 | KU605729 | - |
| SKS1 | KU605728 | - |
| SEFSK12 | KU605709 | - |
| SELK3 | KU605724 | - |
| SESRK16 | KU605678 | - |

| | | |
|-----------------|----------|---|
| SEPRH9 | KU605682 | - |
| SEFLK1 | KU605719 | - |
| SESRK8 | KU605763 | - |
| SKS2 | KU605707 | - |
| SEFLH1 | KU605706 | - |
| SELK1 | KU605710 | - |
| SEPRH5/1 | KU605769 | - |
| FPBTIH1 | KU605683 | - |
| SEFSH2 | KU605713 | - |
| SEFSRH1 | KU605715 | - |
| SEFPRK4 | KU605731 | - |
| SEFPRK16 | KU605674 | - |
| SESRK10 | KU605714 | - |
| SEFSH7 | KU605711 | - |
| HPBSKH2 | KU605730 | - |
| FPBBIK6 | KU605689 | - |
| SESRK5K | KU605685 | - |
| SESRK1 | KU605697 | - |
| SEFSRK3 | KU605693 | - |
| SEFSRK5 | KU605712 | - |
| SEFPRH12 | KU605722 | - |
| SEPRK11 | KU605686 | - |
| SEPRK9 | KU605680 | - |

>SELH1_16S rRNS gén

TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCCTTGACATCCAATGAACCTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTCACAGCAGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGC TACACAGTGTACAATGGTTCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAAC TCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCTCACACCATGGG AGTGGGTTGCACCAGAAGTAG

>SELH1_rpoB gén

TATGCGCGCACCAACCAGTATGGCTTCCTCGAGAGCCCGTACCGTGTGGTGAAAGACGCTCTGGTCACCGACGAGATCGTGTTCCTGTCCGCCATCG AAGAAGCTGATCAGTATCGCTCAGGCTTCGGCCACGATGAACGACAAGAAAGTCTGATCGACGAGCTGGTAGCTGTTGCTCACTGAACGAGTT CACCGTCAAGGCGCCGGAAGACGTCACCTTGATGGACGATATCGCCGAAGCAGGTAGTTTCGGTTCGACGCTCGTGTATCCCGTTCCTGGAACACGAT CACGCCAACCGTGCCTGATGGGTTCCAACATGCAGCGTCAAGCTGTACCACCGTGCCTGTCACAAGCCGCTGGTAGGTACCGGCATGGAGCGTA ACGTAGCCCGTGACTCCGGCGTTTGGCTCGTGGCTCGTGGCGCGTGCATCGATTCCGTCGATGCCAGCCGATCGTGGTTCGTGTTGCTGATGA TGAAGTTGAAACGGGTGAAGCCGGTTCGACATCTACAACCTGACAAAATACACCCGCTCGAACCAGAACACCTGCATCAACACGCGTCCGCTGGTG CGTAAGGGTGTATCGCTTCAGCGTAGCGACATCATGGCTGACGGTCCGTCACCGATATGGGTGAATGGCTCTGGGTGAGAATGCGCATCGCGT TCATGGCATGGAACGGCTTCAACTTCGAAGACTCCATCTCCCTGTCCGAGCGTGTGGTTCAAGAAGATCGCTTCACCACGATCCACATTCAGGAGCT GACCTGTGTGGCAGTGCACCAAGCTTGGGCCAGAGG

>SEPRK16_16S rRNS gén

TTTAAGTTGGGAGGAAGGGCCATTACCTAATACGTGATGGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTTGTTAAGTTGGATGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAA CTGCATTCAAAACGACTGACTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG AAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGTCA ACTAGCCGTTGGGAGCCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAATT GACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCCTTGACATCCAATGAACCTTCTAGAGATA GATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCT TGTCTTAGTTACCAGCAGTAATGGTGGGCACCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCT TACGGCCTGGGTACACACGTCATAATGGTTCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATC GCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCG TCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAA

>SEPRK16_rpoB gén

GACTCACTACGGTCTGTATGCCGATTGAAACGCCGGAAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGGCCGCTATGCGCGCACCAACCAGTAT GGTTCCTCGAGAGCCCGTACCCTGTGGTGAAAGACGCTCTGGTCACCGACGAGATCGTGTTCCTGTCCGCCATCGAAGAAGCTGATCAGGTGATCG CTCAGGCTTCGGCCACGATGAACGACAAGAAAGTCTGATCGACGAGCTGGTAGTGTTCGTACCTGAACGAGTTACCGTCAAGGCGCCGGAAGA

