

TDK DOLGOZAT

Kovács Csilla

Debrecen

2013.

**DEBRECENI EGYETEM
AGRÁR-ÉS GAZDÁLKODÁSTUDOMÁNYOK CENTRUMA
MEZŐGAZDASÁG-, ÉLELMISZERTUDOMÁNYI- ÉS
KÖRNYEZETGAZDÁLKODÁSI KAR ÉLELMISZERTUDOMÁNYI-,
MINŐSÉGBIZTOSÍTÁSI ÉS MIKROBIOLÓGIAI INTÉZET**

Intézetigazgató:
Prof. Dr. Kovács Béla
egyetemi tanár

**A fertőző tőkeelhalásban szerepet játszó gombák
izolálása és azonosítása hagyományos és molekuláris
biológiai módszerekkel a Tokaj-Hegyaljai
borvidéken**

Készítette:
Kovács Csilla
Élelmiszerbiztonsági és -minőségi mérnök MSc.

Konzulensek:
Dr. Karaffa Erzsébet Mónika
egyetemi docens

Dr. Peles Ferenc Árpád
egyetemi adjunktus

Debrecen
2013.

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	3
1. TÉMAFELVETÉS	4
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. A szőlő korai, vagy fertőző tőkeelhalása	5
2.2. A fertőzés különböző megjelenési formái, és tünetei	5
2.3. A tőkeelhalásban szerepet játszó fontosabb fajok taxonómiája	9
2.3.1. <i>Aszkuszos gombák</i>	9
2.4. Molekuláris populációgenetikai elemzésekhez alkalmas markerek (ITS 1-2) ...	12
2.5. PCR-reakció	13
2.6. Bioinformatikai analízis	14
2.7. DNS szekvenálás	15
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	16
3.1. Kísérleti beállítások	16
3.2. Mintaelőkészítés és mikrobiológiai vizsgálatok	16
3.3. Molekuláris vizsgálatok	17
3.3.1. <i>Izolátumok felszaporítása, izolálása, futtatása</i>	17
3.3.2. <i>PCR reakció az ITS amplifikációjához</i>	17
3.3.3. <i>A szekvenáltatás előkészítése (PCR termék tisztítása, koncentrációjának meghatározása)</i>	18
3.3.4. <i>A szekvenciák bioinformatikai analízise</i>	18
4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE	19
4.1. A fás részekben látható tőkeelhalás tünetei	19
4.2. Telepmorfológia alapján beazonosított izolátumok	19
4.3. A gombák molekuláris identifikálása	22
4.3.1. <i>A DNS izolálása</i>	22
4.3.2. <i>A PCR termék ellenőrzése gélelektroforézissel</i>	23
4.4. Gombák azonosítása az ITS régiók szekvenciája alapján	24

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	29
ÖSSZEFOGLALÁS	30
SZAKIRODALOM JEGYZÉK	31
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	36
FÜGGELÉK	37
NYILATKOZAT	43

BEVEZETÉS

A tőkeelhalás napjainkban a szőlőültetvények egyik legsúlyosabb betegsége világszerte, mely a magyarországi szőlőkben is megtalálható (DULA B.NÉ, 2011). A magasművelés elterjedésével Magyarországon is növekedett a korai tőkeelrothadás mértéke.

A tőkeelhalást okozó kórokozó gombák hatására jelentős gazdasági károk keletkezhetnek a szőlőültetvényekben, melyek eredményeképpen jelentős termésvesztés léphet fel. A tőkepusztulást befolyásolja azonban a tőkeelhalásra való hajlam is. A fertőzött növényi anyagok (oltványok) növelik a betegség földrajzi elterjedését.

A szőlőtőke fertőző elhalásának (*Grapevine Trunk Diseases*) kialakulásában többféle kórokozó gomba is részt vehet. Eltérő tünetekkel, illetve eltérő formában jelentkezhetnek. A betegségnek többféle megnevezése van, pl.: Esca, Petri-betegség, Eutypa-, Botryosphaeria-elhalás, stb. Megjelenési formája is többféle van: (i) egy lassabb lefolyású - krónikus, és egy (ii) gyors lefolyású – akut, amit apoplexiának (gutaütés) neveznek. A betegséggel kapcsolatban több gombafajt is azonosítottak eddig, ezek közül a leggyakoribbak a *Phaeocremonium aleophilum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Diplodia seriata*. A Petri-betegséget a *Phaeomoniella chlamydospora* gomba okozza, mely a fiatal hajtásokat támadja meg. A betegség kialakulásában a fertőzött oltványok szerepe bizonyított. Az Esca betegséggel kapcsolatban többféle kórokozó gomba kóroktani szerepét is bizonyították már. A betegség lefolyása több évig is eltarthat. Először a fás részt támadja meg a gomba, majd a vegetatív szervek pusztulása is bekövetkezik. A gombaspórák a szőlőn ejtett metszési sebeken keresztül jutnak a növénybe szél segítségével, majd a kórokozó a növényi szövetek teljes pusztulását okozza.

