

**A LEANDERRÁK KÓROKOZÓJÁNAK, A *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *NERII* BAKTÉRIUMFAJ
IZOLÁTUMAINAK AZONOSÍTÁSA ÉS
ÖSSZEHASONLÍTÁSA HAZÁNKBAN**

Fodor Attila¹ - Palkovics László² - Juhász Áron¹ - Végh Anita^{1}*

¹MATE, Növényvédelmi Intézet

*²Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar,
Növénytudományi Tanszék*

*karacs.vegh.anita@uni-mate.hu

Összefoglalás

Hazánkban már régóta népszerű és mutatós dézsás növény a leander. Bárhol, ahol feltűnik, mediterrán hangulatot teremt. Legsúlyosabb betegsége a leanderrák vagy másnéven a leander pszeudomonászos betegsége, amit a *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* baktérium okoz. A betegség tipikus tünetei a rákos daganatok, melyek a növény összes földfeletti részén képződhetnek. A dísnövények esztétikai értékének csökkenése mellett idővel a növény kondíciója leromlik, és el is pusztulhat. Vizsgálatunkban az ország különböző pontjairól gyűjtött leander növényekből izoláltuk a *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* kórokozót. Azonosítását, jellemzését, valamint az izolátumok összehasonlítását klasszikus módszerekkel - hiperszenzitív reakció, Gram tulajdonság, biokémiai jellemzők, patogenitási teszt, LOPAT teszt- végeztük el.

Kulcsszavak: *Nerium oleander*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*, leanderrák

Abstract

Oleander (*Nerium oleander* L.) is a popular woody ornamental plant. Unfortunately, a plant pathogenic bacterium, *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* causes serious disease with neoplastic lesions in all parts of the plant. This disease is called oleander cancer. Between 2020 and 2021 we collected many infected plant parts nationwide and examined the pathogen by classical methods - hypersensitivity reaction, Gram-property, biochemical characteristics (API20 NE), pathogenicity test, LOPAT test.

Keywords: *Nerium oleander*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*, oleander cancer

Bevezetés

A *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* a *Pseudomonas syringae* fajkomplex tagja, melyet világszerte a legjelentősebb fitopatogén baktériumcsoportnak tekintenek (Mansfield et al., 2012). A betegséget Ferraris (1926) írta le először 1926-ban. Hazánkban Szatmári és munkatársai (1998) izolálták elsőként a kórokozó jelenlétét. *P. savastanoi* pv. *nerii* mellett még három patotípust különíthetünk el: *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *P. savastanoi* pv. *fraxini* és *P. savastanoi* pv. *retacarpa* (Janse, 1981, 1982; Surico et al., 1985; Matas et al., 2009; Young et al., 1996). Az egyes törzsek fenotípusosan és genotípusosan egyaránt heterogének. Számos dísz – *Ligustrum japonicum*, *Retama sphaerocarpa*, *Mandevilla sanderi*, *Myrtus communis*, *Jasminum officinalis*, *Phillyrea* sp., *Forsythia* sp., *Rhamnus alaternus* – és gazdaságilag meghatározó – *Olea europaea*, *Punica granatum*, *Fraxinus* sp. – növényt képesek megfertőzni (Bradbury, 1986; Szatmári et al., 1998; Garcia, 1999; Saad and Hanna, 2002; Eltlbany et al.,

2012; Bozkurt et al., 2014; Cinelli et al., 2014;). Tipikus tünetként sejt túlburjánzást figyelhetünk meg a fertőzött növényi részeken, amiket a baktérium által termelt fitohormonok váltanak ki (Surico and Iacobellis, 1992).

Anyag és módszer

Az ország különböző pontjáról a leander rákra jellemző tipikus tüneteket mutató mintákat gyűjtöttünk 2020-2021 között. A fertőzött növényi részeket a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Növényvédelmi Intézet, Növénykórtani Tanszék laboratóriumába szállítottuk. A szállítást követően a mintákat 70% etilalkohollal fertőtlenítettük, steril desztillált vízzel homogenizáltuk, táptalajra szélesztettük, és tiszta tenyészetet készítettünk.

