



BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM  
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR



ELTÉRŐ VIRULENCIÁJÚ FITOPLAZMA TÖRZSEK KÖLCSÖNHATÁSÁNAK SZEREPE A  
KERESZTVÉDETTSÉG KIALAKULÁSÁBAN

Doktori értekezés tézisei

Tibenszkyné Kiss Emese

MTA ATK Növényvédelmi Intézet

Budapest, 2015

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM  
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR

ELTÉRŐ VIRULENCIÁJÚ FITOPLAZMA TÖRZSEK KÖLCSÖNHATÁSÁNAK SZEREPE A  
KERESZTVÉDETTSÉG KIALAKULÁSÁBAN

Doktori értekezés tézisei

Tibenszkyné Kiss Emese

MTA ATK Növényvédelmi Intézet

Budapest, 2015

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Kertészettudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Növénytermesztési és kertészeti tudományok

**vezetője:** Dr. Tóth Magdolna  
tanszékvezető, egyetemi tanár, az MTA doktora  
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,  
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

**Témavezető:** Dr. Barna Balázs  
az MTA lev. tagja  
MTA Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet,  
Kóréletani Osztály

Dr. Palkovics László  
egyetemi tanár, tanszékvezető az MTA doktora  
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,  
Növénykórtani Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus 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 témavezető jóváhagyása

## 1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

Napjainkban egyre nagyobb gazdasági károkat okoznak a fitoplazmák által előidézett megbetegedések mind lágyszárú-, mind fásszárú dísz- és haszonnövényeken. Habár a kórokozócsoportot már az 1900-as évek eleje óta kutatják, a molekuláris kimutatási módszerek elterjedésével csak a XX. század végére vált lehetővé a fitoplazmák alaposabb jellemzése, életmódjuk tanulmányozása, illetve rendszertani besorolásuk. Miután jelenleg nem ismert hatékony növényvédelmi intézkedés a fitoplazmákkal szemben, a hangsúlyt a megelőzésre kell helyezni.

Hazánkban a kajszipusztulás (European Stone Fruit Yellows) mellett a legnagyobb veszélyt a szőlő aranyszínű sárgasága (Flavescence Dorée) fitoplazmás betegség 2013-as felbukkanása jelenti. Magyarországon csak a kajszitermesztésben egyes területeken a fertőzöttség arányát 70-80%-osra becsülik. Nyugat-Európa egyes régióiban az almafa boszorkányseprűsödés (Apple Proliferation) fitoplazma okoz súlyos minőségi és mennyiségi, ezáltal pedig gazdasági károkat. A betegség hazánkban kisebb jelentőségű, de az előfordulás közelsége és a kórokozó áthurcolhatósága miatt (vektorok, ellenőrizetlen szaporító anyag) fennáll a veszély, hogy nálunk is fontosabb növényegészségügyi problémává válik.

Jelen kutatásainkkal a fitoplazma-gazdanövény kapcsolatot, az eltérő virulenciájú fitoplazma törzseket és a köztük fellépő kölcsönhatásokat kívántuk jellemezni, amelyek előrelépést jelenthetnek a kórokozó elleni biológiai védekezés megalapozásában.

Ezek alapján célkitűzéseink a következők voltak:

1. A '*Candidatus Phytoplasma mali*' 1/93-as avirulens törzs feltételezett gátló hatásának igazolása üvegházi körülmények között rózsameténg és dohány teszt növényeken.
2. A '*Ca. P. mali*' 1/93-as avirulens törzs keresztvédettséget adó hatásának ellenőrzése azonos fajba tartozó '*Candidatus Phytoplasma mali*' AT virulens törzs, azonos rendszertani csoportba tartozó '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' GSFY és '*Candidatus Phytoplasma pyri*' PD1, valamint eltérő rendszertani csoportba tartozó '*Candidatus Phytoplasma solani*' STOL és '*Candidatus Phytoplasma asteris*' AAY1 virulens törzsekkel szemben.
3. A természetesen fertőződött almafákban megtalálható fitoplazma törzsek együttes jelenlétének kimutatása, valamint virulenciájuk és a tünetek összefüggéseinek feltérképezése molekuláris módszerekkel.
4. A '*Ca. P. mali*' 1/93-as izolátum jellemezése a *hflB*, illetve az *imp* gének alapján.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérletekhez szükséges fitoplazma törzseket *Catharanthus roseus* L. (rózsameténg), *Nicotiana occidentalis* H.-M.Wheeler (közönséges dohány) és *Malus domestica* Borkh. 'Golden Delicious' (nemes alma) teszt növényeken tartottuk fenn; egy részüket a Növényvédelmi Intézet üvegházában, Budapesten, a többit a dossenheimi kutatóintézet klimatizált üvegházában, Németországban. A kísérletekhez a '*Candidatus* Phytoplasma mali' 1/93 avirulens, a 17/93 enyhén virulens, az AT virulens (16SrX csoport), a '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' GSFY virulens (16SrX csoport), a '*Candidatus* Phytoplasma pyri' PD1 virulens (16SrX csoport), a '*Candidatus* Phytoplasma solani' STOL virulens (16SrXII csoport) és a '*Candidatus* Phytoplasma asteris' AAY1 virulens (16SrI csoport) törzseit használtuk.