Jelenleg a betegség megelőzésére, vagy kezelésére nem áll rendelkezésre vegyszeres védekezési lehetőség. A megelőzésben fontos a fertőzött oltványok kiszűrése, és a fertőzés csökkentésére irányuló fitotechnikai eljárások.

1. TÉMAFELVETÉS

Magyarországi borvidékeken a tőkeelhalás kialakításában szerepet játszó kórokozók előfordulásáról nagyon kevés adat található, a Tokaji borvidéken pedig nincsenek ismereteink arról, hogy jelenleg milyen kórokozók találhatóak meg az ültetvényekben. Kutatómunkánk során célul tűztük ki a Tokaji borvidéken észlelt fertőző tőkeelhalás néven összefoglalt egyes betegségtypusok helyzetének felmérése, a helyi szakemberek közreműködésével, továbbá a beteg tőkéből izolálható kórokozók morfológiai és genetikai alapon történő azonosítása.

A kutatómunka során az elvégzendő vizsgálatokkal azt szeretnénk meghatározni, hogy melyek gombafajok mutathatóak ki a fertőző tőkeelhalás tüneteit mutató fás növényi részekből a Tokaji borvidéken a betegség akut és a krónikus megjelenési formái esetén.

Tanulmányozni szeretnénk, hogy az adott gombafajok milyen tünetcsoportot jelenítenek meg a borvidéken a különböző szőlőfajtákon, illetve további célunk molekuláris populációgenetikai vizsgálatokhoz használható markerek (TEF1) keresése.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A szőlő korai, vagy fertőző tőkeelhalása

A szőlők korai tőkeelhalása mára már globális megbetegedésnek számít. A szőlőtőke korai, fertőző okokra visszavezethető elhalásának (*Grapevine Trunk Diseases* – továbbiakban fertőző tőkeelhalás) kialakulásában többféle kórokozó gomba is részt vehet (BERTSCH et al., 2012). A tőkeelhalás megelőzése azért is jelent nagy problémát, mert nincsenek olyan szőlőfajták, melyek ellenállnak a betegségnek. A megbetegedés nem egy kórokozóra, vagy kórokra vezethető vissza, hanem komplex betegségként értelmezendő, hiszen nem csupán egy gombafaj válhatja ki, hanem együttesen megjelenve több kórokozó faj is kialakíthatja, illetve valószínűsíthető szerepe van egyes környezeti tényezőknek is (BERTSCH et al, 2012). Az egyenlőtlen csapadékeloszlás lehet valószínűleg a legfontosabb abiotikus tényező, ami szerepet játszik a tünetek kialakulásában és a fertőzött tőkék korai pusztulásában. Kutatások bizonyítják, hogy az abiotikus és a biotikus tényezők mellett az emberi tevékenység is befolyásolja a betegség kialakulását. Utóbbiak közé tartozik a helytelen talajművelés, telepítés, továbbá az öntözéssel kapcsolatos problémák (II).

A betegség lefolyása alapján megkülönböztetnek egy lassabb (krónikus), és egy gyors (akut) megjelenési formáját is.

2.2. A fertőzés különböző megjelenési formái, és tünetei

A tőkeelhalás tüneteinek megjelenése világszerte fokozatosan növekszik. A fertőzés eltérő tünetekkel, illetve eltérő formában jelentkezhet. Az akut formánál egyértelműen gyorsan alakulnak ki a tünetek, míg a krónikus esetén akár több éven keresztül történő pusztító hatásról is beszélhetünk (MIKULÁS, 2008, BERTSCH et al., 2012). A betegség legszembetűnőbb tünete a levelek elszíneződése, amikor világos, klorotikus pontok jelennek meg, majd későbbi hervadása (RÁBAI et al., 2005, BERTSCH et al., 2012). MIKULÁS (2008) szerint nem mindig a teljes tőke fertőződik meg, vannak olyan esetek, amikor csak a hajtások vagy azoknak csak egy részét támadja meg a kórokozó. A levéltünetek nem feltétlenül jelennek meg minden évben. A fertőzés kiindulhat a tőkéről is, illetve a levágott

