

A DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Laskagomba-patogén *Pseudomonas* törzsek vizsgálata, és az ellenük  
történő biológiai védekezés lehetőségeinek felmérése**

**Sajben-Nagy Enikő Ilona**



Témavezető:

**Dr. Manczinger László**  
egyetemi docens

**Biológia Doktori Iskola**

**Szegedi Tudományegyetem**  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Mikrobiológiai Tanszék

2011

## 1. BEVEZETÉS

Napjainkban a gombatermesztésnek hazánkban és világszerte egyaránt egyre nagyobb a jelentősége. Számos gombafaj könnyen termesztethető, tápláló, éppen ezért egyre keresettebb élelmiszer. Szárazanyag-tartalmuk körülbelül 10%, tápértékük összevethető a tojáséval, tejével vagy akár a húséval. Mindezen felül vitaminokat és esszenciális aminosavakat is tartalmaznak, és főként a Távol-Keleten részét képezik a tradicionális népi gyógyászatnak is.

A laskagomba (*Pleurotus ostreatus*) egyike a világon legintenzívebben termesztett ehető kalapos gombáknak, a piacon mára már csak a csiperkegomba (*Agaricus bisporus*) előzi meg. Korábban nagy mennyiségben csak Ázsiában termelték, mára azonban már Európában és az amerikai kontinensen is elterjedt, termesztett gombafajta. Köszönhetően jó természekihozatalának és annak, hogy szükségletei nem drágítják jelentős mértékben az előállítását, egyre nagyobb népszerűségnek örvend. Termesztésében azonban világszerte problémát okoznak különböző mikroszkopikus szervezetek, melyek károsíthatnak a termőtestképzés során, illetve a raktározási idő alatt a felhasználásig terjedő időszakban. A magyarországi laskagomba-termesztőknél ezen mikroorganizmusok közül kiemelkednek a „zöldpenészek” és a termőtestek barnulását, sárgulását kiváltó baktériumos fertőzések. A fertőző baktériumok közül kiemelhetőek a *Pseudomonas* nemzetség tagjai, melyek kiválthatnak abnormális növekedést is, de főként a már kialakult termőtesteken okoznak problémákat. Az általuk megfertőzött anyag már nem eladható a termőtestek leromlott minősége miatt.

Jelen dolgozat a *Pseudomonas*-ok kártételével és az ellenük való védekezési lehetőségek kidolgozásával foglalkozik, közülük főként a bakteriális foltosodást kiváltó *Pseudomonas tolaasii* baktériummal, mely jól ismert gombapatogén.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

- egy magyarországi laskagomba-termesztő helyen a *Pseudomonas* nemzetség sokféleségének felmérése, a *Pseudomonas tolaasii* jelenlétének, jelentőségének vizsgálata,
- az izolált fajok laskagombát gátló és nektrózist kiváltó tulajdonságainak meghatározása, a nekrotikus képesség mérésére alkalmas, megbízható módszer kidolgozása, a törzsek enzimtermelési képessége és a kiváltott károsító hatás közötti összefüggés vizsgálata,
- biológiai védekezés céljaira alkalmazható mikroorganizmus-csoportok kiválasztása,
- a korábbiakban izolált, ártalmatlannak bizonyult, fluoreszkáló *Pseudomonas* törzsek kompetíciós képességeinek vizsgálata a laskagomba-kártevő törzsek ellen, mesterségesen kevert kultúrákban, valamint a jelenség molekuláris módszeren alapuló követése,
- apatogén *Bacillus*-ok izolálása, jellemzése és kórfolyamatot kiváltó *Pseudomonas*-ok elleni tesztelése,
- bakteriofágok alkalmazási lehetőségeinek vizsgálata, a fágizolátumok hatásspektrumának felmérése,
- integrált védekezés kialakítása és termesztési körülmények közötti tesztelése.

