



Élelmiszertudományi Kar

Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

BOTRITIZÁLÓDÁSI FOLYAMATOK VIZSGÁLATA AZ EGRI BORVIDÉKEN

TDK Dolgozat

KALÓ JÚLIA

Élelmiszermérnök MSc, II. évfolyam

Témavezető(k): Dr. Pomázi Andrea, adjunktus

Dr. Váczy Kálmán Zoltán, tudományos munkatárs

KRF Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet, Eger



TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0005

TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023

Budapest

2012

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
2.1. A <i>Botrytis cinerea</i>	6
2.1.1. Taxonómiai, morfológiai és fiziológiai jellemzők, identifikálás	6
2.1.2. Patogenitás	8
2.1.3. Fungicid-kontroll és fungicid-rezisztencia	9
2.2. Variabilitás	10
2.2. 1. Genetikai variabilitás.....	11
2.2.2. <i>Botrytis cinerea</i> populációk molekuláris variabilitása	12
2.2.2.1. Szatellit szekvenciák	13
2.2.2.2. β -tubulin gének	14
2.4. Szőlészeti és borászati jelentőség.....	14
2.4.1. A szürkerothadás hatása a borokra.....	15
2.4.2. A nemesrothadás, aszúsodás.....	15
2.4.3. A botritiszes borok és az egészség kapcsolata.....	17
3. CÉLKITŰZÉSEK	18
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	19
4.1. A kísérleti területek bemutatása és jellemzése	19
4.2. Izolálás, törzsgyűjtemény és fenntartás	20
4.3. DNS izolálás.....	20
4.4. DNS koncentrációk meghatározása és normalizálása	22
4.5. DNS fragmentumok amplifikációja és detektálása	23
4.5.1. Miniszatellit szekvenciák felszaporítása	23

4.5.2. Tubulin szakaszok felszaporítása.....	24
4.6. Szekvenálás	24
4.7. Szekvencia elemzések és populáció differenciálódás.....	24
4.8. Elektron mikroszkópos vizsgálatok.....	24
4.9. Morfológiai jellemzés	26
5. EREDMÉNYEK.....	27
5.1. Botrytis cinerea törzsgyűjtemény összeállítása.....	27
5.2. Fenotípus vizsgálatok	28
5.3. Szekvencia vizsgálatok.....	32
5.3.1. Miniszatellit szekvencia vizsgálatok.....	32
5.3.2. β -tubulin szekvencia vizsgálatok	34
5.4. Genetikai differenciáltság vizsgálata	36
6. ÖSSZEFOGLALÁS	37
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	39
8. MELLÉKLETEK.....	43

1. BEVEZETÉS

A *Botrytis cinerea* a szőlőtermesztést és a borászatot figyelembe véve rendszerint két gondolatkört érint. Egyrészt, mint a szőlő termésbiztonságát leginkább veszélyeztető három járványos betegség egyike - a szőlő peronoszpóra (*Plasmopara viticola*) és a szőlő lisztharmat (*Erysiphe necator*) mellett -, másrészt, mint a nemes, édes és aszú borok létrejöttében nélkülözhetetlen tényező, ami a Földön rendkívül kevés helyen tud létrejönni a szőlőtermesztésre alkalmas környezetekben.

A termesztett növények különböző kultúráiban okoz megbetegedéseket - eddig bizonyítottan 235 gazdanövény fajt képes megfertőzni és rajtuk a szürkerothadás nevű megbetegedést kiváltani -, de mint tárolási betegségeket okozó mikroorganizmust is nyilvántartják. A nagyobb gazdasági jelentőséggel bíró növénykultúrák mellett, további termesztett és vadon élő növényeket is megfertőzhet (Jarvis, 1977).

A kórokozó a szőlő esetében annak minden zöld részét fertőzheti, de a virágzásban lévő fürtök teljes pusztulását eredményezheti hűvös, csapadékos időben (medárdi csapadékhullám), melynek következtében súlyos terméskiesést okoz. Az érett, magas cukortartalmú fürtök szemmel láthatóan sérüléstől mentes bogyóin aszúsodás, „nemes rothadás” indulhat meg. Ez utóbbi folyamat a kórokozó jelenléte esetén, illetve kedvező körülmények között a legtöbb Kárpát-medencei borvidék szőlőültetvényében, a legkülönbözőbb szőlőfajták esetében is megfigyelhető. Ezekből a szőlőkből, kellő odafigyeléssel kedvező élettani tulajdonságú, magas minőségű botritiszes, édes, fehér- és vörös aszúborok készíthetők.

A botritizálódott aszúszemekből különleges technológiával készülő borok (aszú, szamorodni, másolás, fordítás), a világon egyedülálló, nagyon értékes, speciális termékminőséget jelentenek. Történelmi bizonyítékok vannak arra, hogy a Tokaji Aszú készítése Tokaj-hegylánján már a 16. századtól folyik, valamint, hogy 1772-ben a világon elsőként, a tokaji dűlőket osztályozták a királyi feljegyzések szerint (Balassa, 2012). A Tokaji Aszút egészen a 18. századig a királyok kiváltságos boraként tartották számon egész Európában.

A Tokaji Aszú esetében több évszázad tapasztalata áll rendelkezésre, ugyanakkor a kék szőlőből történő botritiszes, édes vörösborok (vörös aszú) készítésében szünet következett be. Még az 1900-as évek első feléből találhatunk bizonyítékokat arra, hogy a Kárpát-medencében általános volt a vörös aszú készítése. Ilyen volt például a Ménesi Aszú, amit Kadarkából készítettek, és őriznek egy 1902-es címkét is Villányi Vörös Aszú felirattal a szegedi Móra Ferenc Múzeumban. Az Egri borvidéken is, a boros gazdák legféltettebb kincse volt a természetes édes vörösbor, amit mindig teljes- és túlérésben szüretelt kékszőlőikből (október közepe és november vége között) készítettek (saját adat). Az elmúlt 60 évben azonban sok elméleti és gyakorlati tapasztalat merült feledésbe.

A korábban hagyományosan vörös aszú készítésre használt, elsősorban Kadarka változatok már eltűntek a termesztésből (például az Egri borvidékről a lúdtalpú Kadarka), vagy pedig csak nagyon kis területen találhatók meg, így új, erre alkalmas szőlőfajták felkutatására volt szükség. Családunk, és az egri Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet szőlő-növénykórtani részlegének közös kutatásai megerősítették, hogy nem csak a jelenleg használt fajták (Furmint, Hárslevelű) alkalmasak aszú borok előállításra, hanem egyéb fehér- és kékszőlő fajták is (pl. Olasz rizling, Turán). Az általunk végzett Turán szőlőfajta fajtaérték kutatásának nagy jelentőségű eredménye, hogy a szőlőfajta kiválóan alkalmas vörös aszú előállítására (Kaló, 2006).

A vörös aszú hagyományának felélesztése érdekében kutatásokat kezdtem a fajtahasználattal, a szőlő termesztés-technológiájának kiválasztásával és magát, a nemes rothadást előidéző *Botrytis cinerea* gomba vizsgálatával kapcsolatban. Jelen dolgozatban a jellemzően jól aszúsodó szőlőterületekről származó izolátumok genetikai változékonyságának vizsgálatát tűztem ki célul.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A *Botrytis cinerea*

2.1.1. Taxonómiai, morfológiai és fiziológiai jellemzők, identifikálás

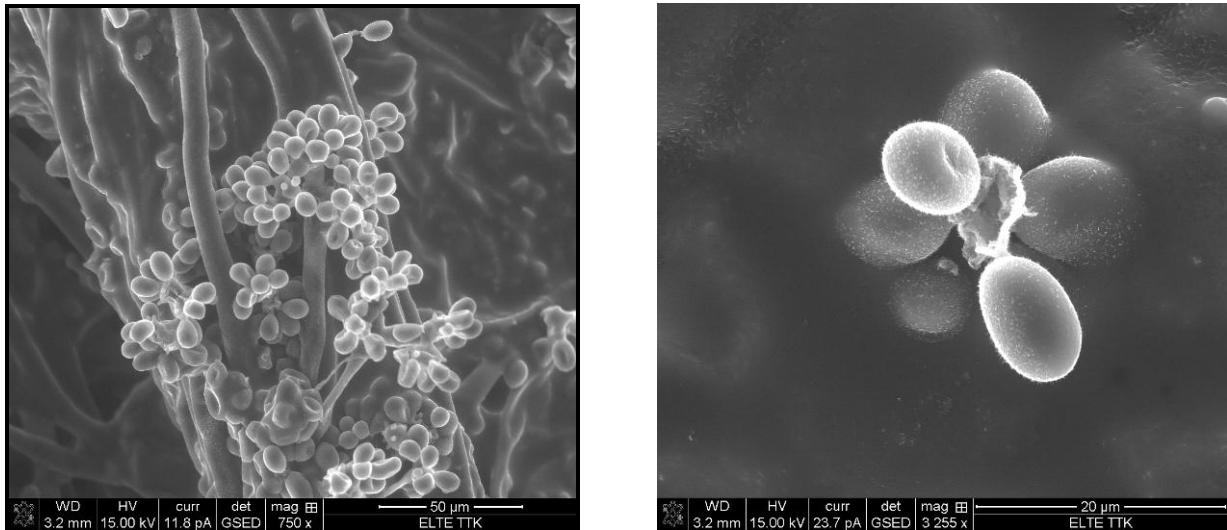
A *Botrytis* P. Micheli („fürtöspenész”) nemzetség, nemzetségbe tartozó *Botrytis cinerea* taxonómiai besorolását az 1. táblázat tartalmazza. A *Botrytis* nemzetség tagjai gyakran előfordulnak a mérsékelt égövben, elsősorban, mint növénypatogén gombák. A *Botrytis* fajok közül a leginkább ismert és vizsgált faj a *Botrytis cinerea*, amely az újabb szakirodalomban fellelhető eredmények alapján inkább fajkomplexnek tekinthető, mint önálló fajnak (Pitt et Hocking, 1997).

1. táblázat: *Botrytis cinerea* taxonómiai rendszerezése (www.scribd.com/doc/82390241/BOTRYTIS)

	Aszexuális rendszerezés (Ivartalan)	Szexuális rendszerezés (Ivaros)
Ország	Fungi	Fungi
Divízió	Deuteromycota	Ascomycota
Osztály	Hyphomycetes	Discomycetes
Rend	Moniliales	Helotiales
Család	Moniliaceae	Sclerotiniaceae
Génusz	<i>Botrytis</i>	<i>Botryotinia</i>
Faj	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Botrytinia fuckeliana</i>

A *Botrytis cinerea* Petri-csészés tenyészetén pihés, foltokban növekvő fehér micéliumokat tapasztalhatunk, melyek sötétszürkévé válnak a konídiumképződés befejeződésekor. Tenyésztése nem igényel különleges környezeti körülményt, szobahőmérsékleten jól és gyorsan növekszik. Petri-csészében való tenyésztése során egyes izolátumai, akár 48-72 órán belül képesek micéliummal borítani a rendelkezésükre álló területet (saját megfigyelés).

A *Botrytis cinerea* jellegzetes szőlőfürt alakú konídiumtartói jól felismerhetők az 1. ábrán lévő pásztázó elektronmikroszkópos felvételen. Ennek az egyedi karakternek köszönhetően könnyen megkülönböztethető más penészgombáktól.



1. ábra: *Botrytis cinerea* konídiumtartók konidimokkal (a szerző felvételei)

A *Botrytis cinerea* szaporodási ciklusa vegetatív és ivaros szakaszokból áll. A vegetatív (szomatikus) reprodukció során a micéliumokból aszexuális konídiumok, szkleróciumok és mikrokónídiumok fejlődnek. A szkleróciumokból megfelelő környezeti körülmények között apotécium fejlődhet, melyek a meiózis eredményeként az aszkospórákat tartalmazzák. Ez az ivaros folyamat ritkán figyelhető meg a természetben, viszont laboratóriumban speciális körülmények között reprodukálható és tanulmányozható.

A *B. cinerea* életciklusa során létrejött szkleróciumok, azaz kitartóképletek fontos szerepet játszanak a gomba túlélésében. E képletek faji bélyegnek tekinthetők, mivel több faj is lehet morfológiailag hasonló, illetve a fajon belüli szklerócium-variabilitás is lehet magas (Elad, et al., 2004), ezért természetesen nem támaszkodhatunk csak erre az információra a taxonómiai besorolásnál.