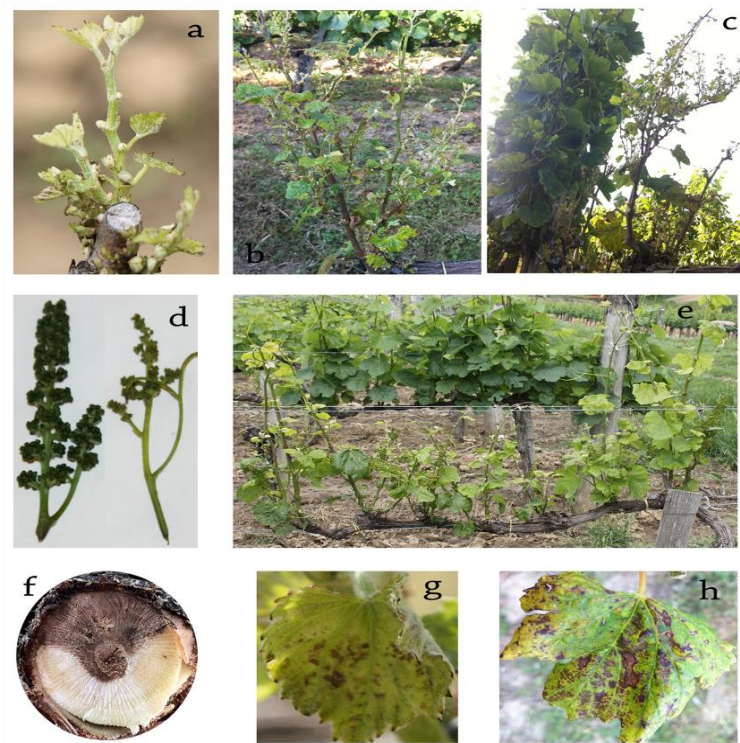
vesszőt is megfertőzhetik. A tőkék szöveteit belülről „emésztik” fel a gombák, mely hatására a fás részben korhadás alakul ki.

A szőlőtőke korai, fertőző tőkeelhalását korábban többféle néven írták le, pl.: Esca, Petri-betegség, Eutypa-, Botryosphaeria, vagy fekete kordonkar-elhalás (BDA, black dead-arm), stb. (ÚRBEZ-TORRES, 2011). A betegséggel kapcsolatban több gombafajt is azonosítottak eddig (pl.: *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Diplodia seriata*) (BERTSCH et al, 2012).

A **Petri betegség** kialakításában az 1 évnél fiatalabb hajtásokat megtámadó *Phaeomoniella chlamydospora* gomba szerepét bizonyították (GRAMAJE-ARMENGOL, 2011, BERTSCH et al., 2012, DULA B.NÉ, 2012). Elsősorban a fertőzött oltványok révén terjed. Rohamos hozam csökkenést okoz, de emellett a leveleken az erek mentén foltok jelennek meg, melyek aztán klorotikus és nekrotikus szalagokat alkotnak majd. A legtöbb esetben ezt nevezik a tigris csíkosságnak. Ezek a tünetek általában néhány év után jelennek meg, mikor már fertőzötté vált a szőlő. Általában nyár közepén száraz, forró, majd csapadékos időben jelenik meg (SURICO et al., 2006).

Az **Esca** (latin) jelentése: étel, eledel, az angol szóképp ezzel megegyező, de a görög (eszkhatosz: legutolsó, végső /betegségállapot/) eredeten alapul (KÖVICS, 2009). Világszerte elterjedt betegség (FISCHER-KASSEMAYER, 2003, DULA B.NÉ, 2012). Az 1900-as években kezdték esca néven emlegetni a betegséget. Több gomba is okozhatja a tüneteket. *Pa. chlamydospora* (*Chaetothyriales*, *Herpotrichiellaceae*) és a *P. aleophilum* (*Diaporthales*, *Togniniaceae*) és számos *Basidiomycetes* faj (FISCHER, 2006), melyek közül a legelterjedtebb *Fomitiporia mediterranea* (syn: *Phellinus punctatus* és *Fomitiporia punctata*). Magyarországról, Dula Bencéné által gyűjtött, Tokaj-hegyaljáról származó mintából izoláltak egy új, *Phaeoacremonium hungaricum* néven leírt fajt is a betegséggel kapcsolatban (ESSAKHI et al., 2008). Az idősebb tőkéken jelenik meg a betegség és a fent említett kórokozók idézik elő. Esca esetében a szőlőlevélen az erek megsárgulnak, majd elsáradnak. A betegség lefolyása több évig is eltarthat, és először a fás részeken jelenik meg, majd ezt követően figyelhető meg a vegetatív részek pusztulása (LIMA et al., 2010, BERTSCH et al., 2012). Valószínűleg a szőlőn ejtett metszési sebeken keresztül a szél segítségével jutnak a gombaspórák a növénybe (VARGA, 2009, DÍAZ-LATORRE, 2013). A kórokozó a szövetek teljes pusztulását okozza (ÚRBEZ-TORRES, 2011). A vegetációs időszakban a lombozati tünetek általában júniustól szeptemberig jelennek meg a szőlőn, de nem minden szőlőtőkén, illetve nem is minden levélen láthatóak a tünetek (PETIT et al., 2006).

