

RÖVID KÖZLEMÉNY

ÚJ GAZDANÖVÉNYEN (*PRUNUS DOMESTICA* L. 'D'AGEN') JELENT MEG AZ *ERWINIA AMYLOVORA* MAGYARORSZÁGON

Végh Anita, Némethy Zsuzsanna, Hajagos Laura és Palkovics László

Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Növénykórtani Tanszék, 1118 Budapest, Ménesi út 44.

Tüzelhalásra emlékeztető tüneteket figyeltünk meg 2011 nyarán Budaörsön, 10 év körüli ültetett szilvafa (*Prunus domestica* L. 'd'Agen') hajtásain. A fiatal hajtásokra pásztorbotszerű görbület, megfeketedő, elhalás volt jellemző. A kórokozót (*Ea-PlumBo1*) klasszikus – tenyészbélyeg, Gram-tulajdonság, hiperszenzitív reakció, biokémiai (API 20E, API 50CH) tulajdonság, patogenitási teszt – és molekuláris vizsgálati módszerrel – 16S rRNS – azonosítottuk. A kórokozó tenyésztéséhez King-B táptalajt használtunk, melyen ép szélű, kiemelkedő, mukoid kolóniák képződtek. Meghatároztuk a kórokozó alapvető biokémiai és fiziológiai tulajdonságait. A kórokozó patogenitását egészséges fiatal szilvahajtásokra történő inokulációval bizonyítottuk.

Eredményeinket összevetve az irodalmi adatokkal a kórokozót *Erwinia amylovora*-ként azonosítottuk. A molekuláris vizsgálatok során vizsgáltuk a 16S rRNS-t kódoló gén bázis-sorrendjét. A 16S RNS gén vizsgálat során univerzális primereket (63f, 1398r) használtunk. A szilva izolátum a vizsgált szakaszon 100% homológiát mutatott az *E. amylovora* izolátumokkal. Fiatal szilvahajtásból sikeresen izoláltuk és meghatároztuk a tüzelhalás kórokozóját, az *Erwinia amylovora*-t. A kórokozó szilván megjelenő természetes fertőződéséről eddig csak az USA-ban és Németországban számoltak be. A tüzelhalás fertőzés szilván a hazai szilvaállományok potenciális fertőződésének lehetőségét vetíti elő, ésfeltételezi újabb, más csonthéjas fajokon történő előfordulását sem.

Kulcsszavak: tüzelhalás, *Erwinia amylovora*, új gazdanövény, szilva (*Prunus domestica*)
fire blight, *Erwinia amylovora*, new host plant, plum (*Prunus domestica*)

A „tüzelhalás betegség” (kórokozó: *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow és mtsai 1920) súlyos gazdasági veszteséget, problémát jelent, mely a világ mintegy 40 országában előfordul. A kórokozó Amerikában őshonos, Európában 1955-ben (Anglia) jelent meg, majd fokozatosan terjedt észak-kelet, kelet felé. Magyarországon a kórokozót és tüneteit először 1995 telén észlelték Nyárlőrinc térségében almafákon (Hevesi 1996). Megjelenése óta évről-évre előfordul, s bizonyos években – a baktérium számára

kedvező időjárás esetén (meleg, párás, nedves) – az okozott kár igen jelentős.

A *Rosaceae* család mintegy 40 nemzetségébe tartozó 200 növényfajt képes megfertőzni, főként az almatermésűeket, számos dísznövényt és vadonélő növényfajt (van der Zwet és Keil 1979). A kórokozó megjelenését egyre több új gazdanövényről publikálták az elmúlt években. Az Amerikai Egyesült Államokban a tüskétlen szedren (Evans 1996) és málnán is jelezték a kórokozó megjelenését (Schnabel

és Jones 2001). Beszámoltak a japán szilva fiatal hajtásainak természetes fertőződéséről is (Mohan és Thomson 1996). Az USA-ban szilva és kajszi faj-hibridjén hajtásszáradásról (Mohan 2007), Észak-Németországban európai szilva fertőződéséről (Vanneste 2002) és Csehországban a kajszi (*P. armeniaca*) természetes fertőződéséről jelentek meg publikációk (Korba és Sillerova 2010).

Anyag és módszer

2011 nyarán tűzelhalásra emlékeztető tüneteket figyeltünk meg Budaörsön, 10 év körüli ültetett utcai szilvafa (*Prunus domestica* L. 'd'Agén') hajtásán. A fertőzött hajtást a Budapesti Cor-vinus Egyetem Növénykórtani Tanszékén vizsgáltuk tovább.

A szilvahajtásokat alkohollal fertőtlenítettük ezután az elhalt és az egészséges növényi szövetrész határáról mintát vettünk, majd steril desztillált vízzel homogenizáltuk. Majd táptalajon tenyésztettük és tiszta tenyészetet állítottunk elő.

