



**SZENT ISTVÁN EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR**

4. Ülészak, Pécsi Akadémiai Bizottság Növényorvosi és Kertészeti Munkabizottsága, Pécs, 1998.
5. **Viczián O., Süle S. és Gáborjányi R.** Fitoplazmás betegségek Magyarországon. 44. Növényvédelmi Tud. Napok, Budapest, 1998.
6. **Viczián O., Süle S. és Gáborjányi R.** A sztolbur fitoplazma természetes gazdanövényei Magyarországon. "Lippay János-Vas Károly" Tud. Ülészak, IX. Budapest, 1998.
7. **Viczián O., Mergenthaler E., Fodor M. és Süle S.** Fitoplazma gének izolálása antiszérum termelés céljából. 46. Növényvédelmi Tud. napok. Budapest, 2000.
8. **Fodor M., Viczián O., Mergenthaler E. és Süle S.** Újabb adatok a hazai fitoplazma fertőzésekről. 46. Növényvédelmi Tud. Napok. Budapest, 2000.
9. **Mergenthaler, E., Viczián, O., Fodor, M., and Süle, S.** Isolation and expression of an immunodominant membrane protein gene of the ESFY phytoplasma for antiserum production. Proceedings of the 18th International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, Acta Horticult., 550 (2): 355-360. 2001.

Egyéb közlemények

Mozsár, J. and Viczián, O. (1996): Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis* spp. *Vitis*, 35 (4): 155-157.

Mozsár, J., Viczián, O., and Süle, S. (1998): Agrobacterium-mediated transformation of an interspecific grapevine. *Vitis*, 37 (3): 127-130.

Kehm, R., Jakob, N. J., Welzel, T. M., Tobiasch, E., Viczián, O., Jock, S., Geider, K., Süle, S., and Darai, G. (2001): Expression of immunogenic puumala virus nucleocapsid protein in transgenic tobacco and potato plants. *Virus Genes*, 22 (1): 73-83.

Mozsár, J., Mergenthaler, E., Viczián, O., and Süle, S. A szőlő poligalakturonáz-inhibitor tartalma és *Agrobacterium vitis*-szel szembeni ellenállósága. 44. Növényvédelmi Tud. Napok., Budapest, 1998.

Mozsár, J., Süle, S. és Viczián, O. Transzgenikus szőlő előállítás agrobaktériumos transzformációval. IV. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 1998.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek: Dr. Süle Sándornak, aki felkarolta a fitoplazma-kutatást Magyarországon és lehetőséget biztosított számomra, hogy ezzel a rendkívül érdekes és új területtel foglalkozhassak; Dr. Erich Seemüllernek, Dr. Michael Bergnek és Dr. Uli Lauernek a fitoplazma kutatásban általuk alkalmazott módszerek szíves átadásáért; Dr. Gáborjányi Richardnak a számos fitoplazma fertőzött növénymintáért és fényképért; Dr. Tóbiás Istvánnak ugyancsak a beteg növénymintákért; kollégáimnak, Mergenthaler Emesének és Fodor Márknak a munka során nyújtott segítségükért; valamint családomnak, barátaimnak és mindenkinek, aki közvetett, vagy közvetlen módon támogatott.

**A MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ FITOPLAZMÁK MOLEKULÁRIS
BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSA ÉS
TANULMÁNYOZÁSA**

Doktori értekezés tézisei

Viczián Orsolya

MTA Növényvédelmi Kutatóintézet

**Gödöllő
2002**

A doktori iskola

Megnevezése: Multidiszciplináris Agrártudományok

Tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

Vezetője: Papp János, DSc.

Tanszékvezető egyetemi tanár

Szent István Egyetem Kertészettudományi Kar,

Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezető: Süle Sándor, DSc.

Tudományos tanácsadó, Osztályvezető

Magyar Tudományos Akadémia

Növényvédelmi Kutatóintézet, Biotechnológia Osztály

Tanszékvezető

Szent István Egyetem Kertészettudományi Kar

Növénykórtani Tanszék

Jelenleg a specifikus antigén immunizáláshoz szükséges mennyiségének előállításán dolgozunk, amely végül alkalmas lesz a fitoplazmák szerológiai vizsgálatához.