A baktériumok tenyésztéséhez King-B táptalajt használtunk (King et al., 1954), amiket szobahőmérsékleten inkubáltunk. A Gram-tulajdonságot 3%-os KOH oldattal határoztuk meg (Gregersen, 1978). A hiperszenzitív reakció vizsgálatához dohánynövény (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*) levelébe 5×10^7 sejt/ml mennyiségű baktérium szuszpenziót injektáltunk fecskendővel (Klement, 1982). A patogenitási vizsgálat során az egy éves, saját szaporítású leander cseméték hajtásait a második és negyedik internódiumnál $100 \mu\text{l}$ baktérium szuszpenzióval fertőztük. A kontroll növényekbe steril, desztillált vizet injektáltunk. A fertőzött növényeket szobahőmérsékleten pára kamrába helyeztük magas relatív páratartalom (90% feletti) mellett. A biokémiai tulajdonságok vizsgálatához a Biomérieux (France) által gyártott API20 NE tesztsíkokat alkalmaztuk. A gyártó előírásainak megfelelően 5×10^7 sejt/ml töménységű baktérium szuszpenziót juttattunk a zsebekbe, amiket a gyártó által meghatározott színkódok alapján értékeltünk.

A LOPAT teszt során a Levan-termelést 5% cukrot tartalmazó Nutriet agaron vizsgáltuk. Az oxidáz tulajdonság meghatározásához a Biolab által forgalmazott oxidáz tesztsíkot használtuk.

A burgonya rohasztás során, a piacon vásárolt gumókat fertőtlenítettünk, szeletekre vágtuk, és

steril fogpiszkáló segítségével baktérium kolóniákkal fertőztük meg. Kontroll esetében steril desztillált vízbe mártott fogpiszkálóval fertőztünk. Az arginin-dihidroláz termelést ADH táptalajon határoztuk meg. A hiperszenzitív reakció indukáló képesség vizsgálata az előző bekezdésben leírt módon dohánynövényen történt (Lelliott et al., 1966; Schaad et al., 2001; Thornley, 1960).

Eredmények

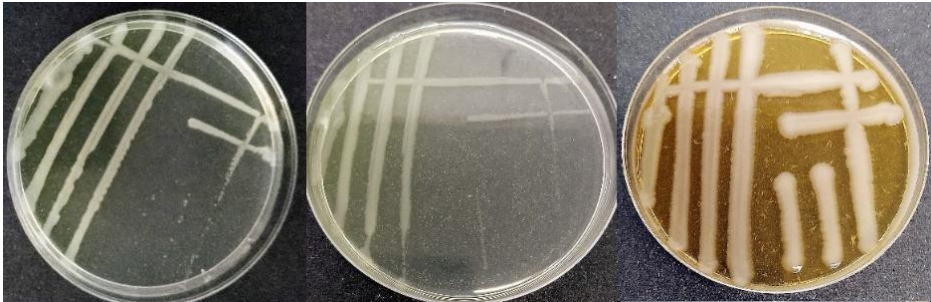
Minden gyűjtött leander mintán a *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* által kiváltott leander rákra utaló, tipikus tüneteket tapasztaltuk (1. ábra).



1. ábra A leander rák megfigyelt tünetei

Az izolálás során nagymértékben kevert tenyészetek nem voltak jellemzőek. A korai fertőzés szakaszában lévő minták bizonyultak a legjobbnak, amiket a gyűjtés után a lehető leghamarabb feldolgoztunk. King-B táptalajon összesen 25 tiszta tenyészetet (L6, L13, L15, L17, L19, L20, L25, L36, L37, L38, L50, L51, L52, L53, L56, L57, L58, L62, L64, L65, L66, L67, L18, L54, L49) hoztunk létre, melyek könnyen tenyészthetők és fenntarthatók voltak (2. ábra). Apró,

szürkés -fehér színű, szabálytalan szegélyű telepeket figyeltünk meg. A baktériumok fluoreszcens pigmentet termeltek és a táptalajba diffundáltak. Hosszabb inkubálás után (96 óra) két izolátum (L6, L15) a többitől eltérően nem zöld, hanem barna diffundáló pigmentet termelt.



2. ábra Izolátumok tenyészbélyege (L36, L54, L15) King-B táptalajon 24 órás és 96 órás inkubálás után

Minden izolátum Gram-negatív tulajdonságot mutatott, mivel a KOH oldat oltotta az izolátumok sejtfalát. A dohánynövény (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Xanthi*) leveleibe inokulált szuszpenziók 24 óra után gyors szöveti nekrozist okoztak (3. ábra).



3. ábra Hiperszenzitív reakció dohánynövény levelén (L13, L36, L50) az inokulálás után 36 órával

A patogenitási teszt során az első tünetek a fertőzés utáni 28. napon jelentkeztek. 46 nap elteltével mindegyik beoltott növényen kialakultak a tipikus tünetek, vagyis az inokulálás helyén rákos sebek jelentek meg. A kontroll növény esetében elváltozásokat nem tapasztaltunk (4. ábra). A mesterségesen fertőzött csemetékről visszaizoláltuk az izolátumok mindegyikét és igazoltuk a Koch posztulátumokat.