A *Botrytis* fajok elkülönítését először a fenotípusos jellemzőik és a gazdanövény specifitásuk alapján kezdték meg. Mivel több faj is lehet fiziológiailag hasonló, és ráadásul a tenyésztési körülmények is hozzájárulnak a tulajdonságok kialakulásához, így nem tekinthetők kizárólagos módszereknek. A biológiai fajkonceptiók módszer alapja, hogy az ivaros és

ivartalan szaporodási folyamatok alapján különítik el a fajokat. Az ivaros szaporodás *in vitro* formája azonban korlátozott, ezért ezt sem tekinthetjük biztos módszernek. A DNS szekvenálásával új, biztosabb eredményeket adó módszerek állnak rendelkezésünkre.

Az identifikálásra (fajok elkülönítésére) alkalmas molekuláris módszerek közös jellemzője, hogy olyan szekvenciákat vizsgálnak, melyek az evolúció során alig változtak, vagy olyan tulajdonságot határoztak meg, melyek megléte adott fajra jellemző. Ilyen szekvenciák elsősorban az rDNS szakaszok, a gombáknál DNS barcod-ként alkalmazható ITS régió (Schoch, et al., 2012).

2.1.2. Patogenitás

A patogén gomba a növény egyes részein, illetve szervezetében telepszik meg, és anyagait használja fel életműködésének biztosításához. A behatolás a növény felületének sérülésein, természetes nyílásain vagy az ép szöveten keresztül következik be (Jakucs és Vajna, 2003).

A *B. cinerea* élő és holt szövetekben is képes fennmaradni és szaporodni. Leggyakrabban az elhalt növényi szövetekben képződő szkleróciumokból fejlődő konídiumok szóródása indítja el a fertőzést, ugyanakkor az érés folyamán, a virágzás során kialakult látens fertőzések is aktiválódhatnak különböző mechanizmusok szerint, némely esetben jelentős rothadási folyamatokat eredményezve (Elmer et Michailides, 2004).

A szőlőnél kialakuló fertőzéshez minimum 15 óra és 18-21°C-os hőmérséklet, magas relatív páratartalom és csapadékos időjárás szükséges. A bogyófelszínre került konídiumok, a megfelelő környezeti feltételek mellett csírázásnak indulnak és fertőznek, vagy látens állapotban maradnak. E látens szakasz már sok kutatás kulcskérdése volt a *B. cinerea* esetében. Maga a folyamat három fő lépésre bontható: fertőzési fázisra, lappangási fázisra és az aktív növekedési szakaszra (Váczy, 2009).

Mindenféle sérülés (eső okozta bogyórepedés, jégverés, viharkár, lisztharmat-fertőzés, rovarrágás) utat nyit a *B. cinerea* okozta fertőzésnek. A szőlővesszők fertőződésekor fakóbarna, majd barnás-fehér foltok jelennek meg, később konídiumtartó gyeppel a felszínükön és a kifehéredő háncsszövetben szkleróciumok képződnek. A leveleken egy-egy főértől kiindulva gyorsan képződő szabálytalan foltok keletkeznek. A fűrtvirágzat, illetve a fűrtkocsány megbetegedése részleges, vagy teljes fűrtelhaláshoz vezet. A beteg növényrészek

felületén szürke konídiumtartó gyp figyelhető meg. Az érett, szemmel láthatóan sérüléstől mentes bogyókon aszúsodás (nemesrothadás) indulhat meg (Lázár, et al., 2004).

A szőlőnövény önvédelmi mechanizmusai különböző szinten jelentenek akadályokat a fertőzésekkel szemben. Az epidermiszt borító viaszréteg szerepén és a kutikula vastagságán, mint fizikai tényezőkön túl, egyéb kórokozó miatti inhibíciós folyamatok is szerepet játszanak (Pezet, et al., 2003). A bogyók antioxidáns tartalmú vegyületei, a jelenlévő polifenolok, és stilbének mennyisége szintén növelik a bogyók *B. cinerea* elleni rezisztenciáját (Goetz, et al., 1999). A szőlőbogyók az érés előrehaladása során (a magas polifenol tartalom ellenére is) egyre érzékenyebbek, míg a levelek rezisztensebbek lesznek a sejtfalhoz rögzült fenoloknak köszönhetően (Weber, et al., 1995). E folyamatok vizsgálata különösen érdekes lehet azokban az esetekben, mikor nagy polifenol tartalmú kék szőlők botritizálódása következik be.

2.1.3. Fungicid-kontroll és fungicid-rezisztencia

A *B. cinerea* elleni védekezést napjainkban is a különböző kemikáliák használata jelenti, melyek alkalmazása a használat előrehaladtával a legtöbb botriociddal szembeni fungicid-rezisztencia kialakulásához vezet. A botriocidek hatásmechanizmusuk alapján öt nagy csoportba sorolhatók.

A *légzést gátló fungicidek* megzavarják a gombák energiatermelő folyamatát, azaz az ATP szintézist, ezzel gátolva a konídiumok csírázását. A légzést gátló fungicideken belül megkülönböztetünk több helyen ható vegyületeket, oxidatív-foszforilációt gátló vegyületeket, valamint a III és a II mitokondriális komplex inhibitorait. Mára már majdnem minden légzést gátló inhibítor esetében mutattak ki rezisztenciát. Ezek közül a III mitokondriális komplex inhibítoraival szembeni rezisztencia kialakulása a citokróm b génben bekövetkezett mutáció eredménye (Leroux, et al., 2010).

A *mikrotubulus-szintézist gátló fungicidek*, az egy hatóhellyel rendelkező benzimidazolok, melyek az első széles hatásspektrumú, szisztémikus fungicidek voltak (Leroux, 2004). E szerek alkalmazását a szürkerothadás ellen régóta nem javasolják, mivel tartós rezisztencia alakult ki velük szemben (Lázár, et al., 2004).

Az *ozmoregulációra ható fungicidek* csoportjába a dikarboximidek, a fenilpirrolok és az aromás hidrokarbonátok tartoznak. A dikarboximidek mind a spórák csírázását, mind a

micéliumok növekedését gátolják. A kutatások szerint bebizonyosodott, hogy a dikarboximid tartalmú gombaölő szerek célszekvenciája a *Daf1* hisztidin kináz gén (Cui, et al., 2002).

Az *aminosavakkal antagonizáló fungicidek* széles hatásspektrummal rendelkeznek, és mint botriocideket vezették be az európai piacra a 90-es évek közepén. Gátolják a csíratömlő növekedését, de a micélium növekedésére is hatással vannak.

A *szterol-bioszintézist gátló fungicidek* közé tartozik a fenhexamid, melyet szintén botriocidként vezettek be. A konídium csírázását nem gátolja, de már alacsony koncentrációban is gátolja a csíratömlő és micélium növekedést. A legújabb kutatások szerint a 3-ketoreduktáz génjének (*Erg27*) működését gátolja, de egyre több rezisztens törzset találtak francia szőlőterületeken. A rezisztens törzsek esetében mutáció következett be az *Erg27* génben (Billard, et al., 2012).

2.2. Variabilitás

A *Botrytis* nemzetségen belül a *B. cinerea* szokatlan változatosságot mutat, melynek oka még a mai napig sem teljesen feltárt, mivel alig több mint 20 éve folynak ezzel kapcsolatos vizsgálatok. A *B. cinerea* változékonyságát általánosságban a heterokariózis és az aneuploidia jelenségének tulajdonítják. Újabb vizsgálatok szerint azonban a heterotallikus gomba két párosodási típusa mennyiségileg egyenlően oszlik meg. Ez egyértelmű bizonyítéka annak, hogy a *Botrytinia fuckeliana* szexuális reprodukcióra is képes a természetben. E tény a heterokariózisnál és aneuploidiánál valószínűleg sokkal jelentősebben hozzájárulhat a faj variabilitásához (Váczy, et al., 2008).

A szexuális ciklus variabilitását az okozza, hogy a vegetatív fejlődési szakaszba úgy iktatódik be az ivaros rekombinációs szakasz, hogy csak idegen telepről származó hím és női ivarsejtek egyesülése eredményezhet megtermékenyülést. Az ivaros folyamatok során gaméta jellegű sejtek egyesülése játszódik le, de sejtfúzió bekövetkezhet szomatikus gombasejtek között is. Az ivaros folyamat a különböző gombsejtek egyesülését engedi és véd a beltenyészet kialakulásától, míg az ivartalan kompatibilitási rendszerek az azonosságot részesítik előnyben, és védnek a kedvezőtlen genetikai hatásoktól. Az ilyen vegetatív kompatibilis csoportok (VCG) vizsgálatakor is a genetikai változékonyságra kapunk választ. A VCG-k nagy száma és az ugyanabba a csoportba tartozó izolátumok limitált előfordulása jelzi, hogy a szexuális

rekombináció fontos szerepet játszik a természetben előforduló *B. cinerea* populációk esetében (Elad, et al., 2004).

2.2. 1. Genetikai variabilitás

A modern növénykórtan elengedhetetlen kiegészítői a populáció- és filogenetikai elemzések, melyek alkalmazása hozzájárul a patogén populációk variabilitásának megismeréséhez. Ehhez egyre újabb technikák állnak rendelkezésre a teljes genom szekvenálástól, a fluoreszcens fehérje markerek használatáig (Schumacher, 2012).

A tipizálás (fajon belüli változatok elkülönítése), mint genetikai módszer által kapott információ alkalmas a mikrobák, köztük a patogén gombák populációgenetikai jellemzésére. Ezekhez a vizsgálatokhoz olyan genetikai markereket kell kiválasztani, melyek nagy valószínűséggel függetlenek a szelekciós nyomás alatt álló tulajdonságoktól és eléggé változatosak ahhoz, hogy megjelenítsék az egy fajon belüli különbségeket (Pomázi, 2010).

A genetikai markerezés napjainkban már egyszerűen és olcsón megvalósítható vizsgálati módszer, hiszen a DNS egyszerűen kivonható minden élő és holt szövetből, sejtből, ráadásul kis mennyiségű minta is elegendő, mivel a PCR (polimeráz láncreakció) segítségével könnyen felszaporíthatók a kívánt szakaszok (Parker, et al., 1998). A DNS erősen variábilis szakaszai révén finom genetikai változások is nyomon követhetők, ugyanakkor a nem kódoló régiók nem állnak szelekciós nyomás alatt, így a kísérlet céljának megfelelően választható a vizsgálni kívánt marker. A szekvenálási szolgáltatások költségeinek csökkenésével és az elemzést végző számítógépes programok segítségével lehetővé vált a polimorf régiók szekvenciájának közvetlen összehasonlítása és a gombapopulációk ilyen irányú részletes tanulmányozása.

A PCR-es technikán alapuló tipizálási módszerek számos variációját ismerjük. A δ szekvenciákat úgynevezett „ugráló” géneknek nevezzük, mivel képesek kivágódni és a kromoszómák között áthelyeződni. A módszer használata csak a *Saccharomyces cerevisiae* vizsgálatára terjedt el. Ilyen módszer még a RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) analízis. Eltérés az eddigiekhez képest annyi, hogy az alkalmazott primerek nem ismert szekvenciákat szaporítanak fel, véletlenszerűen kötődnek a genomi DNS-hez. Az ilyen primerek rövidek (kb. 10 bp hosszúak), szekvenciájuk önkényes, mivel nem tervezettek. Ezért

a primer kötődés érdekében, a hibridizációt alacsony hőmérsékleten végzik. Ez a módszer önmagában is képes információt nyújtani az egész genom variabilitásáról, a primer megszintetizálásához nem szükséges előzetes információ a gének szekvenciájáról és az ilyen primerek kereskedelmi forgalomból beszerezhetők. Az alacsony primerkötődési hőmérséklet miatt, a kapott eredmény nehezen reprodukálható.

