

**Növényi szervek felületi fertőtlenítése stabil klór-dioxid oldattal:
Új lehetőség az obligát biotróf növényparazita gombák
in vitro kultúráinak létesítésére**

Tóth Endre Kristóf és Kiss Levente

MTA ATK Növényvédelmi Intézet

1022 Budapest, Herman Ottó út 15.

e-mail: toth.endre@agrar.mta.hu; kiss.levente@agrar.mta.hu

Összefoglalás

A különféle növényfajok steril *in vitro* kultúrába vonásának első kritikus eleme az explantátumnak szánt növényi szervek, szövetek felületi fertőtlenítése. Nehezíti a feladatot, ha valamilyen kórokozóval fertőzött növényi rész tenyésztését szeretnénk úgy kialakítani, hogy a kórokozó is fennmaradjon. A leggyakoribb eljárás az oxidáló hatású vegyületekkel (hipokloritokkal) történő fertőtlenítés. Ez legtöbbször hatékony, használata után a növényi szövetek, szervek általában steril növénné regenerálódnak. Ugyanakkor a növénykórokozó gombák felszíni struktúrái is elpusztulnak, sőt pl. a hausztóriumok mentén beszívárgó fertőtlenítőszer e képletek mellett a levél mezofillumát is károsíthatja.

2011-ben új, az eddigiektől eltérő hatásmechanizmusú fertőtlenítőszer került forgalomba, amelynek hatóanyaga különlegesen tiszta, stabil klór-dioxid. E vegyületre a különféle szervezetek érzékenysége különböző, erősen függ a sejtmérettől is, így joggal reméltük, hogy a baktériumok elpusztítása mellett ép gombaelemek maradnak a biológiai rendszerben s így obligát biotróf parazita gombákkal fertőzött, de más mikroorganizmusoktól mentes növénykultúrákat nyerünk.

A klór-dioxidos fertőtlenítés eredményességi adataiból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a fertőtlenítés hatékonysága általában megegyezik a kalcium-hipokloritos fertőtlenítés hatékonyságával, egyes esetekben (pl. nem sima felszínű magvak) elmarad attól.

A készítmény kíméletességét bizonyítja, hogy mindhárom kísérletbe vont gazda-parazita kapcsolatban levő növényfajból sikerült *in vitro* kultúrát indítani, igaz nagyon eltérő hatékonysággal.

A kísérletek eredményeképp olyan obligát biotróf parazitákat vizsgálhatunk akár biokémiai, akár molekuláris genetikai célból, amelyeknél a vizsgálatokat nem zavarják más mikroorganizmusok, ill. ezek genetikai elemei, enzimei, másodlagos anyagcseretermékei.

Kulcsszavak: felületi fertőtlenítés, *in vitro* szervkultúra, klór-dioxid, obligát parazita

Abstract

Surface disinfection procedure is the first critical step to establish sterile *in vitro* culture of plants. To make this task more complicated, sometimes we need to develop co-cultures of some plants and pathogens. The most common procedure is using oxidizing compounds (e.g. hypochlorites), which are effective disinfectants, so explants are able to regenerate into sterile plants. These treatments destroy fungal elements on the plant surface but infiltration of disinfectant along the haustoria can damage the mesophyll cells too.

In 2011, a new disinfectant product became available with a new mechanism of action. Its active ingredient is extremely clean, stabil chlorine dioxide. The sensitivity of organisms to this substance varies greatly and is strongly dependent on the cell size. Chlorine dioxide was expected to eliminate contaminating bacteria without destroying fungal structures on plant surfaces, and, thus, providing clean co-cultures of the host plant and a parasitic obligate biotrophic fungus inside the plant tissues. The disinfecting effectiveness data of chlorine dioxide showed that its performance was comparable to the disinfection efficacy of calcium hypochlorite, although in some cases (e.g. seeds with scabrous surface) it lagged somewhat behind.

The gentle effect of the product was proved by the facts that all three plant species infected with obligate biotrophic parasites survived disinfection treatment with chlorine dioxide and viable *in vitro* cultures have been established, albeit with different efficiencies.

The conclusion is that disinfection with chlorine dioxide enables us to investigate biochemical or molecular genetic parameters of obligate plant parasites without the risk of contaminations deriving from genetic elements, enzymes or secondary metabolites of other unwanted microorganisms.

