

## **Fitoplazma fertőzöttség vizsgálata kajszi ültetvényekben**

**Czotter Nikoletta<sup>1\*</sup>, Oláh Beatrix<sup>1</sup>, Petres Martin<sup>1</sup>, Baráth Dániel<sup>1</sup>, Szabó Luca<sup>2</sup>,  
Kirilla Zoltán<sup>2</sup>, Kocsisné Molnár Gitta<sup>3</sup>, Kocsis László<sup>3</sup>, Preininger Éva<sup>2</sup>, Lakatos  
Tamás<sup>2</sup>, Szabó Zoltán<sup>4</sup> és Várallyay Éva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>NAIK, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, <sup>2</sup>Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet,  
2100 Gödöllő, Szent-Györgyi A. u. 4.

<sup>3</sup>Pannon Egyetem, Georgikon Kar, 8360 Keszthely, Deák F. u. 16.

<sup>4</sup>Balaton Fruit Kft, 8171 Balatonvilágos, Hűtőház 030/4 hrsz

\*e-mail: czotter.niki@gmail.com

### **Összefoglalás**

A gyümölcsfák fitoplazmás eredetű betegségei egyre komolyabb problémát jelentenek a gyümölcsstermesztők számára világszerte, szerepük különösen az utóbbi években nőtt meg ugrásszerűen. A kajszi fitoplazmás betegsége a csonthéjas fajokat veszélyezteti, hazánkban komoly problémát okoz. Munkánk során Magyarország több, jelentős kajszi ültetvényének a csonthéjasok európai sárgulás fitoplazmával való fertőzöttségét vizsgáltuk. Az ültetvényekről levélmintákat gyűjtöttünk és DNS-t tisztítottunk a PCR alapú kimutatáshoz. A kórokozó jelenlétének igazolásához minden fitoplazma kimutatására, illetve az egyes fitoplazma csoportok elkülönítésre alkalmas indítoszekvenciák kombinációját használtuk. Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált kajszi ültetvényekben a csonthéjasok európai sárgulás fitoplazma általánosan elterjedt. A PCR vizsgálatokat olyan gének kimutatására is kiterjesztettük, melyek vizsgálatával a hazánkban jelenlevő törzsek rokonsági viszonyai is feltárhatóak.

**Kulcsszavak:** fitoplazma, *Can. Phytoplasma prunorum*, ESFY, kajszi, csonthéjasok

### **Abstract**

Plant diseases caused by phytoplasmas are serious problems for fruit growers all over the world, their role have been growing significantly in recent years. European stone fruit yellows caused by these type of plant pathogens endangers stone fruit species, especially apricot in our country. During our work we examined phytoplasma infection at the most important apricot

growing regions in Hungary. Leaf samples were collected and DNA was extracted for PCR based detection. We used different sets of primers to detect and distinguish their presence in our samples. During our survey we have found widespread distribution of European stone fruit yellows phytoplasma in our apricot orchards. Beside of highly conservative genes our analysis was broaden to other more variable ones which made it possible to investigate relationships between strains.

**Keywords:** phytoplasma, *Can. Phytoplasma prunorum*, ESFY, apricot, stone fruits

### Bevezetés

Napjainkban egyre súlyosabb károkat okoznak azon növényeket fertőző kórokozók, melyek ellen nem áll rendelkezésre kidolgozott növényvédelmi technológia. Ezen kórokozók közé tartoznak az egysejtű, sejtfal nélküli, táptalajon nem tenyészthető növénykórokozó baktériumok, a fitoplazmák. Az általuk okozott betegségek a termés minőségének romlását, mennyiségének csökkenését, a fák élettartamának rövidülését és nagymértékű fapusztulást okoznak.