Különböző gének variábilis intron régióját is régóta sikeresen használják a fajon belüli variabilitás vizsgálatára. Ilyenek lehetnek például az rRNS-eket kódoló régiók, transzlációs elongációs faktor 2, aktin, β -tubulin és a kitin szintáz gén variábilis intron régiója (Váczy, 2009). Az egylókuszos markerek vizsgálata mellett rendkívül informatív a tandem ismétlődő szakaszokon (mikroszatellitek, miniszetellitek) alapuló vizsgálati módszerek. Mivel a szatellit szekvenciák elemzése nem korlátozódik csupán egy fajra, hanem az alkalmazhatósági köre széles, ezért alkalmas többek között a penészgombák vizsgálatára is (Pomázi, 2010).

2.2.2. *Botrytis cinerea* populációk molekuláris variabilitása

Filogenetikai szempontból is, érdekes adatnak számít több olyan kísérlet, amelyekben különböző gazdanövényről származó izolátumokat vizsgáltak, és gazdanövényenként eltérő genetikai mintázatot mutattak. Karchiani-Balma és munkatársai (2008) tunéziai izolátumokon végzett vizsgálataik során, a különböző gazdanövényekről és földrajzilag izolált területekről származó *B. cinerea* izolátumok esetében a gazdanövény hatását erőteljesebb tényezőnek tapasztalták a földrajzi távolságokkal szemben. Hasonló eredményekre jutottak Fekete és munkatársai (2011), szamócáról és málnáról származó botritisz izolátumokon végzett vizsgálataik során. Különböző molekuláris markerek segítségével, az eltérő fenológiájú gazdanövényekről származó izolátumok között elkülönülés volt megfigyelhető. Francia és argentin *B. cinerea* izolátumokat két transzpozon elem jelenléte és azok kombinációi alapján összehasonlítva kimutatták, hogy a kivi és szőlő, illetve a paradicsom és áfonya transzpozon elemei szignifikáns eltérést mutattak, melyet a RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) analízis során tapasztalt nagy genetikai változékonyság is megerősített (Munoz, et al., 2010).

Az Egri borvidéken, szőlőről gyűjtött izolátumok diverzitásának vizsgálata derített fényt arra, hogy a helyi populációk diverzek és képesek a szexuális reprodukcióra. Az alkalmazott markerek variabilitása ugyan alacsony volt, mégis nagy allélszámban és csak itt előforduló

mutációs variációkban fordultak elő. Borvidéken belül a különböző helyekről származó izolátumok populációi között földrajzi alapú elkülönülés nem volt tapasztalható, a szomolyai területek izolátumainak kivételével, amelyek csekély mértékben, de eltértek a többi populációtól (Váczy, et al., 2008)

2.2.2.1. Szatellit szekvenciák

A szatellit szekvenciák olyan néhány száz bázisból felépülő, egymás után következő (tandem) részek, melyek az eukarióta genom nem kódoló részein találhatók és pontos funkcióját még nem ismerjük. A szatellit elnevezés abból adódik, hogy cézium-kloridban történő grádiens centrifugálás során a DNS szakaszok egy jól elkülönülő csúcsként (szatellitként) jelennek meg (Parker, et al., 1998). A szatellit DNS-ek leggyakrabban a kromoszóma végein lévő teleomer szakaszoknál vagy éppen a centromerhez közel helyezkednek el. Léteznek mini (nagyobb ismétlődő egységekből felépülő), illetve mikro (kisebb egységekből felépülő) szatellitek is. A miniszatellit szekvenciák rövid 6-120 bázispárnyi szakaszok ismétlődéséből állnak és legtöbbször szétszórtan helyezkednek el a genomban. Teljes hosszuk 0,5-120 kilobázis. Erősen variábilis régiók, melyekben egyrészt a felépítő egységek szekvenciája, másrészt az ismétlődő egységek száma változik (Váczy, 2009).

Giraud és munkatársai (1998) írták le a *B. cinerea* első és mindezidáig egyetlen miniszatellit szekvenciáját (MSB1) az ATP szintetáz gén intronjában. Az általuk leírt miniszatellit AT gazdag, és csak egy lókuszon található a genomban. Az ilyen nagy változékonyságú miniszatellitek nagyon jól használhatók a populációgenetikai elemzésekhez (Parker, et. al., 1998). Korábbi vizsgálatok során, magyarországi – a Tokaji- és az Egri borvidékről származó – izolátumok esetében a miniszatellit szekvenciákat felépítő egységek – MVR-ek – között, nagy százalékban találtak új mutációkat hordozó variánsokat, melyek máshol eddig nem kerültek leírásra és valószínűleg helyben kialakuló mutációk révén jöttek létre. Az Egri borvidéken leírt új variánsok nagy részésze szomolyai szőlőtermő területekről származott (Váczy, et al., 2007).

2.2.2.2. β -tubulin gének

A tubulin fehérjék funkciójuknál fogva a finom változások nyomon követésére jól alkalmazható genetikai markernek tekinthetők. A növénypatogén gombák benzimidazol rezisztenciája a β -tubulin gén pontmutációjával van kapcsolatban. A benzimidazol rezisztens törzsek esetében pontmutáció következik be a 198. kodonon a β -tubulin génben, melynek következtében, az más aminosavat kódol (Zhang, et al., 2010). Már 1995-ben is végeztek kutatásokat allélspecifikus PCR kifejlesztésével benzimidazol rezisztens törzsek azonosítására Ausztráliában és Új-Zélandon szekvencia analízis segítségével (Luck et Gillings 1995). Az újabb kutatások feltárták, hogy a *B. cinerea* esetében már azt is leírták, hogy két fő benzimidazol rezisztens mutáns létezik, az egyik esetében GAG (Glutaminsav) GCG-re (Alaninra) változik, a másikon pedig a GAG kodon (Glutaminsav) AAG (Lizinre) változik. Ez a második mutáns nagyobb rezisztenciát mutat (Malandrakis, 2010). A korábban már említett Egri borvidéken végzett vizsgálatok során a β -tubulin szekvencia eredmények, bár önmagukban genetikailag nem voltak elég informatívak, mégis, a gén 20 különböző allélja került leírásra, amely a szűk mintavételi területhez képest jelentős mennyiségnek számít (Váczy, 2009).

2.4. Szőlészeti és borászati jelentőség

A világ több borvidékén is készítenek botritiszes, édes borokat. Ausztriában a burgenlandi területeken készítik az egykor ruszti aszúként híressé vált borkülönlegességet, melynek ottani elnevezése Ausbruch és botritiszes, túlérett és aszalódott szőlőbogyók mustjából készül. Németországban a Beeren-és Tockenbeerenauslese-keket tekintjük botritiszes édes boroknak, melyek szintén botriszes és túlérett szőlőbogyók keverékéből készülnek, ugyanakkor a boroknál a botritiszesedés nem alapkövetelmény. Franciaországban Bordeaux Sauternes-Barsac-i borvidékén és Elzászban készítenek botritiszes borokat, melyek közül a Sauternes-i az, amelyik világhírnévnek örvend (Magyar, 2011). Magyarországhoz viszonyítva nagy különbség érzékelhető az itthoni és a világ aszúborai között. A Magyarországon termelt aszúbor jellegzetes karakterét az aszúsodott alapanyag, egyedi talajtípusok, szőlőfajták és éghajlati viszonyok együttese adja. Ezen kívül az elkészítés és érlelés módja is jelentős mértékben hozzájárul az aszúbor karakterének kialakításához (Bene, 2004).

2.4.1. A szürkerothadás hatása a borokra

A szürkerothadásos fertőzés következtében létrejövő változások nagyon sokrétűek, melyek közül a leglátványosabb a cukortartalom nagymértékű csökkenése. Ezen kívül jelentős mértékben csökken a must nitrogén és vitamin tartalma - tiamin mennyisége 70-80%-al, piridoxin mennyisége 50%-al, miközben a borkősav oxidációja pedig progresszíven növekszik. A gomba, jelentős pektinbontó aktivitással rendelkezik, így a must pektin tartalma akár teljesen le is bomolhat, míg a galakturonsav mennyisége nő, ami az egészséges szőlőbogyó mustjára nem jellemző. A *B. cinerea* a bor kezelését és erjedést károsan befolyásoló poliszacharidok szintézisére is képes. A glükánok lényegesen rontják a bor szűrhetőségét. A galaktózban és mannózban gazdag heteropoliszacharidok pedig az alkoholos erjedést gátolják és az ecetsav termelődést fokozzák az erjedés során. A szürkerothadás mégis talán legsúlyosabb következménye a lakkáz enzim aktivitása, melynek következtében a bogyó fenolos vegyületei kinonokká oxidálódnak. Fehérborok esetében ez barnulást, barna törést, keserű ízanyagok megjelenését, vörösborokban, a színyanyagok lebomlását eredményezi (Magyar, 1998).

A szürkerothadást kísérő jelenséggént a bogyóban a *B. cinerea*-án kívül számos más penészgomba (*Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*), élesztőgombák és ecetsavbaktériumok (*Gluconobacter*, *Acetobacter*) is fejlődésnek indulhatnak. Mindezek hozzájárulnak a bogyó értékes anyagainak lebomlásához, a kellemetlen íz- és illatanyagok kialakulásához. Ha a társult mikrobiota jelentősebb arányban vesz részt a fertőzés kialakulásában, vegyes rothadásról beszélünk. Ennek eredményeként a fertőzött mustok jó minőségű borkészítésre nem használhatók (Magyar, 2010).

2.4.2. A nemesrothadás, aszúsodás

Az aszúsodás kialakulásához több feltételnek is teljesülni kell: a nedves időjárás már teljes érésben lévő szőlőbogyót érjen, a bogyók szemre épek legyenek, a nedves időszakot száraz, meleg idő kövesse, illetve a szőlőfajta aszúsodás szempontjából megfelelő tulajdonságú legyen. Jelenlegi ismereteink alapján a szürke- és nemesrothadás közötti különbségek a folyamat körülményeiben rejlenek. A nemesrothadást a gomba metabolizmusának biokémiai folyamatai és a szőlő töppedésének fizikai változásai együttesen eredményezik. A biokémiai

folyamatok alapvetően azonosak a szürkerothadásakor lejátszódó folyamatokkal, a legnagyobb különbséget mégis az okozza, hogy a túlérlett szőlő esetén a fürtkocsány elfásodik, így nincs lehetőség a töppedő bogyóból elpárolgó víz pótlására, ami az oldott anyagok bekonzentrálódását eredményezi. Az érett szőlőben már kialakult a fajtának megfelelő cukor- és savtartalom, a „zöld” ízt okozó fenolos anyagok pedig lebomlottak (Magyar, 2011).

A bekonzentrálódás során egyre növekvő ozmotikus nyomás korlátozza a gomba növekedését és metabolizmusát, és megváltoztatja az extracelluláris enzimek aktivitását. A gombahífák az epidermisz alatti sejtrétegekben növekednek, a felületi légmicélium képzés minimális vagy hiányzik. A termés össztömege és must mennyisége töredékére csökken, de mindez rendkívül nagy minőségjavulással jár együtt. A bekonzentrálódás miatt jelentős cukorkoncentráció növekedés tapasztalható, amely 600 g/l fölé is emelkedhet. A cukortartalmat alacsony glükóz-fruktóz arány jellemzi, a magas fruktóz tartalom az édesség érzetét fokozza (Magyar, 2010). A légmicélium hiánya miatt a gomba oxigén ellátottsága korlátozott, ennek következtében jelentősebb mennyiségű glicerín és glükonsav keletkezik. A glükonsav felhasználása a gomba növekedésének stacioner fázisában megszűnik, így az feldúsul a bogyóban, 10-30 g/l glicerín tartalom mellett, 1-3 g/l-ben található meg az aszús mustokban. Ezek a vegyületek indikátorai az aszú mustnak, mivel az egészséges szőlő mustjában nem találhatók meg. A glicerín tartalom tovább növekszik az erjedés során, míg a glükonsav mennyisége tovább nem változik. Ezért ezek a vegyületek a kiejert borokban is alkalmasak a nemesrothadás tényének megállapítására (Magyar, 1998).

A botritisz borkősav-felhasználása növekedhet az aszúsodás során. A nemesrothadás során az ecetsav tartalom is általában növekszik, de ez a kísérő mikrobiotának köszönhető. A citromsav, almasav mennyisége is változik a fertőzés következtében (Magyar, 2011). A Tokaji Aszú és a világ más botritiszes borainak összehasonlítását végezték el főkomponens analízis (PCA, principal component analysis) segítségével 2008-ban. Az eredmények azt mutatták, hogy a borkősav és az ecetsav mennyisége a legállandóbb, illetve nem mutat nagy különbségeket a külföldi aszúborok és Tokaji Aszúk között. Az almasav mennyisége jelentősen eltért, a Tokaji Aszúk esetén szignifikánsan nagyobb mennyiségeket mértek (Sass-Kiss, et al., 2008).