Az eltérő fitoplazma törzsek rózsameténgre gyakorolt hatását növényenként 10-10 véletlenszerűen választott hajtás átmérőjének mérésével értékeltük a fertőzéstől számított 6. hónaptól 2 hónapos rendszerességgel. A kifejlődött tüneteket a fertőzéstől számított 6. hónapban értékeltük vizuális úton.

Eltérő virulenciájú '*Ca. P. mali*' törzsekkel természetes úton fertőződött, 10 évnél idősebb, valamint mesterségesen fertőzött, fűtetlen fóliaházban fenntartott almafákból izoláltuk a fitoplazma DNS-t a „Doyle and Doyle” (Doyle and Doyle, 1990) módszerrel. A kevert fertőzésben résztvevő fitoplazmák *hflB* génjének 528 bp hosszúságú ATP00464-es szakaszát az AP specifikus fHfIB3\_1/rHfIB\_3 (Schneider and Seemüller, 2009) indítószekvencia-párokkal, míg az *imp* génjük egy szakaszát a szintén AP specifikus f318B\_seq/r318B\_seq (Kube *et al.*, 2008) párok segítségével szaporítottuk fel. Ezen gének alkalmasak a fitoplazmák közötti genetikai változékonyság kimutatására.

A fitoplazma törzsek variabilitását egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP) elemzéssel vizsgáltuk, amely alkalmas két törzs nukleotid sorrendjében megtalálható kis különbségek detektálására is. A PCR termékeket denaturálást követően poliakrilamid-gélen választottuk el. A komplex profilt mutató, felszaporított *hflB* és *imp* gén fragmentumokat pGEM-T Easy vektorba (Promega, Madison, WI) ligáltuk, majd ezt a konstrukciót használtuk fel *Escherichia coli* XL1 Blue kompetens sejtek (Stratagene, La Jolla, CA) transzformálásához. A klónozott inzerteket ismét SSCP analízisnek vetettük alá. A különböző profilt adó rekombináns plazmid DNS-t Plasmid Miniprep KIT (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével tisztítottuk ki, majd nukleotid sorrendjét meghatároztattuk.

A kapott szekvenciák egymáshoz, és a referencia adatbázisban található szekvenciákhoz való

igazítását a Clustal X2 (Thompson *et al.*, 1994) program, a filogenetikai összehasonlítást és törzsfán való ábrázolását a MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) szoftver segítségével végeztük el.

A '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens törzs gátló hatását teszteltük azonos fajba tartozó '*Ca. P. mali*' AT, azonos rendszertani csoportba, de más faj, a '*Ca. P. prunorum*' GSFY, '*Ca. P. pryii*' PD1, illetve más rendszertani csoportba tartozó '*Ca. P. solani*' STOL, '*Ca. P. asteris*' AAY1 virulens törzsekkel szemben rózsameténg, illetve egy esetben dohány tesztnövényeken több biológiai ismétlésben. Előfertőzést, illetve egyidejű fertőzést is alkalmaztunk. Egyidejű fertőzés során a két törzset egyszerre juttattuk a növénybe oltással, előidejű fertőzés esetén az avirulens törzsszel való fertőzést követően a virulens törzset AT esetében 2,5, 3, vagy 4, GSFY, PD1, STOL és AAY1 törzsek esetében 3 hónappal később oltottuk a növényre. A mintákat az oltás helyéről, vagy attól távol vettük rendszeres időközönként. A fitoplazma DNS-t a levelek főeréből izoláltunk a Doyle and Doyle (Doyle and Doyle, 1990) tisztítási módszerrel.