Az **Eutypás tőkeelhalás** az *Eutypa lata* gomba faj okozza (DULA B.NÉ, 2012). A leggyakoribb betegségként írták le. Megjelenésével azokon a területeken kell számolni, ahol az éves csapadékmennyiség több mint 250 mm (BERTSCH et al., 2012). Az Eutypás tőkeelhalást előidéző más, új fajokat is leírtak Ausztráliában (TROUILLAS et al., 2011). Ezek a fajok az *Eutypella microtheca*, az *Eutypella citricola* és a *Diatrypella vulgaris* voltak. DÍAZ-LATORRE (2013) Chilében az *Eutypella leprosa* fajt írták le. A tünetek közül a satnya hajtások, a klorotikus pontok jellemzőek. A lombozati tünetek általában tavasszal jelennek meg. A kórokozó hatására a növény vízellátása összeomlik, a növényi sejteknek csökken a permeabilitása, ami kiszáradáshoz vezet. Az **1. képen** az *Eutypa lata* okozta tőkeelhalás tünetei láthatóak.



1. kép: Az Eutypás elhalás a Furmint levelén, a fás részen és a virágzaton

Forrás: Xie Hongtao felvétele

Az **a**, **c** és az **e** képek a satnya hajtásokat mutatják. A **d** képen a virágzat látható, a bal oldali a normál, a jobb oldali pedig a kiszáradt virágot szemlélteti. Az **f** kép mutatja a fás rész elhalását. Jellegzetessége az ék alakú elhalás. A **g** és a **h** képek a tipikus tigris csíkos nekrotikus elhalást mutatják a leveleknek.

A **Botryosphaeria okozta tőkeelhalás esetében** a *Botryosphaeria stevensii* (anamorf: *Diplodia mutila*) gombafaj megjelenése jelentős (MIKULÁS, 2008, BERTSCH, 2012). A

betegség pontos leírása SCRIBNER és VIALA (1888) nevéhez fűződik. A **2. képen** a *Botryosphaeria* okozta pusztító hatás figyelhető meg.



2. kép: A *Botryosphaeria* okozta pusztító hatás a Furmint levelén, a fás részen és a bogyókon

Forrás: Xie Hongtao felvétele

Az **a**: elszáradt leveleket, a **b**: sárgás és narancssárga elszáradásokat a levél felületén, a **c**: a fa keresztmetszetén látszó nekrotikus részeket, a **d** és az **e**: kiszáradt bogyókon megjelenő betegségtüneteket mutatják.

A **fekete kordonkar elhalást (black dead-arm, BDA)** (néha: szőlő rák, grape canker) először Magyarországon a tokaji régióban írták le. A betegség során klorotikus pontok jelentek meg a leveleken, melyek később hervadásnak indultak (LEHOCZKY, 1974). A BDA betegség kórokozójaként korábban csak a *Diplodia mutila* (teleomorf: *Botryosphaeria stevensii*) faj volt leírva, ma már azonban az említett kórokozóhoz társult a *Diplodia seriata* és a *Botryosphaeria dothidea* is (PHILLIPS, 2002, ÚRBEZ-TORRES, 2006, ANDOLFI et al., 2011).

A fás részek részleges elhalása az **exkoriózis**. A betegség nevét Ravaz és Verge vezették be 1925-ben.

A jellemző tünetek közé tartoznak a hosszúkás, fekete elváltozások. A vesszőkön látható fehéres és világosszürke elszíneződés a szüret után figyelhető meg. Világszerte, mint például Portugáliában, a több régióban végzett szőlőtermő területek felmérése közben, kiderült, hogy

fajok közül a *B. dothidea* faj a leggyakrabban izolálható az exkoriózist okozó fajok közül (PHILLIPS, 1998, 2000). Később ugyanő közölte, hogy a *Neofusicoccum parvum* az exkoriózis kórokozója.

ÚRBEZ-TORRES (2011) szerint nem elég csak a látható tünetekből következtetni a betegségeket okozó *Botryosphaeria* fajok jelenlétére, hanem szükség van a molekuláris biológiai vizsgálatok alkalmazására is. Nagy variabilitásuk miatt szükséges az egyes fajok DNS alapú pontos azonosítása. Kutatások azt is bebizonyították, hogy ugyanazon fajok különböző látható (levél) tüneteket is produkálhatnak (ÚRBEZ-TORRES, 2011).

2.3. A tőkeelhalásban szerepet játszó fontosabb fajok taxonómiája

2.3.1. Aszkuszos gombák

2.3.1.1. Botryosphaeriaceae

A *Botryosphaeria* rendszertanilag a *Fungi* országba, *Ascomycota* törzsbe, *Dothideomycetes* osztályba, *Botryosphaeriales* rendbe, *Botryosphaeriaceae* családba és a *Botryosphaeria* nemzetségbe tartozik (I4).