A botritiszes mustokra jellemző a kénessavat megkötő ketosavak nagy mennyisége. A piroszőlősav átlagosan másfélszerese, a 2-ketoglutársav pedig több mint kétszerese a

közönséges mustokban mérhetőnek (Magyar, 2010). Néhány egyéb karbonilvegyület feldúsulása az ecetsav baktériumoknak tudható be. Az ilyen mustok erjedése során a tiaminhiány következtében a ketosavak mennyisége tovább növekszik, ezért a botritiszes borok kénessav megkötő képessége nagyon magas. A glükonsav mellett a botritisz kisebb mennyiségben glükuron- és galakturonsavat, valamint galaktársavat is termel (Magyar 1998).

A nagy cukortartalom mellett az egyedi íz-és zamatanyagok képezik az aszúsodott szőlő legfőbb értékeit. Ezek kémiai összetételében jelentős szerepet játszik a furfurol, benzaldehid, fenilacetaldehid és benzilcianid (Magyar, 2010). A mézre, őszibarackra, egyéb gyümölcsökre emlékeztető illatba kulcsszerepe van a δ laktonoknak. Ezen kívül a Tokaji Aszú egyedi karakterét valószínűleg a δ és γ laktonoknak köszönhetjük (Miklósy, 2004). Már korábban azonosították a szotolon nevű (3 hidroxil 4,5 dimetil 2 (5) furanon) laktont (Mashuda, et al., 1984), ami mára már bizonyítottan marker vegyület az elemzések során.

2.4.3. A botritiszes borok és az egészség kapcsolata

A Tokaji aszút, mint „gyógyszert” egész Európában alkalmazták a királyi udvarokban. Pontosan nem azonosították egészségvédő hatását, de azt tudták, hogy a benne található jótékony vegyületekből sokkal több található, mint más borokban (Magyar, 2011).

Ebben a vonatkozásban a polifenolokat kell kiemelni, mivel a normál fehérborokkal összehasonlítva a botritiszes borokban jóval magasabb a polifenolok mennyisége (Magyar, 2011). Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a préselést hosszú, héjon áztatási periódus előzi meg. A rezveratrol tartalom szintén magasabb az ilyen típusú fehérborokban (Celotti, et al., 1996).

A biogén aminok az aminosavak dekarboxileződése során keletkeznek. A botritiszes borokban mennyiségük meghaladhatja az átlagos értéket. Sass-Kiss és munkatársainak (2008) mérései alapján is kimutatható volt a magasabb biogén amin koncentráció az ilyen típusú borokban. A tanulmány szerint a biogén amin koncentrációkból következtetni lehet az aszú eredetére is, azaz Tokajban készült-e vagy sem. A biogén amin tartalom meghatározása azért fontos, mert túl magas mennyiségben az emberi szervezetben allergiás reakciót válthat ki. Ilyen szempontból a legismertebb vegyület a hisztamin, ami bőrirritációt, apró kiütéses foltokat okoz. Sass-Kiss eredményei alapján a Tokaji aszúborokban a putreszcin, tiramin és feniletilamin mennyisége magasabb.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Szőlészeti és borászati szempontból fontos folyamat a szőlő botritiszes fertőződése, illetve az ebből kialakuló szürke- vagy nemesrothadásos folyamatok. A korábban ismertetettek szerint a nemesrothadás és aszúsodás megfelelő környezeti körülmények között, illetve alkalmas szőlőfajta esetén, földrajzi helytől függetlenül is kialakulhat.

Az Egri borvidék nagyobb részén borászati megfontolásokból, általában nem kívánt a botritisz jelenléte. Jelen dolgozatban vizsgálni kívánt szomolyai szőlőtermő területeken viszont speciális, „botritisz kímélő” növényvédelem folyik, így nagy biztonsággal és több évjáratban is kialakul a szőlők aszúsodása.

Munkám során ezen területek bortitizálódási folyamatait vizsgáltam különböző szőlőfajtákon és a következő kérdésekre kerestem válaszokat:

- Milyen fenotípusos tulajdonságok jellemzik a területeken található *B. cinerea* izolátumokat?
- Van vagy lehet-e fenotípusos különbség a kék vagy fehér szőlőfajtákról származó izolátumok között?
- Milyen genetikai tulajdonságokkal rendelkezik a területek *B. cinerea* populációja?
- Van vagy lehet-e genotípusos különbség a kék vagy fehér szőlőfajtákról származó izolátumok között?

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A kísérleti területek bemutatása és jellemzése

A vizsgálatokhoz szükséges területeket Szomolya falu határában elhelyezkedő két elkülönülő szőlőültetvényen - Ispánberki és Csájszél - jelöltük ki. Az Ispánberki termőterület a Turán, a Csájszél pedig az Olaszrizling szőlőfajta kapcsán, hosszú évek tapasztalata alapján kedvező az aszúsodásnak.

Mindkét területen jellemző az agyagbemosódásos barna erdőtalaj, melynek jelentős része csernozjom változatba megy át. Alapközete riolit tufa. A teljesen köves, sekély termőrétegtől kezdve a mély termőtalajig fordulnak elő talajváltozatok a vidéken.

A szomolyai szőlőtermő dombok átlagmagassága 230 m, melyek hosszan elnyúló, észak-déli lefutásúak. A völgyekben patakok folynak, ideális környezetet biztosítva a *B. cinereának*. A szüretidőpontokat általában az aszúsodáshoz igazítjuk, ami október közepe a Turán esetében.

Az Olaszrizling ültetvény combtőkés művelésű, a tőkefejek 60 cm-en helyezkednek el. Fölötte egy pár drót fut, melyekbe a friss hajtások könnyen beigazíthatók. A tartóoszlopok tetején 170 cm magasan, egy darab fűződrót van. Metszéskor hat termőrügyet hagyunk fél szál vesszőn a vezérdrótra kihajtva. A Turán tőkefejes művelésű, táمبرendezés nincs, hagyományosan karókhoz rögzítjük a tőkét. Rövidcsapos metszést alkalmazunk, amin hat termőrügyet hagyunk.

A növényvédelmet kén és réz tartalmú szerekkel végeztük. Rovarölő szert nem alkalmazunk. 2011-ben, az első permetezés maximális dózisú tiszta kénnel történt, ami jól ritkítja a káros atkákat és a lisztharmatot. Virágzás előtt réz és kén vizes oldatát használtuk a legalacsonyabb dózisban. A fürtzáródásig is csak ezt a szert használtuk, utána (július vége és augusztus közepe között) 1-2 alkalommal rézhidroxidot és olajos állapotú kénoldatot alkalmaztunk. Az utolsó permetezés augusztus elején volt.

4.2. Izolálás, törzsgyűjtemény és fenntartás

Az Egri borvidékhez tartozó Szomolya falu határában lévő szőlőültetvényekről (Ispánberki és Csájszél) 2011. szeptember elejétől, november közepéig gyűjtöttem *B. cinerea*-val fertőzött bogyókat Olaszrizling és Turán szőlőfajtákról. A mintavételhez fém csipeszt használtam, melyet mindig gondosan lelángoltam az egyes mintavételek között, a fertőzések és keresztfertőzések elkerülése végett. A töppedt szemeket steril mintatartó dobozokba gyűjtöttem. Az izolálás első lépéseként a bogyókról konídiumokat vittem át spóraszórással bengál-rózsa szelektív táptalajra (Scharlau Chemie S.A. Spain). Azon mintákat, melyek esetében még nem voltak konídiumok a bogyófelszínen, nedves kamrában inkubáltam 28°C-on. A bengál-rózsa táptalajon csírázásnak indult spórákból sztereo-mikroszkóp alatt válogattam, majd agar darabkával kivágva áthelyeztem a növekedéshez szükséges burgonya-dextróz agar táptalajra (Scharlau Chemie S.A. Spain). Az ily módon létrehozott izolátumokat genetikailag homogén, egyspórás izolátumnak tekintettem. Az így létrehozott izolátumokat törzsgyűjteménybe rendeztem és évjárat, származási hely szerint burgonya dextróz agaron tartom fenn, illetve -80 °C-on 50%-os glicerinben tárolom.

4.3. DNS izolálás

A genom vizsgálatához Petri-csészében tenyészet micéliumból nyertem ki a DNS-t. A sejtek feltárása MagNA Lyser készülékben, MagNA Lyser Green Beads-el (Roche Applied Science), 2 mm átmérőjű kerámiagolyókat tartalmazó műanyag csőben történt.

Az extrakcióhoz kereskedelmi forgalomba kapható DNS izoláló kit-et, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) használtam, a gyártó leírása szerint, melyet a következőkben részletezek (2. táblázat):

2. táblázat: DNS izolálási lépések

	Feltárás, homogenizálás
1.	Az összegyűjtött 96%-os etanollal mosott micéliumot, a kerámiagolyókat tartalmazó feltáró csőbe (Green Beeds) tettem, amelybe előzőleg már belemértem 300µl AP1 puffert, 10µl RNáz oldatot és 10µl Proteináz K-t. Ezek segítségével a fehérje és RNS szennyeződés csökkenthető.
2.	Feltárás a MagNaLyser készülékkel (90 másodperc, 5000 rpm).
3.	A feltárt mintákat 10 percig 65°C-on inkubáltam a fűthető eppendorf rázóban, folyamatos rázatás mellett.
4.	Az inkubáció után adtam hozzá 100 µl kloroformot, vortexeltem 10 másodpercig.
5.	Centrifugálás 20.000 g-n 5 percig. Ezután a felülúszóval dolgoztam tovább.
	Szűrés
6.	A sejtlizátumot tartalmazó felülúszót a (lila) QIAshredder Mini Spin oszlopokra pipettam, melyeket 2 ml-es centrifuga csőbe helyeztem.
7.	Centrifugálás 11.000 g-n 2 percig. (Ha a centrifuga csőben pellet volt felfedezhető, ügyeltem, hogy ne kavarjam fel a pipettázással.)
8.	Átpipettáztam centrifugálás után az oldatot új, steril 1,5 ml-es eppendorf csőbe.
	DNS kicsapás, megkötés
9.	Hozzáadtam 450µl PC puffert a tiszta lizátumhoz és azonnal kevertem pipettázással.
10.	Rápipettáztam max. 700µl oldatot a DNeasy Mini Spin oszlopra (zöld), melyeket előzőleg 2 ml-es eppendorfba tettem, majd centrifugáltam 11.000 g-n 1 percig, ezután kiöntöttem az átfolyót.
11.	A 10. lépést megismételtem azzal a maradék mintával, amely az előzőpipettázásból nem fért az oszlopra.
	Mosás

12.	A DNS-t tartalmazó szűrőt (DNeasy Mini Spin oszlop) a 2 ml-es gyűjtőbe tettem, 400 µl PW1 puffert pipettáztam rá és centrifugáltam 11.000 g-n 1 percig, az átfolyót kiöntöttem.
13.	700 µl PW2 puffert pipettáztam rá a membránra és centrifugáltam 11.000 g-n 1 percig.
14.	200µl PW2 puffert adagoltam az oszlopra, centrifugáltam 2 percig 11.000g-n, és a mosópuffert teljesen eltávolítottam.
	Eluálás
14.	A membrán szűrőt egy tiszta 1,5 ml-es (vagy 2 ml-es) eppendorfba tettem és rápipettáztam 50 µl 65°C-os PE puffert közvetlenül a membránra, majd inkubáltam 5 percig 65°C-on. Centrifugáltam 11.000 g-n 1 percig.
15.	Megismételtem a lépést újabb 50µl 65°C-os PE puffer hozzáadásával és centrifugáltam 11.000g-n 1 percig.