## 3. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- ◆*Pseudomonas* nemzetség szelektív izolálása
- ◆Az izolátumok jellemzése klasszikus biokémiai módszerekkel
  - Gram-festés
  - Fluoreszcencia-vizsgálat King's B táplemezen
  - Növekedés alacsony és magas hőmérsékleten
  - Rézérzékenység vizsgálata

- Cukorasszimilációs teszt
- Nitrát-redukció
- Oxidáz reakció
- ◆Izolátumok enzimtermelésének vizsgálata
  - Lipáz, kazeináz, zselatináz, táplemezeken
  - Palmitoil-észteráz,  $\beta$ -glükozidáz, N-acetil-glükózaminidáz (NAG-áz), tripszin-típusú proteáz, cellobiohidroláz, kimotripszin-típusú proteáz, kitobiozidáz, kromogén szubsztrátokkal
- ◆Lipofil sajátságú anyagok termelődésének vizsgálata
  - WLA-teszt, reverz WLA-teszt, vékonyréteg-kromatográfia (VRK)
- ◆Molekuláris jellemzésük
  - Ps. tolaasii* kimutatása specifikus PCR-technikával
  - BOX, ERIC és REP PCR
  - ARDRA és *rpoB* gén restrikciós emésztése
  - rpoB* gén hipervariábilis szakaszának vizsgálata
- ◆Hatékony biokontroll törzsek izolálása
  - Pseudomonas* nemzetség fluoreszkáló tagjai
  - Bacillus* nemzetség
  - Bakteriofágok
  - Integrált védekezés
- ◆Bakteriofágok, és Bf7 részletesebb vizsgálata
  - Gazdaspektrum meghatározása csepp-lízis módszerrel
  - RAPD analízis és restrikciós enzimes emésztés
  - Bf7 egy lépéses növekedés-vizsgálat
  - Bf7 teljes genomszekvencia meghatározása

#### 4. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az ehető gombák iránti kereslet egyre inkább növekszik hazánkban és a világon egyaránt, mivel igen táplálók, ízletesek és számos képviselőjük könnyen termeszthető. A laskagomba (*Pleurotus ostreatus*) egyike a világon legintenzívebben termesztett, ehető kalapos gombáknak, a piacon mára már csak a csiperkegomba (*Agaricus bisporus*) előzi meg.

Munkánk során egy magyarországi laskagomba-termesztő helyen felmértük a *Pseudomonas* nemzetség sokféleségét, vizsgáltuk a *Pseudomonas tolaasii* jelenlétét, valamint annak jelentőségét. Elemeztük az izolált baktériumtörzsek laskagombagátló- és nekrozist kiváltó tulajdonságait, biokontroll törzseket kerestünk a *Pseudomonas* és *Bacillus* nemzetségekből, valamint a bakteriofágok köréből. Az elért eredményeink pontokba szedve:

1. A Gould és mtsai (1985) által kidolgozott *Pseudomonas*-szelektív táptalaj (T-2) segítségével a kapott, bakteriális fertőzés tüneteit mutató laskagomba-termőtestekről, beoltásra váró szalmakomposztból és a zsákok között pangó csurgalékvízből 60 baktérium egy-sejt tenyészetet állítottunk elő.

2. Az izolátumok biokémiai vizsgálatai nagyfokú változatosságra utaltak. Ötven izolátum termelt fluoreszcens pigmentet, három rendelkezett nitrát-reduktáz aktivitással. A zselatint a törzsek 28%-a folyósította el félkémcsőben végzett kísérleteinkben, a törzsek 80%-a mutatott kazeináz és 60%-a lipáz aktivitást. Tizenhat törzs esetében figyelhető meg mindhárom enzim termelődése, ezek nagy valószínűséggel részt vesznek a betegség kialakításában. Tizenegy izolátum esetében nem tudtuk kimutatni ezen enzimek aktivitását, jelenlétük ezért nem biztos, hogy negatívan hat a laskagomba fejlődésére. A hőmérséklet növekedésre gyakorolt hatásával kapcsolatban megállapítottuk, hogy a törzsek nagy része jól szaporodik 4°C-on, míg 42°C-on csupán négy törzs képes növekedni. A cukorasszimilációs tesztekéből kiderült,

hogy az izolátumok igen sokféle szénforrás felhasználására képesek, a nemzetségre jellemző módon.