A *Botryosphaeria* genus kórokozói kozmopoliták. Világszerte elterjedt patogének a szőlőültetvényeken. Krónikus, rákos betegségeket okozó kórokozók (JAKUCS-VAJNA, 20003). A kéregszövet külső rétegének elhalásában részt vevő fakultatív nekrotrófok. Elterjedésüket az éghajlati viszonyok és a szőlőfajták is befolyásolják (ÚRBEZ-TORRES 2011). Az optimális növekedési hőmérsékletük 25-30 °C. A morfológiai és taxonómai elemzések és a nukleotid szekvenciák azonosítása alapján legalább 21 fajt azonosítottak már be a szőlőtőkéken. A szőlőtőke fertőző betegségének (*Grapevine Trunk Diseases*) kialakulásáért felelős kórokozók is tagjai a családnak, melyek hatására levélfoltosság, gyümölcsrothadás, hajtás kiszáradás, rügy nekrózis, erek menti elszíneződés, a farész korhadása figyelhető meg (ÚRBEZ-TORRES, 2011). Egyes fajok a *Botryosphaeriaceae* családban már elismert opportunistáknak, melyek szubkután, szemészeti és/vagy a belső szervek fertőzéseit is okozhatják (WOO, 2008). DENMAN et al. (2000) a *Bothrysophaeria* genusba 143 különböző fajt soroltak be. A fajok azonosítása nehéz feladat, mely a teleomorf és anamorf formák miatt is nehézkes.

A *Botryosphaeria* fajok nem jól definiáltak, mivel különböző fajneveken lettek leírva az éves során, így a hasonló gombák miatt több vita kerekedett, hogy melyek azok, amelyek a nemzetségbe tartoznak (PHILLIPS, 2002). A különböző fajok, az átfedő morfológiai jellemzőik miatt gyakran más fajokkal is kapcsolatba hozhatók (SLIPPERS, 2004). A részletesebb taxonómiai áttekintésről DENMAN et al. (2000) és PHILLIPS (2002) írtak.

Az 1990-es évek és a korai 2000-es években a DNS-alapú azonosítási technikák és a filogenetikai elemzések segítségével a nukleotid szekvenciák segítettek megoldani néhány, a *Botryosphaeria* fajokkal kapcsolatos korábbi rendszertani vitát (DENMAN et al., 2000, ZHOU-STANOSZ, 2001).

A jelenleg ismert, a szőlőt fertőző legfontosabb *Botryosphaeriaceae* családba tartozó fajok: *Bothryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*), *Diplodia mutila* (teleomorf: *Botryosphaeria stevensii*), *Dothiorella iberica*, *Dothiorella americana*, *Guignardia bidwellii*, *Lasiodiplodia crassispora*, *Lasiodiplodia missouriana*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiobiplodia viticola*, *Neofusicoccum australe*, *Neofusicoccum luteum*, *Neofusicoccum macroclavatum*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum ribis*, *Neofusicoccum viticlavatum*, *Phaeobotryosphaeria porosa*, *Spencermartinsia viticola* (ÚRBEZ-TORRES, 2011).

LUQUE et al., (2005) kutatásaikban a *Botryosphaeriaceae* családba tartozó öt fajt vizsgáltak. Nevezetesen *Fusicoccum aesculi*, *Diplodia seriata*, *Dothiorella viticola*, *Neofusicoccum luteum* és *Neofusicoccum parvum*, melyek fitotoxikus metabolitokat termeltek, de a metabolitokat nem azonosították (MARTOS et al., 2008). A *N. parvum* faj esetében azonosítottak exopoliszacharidként azonosított hidrofil, nagy molekulásúlyú fitotoxinokat. A *N. luteum* és a *N. parvum* is termel továbbá lipofil, kis molekulásúlyú fitotoxinokat is.

PHILLIPS (1998, 2002) munkájában megállapította, hogy a *Botryosphaeria* fajok csupán morfológia alapon történő elkülönítése lehetetlen, mert más fajokkal is összetéveszthetők.

A *Botryosphaeriaceae* családba tartozó *N. parvum*, *N. ribis* megkülönböztetése nehéz feladat, mert mind morfológiai jegyeik, mind az ITS régió összetétele hasonló (ZHOU-STANOSZ, 2001).

Az egyes fajok patogenitásának és virulenciájának megítélésére nem áll rendelkezésre elegendő információ. Az eddigi kutatások alapján mindenképpen befolyásoló tényező a gazdaszervezet. Megerősítést nyert továbbá, hogy a *Lasiodiplodia theobromae* faj a leginkább virulens, ezt követi a nagyon virulens *N. luteum*, *N. parvum* és *N. australe*. A *Botryosphaeriaceae* családban a *Botryosphaeria dothidea*, a *D. mutila* (teleomorf: *B.*

stevensii) és a *D. seriata* (teleomorf: *B. obtusa*) fajokat az átmenetileg virulens, míg *D. iberica* és *S. viticola* fajokat a gyengén virulens csoportba lehet sorolni (ÚRBEZ-TORRES, 2011).

A *Diplodia seriata* (anamorf alak) teleomorf alakja a *Botryosphaeria obtusa* a leginkább kozmopolita faj, mert széles hőmérsékleti tartományban (10-40 °C) képes növekedni (PHILLIPS et al., 2007).

A jelenleg rendelkezésre álló, deponált szekvenciák nagy segítséget jelentenek a fajok azonosításában.