4.4. DNS koncentrációk meghatározása és normalizálása

A DNS preparátumok koncentrációját NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) készülékkel mértem, amely nagyon kis mennyiségek koncentrációjának mérésére szolgáló spektrofotométer. A meghatározott koncentrációjú DNS izolátumokat Maxymum Recovery eppendorfokba (Axygen) mértem át, majd a QIAgility (QIAGEN) PCR összemérő robot készülék segítségével egységes koncentrációra (25ng/µl) állítottam be, illetve 96 helyes műanyag plate-be pipettáztattam át. A normalizációt a vezérlőprogramba betáplált DNS minták koncentrációja alapján, hígítással végezte el a készülék.

4.5. DNS fragmentumok amplifikációja és detektálása

A PCR reakciókban használt primereket az Integrated DNA Technologies Inc. (Coralville, USA) szintetizálta. A reakciókat BioRad S1000 96 férőhelyes gradiens PCR készülékben végeztem. A reakciók összeállítását az előzőekben már ismerttetett QIAgility pipettázó készülékkel végeztem, egyedi vezérlő program szerint, enzim-mix és DNS összemérésével.

A reakció során felszaporodott PCR termékeket méret és koncentráció meghatározáshoz kapilláris gélelektroforézis készülékben - QIAxcell (QIAGEN) – futtattam a gyártó utasítása szerint nagyfelbontású QIAxcel DNA High Resolution Kit felhasználásával, OM 500 protokollt alkalmazva. Az MSB1 PCR termékek vizsgálata esetén 15bp-1kb mérettartományt átfogó QX Alignment Markert és 25 bp–500 bp mérettartományú QX DNA Size Markert, míg a *tub1* PCR termékek vizsgálata során 15bp-3kb mérettartományt átfogó QX Alignment Markert és pUC18/HaeIII QX DNA Size Markert használtam.

4.5.1. Miniszatelit szekvenciák felszaporítása

Az MSB1 felszaporítására a következő szekvenciájú primereket használtam Giraud és munkatársai leírása alapján (1998):

MSB1F: 5'-AAGTTGCTGGTTCCTTGA-3'

MSB1R:5'-GTTGCAACCGGCGTAGAT-3'

Az amplifikációt 25 mikroliter térfogatban végeztem, BIOTAQ PCR Mixet (Bioline) reakcióelegy felhasználásával. A PCR reakció körülményei a következők voltak:

95°C 3perc, majd 95°C 1 perc, 60°C 1 perc, 72°C 1 perc, harminc ciklusban; végül 72°C 15 perc.

4.5.2. Tubulin szakaszok felszaporítása

A *tub1* amplifikációjához a következő primerpárt használtam Furnier és munkatársai (2005) leírása alapján:

155: 5'-CAACCTTCAAAATGCGTGAG-3'

1174: 5'-AGATGGGTTGCTGAGCTTCA.3'

Az amplifikációt 25µl-es térfogatban végeztem, BIOTAQ PCR Mixet (Bioline) reakcióelegy felhasználásával. A PCR reakció körülményei a következők voltak:

95°C 3perc, majd 94°C 1 perc, 55°C 1 perc, 72°C 1 perc öt ciklusban, majd 94°C 1 perc, 55°C 1 perc, 72°C 1 perc harminc ciklusban; végül 72°C 15 perc.

4.6. Szekvenálás

A kész PCR terméket megfelelő módon lezárva és csomagolva, eljutattuk az LGC Genomics (Berlin, Németország) részére, aki a PCR termékek tisztítását és szekvenálást is elvégezte. A kész szekvenciákat és elemző fájlokat a cég honlapjáról töltöttem le. Az LGC Genomics a szekvenálást megbízás alapján végezte.

4.7 Szekvencia elemzések és populáció differenciálódás

A DNS szekvenciák illesztését GeneDoc 2.6 (Nicholas, et al., 2007) programmal végeztem, majd a genetikai differenciálódás felderítésekor a szekvenciákat a DNASp 5.10.01 programmal (Rozas, et al., 2003) elemeztem.

4.8. Elektron mikroszkópos vizsgálatok

Pásztázó elektronmikroszkóppal készítettem felvételeket a *B. cinerea* kezdeti fertőzési folyamatáról az ELTE Anyagtudományi Centrumában (Budapest, 1117, Pázmány Péter sétány 1/a). Az elektronmikroszkópos vizsgálatok az Európai Unió támogatásával, az

Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg (a támogatás száma TÁMOP 4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0003)."

Ehhez szőlőbogyót és szőlőlevelet fertőztem 1 µl *B. cinerea* szuszpenzióval, (50%-os glicerinnel mosott konídiumok) a 4. táblázatban feltüntetett beállítások szerint. A fertőzést megelőzően a növényi részek felületét csíramentesítettem. A szőlőbogyók és levelek mosását a 3. táblázatban leírtak alapján végeztem.

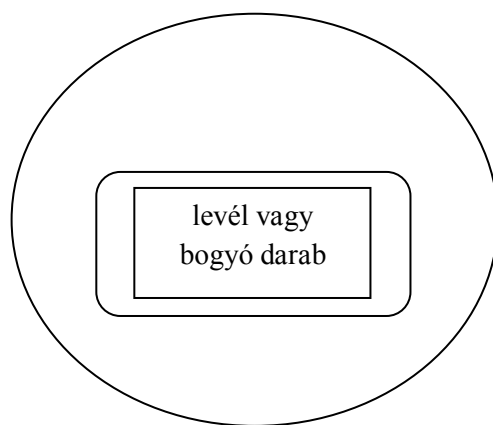
3. táblázat: Mosási beállítások:

	Szőlőbogyó és szőlőlevél tisztítási lépései lamináris box alatt.
1.	Vizes mosás, 5 perc.
2.	Hypokloridos mosás, 20 perc.
3.	Sterilvizes áztatás, 5 perc.
4.	Szárítás steril szűrőpapíron.

4. táblázat: Fertőzési beállítások (Lamináris boks alatt)

Bogyók fertőzése 1µl <i>B. cinerea</i> konídium szuszpenzióval	Levél fertőzése 1µl <i>B. cinerea</i> konídium szuszpenzióval
Kocsányhoz	Karcolt levélfelületre
Kitépett kocsány helyére	
Sértett bogyófelületre	

A fertőzés után kapott mintákat két napig tároltam szobahőmérsékleten, steril körülmények között, majd ráhelyeztem a fertőzött bogyó és levélmintákat az elektronmikroszkóp mintatartójára (2. ábra).



2. ábra: A fertőzött minta mintatartóra helyezése

A pásztázó elektronmikroszkópot (SEM) alacsonyvákuumú környezeti üzemmódban használtam. Ez azt jelenti, hogy a víz hármaspontjához közeli nyomás és hőmérsékletviszonyokat teremtünk a SEM vákuumkamrájában. Vízgőzt beeresztve a relatív páratartalmat a hőmérséklet további hangolásával 100%-ra tudjuk állítani, így elkerülve a minta kiszáradását. Ezzel a módszerrel az alacsony nyomást elviselő élő biológiai minták is vizsgálhatók fixálás nélkül. A rögzítés kétoldalú, fémről készült elektromosan vezető ragasztószalaggal végeztem.

A vizsgálat célja a gomba mikro-morfológiájának jobb megismerése volt, további vizsgálatokat és kísérleteket az elektronmikroszkópos megfigyeléseken túl nem terveztem.

4.9. Morfológiai jellemzés

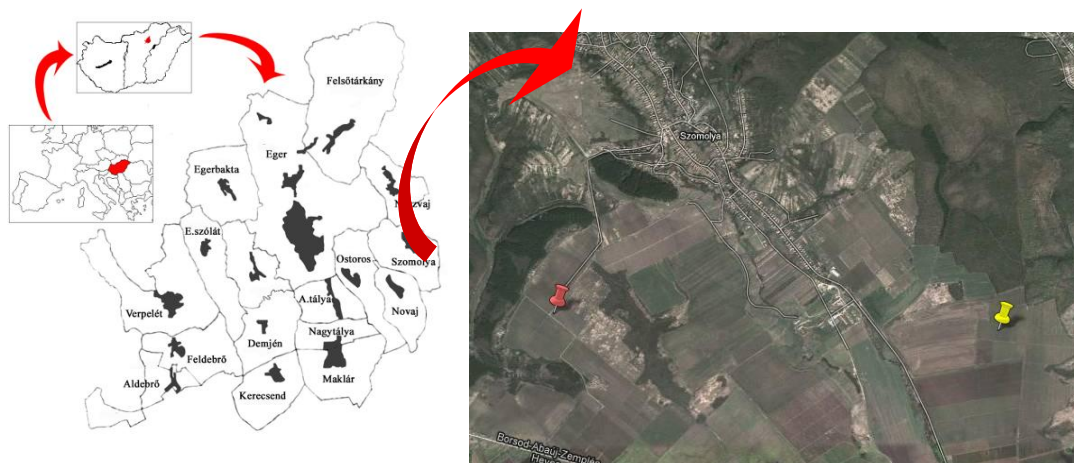
Az egyspórás izolátumokat burgonya-dextróz tápagarra oltottam, majd 21 napig inkubáltam 20°C-on, sötétben. Három hét elteltével az izolátumok fenotípusos megjelenését értékeltem a micéliumképzés, sporuláció és szkelrócium képzés alapján, Martinez és munkatársai munkája szerint (2003).

5. EREDMÉNYEK

5.1. *Botrytis cinerea* törzsgyűjtemény összeállítása

2011-ben, a korábban ismertetett szomolyai szőlőterületekről, a kifejezetten aszús tüneteket mutató szőlőbogyó minták feldolgozása során, 176 egyspórás izolátumot állítottam elő. Az izolátumokat jellegzetes telep- és mikroszkópos morfológiájuk alapján identifikáltam. A jellegzetes morfológiai kép, az irodalmi áttekintésben szereplő saját pásztázó elektronmikroszkópos felvételen is látható (1. ábra). Az izolátumokat a gyűjtés és izolálás sorrendjében kódoltam és dolgoztam fel, illetve készítettem elő tárolásra és további vizsgálatokra. Adataikat törzsgyűjteménybe rendeztem a további vizsgálatok megalapozásához.

A molekuláris vizsgálatokhoz, a törzsgyűjteményben lévő mintamennyiséget optimalizáltam. Az izolált minta, hely és időpont figyelembevételével 96 izolátumot választottam ki, míg a fenotípusos vizsgálatokhoz, a lehető legtöbb mintát használtam fel.



3. ábra: Az Egri borvidék térképe a hegyközségekkel (Váczy, 2009) és Szomolya műholdas térképe (Google Térkép - ©2012 Google) a mintavételi területekkel. Piros jelölővel az Ispánberki dűlő, illetve a Turán szőlőterület, sárga jelölővel a Csájszél dűlő és az Olaszrizling szőlőterület. A két terület közötti távolság kb. három km.

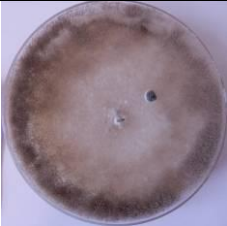
Az adatbázisban az izolátumokat gyűjtési terület és fajta, illetve gyűjtési időpont alapján rendszereztem. Az izolátumok felsorolást és felosztását tartalmazó táblázatok az 1. mellékletben találhatóak (1/a és 1/b).

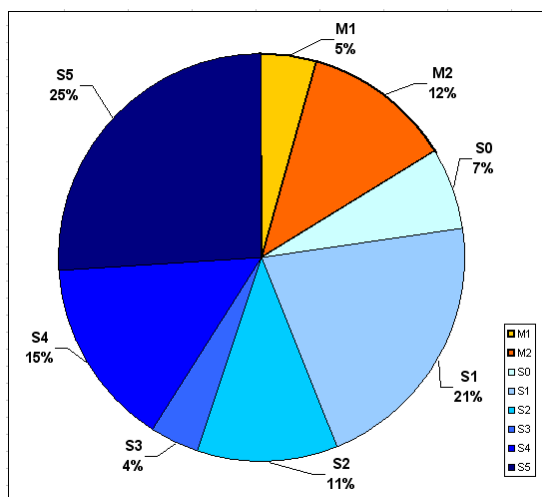
5.2. Fenotípus vizsgálatok

A morfológiai vizsgálat során a begyűjtött izolátumok szklerócium képzési képességét vizsgáltam 150 izolátumnál, mivel ez a legjellemzőbb morfológiai tulajdonság a *B. cinerea* esetében. Az izolátumokat a morfológiai megjelenésük alapján micéliális és szklerociális csoportokra osztottam, melyet az 5. táblázatban tüntettem föl.

