

Hazai és külföldi *Erwinia amylovora* izolátumok jellemzése szénhidrát hasznosítás alapján

Végh Anita¹ – Hevesi Mária² – Palkovics László¹

¹ Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Növénykórtani Tanszék

² Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyümölcsstermő Növények Tanszék
anita.vegh@uni-corvinus.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A „tüzelhalás betegséget” az *Erwinia amylovora* baktérium okozza, mely súlyos veszteséget, problémát jelent az egész világon az alma- és körte ültetvényekben. Hazánkban 1996-ban jelent meg először. Megjelenése óta számos *Erwinia amylovora* izolátumot gyűjtöttünk különböző évekből, különböző földrajzi helyről és különböző gazdanövényekről; és rendelkezésünkre áll néhány külföldi izolátum is. Vizsgálatunk célja, hogy összehasonlítsuk mind a hazai, mind a külföldi izolátumokat szénhidrát hasznosítás alapján.

Kísérletünkben megvizsgáltuk különböző szénhidrátok hatását *Erwinia amylovora* izolátumokra, melyhez API 50 CH kitért (bioMérieux, France) használtunk. Az API 50 CH kitért színváltozást eredményez. Az izolátumok 49 szénhidrát hasznosítása alapján, két szénhidrát csoportot különítettünk el: „hasznosított” és „nem hasznosított” szénhidrátok. Minden izolátum hasznosított 20 különböző szénhidrátot a teljes reakció idő végére (164h). Ezen kívül két másik szénhidrát (arbutin és raffinóz) alapján különbségeket találtunk az izolátumok között. Az izolátumokat négy csoportba osztottuk (1. hasznosítja az arbutint, 2. hasznosítja a raffinózt, 3. hasznosítja az arbutint és a raffinózt is, 4. sem az arbutint, sem a raffinózt nem hasznosítja). Az eredmények alapján elmondható, hogy az izolátumok eltérő eredményeket adtak, amely feltételezi, hogy ezek nem egy törzset alkotnak.

A szénhidrát hasznosítás vizsgálatának eredményei hozzájárulnak az *Erwinia amylovora* hazai és külföldi populációjának feltérképezéséhez és alapját képezik a jövőbeli genetikai vizsgálatoknak.

SUMMARY

Fire blight, a plant disease caused by the bacterium *Erwinia amylovora*, produces serious losses in apple and pear orchards all over the world. Since the appearance of fire blight in Hungary (Hevesi, 1996) *Erwinia amylovora* isolates were collected in different years, from different hosts and areas in order to establish gene bank for future epidemiological studies. We had isolates from foreign countries as well. The aim of our research was to compare all of the Hungarian and foreign isolates by carbohydrate utilization.

In our experiments effect of carbohydrates on *E. amylovora* multiplication was determined using API 50 CH strip (bioMérieux, France). By the API 50 CH strip method we checked a number of unstudied carbohydrates. The results of the tests shows colour changes. Based on utilization of 49 carbohydrates of API 50 CH kit by *E. amylovora* isolates, two groups of carbohydrates can be defined: “Utilized” - and “Not utilized” carbohydrates. All isolates utilized 20 different carbohydrates after 164 hour incubation. Conversely, isolates also could be divided into four groups (1, 2, 3, 4) by arbutin and raffinose utilization. In group 1.-isolates utilize arbutin; 2.- utilize raffinose; 3.- utilize both arbutin and raffinose; 4.- utilize neither arbutin nor raffinose. Presumably carbohydrate content of nectar could play an important role on invasion of the (*E. amylovora*) bacterium via flower.

It could be concluded that the carbohydrate utilization – completed with genetic analysis – can be used for characterization of *Erwinia amylovora* isolates.