2.3.1.2. *Eutypa lata*

Az *Eutypa lata* növénypatogén tömlősgomba (JAKUCS-VAJNA, 2003). Az *Eutypa lata* másodlagos anyagcsere termékeket, főleg acetilént, továbbá heterociklusos vegyületeket is termel. Az *E. lata* által kiválasztott anyag az eutypin 1,4- hidroxil-3-(3- metil-but- 3-én -1 - inil)-benzaldehyd. (BERTSCH et al., 2012, ANDOLFI et al., 2011). Az eutypin gyenge sav jelleget és lipofil tulajdonságot mutat. A toxin növényi sejtekbe általában passzív diffúzió segítségével hatol be és hajlamos a citoplazmában felhalmozódni (AMBORABE et al., 2001). Az eutypin csökkenti az ADP/O arányt. A tőkék keresztmetszeténél a V-alakú elhalást okozza (1. f. kép) (ANDOLFI et al., 2011).

2.3.1.3. *Esca betegség kialakításában résztvevő aszkuszos kórokozó gombák*

Az **esca** betegség kialakításában részt vehetnek aszkuszos és bazídiomos gombák is (BERTSCH et al., 2012). Az Ascomycota (tömlős gombák) törzsébe tartozó *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeomoniella chlamydospora* ritkábban vesz részt az esca betegség kialakításában, mint a bazídiomos *Fomitiporia mediterranea* (FISCHER-KASSEMEYER, 2003). A *Phaeomoniella chlamydospora* által termelt antocianin okozza a levelek tigriscsíkoságát (ANDOLFI et al., 2011). Európában már évek óta izolált fajok (SANTOS et al., 2006).

Tizenhárom *Phaeoacremonium* fajt izoláltak már a szőlőről. Ezek a Petri-kór és az esca kialakításában is részt vesznek. Az 1-5 éves szőlőtőkékénél szignifikáns a szőlőtőkék pusztulási aránya (ESSAKHI et al., 2008).

2.3.1.4. A tőkeelhalásban szerepet játszó bazídiumos gombák

A bazídiumos gombák közé körülbelül húszezer faj tartozik. A gombarendszertanban külön törzset alkotnak. Közös jellemzőik közül egyik legfontosabb az egysejtű, haploid bazidiospórák lefűződési helye, az egy vagy többsejtű bazídium. A bazidiospórák az ivaros folyamatban képződő ivaros spóraalakok. A bazídiumos gombák vegetatív tenyésztése a dikariotikus micélium, melyeknek a hifái harántfalakkal kétsejtmagvú sejtekre tagolódnak (JAKUCS-VAJNA, 2003). A szőlő tőkeelhalásában részt vevő bazídiumos gombák közül legfontosabb a *Fomitiporia mediterranea*.

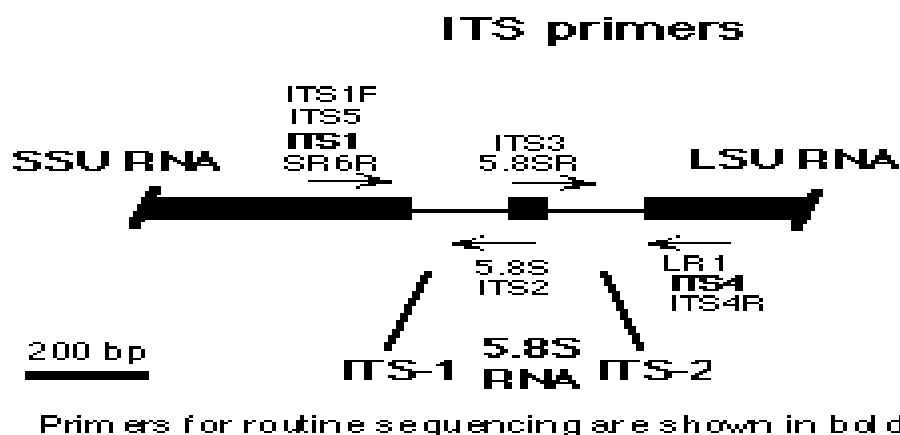
Az **esca** betegség (fehér rothadás) kialakításában résztvevő bazídiumos kórokozó gomba a *Fomitiporia mediterranea*, a *Phaeoacremonium aleophilum* és a *Phaeomoniella chlamydospora* (BERTSCH et al., 2012).

A *Fomitiporia mediterranea* rendszertanilag a *Fomitiporia* nemzetség a *Fungi* országba, *Basidiomycota* törzsbe, *Agricomycetes* osztályba, *Hymenochaetales* rendbe, *Hymenochaetaceae* családba tartozik (I4). FISCHER (2006) korábban *F. punctata* néven azonosított. A micéliumok növekedése 15 és 35 °C között intenzív (FISCHER 2002). Feltűnő termőtesteket növeszt a korhadó farészen.