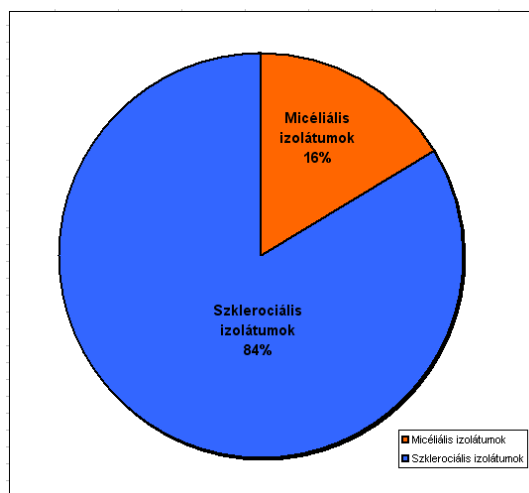
5. táblázat: Az izolátumok morfológiai osztályozása és felosztása micéliális (M1, M2) és szklerociális (S0, S1, S2, S3, S4, S5) csoportokra

	M1	Gyenge micélium-képzés. Sporuláció, szklerócium képzés nem tapasztalható	4, 14, 16, 17, 20, 102
	M2	Normál micélium-képzés, normál sporuláció, nincs szklerócium képzés	1, 8, 9, 33, 37, 38, 51, 53, 68, 72, 73, 75, 97, 118, 122, 128, 137,
	S0	Szöszös, pamacsos micélium-képzés, gyenge sporuláció és szklerócium képzés	83, 108, 129, 130, 131, 134, 144, 146, 167, 176,

	S1	Kevés, elszórt szklerócium, sporuláció a széleken	2, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 34, 36, 42, 57, 59, 71, 74, 76, 77, 78, 80, 82, 84, 105, 119, 121, 123, 124, 125, 133, 136, 138, 155, 164, 170,
	S2	Kisebb-nagyobb szkleróciumok elszórtan, gyenge sporuláció a széleken	13, 23, 24, 25, 40, 41, 81, 101, 103, 109, 112, 113, 116, 117, 140, 174, 175,
	S3	Középen kört kialakító szklerócium tömeg	21, 39, 47, 149, 151, 161
	S4	Göcsörtös szkleróciumok, gyenge sporuláció a széleken	12, 28, 29, 30, 31, 32, 92, 94, 95, 96, 106, 107, 110, 111, 114, 120, 141, 153, 159, 168, 169, 172,
	S5	Gyenge micélium-, erős szklerócium képzés, sporuláció gyakorlatilag nem tapasztalható	22, 26, 27, 43, 52, 60, 62, 66, 79, 86, 87, 88, 90, 91, 93, 98, 99, 100, 104, 115, 127, 135, 139, 142, 143, 145, 147, 150, 152, 154, 156, 157, 158, 160, 162, 163, 165, 166, 171, 173,



4. ábra: A különböző morfológiai csoportok százalékos megoszlása

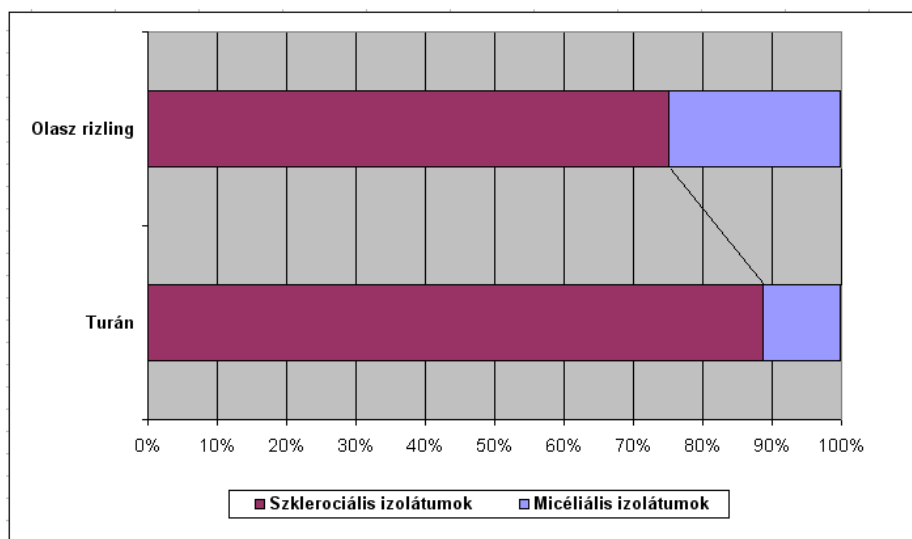


5. ábra: A micéliális és szklerociális izolátumok százalékos megoszlása

Micéliális megjelenés alapján két csoportot különítettem el. Ezek közül az elsőben – M1 – a sporuláció és a szklerócium képzés teljes hiánya volt jellemző, míg a második csoportban – M2 – a normál sporuláció mellett, a szklerócium képződést nem mutató izolátumokat csoportosítottam.

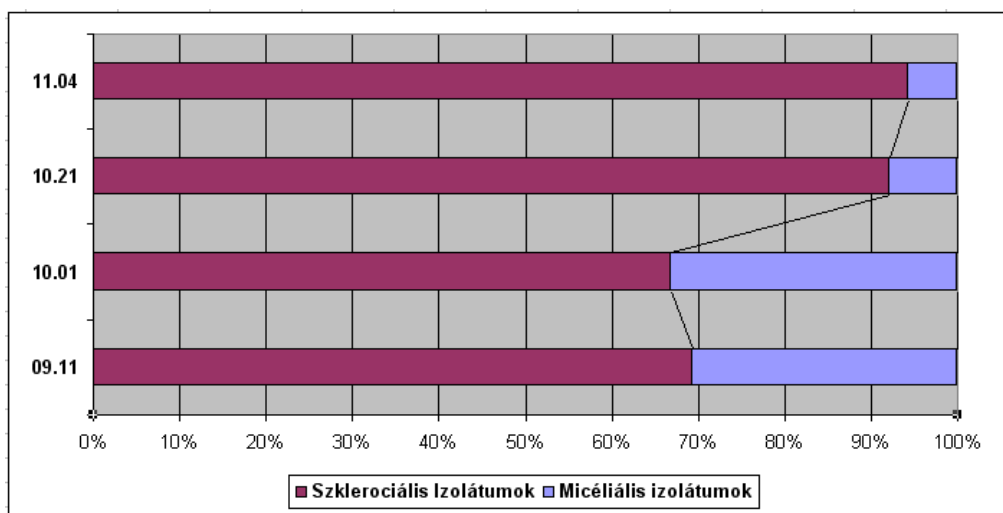
A szklerociális csoportok száma (öt - S0, S1, S2, S3, S4, S5) és a hozzájuk sorolt izolátumok mennyisége jóval nagyobb (4. ábra), mint a micéliális csoportoké. Az ide tartozó izolátumok különböző megjelenésűek és nagy fenotípusos variabilitást mutatnak.

A szklerociális csoportok közül és az izolátumok összességét tekintve is a legnagyobb arányban a kifejezetten erős szklerócium képző izolátumok voltak (S5 csoport). Ezeket az egyaránt sporuláló és szkleróciumkat is képző csoport (S1 csoport) követi. A vizsgált izolátumok 84%-a képez valamilyen formában szkleróciumot és csak 16% a csak micéliumos megjelenési formájú (5 ábra).



6. ábra: A micéliális és szklerociális izolátumok százalékos megoszlása az Olaszrizling és Turán szőlőfajták esetén

A különböző területeken található szőlőfajták alapján, a magas szklerócium képzési képességet figyelembe véve, az Olaszrizlingről származó izolátumok 75%-a volt képes szkleróciumot létrehozni, míg a Turán szőlőfajta esetében ez a mérték 89%-os volt (6. ábra).



7. ábra: A micéliális és szklerociális izolátumok százalékos megoszlása a mintagyűjtési időpontok alapján

A mintagyűjtési időpontok alapján a szklerociális izolátumok mennyiségének növekedését, illetve a micéliális izolátumok arányának csökkenését tapasztaltam a kezdeti 30-33%-os értékről, a mintagyűjtés végén tapasztalt 6-8%-os értékig (7. ábra).

5.3. Szekvencia vizsgálatok

5.3.1. Miniszatellit szekvencia vizsgálatok

A szekvencia vizsgálatra kijelölt minden izolátum esetében sikeres volt a PCR reakció, a termékek megfelelő koncentrációban szaporodtak fel. Az elektroforézis során eltérő méretű termékek megjelenését tapasztaltuk (8. ábra), ami a miniszatellit variánsok elértő számú ismétlődésére utal a különböző izolátumok esetében.



8. ábra: *B.cinerea* törzsekből felszaporított MSB1 miniszatellit szekvenciák futtatásának képe QIAxcell kapilláris gélelektroforézis készüléken.

A 96 izolátum szekvenciáinak vizsgálata során, összesen kilenc miniszatellit variánst (MVR) sikerült azonosítani, ami jól látható a 9. ábrán. Ezen kívül a 96 izolátum alléljai illetve, szinkódolva a 2. mellékletben találhatók.

```

CTACTCATGATTGTTTGACTAATTGTCGGAACATTGAT
a11 : -----ATTGTTCTACTTCTTGTT-GGACATTGAT : 28
b111 : CTACTCATGATTGTTGACTTCTTGTT-GGACATTGAT : 37
b112 : CTAATCATGATTGTTTCTACTTCTTGTT-GGACATTGAT : 37
b115 : CTAATCATGATTGTTTGACTTCTTGTTGGACATT-GAT : 37
b12 : CTAATCATGATTGTTTGACTAATTGTT-GGACATTGAT : 37
b1712 : CTATTCATCATTGTTTGACTAATTGTCATA-CTTTGAT : 37
b174 : CTAATCATGATTGTTTGACTAATTGTCATA-CTTTGAT : 37
b18H : CTACTTATGATTGTTTGACTAATTGTTGGACATT-GAT : 37
b2 : CTACTTATGATTGTTTGACTAATTGTCGGA-CATTGAT : 37
c121 : ATATTTATCAATGTTGATTATTTTCGCA-CATTGAT : 37
c3231 : TTAATGCACAATGTTGGCTCGTCGTCGT-GCATTGAT : 37
c321 : TTAATGCACAATGTTGGCTCATCGTCGT-GCATTGAT : 37
D2H : CTA-----T : 4

```

9. ábra: Az MSB1 miniszatellit szekvenciák variánsai (MVR). A legfelső sorban a konszenzus szekvenciát, alatta sárgával az ezzel megegyezőket, kékkel pedig a különböző nukleotidokat jelöltem, míg a deléciókat gondolatjelek jelölik. Piros keretben az eddig csak Magyarországról származó izolátumokból származó variánsokat jelöltem.

A kilenc variáns közül kettő csak magyarországi előfordulású (b18H, D2H), míg a további hét variáns megegyezik a Giraud és munkatársai (2008) Champagne vidékéről gyűjtött francia mintákból leírt variánsaival.

A b18H jelelölésű, teljes értékű MVR szekvencia, eddig egy alkalommal, a Tokaji borvidékről 2007-ben izolált, csak egyetlen izolátumban volt megtalálható (Váczy Kálmán Zoltán szóbeli közlése, nem publikált eredmény). A D2H, nem teljes értékű, deléciós vagy töredék szekvencia, korábbi vizsgálatok során is több magyarországi izolátumban általánosan előfordult (Váczy, et al., 2007).

6. táblázat: Az MSB1 miniszatellit szekvencia alléljai a miniszatellit variánsok (MVR) (9. ábra) alapján. Az eddig csak magyarországi izolátumokban előforduló variánsokat zöld színnel emeltem ki.