Kulcsszavak: tüzelhalás, *Erwinia amylovora*, API 50 CH kitért, szénhidrát hasznosítás

Keywords: fire blight, *Erwinia amylovora*, API 50 CH strip, carbohydrate utilization

BEVEZETÉS

A „tüzelhalás” betegséget az *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al. baktérium okozza. A *Rosaceae* család mintegy 33 nemzetségébe tartozó 129 növényfajt (1. ábra) képes megfertőzni, főként az almatermésűeket, számos dísznövényt és vadon élő növényfajt (van der Zwet és Keil, 1979). A betegség a fiatal ültetvényekben jelentős. A fertőzés következtében a vesszők, ágak kérge megpuhul, és sötétebb színűvé válik, és a repedésekből, sebekből nyálkacseppek törnek elő. A kórokozó sebzéseken és természetes nyílásokon keresztül jut a levél szövetébe és a levélereken keresztül jut a levélnyélbe és onnan a hajtások edénynyalábjába. A fiatal zöld hajtások gyakran pásztorbotszerűen meggörbülnek. A beteg virágok megbarnulnak, megfeketednek. A virágból a baktérium a kocsányba hatol és megtámadja a gyümölcskezdeményeket is. A gyümölcsfertőzés főként erős zápor és jégverés után gyakori (Agrios 1988, van der Zwet és Keil, 1979). Az egészségesnek látszó növényi szövetekben, a tünetmentes virágokon, leveleken, gyümölcsökön a kórokozó baktériumok jelen vannak (Miller és Schroth 1970, Sutton és Jones 1975). A kórokozó a fertőzött vesszők, ágak és a törzs felrepedt kérge alatt vagy a rákos sebekben meghúzódva telel át, és tavasszal virágzás előtt onnan indul szaporodásnak. A baktérium terjed virággal, rovarokkal, az esővel, széláramlatok útján, de terjeszthetik madarak és az ember is.

A betegség a világ mintegy 40 országában fordul elő. A kórokozó Európában 1955-ben (Anglia) jelent meg, majd fokozatosan terjedt észak-kelet, kelet felé. A szomszédos Ausztriában, 1991-ben észlelték először

(van der Zwet, 1992). Ezzel egy időben megfigyelték a keleti, dél-keleti vonulatát, is, amely folyamatosan terjedt nyugati irányba. Hazánkban a kórokozó tüneteit először 1995 telén észlelték (Hevesi, 1996). Megjelenése óta évről-évre előfordul, s bizonyos években –a baktérium számára kedvező időjárás esetén (meleg, párás, nedves)- az okozott kár igen jelentős.

1996 óta számos hazai és külföldi *Erwinia amylovora* izolátum áll rendelkezésünkre, s jelen tanulmányunkban ezek közül néhány izolátum összehasonlítását végeztük el szénhidrát hasznosítás alapján.

1. ábra: *Erwinia amylovora* által okozott tünetek különböző növényfajokon



Pyracantha sp. (1)



Cotoneaster sp. (2)



Malus sp. (3)

(Fotó: Végh Anita)

Figure 1: Symptoms caused by the bacterium *Erwinia amylovora* on different plant species
Pyracantha sp.(1), *Cotoneaster* sp.(2), *Malus* sp. (3)

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálathoz használt *Erwinia amylovora* izolátumok különböző évekből, különböző földrajzi helyekről és gazdanövényekről származnak (2. ábra). Az izolátumokat liofilizálva és krioprezerválva tarjuk fenn. A virulenciát éretlen körte gyümölcsökön teszteltük, melyek tipikus vizenyős szövetelhalást eredményeztek, melyeken baktériumnyálka is megjelent (3. ábra). A hiperszenzitív reakciót (Klement, 1963) dohánylevélen (*Nicotiana tabacum* L. cv. White Burley) vizsgáltuk (4. ábra). A kórokozó tenyésztéséhez King-B táptalajt (King és mtsai, 1954) használtunk, melynek pH értéke 6,8. Az állandó inkubációs hőmérséklet 26 °C.