CGTCACTTGTATGGACGTATCGCCGAAGCAGGTAGTTTCGGTTCGACGGTTCGCTGATCCCCTTCTGGAAACACGATGACGCCAACCGTGCCTGATG
GGTTCCAACATGCAGCGTCAAGCTGTACCGACCTGCGTGTGACAAGCCGCTGGTAGGTACCGGCATGGAGCGTAACGTAGCCCGTACTCCGGCG
TTTGGCTCGTGGCTCGTCTGGCGCGTGTATCGATTCCGTCGATGCCAGCCGATCGTGGTTCGTGTGCTGATGATGAAGTTGAAACGGGTGAAGC
CGGTGTCGACATCTACAACCTGACCAAATACACCCGCTCGAACCAGAACACCTGCATCAACCAGCGTCCGCTGGTGCCTAAGGGTGTATCGCGTTCAG
CGTAGCGACATCATGGCTGACGGTCCGTCACCGATATGGGTGAATTGGCTCTGGGTGAGAACATGCCGATCGCGTTCATGGCATGGAACGGCTTCA
ACTTCAAGACTCCATCTGCCTGTCCGAGCGTGTGGTTCAGAAGATCGCTTACCACGATCCACATTCAGGAGCTGACCTGTGTGGCACGTGACAC
CAAGCTTGGGCCAGA

>SEPRH2_16S rRNS gén

GACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGTCAACTAGCCGTTGGGA
GCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCG
GGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAGTTACC
AGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGGCTGGGCTA
CACAGTGTCTACAATGGTTCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTC
GACTCGGTGAAGTTCGAATCGCTAGTAATCGGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGGAG
TGGGTTGCACCAGAAGTAGC

>SEPRH2_rpoB gén

AGTACGGCTTCTCGAGAGCCGTACCGTGTGGTGAAGACGCCCTGGTTACCAGCAGATCGTGTCTCGTCCCATCGAAGAAGTGTATCAGCT
GATCGCTCAGGCTTCCGCCACGATGAACGACAAGAAAGTCTGATCGACGAGCTGGTAGCTGTTCTGTCACCTGAACGAGTTACCGTCAAGGCCCG
GAAGACGTACCCCTGATGGACGTATCACCGAAGCAGGTAGTTTCGGTTGCAGCGTTCGCTGATCCCCTTCTCGAGCAGATGACGCCAACCGTGCCT
TGATGGGTTCCAACATGCAGCGTCAAGCTGTACCCACCCTGCGTGTGACAAGCCGCTGGTGGTACCGGCATGGAGCGTAACGTAGCTCGTACTC
CGGCGTTTGCCTCGTGGCTCGTCTGGCGGGCTTATCGATTCCGTCGACGCCAGCCGATCGTGGTTCGTGTGCTGATGACGAAGTTGAAACCGGC
GAAGTGGTGTGACATCTACAACCTGACCAAGTACACCCGCTCCAACCAGAACACCTGCATCAACCAGCGTCCGCTGGTGCCTAAGGGTGTATCGGG
TTCAGCGTAGCGATATCATGGCCGACGGCCCGTCCACCGACATGGGTGAATGGCGCTGGGTGAGAACATGCCGATCGCCTTCATGGCATGGAACGG
CTTCAACTTCAAGACTCCATCTGCCTGTGCGAAGCTGTAGTTCAGGAAGATCGCTTACCACGATCCACATCCAGGAACTGACCTGTGTGGCACGT
GACACCAAGCTT

>SEPRH1_16S rRNS gén

GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAG
TTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAATGAATGACGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACG
CGAAGAACCTTACCAGGCCCTTGACATCCAATGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAG
CTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTACCAGCAGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCA
AGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCCGAATCGCTAGTAATCCG

>SEPRH1_rpoB gén

GTACGCTCGCACTAACAGTATGGCTTCTGGAAAGCCCGTACCGTGTAGTGAAGAGGGTATTGTCACCGACGATATCGTGTCTCGTGGCGATC
GAAGAAGCTGATCAGTTCATCGCTCAGGCTTCCGCCACGATGGACGAGAAGAACCTGATCGACGAACTAGTGGCCGTTCTGTCACCTGAACGAAT
TCACTGTCAAGGCCCCAGAAGACGTACCTTGATGGACGTTTCGCCAAGCAGGTAGTTTCGGTTGCAGCGTTCGCTGATTCGCTTCTCGAGCACGA
CGACGCCAACCGTGCCTTGATGGGTTCCAACATGCAGCGTCAAGGCTGTACCAACACTGCGTGGCGACAAGCCGCTGGTCCGATACCGGTTATGGAGCGC
AACGTTGCGCGTGACTCCGGCGTTTTCGCTCGTGGCTCGTCTGGTGGCGTGTGACTCCGTCGATGCCAGCCGATCGTGTGTTCCGCTTGGCCGATG
ACGAAGTTGAAACTGGCGAAGCCGGTGTGACATCTACAACCTGACCAAATACACCCGTTCAACCAGAACACCTGCATCAACCAGCGTCCGCTGGT
GAGCAAAGGTGATGTGGTTACGCGTAGT

>SEPRH18_16S rRNS gén

TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGG
GAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAATGAATTGACGGGGGCCG
CACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCCTTGACATCCAATGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTT
CGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAGTTA
CCAGCAGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAAC
TCGACTGCGTGAAGTCCGAATCGCTAGTAATCGGAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGG
AGTGGGTTGCACCAGAAGTAG

>SEPRH18_rpoB gén

TCCTGATCGACGAACTGGTTGCCGTACGTACCTGAACGAATTCACCGTCAAGGCGCCGGAAGACGTCACGCTGATGGACGTTTCGCCGAAGCAGGT
TGTGTCCGTTGCAGCGTCCGNGATCCGTTCCCTCGAGCAGCAGCAGCCAACCGTTCGCTTGTGGGTTCAACATGCAGCGTCAAGGCTGTACCGACT
CTGCGCGTGCACAAGCCGTTGGTAGTACCAGCATGGAGCGTAAACGTAGCCCGTACTCCGGCGTTTGGCTCGTGGCTCGTCTGGTGGCGTGTATCG
ATTCGCTCGATGCCAGCCGTTTCGTTGCGGTTCCGATGACGAGTGAAGTGAACCCGTTGAAGCCGGTGTGACATCTACAACCTGACCAAATACAC
CCGCTCGAACCAGAACACTTCATCAATCAGCGTCCGCTGGTGGTGGTGAAGTGAATCCGCTTCCAGCGTACGACATCATGGCCGACGGCCGCTCCACC
GACATGGGTGAACTGGCACTGGGTGAGAATGCGCATCGCGTTCATGGCATGGAACGGCTTCAACTTCAAGACTCCATCTGCCTGTCCGAGCGTG
TGGTTCAGGAAGACCGTTTACCACGATCCACATTCAGGAAGTACCTGTGTGGCCCGTACACCAAGCTTGGCCAGAGGAAAT

>SESRK2_16S rRNS gén

GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGCTTCTGGTCTGTAACCTGACCGTGGAGCGCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAGGTGTTGGGGGTTTCAATACCCTCAGTCCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCTGGGGAGTA

CGCTCGCAAGAGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGT
CTTGACATCCCCTGACCCTCTGGAGACAGAGCTTCCCTTCGGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGATGATGTT
GGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATTCTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAAGCG
GGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGATGTACCTCGCGAGAGGACGCCAAT
CTCTTAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGGGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGA

>SESrk13_16S rRNS gén

TGTAACCTGACGCTGAGGCGCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAGGTGTTGGGGGTT
TCAATACCCTCAGTGCCGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACCGCTCTGGAGACAGAGCTTCCCTTCGGG
GCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATTCTAGTTGCCAG
CATTAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACA
CGTGTACAATGGTTGGTACAACGGGATGTACCTCGCGAGAGGACGCCAATCTCTTAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCT
ACATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGGGAGTTTGA
CAACACCCGAAGTCG

>SEPRK13_16S rRNS gén

CTGTGTAGCTTGTAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTC
TGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAGGTGTTGG
GGGTTTCAATACCCTCAGTGCCGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACCGCTCTGGAGACAGAGCTTCCCT
TCGGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATTCTAGTT
GCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGTACAATGGTTGGTACAACGGGATGTACCTCGCGAGAGGACGCCAATCTCTTAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACT
CGCTACATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGGGA
GTTTGAACACCCGAAGTCGGTGAAGTAAACCGCAA