5. Az értekezéshez kapcsolódó publikációk jegyzéke

A dolgozathoz kapcsolódó közlemények:

Cikkek:

1. **Viczián, O., Süle, S., Péntes, B. és Seemüller, E.** (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása Magyarországon. Új Kertgazdaság, (1): 48-51.
2. **Viczián O., Süle S. és Gáborjányi, R.** (1998): A sztolbur fitoplazma természetes gazdanövényei Magyarországon. Növényvédelem, 34 (11): 617-620.
3. **Viczián, O., Süle, S., and Gáborjányi, R.** (1998): Detection and identification of stolbur Phytoplasma in Hungary by PCR and RFLP methods. Acta Phytopathol. Entomol. Hung., 33 (3-4): 255-260.
4. **Fodor, M., Viczián, O., Mergenthaler, E., and Süle, S.** (1999): Cabbage Infected with Phytoplasma from Aster Yellows. Acta Phytopathol. Entomol. Hung., 34 (1-2): 1-6.

Ismeretterjesztő cikk:

1. **Süle, S., Viczián, O. és Péntes, B.** (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása. Kertészet és Szőlészet, 45: 8-11.
2. **Viczián, O., Süle, S. és Gáborjányi, R.** (1998): Fűben-fában fitoplazma. Élet és Tudomány, LIII (16): 491-493.
3. **V. Németh, M., Kölber, M., Hangyál, R., Süle, S., Viczián, O., Mergenthaler, E. és Fodor, M.** (2000): Csonthéjasok fitoplazmás pusztulása Magyarországon. Agrofórum, 11 (13): 26-32.

Előadások és poszterek:

1. **Süle S., Viczián O., Orosz A. és Tóbiás I.** A sztolbur betegség ismét megjelent Magyarországon. 42. Növényvédelmi Tud. Napok, Budapest, 1996.
2. **Viczián O. és Süle S.** A csonthéjas gyümölcsfák fitoplazmáinak PCR-el történő meghatározása. 42. Növényvédelmi Tud. Napok, Budapest, 1996.
3. **Viczián O. és Süle S.** A kajszi fitoplazmás pusztulása Magyarországon. "Lippay János" Tudományos Ülésszak, Budapest, 1996.
4. **Viczián O., Süle S. és Gáborjányi R.** A szőlő sztolbur-betegség járványtani kérdései. "Integrált növényvédelem a szőlőben" c. Tud.

A fitoplazmák patogenitásáról eddig még keveset tudunk. A kórokozó jobb megismerése azonban magában hordozza az ellene való védekezés lehetőségét is, ezért célul tűztük ki a fitoplazma gének keresését és vizsgálatát. A terjedés mértékét figyelembe véve felvetődik a könnyű és olcsó ELISA eljárás alkalmazása a gyakorlatban. Ennek segítségével az országba behozott, vagy már bent levő fertőzött oltóanyag egyszerűen kiszűrhető, valamint ezzel együtt a kórokozó terjedése is visszaszorítható.

Az elmúlt évtizedben a gyomflóra megfigyelhető átalakulása miatt a gyomok vizsgálatára a jövőben még nagyobb hangsúlyt kívánunk helyezni, hiszen a fitoplazmák bizonyítottan ezekben a növényekben is áttelelnak és következő évben fertőzési forrással szolgálnak a fógékony szervezeteknek.

3. Anyagok és módszerek

Növényi anyagok és fenntartásuk: Nemzetközileg elismert standardként nyilvántartott különböző fitoplazma csoportba (AAY, ESFY, AP és STO-sztozbur) sorolt izolátumok DNS mintáit használtuk fel saját izolátumaink meghatározására. A standard mintákat üvegházban nevelt rózsameténg és dohány növényeken fenntartott törzsekből vontuk ki. A munkának e részét a BBA (Biologische Bundesanstalt für land- und Forstwirtschaft) intézetben (Németország, Dossenheim) végeztük el az ott kidolgozott módszereket követve. A többi vizsgált növényi minta Magyarország különböző vidékeiről származik Saját gyűjtésű sztozbur paradicsomon oltással tartunk fenn.

Kimutatás és azonosítás: A fitoplazma fertőzést közvetlen és közvetett módon mutattuk ki. Közvetlen kimutatásra egy epifluoreszcens, DAPI festéses eljárást alkalmaztunk, rutinszerűen pedig a közvetett, de sokkal érzékenyebb PCR módszert (egyszerű és nested PCR). Az irodalmat követve megpróbálkoztunk hibridizációs technikával is. A megfelelő tisztaságú DNS kinyerése céljából többféle kivonási módszert is alkalmaztunk. A PCR-hez univerzális és csoport specifikus primereket használtunk.

Az azonosítást RFLP módszerrel végeztük. A kapott eredményt az irodalmi adatokkal összevetve, az egyes csoportokat meghatároztuk.