3. A WLA-teszt, a fordított WLA- teszt és a VRK alapján megállapítottuk, hogy 12 izolátum képes lipopeptid-jellegű anyag termelésére. Ezek közül 8 WLIP-jellegű, 2 tolaasin toxin-jellegű, 2 pedig egyéb természetű.

4. A BOX, ERIC és REP ismétlődő szekvenciák elemzése is igazolta a biokémiai tesztek alapján feltáruló változatosságot. A *Ps. tolaasii* specifikus kimutatására alkalmazott PCR segítségével a két tolaasin toxin-jellegű anyagot termelő izolátumról bebizonyosodott, hogy valóban a *Ps. tolaasii* fajhoz tartoznak.

5. Az *rpoB* gén szekvenálásának adatai alapján sikerült nagy mennyiségben kimutatnunk a *Ps. fluorescens* bv. V (37 izolátum), valamint kis számban egyéb *Pseudomonas*-ok – *Ps. putida* (4) *Ps. fluorescens* bv. I (2), *Ps. brenneri* (2), *Ps. mucidolens* (1), *Ps. entomophila* (1), *Ps. synxantha* (1), *Ps. syringae* (1), *Ps. mandelii* (1) – jelenlétét. A korábban lefolytatott kísérletekkel összhangban a két *Ps. tolaasii* izolátum (PS-44 és PS-45) fajsintű besorolása ezzel a módszerrel is bizonyítottá vált. A *Ps. tolaasii* izolátumok a törzsfán a *Ps. fluorescens* bv. V-nek bizonyult törzsek közé ékelődnek be, meglehetősen közeli kapcsolatban vannak továbbá a WLIP-termelő fajokkal. Az *rpoB* szekvenciák ismeretében kijelenthetjük, hogy a vizsgált magyarországi laskagomba-termesztő helyen a barna foltos és sárgulásos elváltozásokat nem kizárólagosan a *Ps. tolaasii* okozza, hanem egyéb, a fluoreszkáló *Ps. fluorescens* bv. V-ös baktériumok. Elképzelhető, hogy a *Ps. tolaasii* csupán a kórfolyamat kezdeti lépéseinél játszik kulcsszerepet.

6. A biológiai védekezés megvalósítása érdekében elsőként a korábbi vizsgálatok során jellemzett, laskagombára nem veszélyes *Pseudomonas*-okat teszteltük. Tizenhárom fluoreszkáló, laskagombára nézve legkevésbé ártalmas *Pseudomonas* izolátum tesztelését követően 10-et találtunk alkalmasnak a *Ps.*

*tolaasii* kiszorítására, melyek közül 4 (PS-2, 29, 47 és 54) kiszákos termesztésben is kipróbálásra került. Leghatékonyabbnak a PS-2 és PS-54 törzsek bizonyultak. Ezek a törzsek alkalmasak lehetnek arra, hogy bakteriális foltosság betegséggel szemben hatékony, antagonistá hatású készítményekként a laskagomba-termesztés során alkalmazhatóak legyenek.

7. A *Bacillus* nemzetség volt a másik mikrobacsoport, melyet alkalmasnak véltünk biokontroll kialakítására. Több mint 60 törzset izoláltunk szelektív módszerrel, melyek közül csupán 7 izolátum (4 *B. subtilis*, 2 *B. pumilus* és 1 *B. licheniformis*) felelt meg a feltételeknek. Ezekkel termesztési kísérletek még nem indultak.