Keywords: surface disinfection, *in vitro* organ culture, chlorine dioxide, obligate parasite

Bevezetés

A különféle növényfajok steril *in vitro* kultúrába vonásának („indítás”) több kritikus eleme van, az első ezek közül az explantátumnak szánt növényi szervek, szövetek felületi fertőtlenítése. Tovább nehezíti a feladatot, ha valamilyen kórokozóval fertőzött együttes tenyészetet szeretnénk kialakítani. Növényvírussal, viroiddal, fitoplazmával fertőzött növények felületi fertőtlenítése nem tér el lényegesen az egészséges növényekétől (Tóth, 2000). Baktériummal, vagy nekrotrof gombával való fertőzöttség esetén általában nem lehet együttes kultúrát előállítani, mivel ezek a szervezetek a táptalajon erőteljesen növekedni képesek és előbb-utóbb elpusztítják a növényi tenyészetet. Az obligát biotróf parazita gombákkal fertőzött növények esetében az adja a feladat nehézségét, hogy a hagyományos, drasztikus hatású fertőtlenítőszer alkalmazása elpusztítja a gombát a filloszféra egyéb organizmusaival együtt. A leggyakoribb eljárás szerint az oxidáló hatású vegyületekkel (nátrium-, vagy kalcium-hipokloritokkal) történő fertőtlenítés hatékony, noha esetenként a növény is károsodik. Az életben maradó merisztematikus szövetek és szervprimordiumok általában steril növénné regenerálódnak. A felszíni gombaelemek elpusztulnak, sőt a hausztóriumok mentén beszivárgó fertőtlenítőszer e képletek mellett a levél mezofillumát is károsíthatja.

2011-ben új, az eddigiektől eltérő hatásmechanizmusú fertőtlenítőszer került forgalomba. A különlegesen tiszta, stabil klór-dioxid oldat elsősorban a fogorvoslásban használatos, de kedvező tulajdonságai miatt egyre több területen válik be, így indokolt a növény-biotechnológiában történő kipróbálása is. A klór-dioxid csak négy aminosavval (a két kéntartalmú aminosav, a cisztein és a metionin, továbbá a tirozin és a triptofán) lép reakcióba, azokkal viszont igen gyorsan. Fertőtlenítő hatása ezen reakcióknak tulajdonítható. A különféle szervezetek érzékenysége különböző, erősen függ a sejtmérettől is (Noszticzius és mtsai, 2013), így joggal remélhettük, hogy a baktériumok elpusztítása mellett ép gombaelemek maradnak a biológiai rendszerben s így obligát biotróf parazita gombákkal fertőzött, más mikroorganizmusoktól mentes növénykultúrákat nyerünk.

Anyag és módszer

Az előkísérletek során a különlegesen tiszta, stabil klór-dioxid oldat (Solvocid, Solumium Kft. Budapest) különféle koncentrációit teszteltük, 0,1; 0,33; 0,5; 0,66; 1,0 % (v/v, a készítményre vonatkoztatva). Az oldatokhoz 0,1 % (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) detergenset is adtunk. A kontroll kezelésekben 7,0 % (m/v) kalcium-hipoklorit (Sigma-

Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) + 0,1 % Tween 20 oldat szerepelt. A behatási idő minden esetben 15 perc volt.

A klór-dioxidos kezelés után nem, vagy csak egyszer öblítettük a növényi részeket steril desztillált vízzel, a kalcium-hipokloritos kontroll kezeléseket pedig háromszor.

Az előkísérletek eredményei alapján a főkísérletekben a 0,33 %-os (v/v) oldatot használtuk. Mivel a készítmény 3300 mgL⁻¹ hatóanyagot tartalmazott, így az általunk választott oldat 11 mgL⁻¹ klór-dioxid hatóanyag koncentrációjú volt.

A fertőtlenítési procedura után a növényi szerveket lamináris boxban, steril papírvattán megszárítottuk, majd új szövet-metszlapokat készítettünk és Murashige-Skoog, vagy ½ koncentrációjú makroelemeket tartalmazó Murashige-Skoog típusú táptalajra helyeztük. 20 μmól⁻²s⁻¹ fotonfluxus-on (kb. 2500 lux) neveltük a növényeket, 16 óra megvilágítás, 8 óra sötét fotoperiódus mellett, 23 °C hőmérsékleten.