A fitoplazma fertőzöttséget valósídejű PCR során értékeltük. A '*Ca. P. mali*' 1/93 avirulens és AT virulens törzsek elkülönítéséhez az AP specifikus fhflB-RT/rhflB-RT1 indítószekvencia-párt, valamint Cy5-jelölt és FAM-jelölt TaqMan próbákat alkalmaztunk. A GSFY és PD1 törzseket az általunk tervezett fECA-RT/rECA-RT ESFY specifikus, illetve az fPD\_RT/rPD\_RT PD specifikus indítószekvencia-párok segítségével detektáltuk. A STOL és AAY1 törzsek jelenlétét az fSTOL/rSTOL STOL specifikus, valamint az fAY/rAY AY specifikus indítószekvenciákkal végzett polimeráz láncreakciók segítségével mutattuk ki hagyományos PCR során.

### 3. EREDMÉNYEK

Igazoltuk, hogy az eltérő virulenciájú fitoplazma törzsek a növény vigorára más mértékben hatnak, amely a különböző tünetek megjelenésén túl a megbetegített növény hajtásának vastagságában is megmutatkozik.

Munkáink eredményeképpen rózsameténg és dohány tesztnövényekben igazoltuk azt, hogy a '*Ca. P. mali*' avirulens 1/93-as fitoplazma törzs képes gátolni az azonos faj, a '*Ca. P. mali*' AT virulens törzsének szaporodását. Igazoltuk, a keresztvédetség hosszú távú hatásosságát azáltal, hogy a virulens törzs a fertőzést követően 2 évvel sem volt kimutatható a növényből.

Kimutattuk, hogy az 1/93-as avirulens törzs képes gátolni egy rokon, de más faj, a '*Ca. P. prunorum*' egy virulens törzsének szaporodását is. Elsőként igazoltuk, hogy a keresztvédetség fitoplazmák között működik rokon, de nem azonos fajba tartozó fitoplazmák között.

A más rendszertani csoportokba tartozó '*Ca. P. mali*' AAY1 és '*Ca. P. solani*' STOL törzsekkel szemben nem tudtuk igazolni az 1/93-as törzs gátló hatását. Ezek alapján eredményeink hozzájárultak ahhoz a korai feltevéshez, hogy a keresztvédetség rokon fajok között működik hatékonyan, a távolabbi rokonságban álló fajokkal szemben nem érvényesül.

Több ismétlésben elvégzett kísérletek sorával igazoltuk, hogy a keresztvédetség abban az esetben hatékony, amennyiben az immunizáló törzset előzőleg oltjuk a növényre és a kihívó törzssel való fertőzés később történik. A két fertőzés között eltelt idő nem befolyásolta döntően a gátlás sikerességét, jelentősége abban mutatkozott meg, hogy minél több idő telt el az immunizálás és a felülfertőzés között, annál hamarabb volt tapasztalható a virulens törzs mennyiségének csökkenése.

Megállapítottuk, hogy a gátlás abban az esetben nem volt hatékony, amikor a két törzset egyidejűleg oltottuk a növényre. Egyidejű fertőzés esetén, bár az avirulens törzs jelenléte is kimutatható volt a növényből, a virulens törzs játszotta a domináns szerepet.

A keresztvédetség meglétét gyökérmintákon is ellenőriztük. Ebben az esetben a fitoplazmák hosszútávú felhalmozódását tapasztaltuk. Vizsgáltuk az oltás helyének jelentőségét is, és megállapítottuk, hogy szerepe csupán a gátlás kialakulásának kezdetében van.

Igazoltuk több fitoplazma törzs együttes jelenlétének növénykórtani jelentőségét. Kimutattuk, hogy a fitoplazmával fertőzött almafák esetében a tünetek változékonysága összefüggést mutat a benne előforduló törzsek predominanciájával. Eredményeink arra utalnak, hogy egyes esetekben a fertőzést nem egy homogén fitoplazma törzs okozza, hanem azon belüli vonalokból álló komplex, amelyek virulenciája is eltérhet. A különbségek törzsek, vonalak *hflB* gén



szekvenciájának szintjén is kimutathatók.

Megállapítottuk, hogy az almában található komplex törzset alkotó egyes vonalak erőteljes gazdanövény preferenciával rendelkeznek.

Új tudományos eredmények:

1. Rózsameténg és dohány tesztnövényekben igazoltuk azt, hogy az avirulens '*Ca. P. mali*' 1/93-as fitoplazma törzs hosszú távon is képes gátolni az azonos rendszertani csoportba és azonos fajba tartozó AT törzs szaporodását.

2. Kimutattuk, hogy az 1/93-as avirulens törzs képes gátolni egy rokon faj, a '*Ca. P. prunorum*' virulens törzsének szaporodását is, ezzel elsőként igazoltuk, hogy a keresztvédettség fitoplazmáknál rokon fajok között is kialakul.