A különböző szénhidrát hasznosítás meghatározáshoz API 50 CH kiteszt (bioMérieux, France) használtunk. A King-B agar lemezről a baktériumok 24 órás tiszta tenyészetéből steril desztillált vízzel szuszpenziót készítettünk, melynek töménysége 10^8 sejt/ml. A szuszpenziót az API folyékony táptalajba kevertük és ezzel a 49féle szénhidrátot tartalmazó kiteszt mintahelyeit töltöttük meg, melyeket 26 °C-on inkubáltunk. Az eredményeket 24h, 48h, 66h, és 164h múlva értékeltük (Hevesi, 2004) és összehasonlítottuk az izolátumok jellemzőit.

2. ábra: *Erwinia amylovora* izolátumok származásának adatai (földrajzi elhelyezkedés, kód/ izolálás éve)

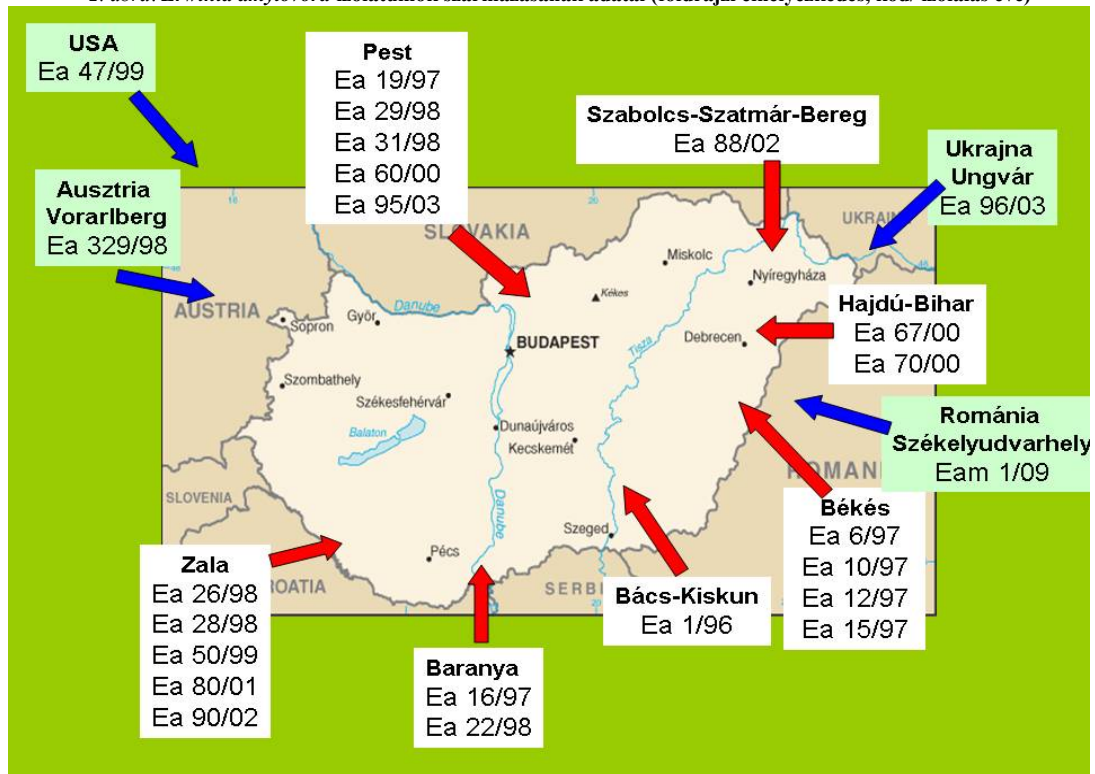


Figure 2: Date of *Erwinia amylovora* isolates (place, code/ year of isolation)

3. ábra: Virulencia vizsgálat éretlen körte gyümölcsön



Figure 3: Virulence was confirmed on unripe pear fruits)

4. ábra: Hiperszenzitív reakció dohánylevelel



Figure 4: Hypersensitive reaction on tobacco leaves

EREDMÉNYEK

A nektár meghatározó cukor komponensei (fruktóz, glükóz, szacharóz) mellett csak néhány adat létezik az irodalomban más kevésbé gyakori szénhidrátok hatásairól az *Erwinia amylovora* szaporodásánál. Ezek mellett más cukrok hatásairól, mint a maltóz, melobióz és raffinóz, melyek előfordulnak számos *Rosaceae* családba tartozó növényfajok nektárjaiban, nem áll elegendő adat rendelkezésünkre (Percival, 1961). Valószínűleg a szénhidráttartalom jelentős szerepet játszhat az *Erwinia amylovora* virágfertőzésében.