>FPBBIK4_16S rRNS gén

TGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGTTGGGCGCTAGATGTAGGGACCTTCCACGGTTTCTGTGTCGTAGCTAACGCATTA
AGCGCCCCGCTGGGAGTACGCGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGGCGATTAAATTCGATGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGGCCAGAGATGGTCCGCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAG
CTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCGTCTATGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGGACTCATAGGAGACTGCCGG
GGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTGGGCTTACGCGATGTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGA
TACCGTAAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT
CAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCTAACCCCTT

>SEPRK12_16S rRNS gén

GAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGACGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGC
CCAGTCTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATACGATCTGAGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCCTCGCCGCGATTGGAGCGG
CCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGCAAAGCCTGATCCAGCAATGCCCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGT
TGTAACCTGCTTTTGTACGGAACGAAAAGCTCCTTCTAATACAGGGGGCCATGACGGTACCCTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGGCGAGCGGTTATGTAAGACAGATGTGAAATCCCGGGCTC
AACCTGGGAACCTGCAATTTGTGACTGCATGGCTAGAGTACGGTACGAGGGGATGGAATTCGCCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAAC
ACCGATGGCGAAGGCAATCCCTGGACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTA
AACGATGTCAACTGGTTGTTGGGAATTAGTTTTCTCAGTAACGAAAGCTAACCGGTGAAGTTGACCGCTGGGAGTACGCGCCGCAAGGTTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGACCCCGCACAAAGCGGTGGATGATGTGGTTAATTCGATGCAACCGGAAAACCTTACCCACCTTGTGACATGGCAGGAAGTTT
CCAGAGATGGATTCTGTCTGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACG
AGCGCAACCCCTGTGATAGTTGCTACATTCAGTTGAGCACTTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTC
ATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCCAACCCTCGAGGGGGAGCTAATCCATAAAAACCGTCTGATG
TCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC

>SESrk7K_16S rRNS gén

CAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCCGATGGCGAAGGCGAGTCTCTGGG
CTGTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGAC
ATTCCACGTTTTCCCGCGCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGCGGAGCATCGGATTAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGATCGTTCAGAGATGGTCTTCCCCTTT
GGGTCCGGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCCATGTTGCC
AGCACGTGATGGTGGGGACTCATGGGAGACTCGCGGGTCAACTCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATGATGCCCTTATGCTTGGGCTT
CACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGATTGAGGTCTGCAACTC
GACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAAGTACAGAAA
GTCGGTAACACCCGAAGCCGG

>FPBTIK1_16S rRNS gén

TGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCT
TAGATACCCCTGGTAGTCCACCCGTAACGTTGGGAAGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCAGCC

TGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACC
TTACCAAGGCTTGACATATACGAGAAGCGGGCCAGAAATGGTCAACTCTTTGGACACTCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCATGGGATACTGCCGGGTCAAACCTG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGCTTGGGCTTACGCGATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGTGAGG
TGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGTCCAGTTCGGATTGAGGCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCT
CGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGCCAA

>SESRK1K_16S rRNS gén

TAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTA
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCC
ACGGTTTCCGCGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
GGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGTTTCCCTTTGGGGC
GGGTTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCATGTTGCCAGCAC
GTAATGGTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGCG
ATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCC
CATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCTCAAGTCACGAAAGTTGG
TAAC

>SESRK4K_16S rRNS gén

TAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTA
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCC
ACGGTTTCCGCGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
GGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGTTTCCCTTTGGGGC
GGGTTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCATGTTGCCAGCAC
GTAATGGTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGCG
ATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCC
CATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCTCAAGTCACGAAAGTTGG
TAAC

>SEFSK6_16S rRNS gén

GAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTA
GATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCGCGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCT
ACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGTTTCCCTTTGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTGAGCTCGTGTGCTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGG
AGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGCGATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGT
GGAGCTAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCG

>FPBSKK2_16S rRNS gén

GATACTGGGTATCTTGGATGGAAGAGGTAAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
TTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGAATGTTAGCCG
TCGGGCAGTATACTGTTCCGTTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCGCCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTTGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCTCTTGACATTCGGGGTTTGGGCAGTGGAGACATTTGCTCT
TCAGTTAGGCTGGCCCCAGAACAGGTGCT
TTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTAGCGG
CTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGTGGTGCAGTGGGCGAGACAGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCT
GCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCTCACACC
ATGGGAGTTGGTTTTTACCCGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGGACGCT

>FPBSKK3_16S rRNS gén

CCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGAATGTTAGCCGTGGGCAGTATACTGTTCCGTTGGCGCAGCTAACGCATTA
ACATTCGCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTTGTTAATTCGAAGCAAC
GCGCAGAACCCTACCAGCTCTTGACATTCGGGGTTTGGGCAGTGGAGACATTTGCTCTCAGTTAGGCTGGCCCCAGAACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGTCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGC
CGGTGATAAGCCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGTACACACGCTGCTACAATGGTGGTGCAGTGGGCA
GCGAGACAGGATGTCGAGTAACTTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCA
GATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCTCACACCATGGGAGTTGGTTTTTACCCGAAGGTAGTGCCTAACCGCA
AGGAGGCAGCT

>SELH5_16S rRNS gén

GATACTGGGTATCTTGGATGGAAGAGGTAAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
TTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGAATGTTAGCCG
TCGGGCAGTATACTGTTCCGTTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCGCCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATTGACGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTTGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCTCTTGACATTCGGGGTTTGGGCAGTGGAGACATTTGCTCT
TCAGTTAGGCTGGCCCCAGAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTTCCTCATGGCCCTTACGGG
CTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGTGGTGCAGTGGGCGAGACAGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCT

GCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCCGTCACACC
ATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAGTGCGCTA

>SEFPRK18_16S rRNS gén

GATACTGGGTATCTTGTAGTATGGAAGAGGTAAGTGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
TTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCG
TCGGGCAGTATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCGCCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAACACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCTCTTGACATTCGGGGTTTGGGAGTGGAGACATTTGTCT
TCAGTTAGGCTGGCCCCAGAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCC
TTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGG
CTGGGCTACACAGTGCATAAATGGTGGTGCAGTGGGAGCAGGACAGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCT
GCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCCGTCACACC
ATGGGAGTTGGTTTTACCCGAAGGTAGTGCGCTAACCCGA

>SKS3/2_16S rRNS gén

CTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTC
CGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACCGCTCTAGAGATAGAGTCTTCCCTTCGGGG
ACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATC
ATTAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGACAATAACAAGGGCAGCTAAACCCGAGGTCAGCAAAATCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTA
CATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCCGCCCGTCACACCAGGAGTTTGT
AACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCATTA

>SEFSK7_16S rRNS gén

GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAA
TGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTCGC
CCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACCGCTCTAGAGATAGAGTCTTCCCTTCGGGGGACA
AAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATT
AAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTC
CTACAATGGACAATAACAAGGGCAGCTAAACCCGAGGTCAGCAAAATCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACAT
GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCCGCCCGTCACACCAGGAGTTTGTAA
ACCCGAAGCCGG

>SEPRH6_16S rRNS gén

GGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCCGCCCTGGGGAGTACGGTGCAG
ACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATGT
CGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTGCTTCGGGAACTCGAACACAGTGTGCTGCATGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTTC
CCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACC GCCGGTGACAAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACAGGGCTACACACGTAACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAAACCAGGAGGCAAGCCAATCCAGAAA
CCCTATCTCAGTCCGATGGAGTCTGCAACTGCACTCCATGAAGTCGGAATCGTGAATTCGAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGACACACCCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTGTGACCCAGAAGCAGGT

>SEPRH11_16S rRNS gén

CAGCTACCTGGACCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTG
GATGTTGGGTGCAATTTGGCAGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCCGCCCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATGTCGAGAACTTTCCAGAGATGGAT
TGGTGCCTTCGGGAACCTGCAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGT
CCTTAGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACC GCCGGTGACAAACCAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC
GACCAGGGCTACACACGTAACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAAACCAGGAGGCAAGCCAATCCAGAAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGA
GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTC
ACACCATGGGAGTTTGTGTGACCCAGAAGCAG

>SESRK5_16S rRNS gén

CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAG
CACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACG
CGAAGAACCCTTACCAGGCTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGGACAGAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTG
AGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGATCTTAGTTGGCAGATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGG
TGACAAACCAGGAGGAGTGGGATGAGCTCAAATCATGATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTCATAAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAA
ACCTGCGAAGGTAAGCGAATCCATAAAGCCATTTCTCAGTTCGGATTGACAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT
CAGCATGCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGC

>SESRK3_16S rRNS gén

CTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT
AACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTC

CGCCCTTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGG
ACAGAGTGACAGGTGTCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGC
ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
GTGTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCCCATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTG
CATGAAGCCGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGT
AACCCCGAAGTCGGTGAGGTAACC

>SEPRH8_16S rRNS gén

GAGTGCAGAAGAGAAAAGTGAATTCACAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAC
TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGC
CCTTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGGACA
GAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTATCTTAGTTGCCAGCATT
CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG
CTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCCCATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTCAT
GAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAAAC
ACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC

>SEPRK24_16S rRNS gén

GAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTTTTGGTCTGTAAC
TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGC
CCTTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGGACA
GAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTATCTTAGTTGCCAGCATT
TAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG
CTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCCCATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTCAT
GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTGTAAAC
ACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC

>SEPRK7_16S rRNS gén

AACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTTTTGGTCT
GTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTT
TCCGCCCTTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
CGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGG
GGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTATCTTAGTTGCCA
GCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAC
ACGTGTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCC
TACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTT
GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC

>SEPRK27_16S rRNS gén

AAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGCT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCGCGAGGTC
AAGCCAATCCCATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGG
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCC

>SEFSH5_16S rRNS gén

TGACGTGGGTACGGGACACTAGAGTGCAGTGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGA
AGGCAGATCTCTGGGCGGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAA
CTAGTTGTTGGGACCATTCACAGGTTTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAAT
TGACGGGACCCGCAAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCAGAACGGGCCAGAAA
TGGTCAACTCTTTGGACACTGGTGAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTT
CGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTATGGGATACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
TATGCTTGGGCTTCCAGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCCTGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCCAGTTCGGATT
GAGGCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCCGAGTGCATAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCC
GTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGT

>SEFPRH9_16S rRNS gén

TGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACCCGTAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCTGACGAGCTAACGCATTAAGTTCGCCCTGGGG
AGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAAGCGGGCGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC
AAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCCAGAAATGGTCAACTCTTTGGACACTCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGTTCTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTATGGGATACTGCCGGGTCAACTCGGAGGA

AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCAATACCGCGAGGTGGAG
CGAATCCCAAAAAGCCGGTCCCAGTTCCGATTGAGGCTGCAACTCGACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGT
GAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCCGCCCTCAAGTCATGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCG

>SELH2_16S rRNS gén

CAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTGGG
CCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCACCCGTAACGTTGGGAAGTCTGTGGGGTCC
ATCCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCA
CAAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGAGAACGGGCCAGAAATGGTCAACTCTTTGG
ACACTCGTAAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTCTATGTTGCCA
GCACGTAATGGTGGGAATCATGGGACTGCCCCGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTC
ACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAAGGGTCAATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCCCAGTTCCGATTGAGGTCTGCAACTCG
ACCTCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCCGCCCTCAAGTCATGAAAG
TCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGCC

>SEFPRH13_16S rRNS gén

AGTGGCGAAGGGCGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
GATGAATGTTAGCCGTGCGGCAGTATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACACTCAA
GGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCTCTTGACATTCGGGGTATGGGCAT
TGGAGACGATGTCTTCAGTTAGGCTGGCCCCGAAACAGGTGTCATGGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGTCCCGCAACGGA
GCGCAACCCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCTC
CATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACAGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAG
TTCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACAC
ACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTACC CGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGGCAGCT

>SEFPRH8_16S rRNS gén

GATACTGGGTATCTTGTAGTATGGAAGAGGTAAGTGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGC
TTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCG
TCGGGCAGTATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACACTCAAAGGAATTGACGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAGCTCTTGACATTCGGGGTATGGGCATGGAGACGATGTCCT
TCAGTTAGGCTGGCCCCAGAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCC
TTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTACGGG
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACAGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCT
GCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTCACACC
ATGGGAGTTGGTTTACC CGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGGCAGC

>HPBBIH6_16S rRNS gén

CCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTGCGGCAGTATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATTA
ACATTCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAACACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAAC
GCGCAGAACCTTACCAGCTCTTGACATTCGGGGTATGGGCATTGGAGACGATGTCCTTCAAGTTAGGCTGGCCCCAGAACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGC
CGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCA
GCGAGACAGCGATGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCA
GATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTACC CGAAGGTAGTGCCTAACCGCA
AGGAGGCAGC

A palántákból újr izolált 16S rRNS génszekvencia adatok:

>PSEGY11_16S rRNS gén

TTCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTACGTTACCAGCAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGT
GCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCC
CGGGCTCAACCTGGGAATGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATCGCTAGATATAGG
AAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAACGATGCTCAACTAGCCGTTGGGTACCTTGGTACTTACTGAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTG
AGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GTAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGAACAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGCTACACACGTCTACAATGGTGGTGGTTCGTAAGGGTGGCAAGGGTGGCAAGCCGAGGTGAGCTAATCCCATAAAAC
CGATCGTAGTCCGGATCCAGCTGCAACTCGCTGCAAGTGCATGCGGTAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGC
CTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGTACT

>CHRL12_16S rRNS gén

GGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGTTAGCGCCTGATCCAGCCATCCCGGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGT
GTAAACTTCTTTTGTACAGGGATAAACCTTTCCACGTTGGGAAAGCTGAAGTACTGTACGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGG
GTAATACGGAGGGTGAAGCGTTATCCGGATTTATGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGATGCGTAAGTCAAGTGGTGAATCTCACAGCTCAACTGT

>Sgy_16S rRNS gén

TCAGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCAATTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACAGTCATAAATGGTACATACAGAGGGCCGCAACC
CGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAGTGTATCGTAGTCCGGATCGTAGTCTGCAACTCGACTACGTGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG
CATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGCGGGTTTTACCAGAAGTAGGTAGCTTAACCGCAAGGAGG
GCGCT

>Ssl_16S rRNS gén

TCAGCTCGTGTGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTGTTTAGTTGCCATCGTTGAGTTTGGAAACCCTGAACAGACTGCC
GGTGATAAGCCGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGCCCTGGGCGACACAGTGCTACAATGGCCGGGACAAAGGGTCCG
GATCCCGGAGGGTGAGCTAACCCAAAACCCGTCCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCCG
GTCAGCCATACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACTATGGGAGCTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACCTTAACCGCA
AGGAGGGGG

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton is hálás köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek **Dr. Belák Ágnesnek** szakmai iránymutatásáért és támogatásáért.

Őszintén köszönöm a **Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék valamennyi dolgozójának**, hogy mindig támogattak és segítőkészek voltak, de különösképpen **Bayer Gizellának** és **Szabovitsné Tessényi Katalinnak**.

Köszönöm a Bécsi Egyetem, Mikrobiológia és Ökoszisztéma Tudományok Tanszék vezetőjének, **Prof. Dr. Wagner Michael-nak**, hogy PhD tanulmányaim alatt részt vehettem az ott folyó kutatási feladatokban, elsajátíthattam a FISH-CLSM technikát és a saját kísérleteim egy részét is elvégezhettem. Köszönöm továbbá az **Osztály minden tagjának**, de különösen **Dr. Schmid Markus-nak**, **Dr. Szabó Gittának** és **Dr. Palatinszky Mártonnak**, hogy befogadtak és mindenben segítettek. Az ott eltöltött szakmai gyakorlatomat a TÁMOP-4.2.4B/1-11/1-2012-0001 azonosító számú „*Nemzeti Kiválóság Program - Campus Hungary K+F projektekhez és képzési programokhoz kapcsolódó nemzetközi hallgatói mobilitás személyi támogatási rendszerének fejlesztése országos program*” támogatta.

Hálával és köszönettel tartozom az MTA TTK részéről **Dr. Lőrincz Andrásnak**, hogy segített a növényi metszetek elkészítésében, továbbá különösen köszönöm **Dr. Tőkési Natáliának** és **Gervai Judit Zsuzsannának**, hogy a növényi metszetekről készült CLSM fényképek elkészítésében lehetőséget és segítséget nyújtottak.

A filogenetikai vizsgálatok elvégzéséhez segítséget és útmutatást kaptam az ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék részéről **Dr. Felföldi Tamás** személyében, amiért ezúton hálámat és nagyrabecsülésemet szeretném kifejezni.

Végül, de nem utolsó sorban, köszönettel tartozom **nagyszüleimnek, szüleimnek, barátaimnak, menyasszonyomnak Ajtai Emesének és édesanyjának**, hogy támogattak, bíztattak, bíztak bennem és el nem múló szeretetükkel segítettek abban, hogy elvégezzem feladatomat.

A doktori értekezésben foglalt kutatómunka az OTKA K-101716 számú projekt támogatásával valósult meg.