4. Igazoltuk több fitoplazma törzs együttes jelenlétét almafákban, és kimutattuk, hogy a tünetek változékonysága összefüggést mutat a növényben előforduló törzsek predomináciájával. A különbségek a törzsek, vonalak *hflB* gén szekvenciájának szintjén is igazolhatók.

5. Bizonyítottuk, hogy az almában található komplex törzset alkotó egyes vonalak erőteljes gazdanövény preferenciával rendelkeznek.

#### 4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A különböző fitoplazma törzsek eltérő virulenciája a tesztnövényeken vizuális úton is mérhető. Vizsgálataink nyomán bizonyossá vált, hogy a 'Ca. P. mali' különböző törzsei által almafákon kiváltott tünetek egyenetlen formában történő megjelenése legnagyobb bizonynyal a kevert fertőzéseknek köszönhető. A fákban olyan törzskomplexek lehetnek jelen, amelyeket avirulens és virulens törzsek alkotnak. A vizsgált, 10 évesnél is idősebb almafák 50%-nál is magasabb arányban bizonyultak több, akár 2-5 törzs által fertőzöttnek. Ennek ellenére a valóságban többszörösen, vegyesen fertőzött fák aránya még magasabb lehet, ami a vektorok több éven át tartó fertőzési tevékenységével magyarázható. A tünetek kifejeződését feltehetően az avirulens és virulens törzsek szaporodási feltételei, a közöttük kialakuló kölcsönhatások, ennek eredményeképp a populációk arányának változásai befolyásolhatják. Feltételezhető, hogy az avirulens törzs egyes összetevői gátolhatják a virulenciafaktorokat. A törzskomplexeket alkotó törzsek, illetve vonalak variabilitása a *hflB* és az *imp* gének szintjén is megjelenik.

Az 1/93-as törzskomplex jellemzésekor azt figyeltük meg, hogy azok nagyfokú gazdanövény-preferenciával rendelkeztek dohányon, illetve rózsameténgen. Feltételezhető, hogy mindkét törzs jelen lehet mindkét tesztnövényben, azonban eltérő fitnessük következtében a predomináns törzs jelenléte meghatározó. Azok a törzsek, amelyek az almafán csak enyhe tüneteket okoztak, rózsameténg és dohány tesztnövényeken csupán csekély szimptomák megjelenését indukálták.

Keresztvédetségű kísérleteink eredményeképpen igazoltuk azt a feltevést, hogy a törzsek közötti gátlás csak abban az esetben működhet hatékonyan, amennyiben a két törzs azonos rendszertani csoportba tartozik. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy minél több idő telik el a két (avirulens és virulens) törzssel való inokulálás között, annál nagyobb mértékben képes az avirulens törzs immunizálni a növényt. Ez köszönhető egyrészt annak, hogy az avirulens törzsnek több idő áll rendelkezésére ahhoz, hogy a növényben felszaporodjon, másrészt az elszaporodása során több olyan reakciót is kiválthat a növényből, amelyek védik azt a virulens törzs fertőzésével szemben. Az kérdéses, hogy a növény az immunitását az avirulens, vagy a virulens törzssel való fertőzés során szerzi-e meg.

Igazoltuk, hogy nem csak egy fajon belüli fitoplazma képes gátolni egy virulens törzs szaporodását, hanem azonos rendszertani csoportba tartozó, de más faj is.

Arra a megállapításra jutottunk, hogy az avirulens törzs nem képes gátló hatást kifejteni azokkal a törzsekkel szemben, amelyek más rendszertani csoportba tartoznak (AAY1, STOL).

Tapasztalataink alapján a gyökér érzékenyebbnek bizonyult mind előfertőzés, mind egyidejű

fertőzés esetében. A virulens fitoplazma jelenléte hosszabb ideig volt kimutatható benne, utalva arra, hogy a kolonizáció mértéke a gyökérben a legmagasabb és hogy a fitoplazma kolonizációja a gyökér felől indul.

Feltételezhető, hogy hatékony gátlás esetén a virulens törzs elpusztul, vagy pedig elveszíti a virulenciáját, ami a tünetmentesség kialakulásában mutatkozik meg. Habár a fitoplazma törzsek közötti kölcsönhatásokat többféle elmélettel is magyarázzák, napjainkig sem tisztázott egyértelműen a folyamat molekuláris háttere. Mindezek ismeretében eredményeink egy reménykeltő gyakorlati alkalmazhatóság irányába vezetnek el minket, azonban a biztonságos felhasználáshoz elsőként molekuláris szinten szükséges tisztázni a keresztvédettség mögött rejlő mechanizmust.