Vizsgálatainkban meghatároztuk az *Erwinia amylovora* szaporodásánál kevésbé jelentős szénhidrátok hatását is, melyhez API 50 CH kitet használtunk (Végh, 2009). Az API 50 CH kit módszer színváltozást eredményez: ha az adott baktérium hasznosítja az adott szénhidrátot, akkor az eredeti piros színű oldat sárgára változik (5. ábra). Az izolátumok 49 szénhidrát hasznosítása alapján, két szénhidrát csoportot különítettünk el: „hasznosított” és „nem hasznosított” szénhidrátok (1. táblázat). A teljes reakció idő 164 h volt. Az izolátumok 20 különböző szénhidrátot hasznosítottak ennek a periódusnak a végére.

5. ábra: Ea 10 izolátum szénhidrát hasznosítása különböző időpontban (0- kontroll, 1-49 különböző szénhidrátok; szénhidrát hasznosítás színreakciót eredményez)

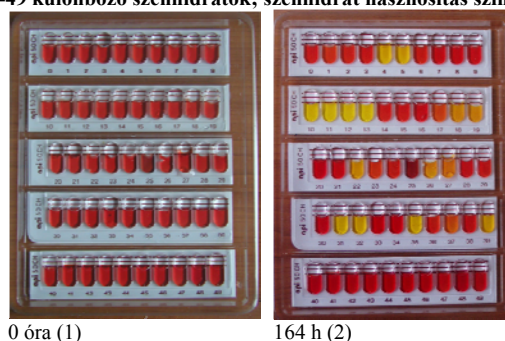


Figure 5: The utilization of carbohydrates by Ea 10 in different times (0- control, 1-49 different carbohydrates; color changes indicate utilization) 0 hour (1), 164 hour (2)

1. táblázat

| „Hasznosított” és „nem hasznosított” szénhidrátok | | | |
|---|----------------------|-------------|----------------------|
| „Nem hasznosított” (1) | | | |
| Sorszám (3) | | Sorszám (3) | |
| 0 | Control | 33 | Inulin |
| 2 | Erythritol | 34 | Melezitose |
| 3 | D Arabinose | 36 | Starch |
| 7 | L Xylose | 37 | Glycogen |
| 8 | Adonitol | 38 | Xylitol |
| 9 | β-Methyl-D-Xyloside | 40 | D Turanose |
| 14 | Sorbose | 41 | D Lyxose |
| 15 | Rhamnose | 42 | D Tagatose |
| 16 | Dulcitol | 44 | L Fucose |
| 20 | α-Methyl-D-Mannoside | 45 | D Arabitol |
| 21 | α-Methyl-D-Glucoside | 46 | L Arabitol |
| 28 | Maltose | 47 | Gluconate |
| 29 | Lactose | 48 | 2-Keto-Gluconate |
| 30 | Melobiose | 49 | 5-Keto-Gluconate |
| „Hasznosított” (2) | | | |
| Sorszám (3) | | Sorszám (3) | |
| 1 | Glycerol | 22 | N-Acetyl-Glucosamyne |
| 4 | L-Arabinose | 23 | Amygdalin |
| 5 | Ribose | 24 | Arbutin |
| 6 | D Xylose | 25 | Esculin |
| 10 | Galactose | 26 | Salicin |
| 11 | Glucose | 27 | Cellulose |
| 12 | Fructose | 31 | Sucrose |
| 13 | Mannose | 32 | Trehalose |
| 17 | Inositol | 35 | Raffinose |
| 18 | Mannitol | 39 | Gentiobiose |
| 19 | Sorbitol | 43 | D Fucose |