Fitoplazma gének keresése: Fitoplazma géneket AP fitoplazma DNS-ből készített lambda fág-könyvtárban kerestünk. AP fertőzött rózsameténg és dohány növényből fitoplazma gazdagító eljárással fehérje kivonatot készítettünk, amit a Diagnosticum KFT antiszérum előállításra használt fel; poliklón és monoklón antitesteket termeltetve egérben. A könyvtár szűrését az így nyert antiszérummal végeztük immunoblot módszerrel.

Ismert fitoplazma gén klónozása: Az AP fitoplazma *tuf* gént antiszérum termeltetésre kívánjuk felhasználni, ami ELISA technikában alkalmazható. Első lépésként a gént A-T klónozó plazmidba építettük, majd speciális restriktív vágási helyet tartalmazó primereket terveztünk hozzá, amelyek segítségével pontos olvasási keretben, egy olyan expressziós plazmidba tudtuk szubklónozni, ahol az átírást szabályozni lehet. Ezután nagy mennyiségben termeltettük a fehérjét, és hozzákezdünk az elválasztásához.

4. Eredmények és megvitatásuk

A fitoplazma okozta tünetek: Az utóbbi években, nagy számban találtunk a gyümölcsösökben és zöldségveteményekben sárgulások, és boszorkányseprűs tüneteket mutató növényeket. Sokszor a virágok megváltozott alakja és színe hívta fel a figyelmet, hogy valamilyen szokatlan betegséggel állunk szemben. A tünetek nem minden esetben utaltak egyértelműen fitoplazma fertőzésre, hiszen a sárgulást számos más kórokozó, és egyéb ok, többek között ásványi anyaghiány is okozhatja (pl. kajszi, paprika, japánszilva). Egyes esetekben (alma, paradicsom, petrezselyem, zeller stb.) viszont már a tünetkép alapján biztosak lehettünk abban, hogy a kórokozó fitoplazma. Ennek ellenére tartózkodni kell a kizárólag tünet alapján történő kórokozó azonosítástól.

Kimutatás és azonosítás: A kimutatás közvetlen és közvetett módszerekkel egyaránt sikerült. A közvetlen, epifluoreszcens módszerrel csak magas fitoplazma koncentrációnál tudtuk kimutatni a fertőzést, tehát figyelembe véve a terjedés mértékét, ez nem mondható kielégítőnek. Hibridizációs technikával ugyan alacsonyabb fitoplazma szám mellett is pozitív eredményt kaptunk, ellenben a módszer rendkívül idő- és költségigényesnek bizonyult, tehát széles körben és rutinszerű kimutatásra jelenlegi kidolgozottságában nem alkalmazható. A legérzékenyebb eljárásnak a PCR technika bizonyult, amelyből a kapott terméket restriktív enzimekkel hasítva (RFLP) az azonosítást is elvégeztük.

A Magyarországon előforduló fitoplazmák és gazdanövénykörük: Eddig 24 növényfajon 5 fitoplazma csoportot (AAY, ESFY, AP, CPh és sztozbur) azonosítottunk. Magyarországon elsőként írtuk le az ESFY fitoplazmát: kajszin, japán szilván, mandulán és cseresznyén; az AP-t: almafán; az AAY-t: pohánkán, fejeskáposztán, vöröskáposztán, bimbóskelen, kelkáposztán és karfiolon; a sztozbur: zelleren, petrezselymen, sárgarépan, pongyola pitypangon és hólyagos habszegfűn, valamint a CPh-t fehér herén.

A sztozbur előfordulását pongyola pitypangon, hólyagos habszegfűn és pohánkán a nemzetközi irodalom számára is elsőként írtuk le.

A százszorszép fitoplazmás betegségéről nem találtunk adatot a hazai és a nemzetközi irodalomban sem, de eddig még nem sikerült a kórokozót a megfelelő rendszertani csoportba besorolni.

Az általunk gyűjtött növényminták Békés, Csongrád, Heves, Pest, Szabolcs-Szatmár-Bereg és Zala megyéből származtak. Békés és Csongrád megyében sztolbur fertőzést találtunk paprikán, paradicsomon, petrezselymen, sárgarépan, és zelleren. Heves megyében a paprika és paradicsomtáblákon erős sztolbur fertőzöttséget figyeltünk meg; paprika esetében ez egyes táblákon és főliásátrakban elérte a 95%-ot. Pest megyében kimutattuk az AAY fitoplazmát bimbóskelen., fejeskáposztán, karfiolon, kelkáposztán, pohánkán és vörös káposztán, az AP-t almafán, az ESFY-t cseresznyén, japán szilván és kajszin, valamint egy eddig még eddig még csoportba nem sorolt fitoplazmát százszorszépen. Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében dohányon azonosítottuk a sztolbur fitoplazmát. Zala megyében csattanó maszlagon, hólyagos habszegfűn, paradicsomon, paprikán, pongyola pitypangon, repcén, és szőlőn a sztolbur; mandulán az ESFY és fehér herén a here ellevelesedése fitoplazmát azonosítottuk.