A kórokozót (Ea-PlumBo1) klasszikus – tenyészbélyeg, Gram-tulajdonság, hiperszenzitív reakció, biokémiai tulajdonság, pato-genitási teszt – és molekuláris vizsgálati módszerrel – 16S rRNS – azonosítottuk

A tenyésztéshez King-B (King és mtsai 1954) táptalajt (pH értéke 6,8) használtunk, melyet egyenletes hőmérsékleten, 26 °C-on termosztátban 24 órán át inkubáltunk. A Gram festődést, illetve a KOH próbát (Suslow és mtsai 1982) is elvégeztük. Hiperszenzitív reakciót indukáló képességét (Klement 1963) dohánylevélen (*Nicotiana tabacum* L. cv. White Burley) vizsgáltuk. Meghatároztuk a kórokozó biokémiai tulajdonságait is, melyekhez API20E és API50CH (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) gyorsteszteket használtunk.

A patogenitás igazolásához alkohollal fertőtlenített fiatal szilvahajtásokat használtunk. A kórokozó 24 órás tiszta tenyészetéből steril desztillált vízzel 5×10^8 sejt/ml töménységű baktérium szuszpenziót készítettünk, melyet a hajtás csúcsától számolt 2. teljesen kifejlődött levél hónaljába juttattunk be injekciós tűvel. A

kontrollnövényt desztillált vízbe mártott tűvel szűrtük meg. Mind az inokulált, mind a kontrollhajtásokat 24–26 °C-on steril műanyagdobozban tartottuk. A megfelelő páratartalomról nedves szűrőpapírral gondoskodtunk. Az eredményeket 10–15 nap elteltével értékeltük.

A molekuláris azonosítás során vizsgáltuk a szilvahajtásról származó kórokozót a 16S rRNS-t kódoló gén bázis-sorrendjét. A DNS-t a kórokozó King-B táptalajon növekedett 24 órás tiszta tenyészetéből nyertük. A 16S RNS vizsgálat során univerzális primereket (63f: 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3', 1389r: 5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3') (Osborn és mtsai 2000) használtunk. A PCR ciklus a következő részekből tevődött össze: a 3 perc 94 °C-on történő denaturálást 35 ciklus követte, mely 15 mp 94 °C-os denaturálást, 30 mp 55 °C-os primer kötést és 90 mp 72 °C-os láncépítést tartalmazott, majd ezt 10 percig tartó 72 °C-os ciklus követte. A tisztított PCR-terméket a pGEM-T Easy plazmidjába (Promega) ligáltuk. A ligátumot az *Escherichia coli* baktérium DH 5α törzsébe transzformáltuk (Maniatis és mtsai 1989). A rekombináns plazmidot szekvenáltattuk.

Eredmények

Tünetek

A szilvafa fiatal hajtáscsúcsain barnás-feketés elhalás, pásztorbotszerű görbület volt megfigyelhető (1., 2. ábra), mely a csúcstól lefelé halad. Ezek a tünetek megegyeznek, a korábban más gazdanövényekről, helyekről publikált tűzelhalás betegség tüneteivel (3. ábra).

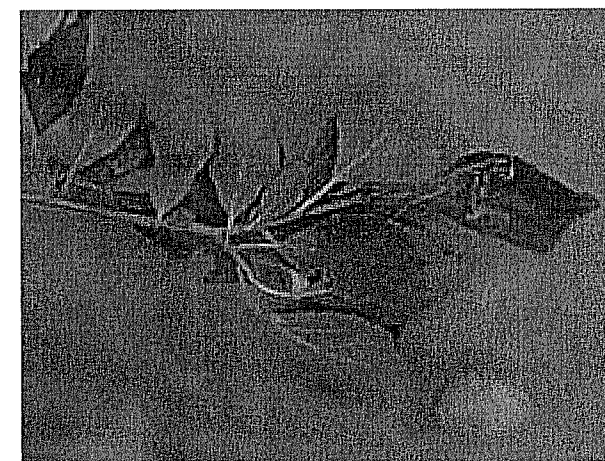
Azonosítás klasszikus vizsgálatok alapján

A kórokozó King-B táptalajon 24 óra elteltével ép szélű, sima felületű, tejfehér, fénylő kolóniát képez (4. ábra). A 3%-os KOH oldat oldotta a baktérium sejtfalát, mely alapján az általunk vizsgált kórokozó Gram-negatív. Hiperszenzitív reakciót okoz dohánylevélen.