Az alábbi növényfajokon, illetve növény-kórokozó kapcsolatokon vizsgáltuk a klór-dioxid oldat fertőtlenítő hatását és a kórokozó túlélését:

NÖVÉNYFAJ	OBLIGÁT BIOTRÓF PARAZITA	NÖVÉNYI SZERV
Bab (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) cv. Orinoco	babrozsa <i>Uromyces appendiculatus</i> F. Strauss	magonc hajtáscsúcsok 1-3 lomblevéllél (2 x 20-20 db)
Szőlő (<i>Vitis vinifera</i> L.) 540-es jelű vonal	szőlőlisztharmat <i>Erysiphe necator</i> Schwein.	zöld hajtásdarabok, 10-10 db
Paprika (<i>Capsicum annum</i> L.) cvs. L3; Total; Kard	paprikalisztharmat <i>Leveillula taurica</i> (Lév.) G. Arnaud	kifejlett levelek, 24 sorozatban összesen 500 levél
Fekete bodza (<i>Sambucus nigra</i> L.) klónok és cv. Sampo	-	zöld hajtáscsúcsok, összesen 94 db a kontroll kezelés 82 db
Sajmeggy x vadcsereesznye hibrid Ma x Ma 14 (<i>Prunus mahaleb</i> L. x <i>P. avium</i> L.)	-	félfás hajtásdarabok, összesen 62 db a kontroll kezelés 49 db
Réti szegfű (<i>Dianthus deltooides</i> L.)	-	30-30 mag
Közönséges búza (<i>Triticum aestivum</i> L.) cv. Buzogány	-	4 x 10-10 szem

Eredmények

A bab-babrozsa rendszerben a klór-dioxid hatékonysága megegyezett a kalcium-hipokloritos fertőtlenítésével. Két kísérletsorozatban, 20-20 levélből mindössze 1-1 szaprofiton gomba növekedése volt megfigyelhető. Jelentős különbség volt a babrozsa túlélését illetően: míg a klór-dioxidos kezelés egyáltalán nem károsította a leveleket és 6 nap elteltével tömeges uredospóra szóródás volt tapasztalható, addig a kalcium-hipokloritos fertőtlenítés 1-4 mm-es, fehér nekrotikus levélfoltokat okozott és levelenként csak néhány rozsdapusztula képződött.

A szőlő-szőlőlisztharmat kapcsolatban a klór-dioxid hatékonysága szintén megegyezett a kalcium-hipokloritos kezeléssel, valamennyi szerv steril lett (10/10). Két alvórügy kihajtása nyomán észleltünk az *in vitro* leveleken lisztharmat-fertőzöttséget. A kór folyamatban bőségesen keletkeztek konídiumok, amelyek steril ecsettel történő átvitel nyomán fertőzőképesek voltak. Egyéb mikroorganizmus nem volt kimutatható.

A paprika-paprikalisztharmat kapcsolat kísérleteiben jellemző volt, hogy mindkét fertőtlenítőszer hatékonysága nagyban függött a kiindulási növényanyag minőségétől, azaz fajtájától, a levelek korától, évszaktól, turgortól és más, ismeretlen tényezőktől. Ennek megfelelően a 24 kísérletben vizsgált 16-24 db (összesen 500 db) levélen tapasztalt fertőtlenítési hatások a 0-100 % között váltakozott. A kalcium-hidroxid alkalmazásakor megfigyelhető volt, hogy a lisztharmatos foltok barna nekrotikus levélfoltokká változtak s ezekből sohasem fejlődött ki a lisztharmat *in vitro*. A klór-dioxidos kezelések nyomán sterilnek bizonyuló levelek (átlagosan 20 %) általában 3 hétig voltak életben tarthatók *in vitro*. Ez általában nem elegendő a lisztharmat telepek újrafejlődéséhez. Mindösszesen 4 levél esetében sikerült 4 hét után a lisztharmat konídiumképzéséig eljutni.

A fekete bodza hajtások fertőtlenítési eredménye hasonló: a klór-dioxidos kezeléssel 6,3 % maradt fertőzött (6/94 db), a kalcium-hipokloritos kezelésnél pedig 12,1 % (10/82 db).

Az M14 *Prunus*-hibrid esetében is a kalcium-hipokloritos kezelés bizonyult kissé előnytelenebbnek: 75 % maradt fertőzött (37/49 db), míg a klór-dioxidos kezelésnél ez az érték 70 % (44/62 db).

A réti szegfű magjai könnyen sterilizálhatók: a klór-dioxidos kezeléssel 3 % maradt fertőzött (1/30 mag), míg a kalcium-hipokloritos kezelésnél ez az érték 0 % (0/30 mag).

A búzaszemek esetében is jó hatékonyságot lehet elérni mindkét fertőtlenítőszerrel: a klór-dioxidos kezeléssel 2 szem maradt fertőzött a 4 x 10 szemet tartalmazó kezelés egyik ismétlésében (5 %), a kalcium-hipokloritos kezelésnél ez az érték 0 % (0/4 x 10 szem).