Fitoplazma gének keresése: Az immunizáláshoz több fehérje kinyerési és tisztítási módszert ötvözve, kidolgoztunk egy megfelelő mennyiségű és tisztaságú fehérje előállítású eljárást. Az AP-lambda fág-könyvtár immunoblot módszerrel és az immunizálás során kapott poliklonális antiszérummal történt szűrése során egy 50bp és egy 100bp nagyságú AP fitoplazma DNS szakaszt találtunk. A kis méret alapján egyértelmű volt, hogy ezek az inszertek nem tartalmazhatnak egy teljes nyílt olvasási keretet, tehát csak töredék fehérjét kódoló DNS szakaszok lehetnek, amelyek nem alkalmasak antiszérum előállítására.

Az analízis során a fág-könyvtár expressziója nem bizonyult megfelelőnek, valamint a poliklonális antiszérum használata több esetben téves eredményt adott, így a továbbiakban egészen más módszerrel közelítettük meg a problémát.

Az AP fitoplazma *tuf* génjének klónozása: A kísérlet során a felszaporított *tuf* gént tartalmazó szakaszt klónoztuk egy A-T klónozó plazmidba; a beépült génhez speciális hasítási helyeket tartalmazó indítószekvenciákat terveztünk, amelyekkel sikeresen felszaporítottuk a kívánt szakaszt, és végül a terméket szabályozható promotertű expressziós plazmidba építettük, pontos olvasási keretbe.

A sikeres beépítést követően a kívánt fehérjét termeltetni tudtuk, és a fehérje frakciót PAGE gélen elválasztottuk.

1. Tudományos előzmények

A fitoplazmák -régébbi nevükön MLO-mycoplasmalike organism- sejtfal nélküli, táptalajon nem tenyészhető növényi kórokozók. Rendszertani elhelyezésük ma még nem teljesen tisztázott, de az utóbbi évtizedekben rohamosan fejlődésnek indult molekuláris genetikai módszerek alkalmazása, valamint az immun- és genetikai vizsgálatok alapján világossá vált, hogy valóban a *Mollicutes* osztályba tartoznak, de csak távoli rokonságban állnak a mikoplazmákkal. Legközelebbi rokonaik az *Acholeplasma*-k. Ezért is javasolták 1994-ben a “mycoplasmalike organism” elnevezés megváltoztatását “fitoplazmára”, amely egyértelműen jelzi növénykórokozó mivoltát. Az 1960-as évek óta több száz sárgulásos, törpülésszerű, illetve seprősödéses tüneteket mutató növényfaj esetében mutatták ki fitoplazma jelenlétét.

Jelenlegi ismereteink szerint a fitoplazmák a növényekben kizárólag a floémában fordulnak elő és halmozódnak fel. A növények floémát alkotó sejtek összeesnek, a rostacsövekben kallóz és keményítő felhalmozódás figyelhető meg. A csökkent nedv-áramlás miatt romlik a szövetek tápanyag ellátottsága, és a hormonszintek eltolódnak. Ezek súlyos elváltozásokat okoznak a vegetatív és a szaporító szervekben egyaránt. A fitoplazmák arankával, kabócákkal és oltással terjedhetnek. Megkísérelték a kórokozót mechanikai úton is átvenni; eredménytelenül.

A korszerű genetikai módszerek (hibridizáció, PCR, RFLP és szekvenciaelemzés) segítségével már alacsony koncentrációnál is ki tudjuk mutatni, és azonosítani őket. A fitoplazmák élettanáról eddig még csak feltevések léteznek. Arról, hogy milyen hatásmechanizmusok útján okoznak ilyen súlyos tüneteket, szinte semmit nem tudunk. A fent említett módszerekkel elkezdődtek a fitoplazma gének vizsgálatai, remélve, hogy választ adnak a kérdésekre.

2. Célkitűzések

Elsősorban a hazánkban előforduló fitoplazmák kimutatását és az egyes csoportok azonosítását kívántuk megvalósítani molekuláris biológiai módszerekkel. A vizsgálatok lehetőséget adtak az eddig Magyarországon leírt, hagyományos módszerekkel azonosított fitoplazmák, valamint a megfigyelt tünetek, és az elmúlt években felderített fitoplazmás betegségek összehasonlítására; egyes esetekben a kiigazításra. Ezáltal a jelenleg feltérképezett gazdanövénykör és előfordulási helyük is összevetésre kerülhetett a hazai irodalomban már előzőleg közölt adatokkal.