Az API20E gyorsteszt alapján a vizsgált kórokozó pozitív reakciót adott a β-galaktozidáz,



1. ábra. *Erwinia amylovora* okozta tünetek szilvahajtáson
Fotó: Némethy Zsuzsanna

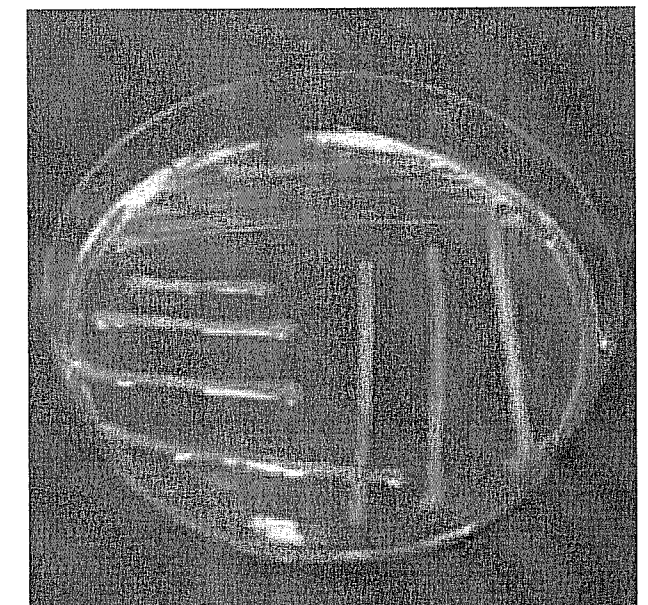


2. ábra. *Erwinia amylovora* okozta tünetek szilvahajtáson
Fotó: Némethy Zsuzsanna

citrát hasznosításra, acetoin termelésre valamint glükóz, mannit, szorbit, szacharóz, melibióz, arabinóz vizsgálatokban. Az API 50 CH során pedig 18 féle szénhidrátot hasznosított. Mind az API20E mind az API50CH biokémiai tesztek eredményei alapján a szilvahajtásról izolált baktérium az *Enterobacteriaceae* család-



3. ábra. *Erwinia amylovora* okozta tünetek tűztővisen
Fotó: Végh Anita



4. ábra. A kórokozó tenyészbélyege King-B táptalajon
Fotó: Végh Anita



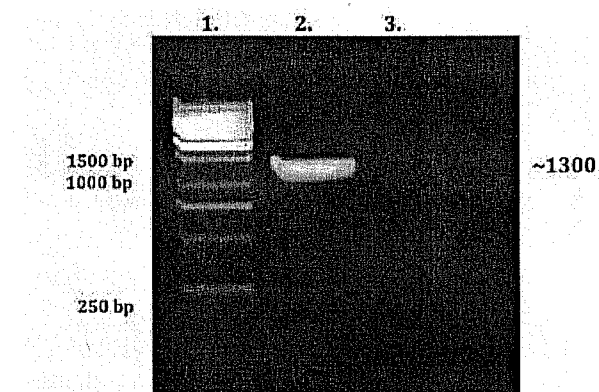
5. ábra. Patogenitási vizsgálat fiatal szilvahajtásokon
Fotó: Végh Anita

ba tartozik és tulajdonságai megegyeznek az *E. amylovora* tulajdonságaival.

A patogenitási vizsgálat során az inokulált szilvahajtások erős fertőződést mutattak. A hajtásokon pásztorbatszerű görbület és barnás-feketés elhalás volt megfigyelhető (5. ábra), melyről visszaizoláltuk a kórokozót. A kontrollhajtások nem fertőződtek, egészségesek maradtak.

Azonosítás molekuláris vizsgálat alapján

A 16 S RNS vizsgálat során PCR technika segítségével a baktérium specifikus primerekkel egy 1300 bázispár hosszúságú PCR terméket sikerült kiemelnünk (6. ábra), mely szekvenciáját meghatároztattuk. A szekvencia a nemzetközi adatbankban a HE610678 hivatkozási számon megtalálható. A kórokozó az azonosítás alapján a vizsgált szakaszon 100% homológiát mutatott más *E. amylovora* izolátumokkal.



6. ábra. A PCR vizsgálat eredménye
Jelmagyarázat:
1-1 kb méretmarker, 2-A szilváról származó izolátum (EaPlumBo1), 3-negatív kontroll

Eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy mind klasszikus, mind molekuláris, genetikai vizsgálatok alapján a tűzelhalás kórokozóját az *E. amylovora*-t izoláltuk szilvahajtásból.

A karantén kórokozó szilván megjelenő természetes fertőződéséről eddig csak az USA-ban és Európában csak Németországban számoltak be. Magyarországon a *Prunus* nemzetségbe tartozó gazdanövényekről eddig még nem azonosították a tűzelhalás betegség kórokozóját.