## 5. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

### Idegen nyelven megjelent publikációk

Seemüller, E. - **Kiss, E.** - Süle, S. - Schneider, B. (2010): Multiple infection of apple trees by distinct strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*' and its pathological relevance. *Phytopathology*, 100, (9), 863-870. (IF: 2,428)

Seemüller, E. - **Kiss, E.** - Süle, S. - Schneider, B. (2010): Multiple infection of apple trees by distinct strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*' and its pathological relevance. *Phytopathology*, 100, (9), 863-870. (IF: 2,428)

**Kiss, E.** - Seemüller, E. - Süle, S. (2013): Cross protection test with '*Candidatus Phytoplasma mali*' 1/93 strain against closely and distantly related phytoplasma strains. *Acta Phytopathol. Hun.*, 48, (2), 207-218.

Seemüller, E. - Kampmann, M. - **Kiss, E.** - Schneider, B. (2011): Molecular differentiation of severe and mild strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*' and evidence that their interaction in multiply infected trees determines disease severity. *B. Insectol.*, 64 (Supplement), 163-164. (IF: 0,371)

### Magyar nyelven megjelent publikációk

Mergenthaler, E. - **Kiss, E.** - Süle, S. (2014): A kajszi téli kivirágzása és a fitoplazmafertőzés. *Kertészet és Szőlészet*, 2014/6, 13-14.

**Kiss, E.** - Viczián, O. - Mergenthaler, E. (2014): Fitoplazmás betegségek előfordulása és jelentősége Magyarországon. *Gazdanapló*, 10, (1), 9-13.

Konferencia összefoglalók idegen nyelven

**Kiss, E.** - Süle, S. - Seemüller, E. (2010): Monitoring of cross protection activity of a '*Candidatus Phytoplasma mali*' strain in periwinkle. In: A. Bertaccini, A. Lavina and E. Torres (szerk.). *COST 1<sup>st</sup> Scientific Meeting*, (1-2. February, 2010, Sitges, Spanyolország), Book of Abstracts, 83.

**Kiss, E.** - Barna, B. - Süle, S. - Seemüller, E. (2012): Egyes enzimatisz antioxidánsok aktivitásának mérése különböző mértékben fertőző '*Candidaus Phytoplasma mali*' törzsekkel megbetegített dohányban. In: Kőmíves, T., Haltrich, A. és Molnár, J. (szerk.). *58. Növényvédelmi Tudományos Napok*, (2012. február 21-22., Budapest), 92.

**Kiss, E.** - Mergenthaler, E. - Kiss, B. - Viczián O. (2015): A csonthéjasok európai sárgulása (ESFY) magyarországi terjedésének háttérében álló okok. In: Horváth, J., Haltrich, A., Molnár, J. (szerk.). *61. Növényvédelmi Tudományos Napok*, (2015. február 17-18., Budapest), 60.

### **Konferencia összefoglalók magyar nyelven**

Tarcali, G. - **Kiss, E.** - Kövics, Gy. - Süle, S. - Irinyi, L. - Kiss, L. (2010): Kajszi ültetvények fitoplazmás pusztulása ('*Ca. Phytoplasma prunorum*') Borsod-Abaúj-Zemplén megyében. *Előadaskivonatok, 15. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum*, (2010. október 20-21., Debrecen)

Süle, S. - Ember, I. - **Kiss, E.** - Ács, Z. - Kölber, M. (2011): Endofita baktériumok és stolbur fitoplazma kapcsolata fertőzött *Convolvulus arvensis*-ben. *Erdei Ferenc VI. Tudományos Konferencia*, (2011. augusztus 25-26., Kecskemét), 483.

**Kiss, E.** - Süle, S. - Seemüller, E. (2010): Fitoplazmák közötti védettség igazolása tesztnövényen. In: Kőmíves, T., Haltrich, A. és Molnár, J. (szerk.). *56. Növényvédelmi Tudományos Napok*, (2010. február 23-24., Budapest), 28.

### **Tudományos könyvrészlet**

Tarcali, G. - Kövics, Gy. - **Kiss, E.** (2015): Occurrence of Stone Fruit Yellows Phytoplasma Disease ('*Candidatus Phytoplasma prunorum*') in Hungary and Central Europe. In: Kharwar RN, Upadhyay RS, Dubey NK, Raghuwanshi R (szerk.): *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Springer India, 205-215. DOI 10.1007/978-81-322-1801-2\_17 Print ISBN: 978-81-322-1800-5, Online ISBN: 978-81-322-1801-2