4. ábra Patogenitási teszt leander növényen (balról jobbra: kontroll, L58, L18, L56 izolátumok)

Az izolátumok biokémiai tulajdonságait API20 NE kittel hasonlítottuk össze (1. táblázat). Összesen 16 vizsgálat során (nitrát-redukció, indol, D-glükóz fermentáció, L-arginin, ureáz, eszculin, zselatin, β -galaktozidáz, D-glükóz, D-mannóz, D-mannitol N-acetil-glükózamin, D-maltóz, K-glükonát, kaprilsav asszimiláció, adipinsav asszimiláció) kaptunk pozitív eredményt, mely során izolátumaink eltéréseket mutattak. L-arabinóz, almasav, fenil-ecetsav, Na-citrát teszteken minden izolátum esetében egységesen negatív eredményt tapasztaltunk. Az L15 és L20, az L13 és a L17, valamint az L19, L36, L37, L38, L50, L51, L52, L53, L56, L57, L67, L49 izolátumok biokémiai tulajdonságaikban teljesen megegyeztek.

I. táblázat A vizsgált 25 izolátum AP120 NE teszt eredményei

	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
L6	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
L13	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L15	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L17	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L20	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L25	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L58	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

LOPAT tesztek során az összes izolátum azonosan viselkedett. Csak dohánynövényen végzett hiperszenzitív reakciók során kaptunk pozitív eredményeket, a többi teszten negatív eredményt kaptunk (5. ábra).



5. ábra LOPAT teszt eredményei

Eredmények értékelése

A leanderrák betegség kórokozója, a *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* növénypatogén baktérium jelentős problémát okoz, hiszen a leander (*Nerium oleander*) növények díszítőértékét jelentősen csökkenti. Kutatásunk során hazai, tipikus tünetet mutató mintákat gyűjtöttünk, majd vizsgáltunk meg 2020-2021 között. Ezek a szakirodalomban leírt tünetekhez viszonyítva eltérést nem mutattak (Surico et al., 1985). Izolátumaink King-B táptalajon könnyen tenyésztethők és fenntarthatók voltak. Apró, szürkés -fehér színű, szabálytalan szegélyű telepeket figyeltünk meg (Kavak and Ustun, 2009). Fluoreszcens pigmentet termeltek, de két izolátum a többitől eltérően barna diffundáló pigmentet termelt (Janse, 1981). Minden izolátum Gram-negatív tulajdonságot mutatott, és hiperszenzitív reakciót indukált dohánynövény levelén (Janse, 1982). A patoganitási tesztek során az izolátumokkal való visszafertőzés után a tesztnövényeinken megjelentek a rákos elváltozások, melyek a kórokozó tipikus tünetei. A

mesterségesen fertőzött csemetékről visszaizoláltuk, és klasszikus módszerek alkalmazásával igazoltuk a Koch posztulátumokat. A LOPAT teszt során izolátumaink azonosan viselkedtek, csak a dohánynövényen végzett hiperszenzitív reakció során tapasztaltunk pozitív választ. Így minden izolátum a LOPAT 1b csoportba tartoznak. Ezáltal megállapíthatjuk, hogy izolátumaink a *P. syringae* fajkomplexen belül a csak hiperszenzitív reakciót mutató *Pseudomonas* fajok közé sorolhatók (Janse, 1982). A biokémiai tulajdonságaikat API20NE tesztekkel határoztuk meg. Biokémiai tulajdonságaikban az L15 és L20, az L13 és a L17, valamint az L19, L36, L37, L38, L50, L51, L52, L53, L56, L57, L67, L49 izolátumok teljesen megegyeztek, a többi izolátum eltérő tulajdonságokkal jellemezhető. Más izolátumokkal való összehasonlítást nehezíti, hogy a kórokozó nevezéktana gyorsan változott. Több tanulmány alátámasztja, hogy a *P. savastanoi* pv. *nerii* izolátumok többnyire a nitrátot redukálják. A glükózt, a cellobiózt és a trechalózt hasznosítják, de a mannitot és a szorbitot nem képesek hasznosítani (Kavak and Ustun, 2009; Marchi et al., 2006). Ezen tulajdonságok alapján a korábban vizsgált izolátumokhoz két izolátumunk mutat egyezést, a többi izolátumaink eltérő biológiai tulajdonsággal jellemezhető.

Eredményeink hozzájárulnak hazánkban a leanderrákkal kapcsolatos ismeretek bővítéséhez, valamint újabb adatokat, ismereteket is eredményeztek a kórokozó hazai populációjáról. A kísérletet a jövőben tovább folytatjuk az izolátumok molekuláris vizsgálatával, más fajokkal való összehasonlítással, és újabb izolátumok azonosításával. Emellett a jövőben tervezzük a leanderrák elleni védekezési lehetőségek vizsgálatát is, ezekkel is hozzájárulva a kórokozó elleni hatékony védekezés kidolgozásához.