8. További biokontroll lehetőségként felmerült a nagyfokú specializáltsággal rendelkező bakteriofágok alkalmazása. Vizsgálataink eredményeként elmondható, hogy 16 darab, dsDNS-genomú bakteriofágot izoláltunk, melyek hasítási mintázatuk és genomméretük alapján nagy valószínűséggel ugyanabba a típusba tartoznak, különbség közöttük csak a gazdaspektrumban volt kimutatható. Munkánk során lehetőség nyílt egy kiválasztott bakteriofág teljes genom-szekvenciájának meghatározására is. Erre a célra az egyik legszélesebb gazdaspektrummal rendelkező Bf7 fágot választottuk, mellyel további kísérleteket végeztünk. A 30580 bázispárnyi dsDNS örökítőanyag, valamint a TEM-felvételek (ikozahedrális fej, kisméretű, nem kontraktilis farok, 62-68 nm-es nagyság) alapján megállapítottuk, hogy a Bf7-es fág a *Podoviridae* családba tartozik. Az előzetes elemzés során a genomon 35 ORF-et találtunk, melyek közül több, erős hasonlóságot mutatott a szintén *Podoviridae* családba tartozó *Caulobacter crescentus*  $\Phi$ Cd1 fághoz. A Bf7 bakteriofág 1-3 mm átmérőjű, tiszta tarfoltokat képez *Ps. tolaasii* LMG 2342<sup>T</sup> baktériumpázsiton, 20°C-os hőmérsékleten, 18 óra inkubációt követően. Hasonló jelenség figyelhető meg 5, 10 és 25°C-on 18-48 órát követően, ám 30 és 40°C-on a plakk-képződés elmarad. A fertőzési kinetikát, a lappangási ill.

látens periódus hosszát és a baktériumok tökéletes lízisének („*burst size*”) bekövetkeztét az egylépéses növekedés (*single-step growth*) vizsgálattal határoztuk meg. A számított „*burst size*” 237-nek bizonyult 20°C-on, 0,06-os MOI értéknél, 140 perces lappangási idővel, azaz ilyen körülmények között megközelítőleg ennyi bakteriofág szabadul ki egyetlen baktériumsejtből a lízist követően. A viszonylag hosszú lappangási idő, ám magas „*burst*” érték mindenesetre jó előjele egy hatékony biokontroll ágensnek, mivel lassabban alakul ki vele szemben az esetleges rezisztencia. Mindemellett a fágpreparátum hosszabb távú tárolásra is alkalmas, kloroform hozzáadása után legalább egy hónapig megőrzi fertőzőképességét.

9. Az integrált védekezési lehetőség kidolgozása folyamatban van. Első lépésként fontos volt, hogy az izolált bakteriofágok ne gátolják a termesztést pozitívan befolyásoló törzsek fejlődését. A PS-2 és 54 baktériumtörzs bármelyik fággal együtt alkalmazható lehet. A további következtetések levonásához kiszákos kísérletek megvalósítása szükséges. Az integrált védekezés megvalósítása egyelőre még várat magára, de a termelői igény egyre nagyobb az ilyen formában történő védekezés iránt, ami a későbbiekben valószínűleg meg fogja gyorsítani egy alkalmazható termék kidolgozását.

## 5. A DOLGOZATHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### Publikációk

**Sajben E**, Manczinger L, Nagy A, Kredics L és Vágvölgyi Cs. Characterization of pseudomonads isolated from decaying sporocarps of oyster mushroom. *Microbiol Res* 2011; 166:255–267. IF: 1.958

**Sajben E**, Mancziner L és Nagy A. A *Pseudomonas* nemzetség haszna és kártétele a gombatermesztésben. *Zöldség-Gyümölcs Piac és technológia* 2010; május 17–18.