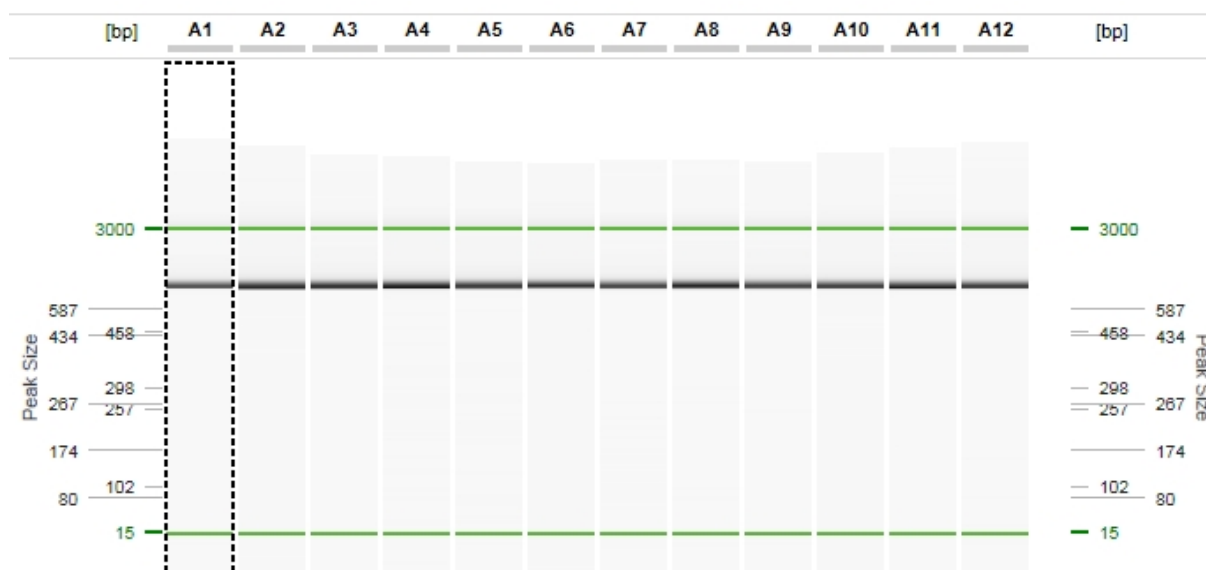
Allél szám	Ismétlődések száma	Izolátumok száma	MVR térkép								
		SZOMOLYA 2011	a11	b111			b115		b174	c121	c3231
1	7	11	a11	b111			b115	D2H	b174	c121	c3231
2	8	1	a11	b111	b112		b12	b18H	b1712	c121	c321
3		82	a11	b111	b112		b12	b2	b1712	c121	c321
4	9	2	a11	b111	b112	b112	b12	b2	b1712	c121	c321

A miniszatellit variánsok ismétlődésének száma hét, nyolc és kilenc között változott egy-egy izolátumban, különböző variánsokból felépülő allélokat kialakítva. A 96 izolátumban összesen csak négy allél fordult elő, melyek közül a hármassal jelzett allél fordult elő az izolátumok nagy többségében (85%-ban). A magyarországi előfordulású variánsokat tartalmazó izolátumok alléljei, csak 12%-ban voltak jelen. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy a jelenlegi vizsgálatok során talált allélok megegyeznek korábbi vizsgálatokban leírtakkal (Váczy, et al., 2007; Váczy, 2009) és különböznek a Giraud és munkatársai (2008) által leírt alléloktól.

Az allélok előfordulása nem mutatott semmilyen korrelációt a különböző szőlőfajtákkal. A b18H jelű variánst tartalmazó izolátum Turán szőlőfajtáról származik és az utolsó mintagyűjtés izolátumai közé tartozik. A D2H jelű töredék szekvenciájú variánst hordozó izolátumok 2/3 – 1/3 arányban származtak Turánról, illetve Olaszrizlingről.

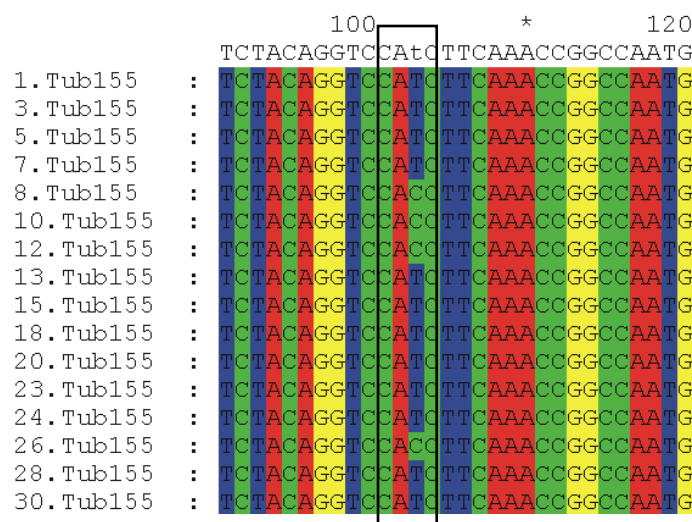
5.3.2. β -tubulin szekvencia vizsgálatok

A másik vizsgált markerhez hasonlóan a *tub1* szekvenciákat is sikerült minden izolátumból felszaporítani. A PCR termékek kb. 1100 bp méretűek voltak (10. ábra). Szekvenálásukat egy irányból, forward primerrel végeztem el.



10. ábra: *B.cinerea* törzsekből felszaporított *tub1* szekvenciák futtatásának képe QIAxcell kapilláris gélelektroforézis készüléken.

A szekvenciák elemzése során, az izolátumok szekvenciáit illesztettem, majd a nem megfelelő jelerősségű részeket eltávolítottam, így nagy biztonsággal 636 bp hosszúságú szekvenciákat elemeztem. A szekvenciák illesztése után, a teljes szekvenciában mindössze egyetlen pontmutációt találtam (11. ábra).



11. ábra: *B. cinerea* törzsekből felszaporított *tub1* szekvenciák
ban előforduló C – T pontmutáció helye a szekvenciákban

A vizsgált izolátumok 20%-nál találtam meg a mutációt, amely szintén nem volt összefüggésben a minta származási helyével vagy a szőlőfajtaival.

Korábbi hasonló vizsgálatok során, ugyanezen marker 20 különböző allélját írták le, allélenként több mutációs hellyel (Váczy, 2009), így a variabilitás hiánya mindenképpen meglepő eredménynek számít. Nyilvánvalóan ezen eredmények alapján a *tub1* szekvencia nem használható fel populációgenetikai vizsgálatokra.

5.4. Genetikai differenciáltság vizsgálata

A *tub1* szekvencia variabilitásnak hiánya miatt, csak az MSB1 genetikai marker esetében tudtam további elemzéseket végezni. Kiszámoltam a genetikai differenciáltság mértékét a különböző területek, illetve szőlőfajták, valamint a különböző mintagyűjtési időpontok között. A G_{st} érték 0,05 - 0,15 tartományban mérsékeltnek, 0,15 és 0,25 közötti tartományban nagy, míg 0,25 érték felett nagyon differenciáltnak mondható.

7. táblázat: Az MSB1 miniszatellit szekvenciák G_{st} értékei mintagyűjtési időpontok és szőlőfajta és területek alapján

Mintagyűjtési időpontok	október 1	október 21	november 4
szeptember 11	0,066	0,123	0,127
október 1		0,044	0,053
október 21			0,051
Szőlőfajta / Terület	Olaszrizling / Csájszél		
Turán / Ispánberki	0,017		

A G_{st} értékek a 0,017 és 0,127 közötti tartományban mozognak, ami a differenciáció hiányát, vagy nagyon alacsony mértékét mutatja. Gyenge vagy mérsékelt differenciáció tapasztalható az idő előrehaladtával a különböző mintagyűjtési időpontok között, ugyanakkor a két szőlőfajta és terület vizsgálatának eredményei között semmilyen különbség nem volt kimutatható ($G_{st}=0,017$). Mindez jól látható a 7. táblázatban.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataim során, nagyszámú mintán végeztem fenotípusos és genotípusos vizsgálatokat az Egri borvidéken található Szomolya község két szőlőtermő területéről. A begyűjtött *B. cinerea* izolátumok két szőlőfajtáról származtak, melyek aszúsodó tüneteket mutattak.

A morfológiai tulajdonságok vizsgálata során nagy variabilitást tapasztaltam az izolátumok között. Az izolátumok többsége képezett szkleróciumot, jelentős eltérések a különböző szőlőfajtákról származó izolátumok között nem voltak. Ugyanakkor a különböző mintagyűjtési időpontokat összehasonlítva, az idő előrehaladtával egyre nőtt a szkleróciumot képző izolátumok aránya.

A szklerócium, vagy kitartóképlet képzés, fontos tulajdonság, mivel nagyarányú jelenléte a helyi populációk környezeti viszonyokhoz való kiváló alkalmazkodását, pl. jó „télállóságát” bizonyítja. Ezt az is alátámasztja, hogy a szkleróciumból való izolálás során rendszerint olyan izolátum származik, amely később maga is képez szkleróciumot (Martinez, et al., 2003). Ez a folyamat valószínűleg a természetben is hasonló módon megy végbe, így az ilyen izolátumok nagy aránya a gomba populáció stabilitására utalhat. Korábbi vizsgálatok során hasonló mértékű és intenzitású szklerócium képzés volt tapasztalható a Tokaji borvidékről származó izolátumokon is, míg az Egri borvidék különböző helyeiről származó izolátumoknál, ez nem volt ennyire domináns (Váczy Kálmán Zoltán személyes közlése, nem publikált adat).

Az izolátumok DNS szintű vizsgálata során a vártnál jóval alacsonyabb genetikai variabilitást tapasztaltam. A korábbi Egri borvidéki izolátumokon végzett populációgenetikai vizsgálatok során (Váczy, et al., 2007; Váczy, et al., 2008; Váczy, 2009), a jelenleg is vizsgált gének genetikai markerként való használhatóságát, valamint a populációk nagy variabilitását találták.

Jelen vizsgálataim során az ATP szintetáz gén intronjában található MSB1 miniszatellit esetében csak négy allélt azonosítottam, míg az előzőekben említett vizsgálatok során 15 allélt írtak le. Ugyanezekről a területekről származó izolátumok több olyan allélt hordoztak, amelyek valószínűleg helyben kialakult mutációk eredményeként létrejött miniszatellit variánsokat tartalmaztak. Ezeket a variánsokat jelenleg nem sikerült azonosítani, idővel kiszelektálódhattak a populációból. Azonosítottam azonban egy és csak egy izolátumban

előforduló olyan variánst (b18H), amelyet korábban szintén csak egy, a Tokaji borvidékről származó izolátumban azonosítottak pár évvel korábban. Az egy-egy izolátummal reprezentált, ugyanakkor térben és időben elkülönülő miniszatellit variáns jelenléte további kérdéseket vethet fel.

A β -tubulin gén vizsgálata során szintén alacsony variabilitást tapasztaltam. A korábban említett vizsgálatok ebben az esetben a génszakasz 20 aléllját, allélenként több mutációt írtak le. A jelenlegi szekvenciák az izolátumok ötödében előforduló pontmutáción kívül tulajdonképpen genetikailag homogénnek mondhatók. Mivel azonban kódoló génben található markerről van szó további vizsgálatok szükségesek majd ahhoz, hogy ez a mutáció eredményez-e fehérje szintű változásokat.

A genetikai differenciáció vizsgálata nem mutatott különbséget a különböző szőlőfajtákról származó izolátumok között, viszont a mintagyűjtési időpontok között különbségek tapasztalhatóak. A szeptemberi és novemberi mintagyűjtési időpontok izolátumai között, különböző differenciáltsági szinteket tapasztaltam, ami arra utalhat, hogy nem állandó a fertőzést, illetve aszúsodást előidéző populáció. Hat év távlatában, különböző évjáratok eredményeit összevetve, az izolátumok szekvenciái közötti differenciáció szintje kiemelkedően magas értéket mutat, ami a populációk hosszú léptékű változását mutatja, és ami megerősítheti a specializálódásról alkotott elképzelést.

Eredményeim alapján elmondható, hogy a vizsgált izolátumok morfológiailag nagy változékonyságot mutatnak, erős szklerócium képző tulajdonsággal rendelkeznek, ugyanakkor a vizsgált genetikai markerek által szolgáltatott információk alapján alacsony variabilitás jellemzi őket. Megalapozottabb következtetések levonásához, további vizsgálatokra lehet szükség genetikailag informatívabb markerek használatával. Ugyanakkor elmondható, hogy a jelen vizsgálatból származó eredmények egy genetikailag egységes (esetleg specializált) populáció képét mutatják, a borvidéki sokszínűséggel összevetve. Ezt megerősíti, hogy Váczy és munkatársai (2008), nagyságrendben hasonló mennyiségű *B. cinerea* izolátumot vizsgálva, az Egri borvidék különböző területei közötti genetikai differenciáltságot, csak a szomolyai izolátumok esetében tapasztaltak.