Table 1: „Utilized” and „Not utilized” carbohydrates „Not utilized” (1), „Utilized” (2), numbers (3)

Ezeken kívül két másik szénhidrát (arbutin és raffinóz) alapján különbségeket találtunk az izolátumok között. Az izolátumokat négy csoportba osztottuk (1. hasznosítja az arbutint, 2. hasznosítja a raffinózt, 3. hasznosítja az arbutint és a raffinózt is, 4. sem az arbutint, sem a raffinózt nem hasznosítja) (2. táblázat). Az

eredmények alapján elmondható, hogy az izolátumok (melyek különböző évekből, különböző földrajzi helyről és gazdanövényről származnak, illetve akár hazai, akár külföldi származásúak) eltérő eredményeket adtak, amely feltételezi, hogy ezek nem egy törzset alkotnak. A szénhidrát hasznosítás vizsgálatának eredményei hozzájárulnak az *Erwinia amylovora* hazai és külföldi populációjának feltérképezéséhez és alapját képezik a jövőbeli genetikai vizsgálatoknak.

2. táblázat

| Izolátumok csoportosítása (1,2,3,4) arbutin és raffinóz hasznosítás alapján | | | |
|--|---|--|--|
| 1. hasznosítja az arbutint (1) | 2. hasznosítja a raffinózt (2) | 3. hasznosítja az arbutint és a raffinózt (3) | 4. nem hasznosítja sem az arbutint sem a raffinózt (4) |
| Ea 6 Ea 12 Ea 19 Ea 50 Ea 60 Ea 67 Ea 70 Ea 88 Ea 329/98 | Ea 10 Ea 16 Ea 29 Ea 31 Ea 80 | Ea 1 Ea 15 Ea 22 Ea 26 Ea 28 Ea 47 Ea 90 Ea 96 Eam 1 | Ea 95 |

Table 2: Isolates also could be divided into four groups (1, 2, 3, 4) by arbutin and raffinosa utilization

Isolates utilize arbutin (1), utilize raffinose (2), utilize both arbutin and raffinose (3), utilize neither arbutin and raffinose (4)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A projektet a TÁMOP – 4.2.1./B-09/1-KMR-2010-0005 pályázat támogatta.

IRODALOM

- Agrios, G. N. (1988): Plant Pathology. Academic Press. INC. 516- 609.
- Hevesi M. (1996): Az *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al. hazai megjelenése almán. Növényvédelem 32 (5): 225- 228.
- Hevesi M., Farkas Á., Kása K. and Orosz- Kovács Zs. (2004): Carbohydrate utilization of *Erwinia amylovora* in vitro. International Journal of Horticultural Science, 10 (2): 31- 34.
- King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. lab. Clin. Med., 44: 301- 307.
- Klement, Z. (1963): Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. Nature, Lond, 199- 300.
- Miller, P. M. and Schroth, M. N. (1970): Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. Phytopathology, 62: 1175- 1182.
- Percival, M. S. (1961): Typesm of nectar in angiosperms. New Phytol. 60: 235- 281.
- Sutton, T. B., and Jones, A. L. (1975): Monitoring *Erwinia amylovora* population on apple in relation to disease incidence. Phytopathology, 65: 1009- 1012.
- van der Zwet and Keil, H.L. (1979): Fire Blight. A bacterial disease of rosaceous plants. U. S. Dep. Agric. Handb. Pp. 510.
- van der Zwet (1992): Worldwide spread and distribution of fire blight- An update. 6th International Workshop on Fire Blight (*Erwinia amylovora*). Athens, Greece, Oct. 20-23.
- Végh, A. Palkovics, L. Tóth, M. and Hevesi, M. (2009): Rapid method of isolation and selection of *Erwinia amylovora*. Lippay János- Ormos Imre- Vas Károly Scientific Symposium, 28-29 october 2009., Budapest. Book of abstracts, p. 248-249.