2.4. Molekuláris populációgenetikai elemzésekhez alkalmas markerek (ITS 1-2)

Az ITS régió a manapság a leggyakrabban vizsgált DNS régió a gombákban. A fajok rendszertani besorolása és azonosítása céljából az egyik leghasznosabb régió (Schoch et al. 2012). A leggyakrabban használt standard ITS-primerek közé tartozik a WHITE et al. (1990) által leírt ITS4 és az ITS5 primerek, melyek az aszkuszos gombák mindegyikénél használhatóak. Univerzálisak, a riboszómális és a DNS-t kódoló génklaszter az ITS1 és ITS2 régiója is felszaporítható segítségükkel a PCR reakciókban.

KENDALL-RYGIEWICZ (2005) munkájukban olyan hatékony PCR primereket kerestek, melyekkel el lehet különíteni az *Ascomycetes* és a *Basidiomycetes* törzsekbe tartozó fajokat. Arra a következtetésre jutottak, hogy az ITS1-F/NLB3 primerpárok segítségével könnyebb a tömlős és a bazídiumos gombák elkülönítése.



1. ábra: Az ITS1 és ITS 2 szakaszokat tartalmazó rDNS régió és az alkalmazott ITS4 és ITS5 primerek

Forrás: WHITE et al. (1990)

Az **1. ábrán** ITS1 és az ITS2 szakaszokat tartalmazó riboszómális DNS régió látható, melyet az ITS4 és ITS5 primerek segítségével amplifikáltunk.

2.5. PCR-reakció

A PCR (Polimeráz láncreakció) technika a DNS-szál egy adott szakaszának *in vitro* körülmények közötti megsokszorozását (amplifikációját) jelenti. A klasszikus PCR reakció folyamán a felszaporítani kívánt célszekvencia mennyisége ciklusonként exponenciálisan növekszik.

Khorana 1971-ben már értelmezte a reakciót, de 1983-ban Kary Mullis dolgozta ki a módszert. 1993-ban ezért a tevékenységéért Kémiai Nobel Díjat kapott. Manapság a kutatólaboratóriumokban, már nélkülözhetetlen eszközzé vált (DOMBRÁDI et al., 2004).

A klasszikus PCR-reakcióban a célszekvenciát tartalmazó templát-DNS-en kívül, szükség van kettő, a célszakaszt határoló specifikus oligonukleotid (Forward és Reverse) primerre, hőstabil polimerázra (pl. Taq-polimeráz), a DNS építőelemeire (dNTP-k) valamint a polimerizációs reakció számára optimális közegre (puffer). A reakció három, eltérő hőmérsékletű lépésből áll. Első lépése a denaturáció folyamata, mely során a DNS két szála magas (90-95 °C) hőmérséklet hatására kettéválik. A következő lépésben, az anelláció során, az oligonukleotid primerek bekötődnek a célszekvenciát határoló komplementer DNS szakaszokhoz. Ez a folyamat általában 50-60 °C-os hőmérsékleten játszódik le. Ezt követően,

a harmadik lépésben a DNS polimeráz segítségével megsztetizálódik a célszekvenciával megegyező DNS rész. Ez a DNS-polimeráz számára optimális hőmérsékleten, általában 72 °C-on játszódik le. Leggyakrabban a Taq polimeráz enzimet alkalmazzák a PCR reakciókban, mely a *Thermus aquaticus* baktériumból származó, magas hőmérsékleten sem inaktíváló polimeráz (DOMBRÁDI et al., 2004).

2.6. Bioinformatikai analízis

A genetikai adatok elérésére többféle adatbázis áll már manapság rendelkezésre, melyek a fajok azonosításának nélkülözhetetlen eszközei. A genetikai kapcsolatok, variációk megértését és feltárását szolgálja a nukleotid adatbázis. Az 1960-as években Margaret Dayhoff és kollégái kezdtek gyűjteni információkat a fehérjék szekvenciáiról és struktúrájukról (POSADA, 2009). Az első nukleotid adatbázis az EMBL és a NIH (NCBI elődje) voltak. Ezek az adatbázisok genetikai információkat, besorolásokat, képeket és információkat tartalmaznak a genombeli helyről (locus), illetve, hogy hol (milyen élőlényben vagy kivonatban) találták meg az adott szekvenciát.

Adott szekvenciához hasonló, az adatbázisban található szekvenciákat blasztolással kereshetünk az adatbázisokból. A blasztoláshoz úgynevezett FASTA formátumban kell lennie a szekvenciának (I6). A szekvenciák összerendezését többféle szoftverrel, például a *Clustal X* (HIGGINS-SHARP, 1988) segítségével lehet elvégezni. Széles körben alkalmazott bioinformatikai módszer a molekuláris biológiai vizsgálatokban. Segítséget nyújthat a törzsfák készítésében is. A szekvenciák összerendezését lehetővé tevő program tulajdonképpen egy többszörös szekvencia szerkesztő program. A szekvenciák hétféle formátumban szerepeltethetők (CHENNA et al., 2003). Mi a FASTA formátumot alkalmazzuk az összerendezéskor bemeneti formátumként.