Megvitatás

A klór-dioxidos fertőtlenítés eredményességi adataiból azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a fertőtlenítés hatékonysága általában megegyezik a kalcium-hipokloritos fertőtlenítés hatékonyságával, egyes esetekben (félfás szár, nem sima felszínű magvak) elmaradhat attól. Ugyanakkor minden esetben megmutatkozott a kéméletessége, azaz a 11 mgL^{-1} klór-dioxid hatóanyag koncentráció mellett, 15 perces behatási idő esetén a növényi részek egyáltalán nem károsodtak.

A készítmény kéméletességét bizonyítja, hogy mindhárom kísérletbe vont gazda-parazita kapcsolatban levő növényfajból lehetett *in vitro* kultúrát indítani, igaz nagyon eltérő hatékonysággal. A babrozsdával fertőzött növényekből sikerült nagy mennyiségű steril uredospórát nyerni az uredotelepek *in vitro* felszakadását követően. Lényeges, hogy az inokuláció után 3-4 nappal történjen a levél felületi fertőtlenítése, amikor az epidermisz még nem szakad fel. A szőlő-szőlőlisztharmat kapcsolat esetében a remélt módon 2 hajtásdarab alvórügyeiben maradt életképes gomba-micélium, így az alvórügyek *in vitro* kihajtása után a növénykékek levelei lisztharmat-fertőzöttek lettek. Steril ecsettel a gomba átvihető volt Sárfehér fajtájú *in vitro* szőlőnövényekre. A legnehezebb feladat a paprikalisztharmattal fertőzött *in vitro* paprikanövények előállítása volt. A *Leveillula taurica* hemiendoparazita, tehát joggal reménykedtünk, hogy a felületi fertőtlenítés után a táptalajra helyezett izolált leveleken a gomba újraképi felszíni telepeit. A nehézséget itt az okozza, hogy a paprikanövény szövettényésztése több szempontból problematikus. A fertőtlenített, izolált leveleket legtöbbször nem sikerül addig életben tartani, ameddig a gomba konídiumképzése beindulhatna. Az 500 izolált levélből ez mindössze 4 esetben sikerült, a keletkezett konídiumokból steril ecsettel sikerült átvinni steril *in vitro* paprikamagoncokra a lisztharmatgombát. Ezekben azonban csak igen kevés konídium képződött, mivel e növények juvenilisek, a paprikalisztharmat viszont a már generatív stádiumba kerülő paprikanövényeken tud jól szaporodni. Idáig a világon csak 1-2 paprika genotípust sikerült az *in vitro* virágzásig eljuttatni, tehát e biológiai rendszer fejlesztésekor a paprika *in vitro* kondícióját kell sikeresen javítanunk s nem a fertőtlenítési technológián.

A klór-dioxidos fertőtlenítés további előnye, hogy – mivel a klór-dioxid illékony – általában nem szükséges steril vízzel öblíteni a fertőtlenített növényi részeket, elég steril papírvattán megszárítani. Kevésbé ismeretes, hogy a hagyományos fertőtlenítőszeres után szükséges 3-5 alkalommal történő steril vizes öblítés az egyik jelentős hibaforrása ezen eljárásoknak. Különösen megmutatkozik ez akkor, amikor egyidejűleg kell nagyszámú klónt, vagy külön

kezelendő magoncot indítani, ilyenkor nagyon sok, steril vízzel töltött edényt szükséges a lamináris boxba zsúfolni.

Az eddig elvégzett kísérletek eredményei biztatóak és azt mutatják, hogy a növényi részek felületi fertőtlenítése stabil klór-dioxid oldattal kíméletes, hatékony eljárás, melynek eredményeképp olyan obligát biotróf paraziták izolátumait vizsgálhatjuk akár biokémiai, akár molekuláris genetikai célból, amelynél a méréseket nem zavarják más mikroorganizmusok, valamint ezek anyagcseretermékei, genetikai elemei, enzimeik.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők ezúton is köszönik Prof. Dr. Noszticzus Zoltán segítségét, a stabil, a különleges tisztaságú klór-dioxid oldat rendelkezésre bocsátását és tanácsait, Dr. Móricz Ágnesnek a babrozsa kísérlethez nyújtott segítségét.

Hivatkozások

Noszticzus Z., Wittmann M., Kály-Kullai K., Beregvári Z., Kiss I., Rosivall L. and Szegedi J. 2013. Chlorine Dioxide Is a Size-Selective Antimicrobial Agent . PLoS ONE 8(11): e79157. doi:10.1371/journal.pone.007915157

Tóth, E. K. 2000. A felületi fertőtlenítés lehetőségei a növényházi kertészet és a növény-biotechnológia területén. Növényvédelem 36: (4) 189-203.