Az *E. amylovora* megjelenése szilván a hazai gyümölcsstermesztésben jelentős gazdasági károkat okozhat, feltételezi újabb csonthéjas gazdanövényeken történő előfordulását.

Köszönetnyilvánítás

A projektet a TÁMOP – 4.2.1./B-09/1-KMR-2010-0005 és a TÁMOP- 4.2.2./B-10/1-2010–0023 pályázatok támogatták.

IRODALOM

- Evans I. R. (1996): Fire blight of raspberries in Alberta. Acta Horticult., 41: 69–72.
- Hevesi, M. (1996): Az *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. hazai megjelenése almán. Növényvédelem, 32 (5): 225–228.
- King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. lab. Clin. Med., 44: 301–307.
- Klement, Z. (1963): Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. Nature, Lond., 199–299.
- Korba, J., Sillerova, S. (2010): First occurrence of fire blight infection on apricot (*Prunus armeniaca*) in Czech Republic. 12th International Workshop on Fire Blight. 16–20 August, 2010. Warsaw. Abstracts: 107.
- Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E. F. (1989): Molecular cloning: a Laboratory Manual. In. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 3: 180–192.
- Mohan S. K. (2007): Natural infection of shoot blight in Pluot® caused by *Erwinia amylovora*. 11th International workshop on Fire Blight. Portland, Oregon. 1217 August, 2007, Abstracts: 64.
- Mohan, S., K. and Thomson, S. V. (1996): An outbreak of fire blight in plums. Acta Horticult., 411: 73–76.
- Osborn, A. M., Moore, E. R. B. and Timmis, K. N. (2000): An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. Environ. Microbiol., 2: 39–50.
- Schnabel, E. L. and Jones A. L. (2001): Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*. Apple Environ Microbiology, 67: 59–64.
- Suslow, T. W., Schroth, M. N. and Isaka, M. (1982): Application of rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72: 917–918.

- van der Zwet, T. and Keil, H. (1979): Fire Blight. A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. U. S. Government Printing Office, Washington, 510.
- Vanneste, J.L., Lex, S., Vermeulen, M. and Berger, F. (2002): Isolation of *Erwinia amylovora* from blighted plums (*Prunus domestica*) and potato roses (*Rosa rugosa*). Acta Hort. (ISHS), 590: 89–94.
- Winslow, C. E. A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, Jr. C., Rogers, L. A. and Smith, G. H. (1920): The families and genera of the bacteria. Final report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. Journal of Bacteriology, 5: 191–229.

PLUM 'Prune d' Agen' IS A NEW HOST PLANT OF *ERWINIA AMYLOVORA* IN HUNGARY

Anita Végh, Zsuzsanna Némethy, Laura Hajagos and L. Palkovics

Department of Plant Pathology, Corvinus University of Budapest, H-1118 Budapest, Ménesi Road 44, Hungary

Appearance of shoot blight was observed in a ten-years-old plum tree in Budaörs, Hungary during the summer of 2011. The naturally infected shoots were on European plum, *Prunus domestica* L. 'd'Agen'. The plum shoots showed typical symptoms of fire blight: blighted, young succulent terminal shoot with brown to black necrotic lesion, wilting and shepherd's crook on affected stems, leaf blighting, and stem cankers on one- year- old shoot. The pathogen examined by classical and molecular features.

Isolations on general (King's B agar) medium yielded pure cultures of a bacterium. The isolate showed typical colony morphology on the medium. The isolate was gram negative and induced a hypersensitive reaction in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. White Burley) leaves. Biochemical tests, API 20E and API 50 CH (Biomérieux, France) were also used for identification. The pathogenicity was tested by injecting healthy plum shoots with a bacterial suspension (10^7 CFU/ml). Controls were injected with sterile distilled water. Ten days after inoculation dark brown to black lesions and shepherd's crook were observed only on inoculated shoots.

For molecular identification of the pathogen the 16S rDNA region was amplified with general bacterial primer pair (63f forward and 1389r reverse). The PCR products were cloned into a pGEM T-Easy plasmid vector and were transformed into *Escherichia coli* DH5 α cells. A recombinant plasmid was sequenced by M13 forward and reverse primers. The sequence was deposited in GenBank (Accession No. HE610678).

On the basis of the classical and molecular features the pathogen was identified as *E. amylovora*. According to our knowledge, this is a first report of a natural outbreak of fire blight on plum in Hungary.

The project was funded by TÁMOP- 4.2.1./B-09/1-KMR-2010-0005 and TÁMOP- 4.2.2./B-10/1-2010-0023 grants.

Keywords: fire blight, *Erwinia amylovora*, new host plant, plum (*Prunus domestica*)

Érkezett: 2012. június 18.