

Debreceni Egyetem

**AGRÁRTUDOMÁNYI KÖZLEMÉNYEK
2013/53.**

ACTA AGRARIA DEBRECENIENSIS

18. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum

KÜLÖNSZÁM

2013. október 16-17.

Debrecen

***Erwinia amylovora*-specifikus bakteriofágok növényen belüli szállítódása**

Kolozsváriné Nagy Judit – Schwarczinger Ildikó

MTA ATK Növényvédelmi Intézet, 1022 Budapest

nagy.judit@agrar.mta.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Az almatermésűek tűzelhalását okozó *Erwinia amylovora* növénypatogén baktérium elleni bakteriofág-alapú biológiai védekezési mód hatékonyságának fokozása céljából *E. amylovora*-specifikus fágok növénybe jutását és a növényen belüli szállítódását vizsgáltuk. Egy amerikai (Φ Ea104) és egy általunk izolált magyar (H5K) fág törzset használtunk perlites közegben nevelt alma magoncokon, kétféle módon. A gyökérszónához történő kijuttatásuk után a növény föld feletti részeit tartuk fel, a szárra és a levélzetre való kipermetezésüket követően pedig a gyökérzetet vizsgáltuk, több időpontban. Mindkét fág esetében a növény föld feletti részeiből és a gyökérzetből egyaránt sikerült detektálni a fágokat, legtöbbször a kezelést követő első mintavételi napon. Ugyanakkor a kijuttatott fáguszuszpenzió titere jelentős mértékben lecsökkent és hét nappal a kezelés után egyik mintából sem volt fág kimutatható. Az általunk vizsgált fágok transzlokációs képességének igazolása teret nyit azoknak a további vizsgálatoknak, amelyek elősegíthetik a bakteriofágok hatékonyabb felhasználását az *E. amylovora* elleni védekezés során.

Delivery of *Erwinia amylovora* – specific bacteriophages in the plant tissue

SUMMARY

Uptake and delivery of Erwinia amylovora-specific bacteriophages in plant tissues were studied in order to improve the efficacy of a phage-based biocontrol method against the bacterial phytopathogen E. amylovora, which causes fire blight of pome fruits. An American (Φ Ea104) and one of our own Hungarian phage isolates (H5K) were applied by two different methods on apple seedlings grown in perlite medium. Following phage application to the root zone, plant parts above ground level were assayed for phage titers. In case of spraying phages onto the surface of the stem and leaves the roots were examined for the presence of phages at various times. Both phage isolates were detectable in plant parts above ground level as well as in the roots, in most cases on the first sampling day after treatment. However, the titer of introduced phage suspensions measurably decreased, and after seven days of treatment we could not detect phages in any of the samples. Nevertheless, demonstration of the translocation ability of these phages could serve as a basis for further investigations that may promote the more efficient application of bacteriophages for the control of fire blight.

Kulcsszavak: bakteriofág, szállítódás, transzlokáció, *Erwinia amylovora*

Keywords: bacteriophage, delivery, translocation, *Erwinia amylovora*

BEVEZETÉS

Az *Erwinia amylovora* az almatermésűek egyik súlyos betegségét, a tűzelhalást okozó baktérium, mely ellen a virágzaskori sztreptomocinnal végzett kezelés betiltása óta nincs igazán hatásos védekezési mód. A számos potenciális alternatív növényvédelmi módszer egyike lehet a bakteriofágok használata. A bakteriofágok, vagy más néven fágok a baktériumok vírusai, melyek már számos vizsgálatban bizonyultak hatékonyak különböző bakteriális eredetű növényi betegségek ellen (Jones és mtsai, 2007). Használatuk számos előnye mellett azonban figyelembe kell venni azokat a jellemvonásaikat is, melyek igazi kihívást jelentenek biopeszticidként való alkalmazásuk terén. Ezek közül kiemelkedik a külső környezeti körülményekre való rendkívüli érzékenyséjük és az, hogy szaporodásukhoz gazdabaktérium-sejtek jelenléte szükséges. Ez jelentősen csökkentheti hatékonyságukat szabadföldi alkalmazásuk során. E problémák megoldására irányuló vizsgálatok azt igazolták, hogy a fágok növényi zöldfelületen való életben maradása nagyban elősegíthető azzal, ha kijuttatásuk megfelelő napszakban – pirkadat előtt és napnyugta után -, fényvédő anyagokkal formulázva (Balogh és mtsai, 2003), vagy a szaporodásukat biztosító szaprofita baktériumokkal együtt (Lehman, 2007) történik. A gyökérszóna kedvezőbb környezetet számukra, ugyanakkor a talaj e kevésbé szélsőséges környezetében viszont számolni kell például a fágok talajrészecskékhez történő adszorpciójával, vagy a szabadon hozzáférhető víz kis mennyiségének, illetve hiányának a fágpopulációt csökkentő hatásával (Williams és mtsai, 1987).