Köszönetnyilvánítás

Tématerületi Kiválósági Program 2020- Intézményi Kiválóság Alprogram (TKP2020IKA-12) növénynemesítés, növényvédelemmel kapcsolatos kutatások tématerületi programja keretében valósult meg.

Irodalom

- Bozkurt, I.A., Soyly, S., Mirik, M., Ulubas Serce C. and Baysal Ö. 2014. Characterization of bacterial knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on pomegranate (*Punica granatum* L.) trees: a new host of the pathogen. Letters in *Applied Microbiology*. **59**. 520–527.
- Bradbury, J.F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. Wallingford, UK: CAB International.
- Cinelli, T., Marchi, G., Cimmino, A., Marongiu, R., Evidente, A. and Fiori, M. 2014. Heterogeneity of *Pseudomonas savastanoi* populations infecting *Myrtus communis* in Sardinia (Italy). *Plant Pathology*. **63**(2). 277–289.
- Eltlbany, N., Prokscha, Z.Z., Castañeda-Ojeda, M.P., Krogerrecklenfort, E., Heuer, H., Wohanka, W., Ramos, C. and Smalla, K. 2012. A new bacterial disease on *Mandevilla sanderi*, caused by *Pseudomonas savastanoi*: lessons learned for bacterial diversity studies. *Applied and Environmental Microbiology*. **78**. 8492-8497.
- Ferraris, T. 1926. Trattato di patologip e terapia vegetale, vol. 1, 3rd ed. Hopli, Milan.
- Garcia De Los Rios, J.E. 1999. *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss, a new host of *Pseudomonas savastanoi*. *Phytopathologia Mediterranea*. **38**. 54–60.
- Gregersen, T. 1978. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. **5**(2). 123–127.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P. and Foster, G.D. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. **13**(6). 614–629.

- Janse, J.D. 1982. *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. nov., nom. rev., the bacterium causing excrescences on *Oleaceae* and *Nerium oleander* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **32**(2). 166–169.
- Janse, J.D. 1981. The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*), caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini* II. Etiology and taxonomic considerations. *European Journal of Forest Pathology*. **11**(7). 425-438
- Kavak, H. and Ustun, N. 2009. Oleander knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* in Turkey. *Journal of Plant Pathology*. **91**(3). 701-703.
- Klement, Z. 1982: Hypersensitivity, In: Phytopathogenic Prokaryotes, Vol. 2. Mount, M.S. and Lacy, G.H. eds. Academic Press, New York, 147–177.
- King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **44**. 301-307.
- Lelliott, R.A., Billing, E. and Hayward, A.C. 1966. A Determinative Scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic *Pseudomonads*. *Journal of Applied Bacteriology*. **29**(3). 470–489
- Marchi, G., Sisto, A., Cimmino, A., Andolfi, A., Cipriani, M.G., Evidente, A. and Surico, G. 2006. Interaction between *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Pantoea agglomerans* in olive knots. *Plant Pathology*. **55**(5). 614–624.
- Matas, I.M., Pérez-Martínez, I., Quesada, J.M., Rodríguez-Herva, J.J. Penyalver, R. and Ramos, C. 2009. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* contains two *iaaL* paralogs, one of which exhibits a variable number of a trinucleotide (TAC) tandem repeat. *Applied and Environmental Microbiology*. **75**. 1030–1035.
- Surico, G. and Iacobellis, N.S. 1992. Phytohormone and olive knot disease. In: Verma, D.P.S. *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*. CRC Press, Boca Raton, USA. 209-227.
- Saad, A.T. and Hanna, L. 2002. Two new hosts of *Pseudomonas savastanoi* and variability in strains isolated from different hosts. *Phytopathology*. **92**. S71.

Schaad, W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd Edition, American Phytopathological Society, St. Paul, 373.

Szalmári Sz., Khadija E. és Hevesi M. 1998. Daganatképző baktériumok hazai előfordulása. *In* IX. Lippay János-Vas Károly Nemzetközi Tudományos Ülésszak, Növényvédelmi Szekció, 1998. szeptember 16-18., Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem, Budapest. 340.

Surico, G., Iacobellis, N.S. and Sisto, A. 1985. Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Physiological Plant Pathology*. **26**. 309–320.

Thornley, M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal of Applied Bacteriology*. **23**. 37–52.

Young, J.M., Saddler, G.S., Takikawa, Y., De Boer, S.H., Vauterin, L., Gardan, L., Gvozdyak, R.I. and Stead, D.E., 1996. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Review of Plant Pathology*. **75**. 721-763.