Kredics L, Kocsubé S, Nagy L, Komon-Zelazowska M, Manczinger L, **Sajben E**, Nagy A, Vágvölgyi C, Kubicek CP, Druzhinina IS és Hatvani L. Molecular identification of *Trichoderma* species associated with *Pleurotus ostreatus* and natural substrates of the oyster mushroom. FEMS Microbiol Lett 2009; 300:58–67. IF: 2.04

Vajna B, Nagy A, **Sajben E**, Manczinger L, Szijártó N, Kádár Zs, Bordás D és Márialigeti K. Microbial community structure changes during oyster mushroom substrate preparation. Appl Microbiol Biotechnol 2009; 86:367–375. IF: 3.583

Nagy A, **Sajben E**, Manczinger L és Vágvölgyi Cs. Laskagombára patogén *Pseudomonas* izolátumok néhány tulajdonságának vizsgálata. Kertgazdaság 2009; 41;10–18.

#### Előadások

**Sajben E.** A *Pseudomonas* nemzetség haszna és kártétele a gombatermesztésben. Hatékony növényvédelem a gombatermesztésben növényvédő szerek alkalmazása nélkül. Gombatermesztési (laskagomba és csiperke) szakmai nap a Pilze-Nagy Kft. szervezésében. 2010.

Manczinger L, **Sajben E**, Vágvölgyi Cs. Egy *Pseudomonas tolaasii* lítikus fág izolálása és jellemzése. Magyar Ökológus Konferencia 2009.

**Sajben E**, Manczinger L, Vágvölgyi Cs. Kompetíciós vizsgálatok *Pseudomonas fluorescens* és laskapatogén *Pseudomonas* törzsek között. Magyar Ökológus Konferencia 2009.

**Sajben E**, Antal Zs, Manczinger L, Nagy A, Vágvölgyi Cs. A sejtfal bontó enzimek jelentősége a *Pseudomonas* törzsek *Pleurotus ostreatus* patogenitálásában Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely 2008.

#### Posztterek

**Sajben E**, Manczinger L, Nagy A és Vágvölgyi Cs. Isolation of fluorescent *Pseudomonas* strains antagonistic to the mushroom pathogen, *Pseudomonas tolaasii*. IOBC/WPRS Working Group. „Biological control of fungal and bacterial plant pathogens”. Graz, Ausztria. 2010.

- Sajben E**, Manczinger L és Vágvölgyi Cs. Isolation and characterization of *Pseudomonas tolaasii* lytic phages. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2009. évi Nagygyűlése, 56.
- Nagy A, **Sajben, E**, Antal Zs, Manczinger L és Vágvölgyi, Cs. Extracellular enzyme producing abilities of *Pseudomonas* isolates pathogenic to oyster mushroom. Proceedings of the 17<sup>th</sup> Congress of the International Society for Mushroom Science, Cape Town, South Africa, 2008.
- Sajben E**, Antal Zs, Manczinger L, Nagy A és Vágvölgyi Cs. The significance of cell-wall degradative enzymes of *Pseudomonas* strains in their pathogenicity against *Pleurotus ostreatus*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 2008; 55, 241.
- Sajben E**, Antal Zs, Manczinger L, Nagy A és Vágvölgyi Cs. Production of fungal cell-wall degrading enzymes of *Pleurotus* pathogenic *Pseudomonas* strains. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése, 67.
- Sajben E**, Antal Zs, Manczinger L, Nagy A, Vágvölgyi Cs. Taxonomical and physiological investigation of *Bacillus* strains antagonistic to oyster mushroom pathogenic pseudomonads. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2007; 54: 111.
- Sajben E**, Antal Zs, Manczinger L, Nagy A, Vágvölgyi Cs. Isolation and properties of *Bacillus* strains antagonistic to oyster mushroom pathogen pseudomonads. Lippay János- Ormos Imre- Vas Károly Scientific Symposium (2007)
- Sajben E**, Antal Zs, Manczinger L, Nagy A, Vágvölgyi Cs. Isolation and characterisation of apathogenic *Pseudomonas* strains antagonistic to *Pseudomonas tolaasii*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2006; 53: 336.
- Sajben E**, Antal Zs, Szekeres A, Manczinger L, Vágvölgyi Cs. Identification and characterization of *Pseudomonas* strains isolated from deformed fruit bodies of *Pleurotus ostreatus*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 2005; 52:136.