Egyes növényi kórokozó baktériumok esetén már ismert, hogy bakteriofágaik képesek a gyökéren át a növénybe jutni, ill a növényben szétterjedni, miközben életképességüket napokig meg tudták őrizni a gazdabaktérium-sejtek hiányában is (Ward és Mahler, 1982; Iriarte és mtsai, 2012). Igazolást nyert továbbá, hogy bizonyos növénypatogén baktériumokra specifikus fágok talajba, a növény gyökérszónájához történő kijuttatását követően az adott baktérium okozta betegség (agrobaktériumos gyökérgolyva, paradicsom baktériumos hervadása) mértéke a fágok hatásának köszönhetően lecsökkent (Boyd és mtsai, 1971; Fujiwara és mtsai, 2011; Iriarte és mtsai, 2012). Ugyanakkor az *E. amylovora* bakteriofágok gyökéren keresztüli felvételét tudomásunk szerint eddig még nem vizsgálták.

Kísérletünkkel első lépésként azt kívántuk tisztázni, hogy alma magoncok levélzetére, vagy gyökérszónájának közelébe juttatott *E. amylovora*-ra fágok bejutnak-e az alma növényekbe és képesek-e a növényekben transzlokálódni.

		(13)																	
3	Közvetlen (12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Felszaporításos (13)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Közvetlen (12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Felszaporításos (13)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
7	Közvetlen (12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Felszaporításos (13)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

nv: nem vizsgált

Table 1: Penetration and translocation of phage isolate H5K in plant tissue

Treatment (1), Sampling (2), Time of incubation (day) (3), Sampling method (4), Detection of phages (5), Lower stem part (6), Upper stem part and leaves (7), Root (8), First experiment (9), Second experiment (10), Water control (11), Direct (12), Multiplied (13), nd: not determined (14)

A ΦEa104 fáguszuszpenzió a gyökérszövethez, illetve a szár és levelek felületére való kijuttatását követően közvetlen mintavétellel az alsó szárrészből, a leveles felső szárrészből és a gyökérszövetből egyaránt kimutatható volt a fágok jelenléte egy nappal a kezelés után. Az alsó szárrészből a harmadik mintavételi napon is sikerült közvetlenül fágot visszaizolálni. A felszaporításos módszerrel a növények alsó, valamint a leveles felső szárrészből tudunk fágot kimutatni az első három mintavételi időpontban. A gyökérszövetből csak egy nappal a permetezést követően sikerült fágot detektálnunk. Fágok a kezelést követő ötödik és hetedik napon nem voltak már kimutathatók (2. táblázat).

2. táblázat

A ΦEa104 fágizolátum növényi szövetbe való bejutása és transzlokálódása

Kezelés (1)	Mintavétel (2)		A fágok kimutatása (5)																	
	Inkub. idő (nap) (3)	Mintavételi mód (4)	Alsó szárrész (6)				Felső szárrész és levelek (7)				Gyökérszövet (8)									
			I. kísérlet (9)		II. kísérlet (10)		I. kísérlet (9)		II. kísérlet (10)		I. kísérlet (9)		II. kísérlet (10)							
ΦEa104	1	Közvetlen (12)	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
		Felszaporításos (13)	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
	2	Közvetlen (12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Felszaporításos (13)	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	Közvetlen (12)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Felszaporításos (13)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	Közvetlen (12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Felszaporításos (13)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	Közvetlen (12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Felszaporításos (13)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2: Penetration and translocation of phage isolate ΦEa104 in plant tissue

Treatment (1), Sampling (2), Time of incubation (day) (3), Sampling method (4), Detection of phages (5), Lower stem part (6), Upper stem part and leaves (7), Root (8), First experiment (9), Second experiment (10), Direct (12), Multiplied (13)

KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink igazolták az *E. amylovora* baktériumra specifikus fágok transzlokációs képességét. Mindkét általunk használt fág képes volt rövid időn belül egyrészt a gyökérszöveten át az alma növények felső, leveles részébe szállítani, másrészt a növények föld feletti részére történő kipermetezésüket követően a szár és a levelek felületéről a gyökérszövetbe eljutni. *E. amylovora* fágok gyökéren keresztül történő felvétele és a növényben való szállítódása eddig nem volt ismert. A legtöbb esetben a kezelést követő első napon detektáltunk

fágokat az adott növényi mintákból. Ugyanakkor a transzlokálódott fágok titere jelentősen lecsökkent. Ez, valamint, hogy viszonylag kevés mintából sikerült fágot detektálnunk feltehetően annak köszönhető, hogy a fágok növény általi felvétele majd szállítódása nagymértékben függ többek között a fág és a növény típusától, a növény korától, kondíciójától, és a termesztő közeg fajtájától (Ward és Mahler, 1982; Iriarte és mtsai, 2012). Összehasonlítva a kísérletben használt két fágot megállapítható, hogy az amerikai származású ΦEa104 gyorsabban és biztosabban szállítódik a növényben, mint a kísérletben szereplő magyar fág törzs, de azt is megfigyeltük, hogy a H5K fágok a gazdabaktérium jelenléte nélkül akár öt napig is meg tudták őrizni életképességüket a növényi szövetekben. Ugyanakkor a két kezelési mód hatékonyságának összehasonlítására a kísérlet nem adott választ, mivel a különböző fágok esetén eltérő eredményt kaptunk.

A jövő feladata a bakteriofágok növényen belüli transzlokációs mechanizmusának a feltérképezése. A kórokozó jelentősége és az ellene való hatékony védekezési módok kidolgozásának szükségessége indokoltá teszi az *E. amylovora*-specifikus bakteriofágok növénybe való behatolásának és transzlokációjának további vizsgálatát. Az, hogy a kórokozó baktérium fágjai a gyökérszöveten keresztül az alma növénybe jutva, vagy a növény föld feletti felületének kezelésekor fejtik-e ki jobban a hatásukat még tisztázásra vár.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A vizsgálat a 75280 számú PD OTKA pályázat támogatásával készült.

IRODALOM

- Adams M. H. (1959): Bacteriophages. Interscience Publishers, New York, N.Y. 450–456.
- Balogh B.-Jones J. B.-Momol M. T.-Olson S. M.-Obradovic A.-Jackson L. E. (2003): Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Dis* 87, 949-954.
- Boyd R. J.-Hildebrandt A. C.-Allen O. N. (1971): Retardation of crown gall enlargement after bacteriophage treatment. *Plant Dis Rep* 55, 145-148.
- Fujiwara A.-Fujisawa M.-Hamasaki R.-Kawasaki T.-Fujie M.-Yamada T. (2011): Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 77, 4155-4162.
- Iriarte F. B.-Obradovic A.-Wernsing M. H.-Jackson L. E.-Balogh B.-Hong J. A.-Momol T. M.-Jones J.B.-Vallad G. E. (2012): Soil-based systemic delivery and phyllosphere in vivo propagation of bacteriophages: Two possible strategies for improving bacteriophage persistence for plant disease control. *Bacteriophage* 2, 215-224.
- Jones J. B.-Jackson L. E.-Balogh B.-Obradovic A.-Iriarte F. B.-Momol M. T. (2007): Bacteriophages for plant disease control. *Annu Rev Phytopathol* 45, 245-262.
- Lehman S.M. (2007): Development of a bacteriophage-based biopesticide for fire blight. PhD thesis, Brock University, St. Catharines, Ontario, Canada.
- Schnabel E. L.-Jones A. L. (2001): Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora* *Appl Environ Microbiol* 67, 59-64.
- Ward R. L.-Mahler R. J. (1982): Uptake of bacteriophage f2 through plant roots. *Appl Environ Microbiol* 43, 1098-1103.
- Williams S. T.-Mortimer A. M.-Manchester L. (1987): Ecology of soil bacteriophages. In: Goyal S. M.-Gerba C. P.- Bitton G (eds). *Phage ecology*, Wiley, New York, 157-179.