7. IRODALOMJEGYZÉK

Balassa I., 2012, Tokaj-Hegyalja történelmének fő vonásai, Zempléni Múzsza XII., 2. évfolyam, 46. szám

Bene Zs., 2004, Aszúbogyók élesztő- és penészbiológiájának tanulmányozása Tokaj-hegyalján, Doktori értekezés, Budapesti Közgazdaságtudományi és Államigazgatási Egyetem, 6-10. o.

Billard, A., Fillinger, S., Leroux, P., Lachaise, H., Beffa, R., Debieu, D., 2012, Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains, Pest Management Science, Volume 68, Issue 5, Pages 684-691

Celotti, E., Ferrarini, R., Zironi, R., Conte, L., S., 1996, Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amorone, Journal of Chromatography, Vol., 73, Pages, 47-52

Cui, W., Beever, R.E., Parkes, S.L., Weeds, P.L., Templeton, M.D., 2002, An osmosensing histidine kinase mediates dicarboximide fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*), Fungal Genetics and Biology, Volume 36, Issue 3, Pages 187-198

Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N., 2004, Botrytis: Biology, Pathology and Control, Kluwer Academic Publishers, Printed in the Neatherlands

Elmer, P., Michailides, T. J., 2004 *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In: Elad, Y., Williamson, B. Tudzynski, P. és Delen, N., Ed: Botrytis: Biology, Pathology and Control, Kluwer Academic Publishers, London, UK, Pages 243-272.

Fekete, É., Árnysai, M., Asadollahi, M., Fekete, E., Irinyi, L., Karaffa L., Sándor, E., 2012, Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary Microbiological research Volume 167(5), Pages 283-291.

Fournier, E., Giraud, T., Albertini, C., Brygoo, Y. (2005) Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. Mycologia, Volume 97, Pages 1251–1267

- Giraud**, T., Fortini, D., Levis, C., Brygoo, Y. (1998) The minisatellite MSB1, in the fungus *Botrytis cinerea*, probably mutates by slippage. Mol. Biol. Evol., Volume 15, Pages 1524-1531
- Goetz**, G. F. A., Metais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R., Pont, V., 1999 Resistance factors to gray mould in grape berries: identification of some phenolic inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. Phytochemistry, Volume 52, Pages 759-767
- Jakucs** E., Vajna L. 2003, A gombák ökológiája. In: Jakucs, E., Vajna, L. szerk. Mikológia Agroiinform Kiadó, Budapest, pp. 239-305
- Jarvis**, W. R., 1977, Botryotinia and Botrytis Species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity, Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada
- Kaló** I., 2006, Termesztési tapasztalatok a Turán szőlőfajtaival, Borászati füzetek, 5, 31-33
- Karchani-Balma**, S., Gautier, A., Raies, A. Fournier, E., 2008 Geography, plants and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. Phytopathology Volume 98, Pages 1271-1279.
- Lázár** J., Dula B., Voigt E., Szendrey L., Makó Sz., 2004, A szőlő védelme I. Növényvédelem, 40, 193-206.
- Leroux**, P., 2004, Botrytis chemical control and resistance, In: Elad, Y, Williamson, B., Tudzynski, P. Delen, N., Ed: Botrytis: Biology, Pathology and control, Kluwer Academic Publisher, London, UK, Pages 195-222.
- Leroux**, P., Gredt, M., Leroch, M., Walker, A. S., 2010, Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold, Applied and Environmental Microbiology, Volume 76, Issue 19, Pages 6615-6630
- Luck**, J., E., Gillings, M., R., 1995, Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction, The British Mycological Society, Volume 99, Issue 12, Pages, 1483-1488
- Magyar** I., 2010, Borászati mikrobiológia, 3. kötet, Budapest, Mezőgazda Kiadó; 2. fejezet, 53-64, 43

Magyar I., 1998 Borászati mikrobiológia, In: Eperjesi, I., Kállay, M., Magyar, I. szerk. Borászat, Mezőgazda Kiadó, Budapest

Magyar, I., 2011, Chapter 6 - Botrytized Wines, In: Roland S. Jackson, Ed: Advances in Food and Nutrition Research, Burlington, Academic Press, Volume 63, Pages 147-206

Mátyás Cs., 2002, Az allélváltozatosság statisztikai elemzése, In: Mátyás Cs. szerk. Erdészeti-természetvédelmi genetika, Mezőgazda Kiadó, Budapest

Malandrakis, A., Markoglou, A., Ziogas, B., 2011, Molecular characterisation of benzimidazole-resistant *B. cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb, Pesticide Biochemistry and Physiology, Volume 99, Pages, 118-124

Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., 2003, Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea* European Journal of Plant Pathology Volume 109, Pages, 479–488

Mashuda, M., Okawa, E., Nishimura, K., Yunome, H. 1984, Identification of 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanon (sotolon) and ethyl-9-hydroynonanoate in botrytised wine and evaluation of the roles of compounds characteristic of it. Biol. Chemistry Volume 48, Issue, 35, Pages, 2707-2710

Miklós É., Kerényi Z., 2004, Comparison of the volatile aroma components in noble rotted grape berries from two different locations of the wine district in Hungary, Analytica Chimica Acta, Volume 513, Pages, 177-181

Munoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y., Giraud, T., 2002, Genetic Characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile, The British Mycological Society, Volume 106, Issue 5, Pages 594-601

Nicholas, K. B., Nicholas Jr, H. B., Deerfield II, D.W. (2007) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation(<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>) EMBNET.news, Volume 4, Pages 1-4

Parker, P. G., Snow, A. A., Malcolm, D. S., Booton, G. C., Fuerst, P. A., 1998, What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. Ecology, Volume 79, Pages 361-382

Pezet, R., Viret, O., Perret, C., Tabacchi, R., 2003, Latency of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. and biochemical studies during growth and 106 ripening of two grape berry cultivars, respectively susceptible and resistant to gray mould. J. of Phytopath., Volume 151, Pages 208-214

Pitt, J.I., Hocking, A. D., 1997, Fungi and Food Spoilage, second edition, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, Blackie Academic & Professional, An Imprint of Chapman & Hall, Chapter 5, Primary keys and miscellaneous fungi, Page 80

Pomázi A., 2010, Molekuláris diagnosztikai módszerek, In: Magyar I., szerk: Borászati mikrobiológia, 3. kötet, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 25-32

Rozas, J., Sanchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, Volume 19, Pages 2496-2497

Sass-Kiss A., Kiss J., Havadi B., Adányi N., 2008, Multivariate statistical analysis of botrytised wines of different origin, Food Chemistry, Volume 110, Pages 742-750

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Barcoding, F., 2012, Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, PNAS 2012, Volume. 109, Issue 16, Pages 6241-6246

Schumacher, J., 2012, Tools for *Botrytis cinerea*: New expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches, Fungal Genetics and Biology, Volume 49, Pages, 483-497

Scribd, The Word's Largest Online Library, www.scribd.com/doc/82390241/BOTRYTIS (2012.10.08)

Váczy K. Z., Karaffa L., Kövics Gy.J., Sándor E. 2007, Szürkerothadást okozó *Botrytis cinerea* populációk jellemzése miniszatellit szekvencia vizsgálatával. (Characterization of

causal agent of grey mould disease, *Botrytis cinerea* populations by minisatellite sequency)
Növényvédelem Volume 43, Issue 2, Pages 57-61

Váczy K. Z., Sándor E., Karaffa L., Fekete E., Fekete É., Árnási M., Czegléd L., Kövics Gy., Druzhinina I., Kubicek C. P., 2008, Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards. Phytopathology, Volume 98, Pages 1312-1319

Váczy K. Z., 2009, *Botrytis cinerea* populációk vizsgálata az Egri borvidéken, Doktori értekezés, Debreceni Egyetem

Weber, B., Hoesch, L., Rast, D. M., 1995, Protocatechualdehyde and other phenols as cell wall components of grapevine leaves. Phytochemistry, Volume 40, Pages 433-437

Zhang, C.Q., Liu, Y.H., Zhu, G.N., 2010, Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables, European Journal of Plant Pathology, Volume 126, Issue 4, April 2010, Pages 509-515

8. MELLÉKLETEK

1. melléklet

1/a Mintanyilvántartás és törzsgyűjtemény

Minta szám	Időpont	Szőlőfajta	Dűlő
E/11/1	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/2	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/3	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/4	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/5	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/6	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/7	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/8	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/9	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/10	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/11	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/12	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/13	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/14	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/16	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/17	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/20	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/21	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/22	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/23	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/24	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/25	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/26	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/27	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/28	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/29	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/30	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/31	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/32	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/33	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/34	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/36	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/37	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/38	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/39	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/40	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/41	2011.09.11	Turán	Ispánberki

E/11/42	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/43	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/47	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/51	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/52	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/53	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/57	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/59	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/60	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/62	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/66	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/67	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/68	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/71	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/72	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/73	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/74	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/75	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/76	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/77	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/78	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/79	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/80	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/81	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/82	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/83	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/84	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/86	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/87	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/88	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/90	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/91	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/92	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/93	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/94	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/95	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/96	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/97	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/98	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/99	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/100	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/101	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/102	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/103	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/104	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/105	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/106	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/107	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél

E/11/108	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/109	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/110	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/111	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/112	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/113	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/114	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/115	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/116	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/117	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/118	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/119	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/120	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/121	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/122	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/123	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/124	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/125	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/127	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/128	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/130	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/131	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/133	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/134	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/135	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/136	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/138	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/139	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/140	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/141	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/142	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/143	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/144	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/145	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/146	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/147	2011.10.31	Turán	Ispánberki
E/11/149	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/150	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/151	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/152	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/153	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/154	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/155	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/156	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/157	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/158	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/159	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/160	2011.11.14.	Turán	Ispánberki

E/11/161	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/162	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/163	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/164	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/165	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/166	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/168	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/169	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/170	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/171	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/172	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/173	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/174	2011.11.14.	Turán	Ispánberki
E/11/175	2011.11.14.	Turán	Ispánberki

1/b Genetikai vizsgálatokhoz válogatott izolátumok jegyzéke

Mintasszám	Mintavételi időpont	Szőlő fajta	Dűlő
E/11/1	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/3	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/5	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/7	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/8	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/10	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/12	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/13	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/15	2011.09.11	Olaszrizling	Csájszél
E/11/18	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/20	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/21	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/23	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/24	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/26	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/28	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/30	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/31	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/33	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/34	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/36	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/39	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/40	2011.09.11	Turán	Ispánberki
E/11/42	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/44	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/47	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/48	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/49	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/50	2011.10.01	Turán	Ispánberki

E/11/53	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/54	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/55	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/57	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/58	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/61	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/62	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/64	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/65	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/67	2011.10.01	Turán	Ispánberki
E/11/68	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/70	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/72	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/74	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/75	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/77	2011.10.01	Olaszrizling	Csájszél
E/11/79	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/80	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/82	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/84	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/86	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/88	2011.10.21	Turán	Ispánberki
E/11/89	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/90	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/92	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/93	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/95	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/96	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/98	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/99	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/101	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/103	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/104	2011.10.21	Olaszrizling	Csájszél
E/11/106	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/108	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/109	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/111	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/112	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/114	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/116	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/118	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/120	2011.11.04	Olaszrizling	Csájszél
E/11/122	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/124	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/126	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/128	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/131	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/134	2011.11.04	Turán	Ispánberki

E/11/137	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/139	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/142	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/143	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/145	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/147	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/149	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/151	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/153	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/155	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/158	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/161	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/164	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/166	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/168	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/170	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/173	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/174	2011.11.04	Turán	Ispánberki
E/11/175	2011.11.04	Turán	Ispánberki

2. melléklet

Az MSB1 miniszatellit allélok illesztett szekvenciái. Az allélokban a különböző miniszatellit variánsok színkódoltak. A szekvenciák elején és végén látható részek a marker határolók, nem színkódolt szakaszok.