A jelentős gazdasági értéket képviselő csonthéjas gyümölcsűek, közülük is elsősorban a kajszi ültetvények körében, évtizedek óta komoly pusztítást végez a csonthéjasok európai sárgulása fitoplazmás betegség (European stone fruit yellows phytoplasma-ESFY). A betegséget okozó *Candidatus Phytoplasma prunorum*, a 16S rRNS alapján történő rokonsági besorolás alapján a X. csoportba tartozik (Seemuller and Schneider, 2004). Hazánkban a betegséget először Süle és mtsai. (1997) azonosították. A betegség sárgulást, torzulást, illetve burjánzást idéz elő, a fertőzött fák gutaütésszerű tüneteket mutatnak, majd néhány éven belül elpusztulnak. Terjedésében a fertőzött szaporítóanyagnak, és vektorának [szilvalevélbolha (*Cacopsylla pruni*)] van jelentős szerepe (Carraro és mtsai, 1998), de a fitoplazma terjedhet oltással, szemzéssel, és nem teljesen tisztázott módon a talajon keresztül is (Süle, 2014; Szalay, 2012). A fitoplazmák kimutatására és azonosítására PCR alapú molekuláris biológiai tesztekkel használnak. A legelterjedtebb és a hatóságok által is használt PCR reakciót a 16S rRNS génre tervezett univerzális és csoport specifikus indítószekvenciákkal végzik. Mivel a 16S rRNS gén igen konzervatív, vizsgálatával a jelenlevő törzsek rokonsági viszonyait nem tudjuk vizsgálni. Ehhez olyan gének vizsgálata szükséges, melyek nagyobb genetikai változékonyságot mutatnak, ezáltal alkalmasak lehetnek a csoportba tartozó fitoplazma fajok és azok törzseinek csoporton, és fajon belüli elkülönítésére (Danet és mtsai, 2011).

Munkánk célja, hazánk jelentős kajszi termesztő régióiban a fitoplazma fertőzöttség felmérése molekuláris módszerekkel, valamint a mintákban található fitoplazmák csoporton belüli elkülönítése és vizsgálata filogenetikai elemzéssel.

### **Anyag és módszer**

A kísérletek elvégzéséhez 2016 nyarán az ország különböző területein gyűjtöttünk levélmintákat tünetes és tünetmentes fákról. A nemcsak magyar, hanem külföldi fajtákat is tartalmazó mintákat termő ültetvényeken (Érd, Boldogkőváralja, Balatonvilágos, Siófok, Zalaszentő), a NAIK Gyümölcsstermesztési Kutatóintézet érdi és újfahértói izolátor házaiban és érdi törzsültetvényén szedtük. A fitoplazmák jelenlétének teszteléséhez 0,1-0,15 g levél szövetből tisztítottunk DNS-t, NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) kit segítségével. A fitoplazma fertőzöttséget nested PCR reakcióban állapítottuk meg, melyhez univerzális: P1-P7 és 16SrX csoport specifikus: fO1-rO1 indítószekvenciákat használtunk (Deng és Hiruki, 1991). A 16SrX csoporton belül a fitoplazma fajok elkülönítésére és rokonságuk vizsgálatára a dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (*aceF*) és polyribonucleotide nucleotidyltransferase (*pnp*) (Danet és mtsai, 2011) génekre végeztünk nested PCR reakciót, amihez minden esetben a Thermo Scientific Phire Green Hot Start II DNS polimeráz enzimet használtunk. Az amplifikált termékeket 1,2%-os agaróz gélben elektroforetikus választottuk el. A kapott termékek egy részének bázissorrendjét a tisztított PCR termékek hagyományos Sanger szekvenálásával állapítottuk meg. Az azonosított fitoplazma törzsek rokonsági viszonyait az így megállapított DNS szekvenciák filogenetikai összehasonlításával vizsgáltuk MUSCLE programcsomaggal.

### **Eredmények**

A molekuláris tesztekhez szükséges nukleinsavat fiatal, hajtás közeli levélrészekből tisztítottuk, CTAB alapú puffert használtunk, mellyel megfelelő minőségű és mennyiségű DNS-t tudtunk izolálni a PCR vizsgálatokhoz.

A 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák kimutatását univerzális P1-P7 primerekkel, majd e reakció termékéről csoport specifikus fO1-rO1 primerek használatával nested PCR-rel végeztük. A PCR reakciók termékeinek vizsgálata alapján elmondhatjuk, hogy az érdi izolátorház kivételével minden vizsgált ültetvényen detektáltunk fitoplazma fertőzöttséget. A fertőzött mintákból kiválasztottunk 15-öt, melyek különböző mintavételi helyekről származtak, magyar és

külföldi fajtákat is képviseltek és a nested PCR alapján fertőzöttek voltak 16SrX csoportba tartozó fitoplazmával. Ebbe a rokonsági csoportba a *Ca. P. prunorum*-on kívül a *Ca. P. mali* és a *Ca. P. pyri* tartoznak. A *16SrRNS* gén e három faj genomjában nagyon hasonló, a csoport specifikus primerpár által amplifikált DNS szakasz bázissorrendje alapján a 16SrX csoportba tartozó fitoplazmák között nem lehet molekuláris különbséget találni. Ahhoz, hogy teljes bizonyossággal eldöntsük, hogy mintáinkban valóban a *Ca. P. prunorum* van jelen, nagyobb változékonyságot mutató, nem konzervatív gének bázissorrendjének összehasonlítására volt szükség.

Ehhez az *aceF* és *pnp* gének felszaporítását végeztük el nested PCR reakcióban, ami a vizsgált 15 mintában 5 (*aceF*), illetve 10 (*pnp*) esetben sikerült. Az amplifikált termékek további vizsgálatával azonban nemcsak a *Ca. P. prunorum* jelenléte vált bizonyossá, hanem a PCR termékek nukleinsav sorrendje már alkalmas volt a jelenlevő törzsek filogenetikai vizsgálatára is. Ehhez a mintáink *aceF* és *pnp* génjeinek nukleotid sorrendjét a nemzetközi adatbázisban (NCBI) található *Ca. P. prunorum*, *pyri* és *mali* szekvenciákkal hasonlítottuk össze a MUSCLE többszörös szekvencia illesztő programmal. Megállapítható, hogy az adatbázisban szereplő *Ca. P. prunorum* eredetű és mintáink szekvenciái 99-100%-os hasonlóságot mutatnak, míg a *pyri* és *mali* eredetű szekvenciáktól bázissorrendjükben jelentősen különböznek. Saját, különböző eredetű mintáink *aceF* és *pnp* génjeit egymással is összehasonlítottuk és köztük igen nagyfokú hasonlóságot találtunk.

### Megvitatás

Korszerű molekuláris diagnosztikai módszerekkel végzett vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a *Ca. P. prunorum* jelen van, és elterjedt az általunk mintázott 5 kajszi termesztő régió ültetvényeiben. Az általunk vizsgált *aceF* és *pnp* gének eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy vizsgálatukkal a 16SrX csoport fajai elkülöníthetőek. Erre az összehasonlításra a szakirodalomban leírt: immunodominant membrane protein (*imp*) gén a legalkalmasabb, de a publikált indítoszekvenciákkal kísérleteink során mégsem sikerült az adott mérettartományban PCR terméket amplifikálnunk. Ezért a továbbiakban olyan primereket tervezünk, melyekkel az *imp* gén darabja jó hatékonysággal felszaporítható lesz. Ilyen, nagy változatosságot mutató gének rokonsági vizsgálata alapján ugyanis megállapíthatjuk, hogy a vizsgált termő ültetvényekben jelen lévő kajszi fitoplazma törzsek a magyar, vagy inkább a külföldi variánsok szekvenciájával mutatnak-e nagyobb hasonlóságot. A különböző fajta kajszi ültetvényekben jelenlevő fitoplazma törzsek hasonlósága alapján következtethetünk arra, hogy a kórokozó az ültetvények közelében

levő természetes rezervoárokból vagy esetleg az új fajták szaporítóanyagával került az ültetvényekbe. A terjedés okának ily módon való felderítése pedig igen fontos információt nyújthat a fitoplazma fertőzöttség további terjedésének megelőzésében.

### Köszönetnyilvánítás

Kutatásunkhoz az FM nyújtott céltámogatást. Czotter Nikoletta a PE Fesztetics doktori iskola PhD. hallgatója és részt vesz a Kutatói utánpótlást elősegítő programban. Petres Martin, SZIE Növényorvos MSc. hallgatójának kutatómunkáját az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP 2016-2017 I/5 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programja támogatja.

### Hivatkozások

- Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P., Refatti, E. 1998. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. Journal of Plant Pathology, 80: 233-239.
- Danet, L. L., Gulnara, B., Cimerman, A., Sauvion, N., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Lavina, A., Battle, A., Krizanac, I., Škoric, D., Ermacora, P., Cigdem, U.S., Kadriye, C., Jarausch, W., Foissac, X. 2011. Multicus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination. Microbiology, 157: 438-450.
- Deng, S. J., Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. Journal of Microbiological Methods, 14: 53-61.
- Seemüller, E., Schneider, B. 2004. '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54: 1217-1226.
- Süle, S., Viczián, O., Péntes, B. 1997. A kajszi fitoplazmás pusztulása. Kertészet és Szőlészet, 45: 8-11.
- Süle, S. 2014. Kajszipusztulás és az ellene való védekezés. Növényvédelem, 50: 23-25.
- Szalay, L. 2012. Miért pusztulnak a kajsziarackfák? Agrofórum, 12: 80-81.