A szekvenciák első, számítógépes, adott algoritmusok szerint (pl. *Clustal-X* programmal) végzett összerendezése után általában szükséges az összerendezés (alignement) pontosítása. Ezt elvégezhetjük például a GeneDoc szekvencia szerkesztő program, segítségével. A program ingyenesen hozzáférhető a <http://www.psc.edu/biomed/genedoc> honlapon. A pontos összerendezés az alapja az egyes szekvenciák közötti filogenetikai kapcsolatok feltárásának, melyet törzsfákkal jelenítünk meg.

A MEGA egy olyan integrált szoftver, mely segítségével filogenetikai fákat lehet készíteni. A fajok egymáshoz való közelségét jelöli az evolúciós változás során (TAMURA et al., 2011). A program az alábbi honlapról ingyenesen letölthető: <http://megasoftware.net/>.

2.7. DNS szekvenálás

A szekvencia analízis széles körben használt módszer az élőlények közötti filogenetikai kapcsolatok felderítésére. A szekvencia-elemzés első feltétele, hogy elegendő mennyiségű tiszta DNS-preparátum legyen, melyből a szekvenáltatást követően a vizsgálni kívánt szekvencia valamilyen fájl formájában jelen lesz a számítógépünkön. Fajok elkülönítésekor általában egy adott DNS szakaszt szaporítunk fel PCR segítségével, majd az amplifikált DNS fragmentumot szekvenáljuk vagy szekvenáltatjuk, és a szekvencia adatbázisban deponált szekvenciákkal hasonlítjuk össze.

A DNS szekvenáltatás során célunk a nukleotid sorrend megállapítása. Korábban csak az RNS meghatározására dolgoztak ki módszereket, de 1977-ben két, új DNS szekvenáltatási módszert határoztak meg. Ezek a módszerek a Maxim-Gilbert-féle kémiai eljárás és a Sanger-féle lánctermináláson alapuló eljárás.

A Maxim-Gilbert módszernél bázismódosítást hajtanak végre speciális kémiai eljárás segítségével, majd a módosított bázis mellett található foszfodiészter kötést hasítják (DOMBRÁDI, 2004). Az azonosítást poliakrilamid gélelektroforézis segítségével lehet megoldani.

A Sanger-féle lánctermináláson alapuló enzimatikus szekvenálás lényege, hogy megállítja a DNS szintézisét adott bázisnál és enzimesen szintetizálja a DNS-t.

A szekvencia analízis előnye, hogy a különböző laboratóriumokból származó eredmények azonnal összehasonlíthatóak, mivel a szekvenciákat elektronikus adatbázisokban helyezik el (pl.: GenBank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory)).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti beállítások

Az elhalt, kitermelt tőkét a Tokaji Borvidék Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet munkatársai gyűjtötték be két területről: Dorgó dűlő (1. terület - Mezőzombor határában) és Szemere dűlő (2. terület – Mád határában). A 20 elpusztult tőkét, február végén vágták ki, és szállították a laboratóriumba, a betegség jelenlétének igazolása és a kórokozó gombák identifikálása céljából. Ezen felül további 209 minta érkezett be Tarcáról (3. terület – Bakonyi dűlő) a vegetációs időszakban, amiből 95 minta feldolgozását végeztük el eddig.

3.2. Mintaelőkészítés és mikrobiológiai vizsgálatok

A minták előkészítését és a mikrobiológiai vizsgálatokat ABREO et al. (2013) leírása alapján végeztük el.

Az első lépés a minta beérkezése után a minta fotózása volt. A betegség jól látható volt a beérkező mintákon, melynek minden betegség/kórokozó (csoport) esetén más-más jellegzetes alakja lehet. Ezután következett a minta levágása a tőkéről, mely lépésnél fontos volt, hogy (a külső fertőzöttség csökkentése érdekében) az első szeletkét eldobjuk, majd a másodikat helyeztük steril Falcon-csőbe, melyen a mintaszámot minden esetben feltüntettük. Itt végeztük el a minták Neomagnolos fertőtlenítését, amikor a tőke felületén lévő mikrobákat távolítottuk el, hogy csak az endogén gombákat izoláljuk. A mintákra a Falcon-csőbe 20-25 ml 10 %-os Neomagnolos oldatot öntöttünk, majd 10 percig áztattuk. Ezt követően a mintákat kétszer mostuk steril desztillált vízzel. A mosások után steril, Petri-csészében levő PDA (Scharlau) táptalajra helyezzük a tőkedarabot.

Az izolátumok inkubálása 25 °C-on történt. A tiszta tenyészet készítéséhez az átoltásokat a micéliumok kifejlődése után (1-3 nap) végeztük, szintén PDA-táptalajra.

Az izolátumok fenntartása PDA ferde agaron történt. A törzseket havonta átoltottuk. A mintákat ferde agaron, 4 °C-on tároltuk.

3.3. Molekuláris vizsgálatok

3.3.1. Izolátumok felszaporítása, izolálása, futtatása

A DNS izoláláshoz az izolátumokat burgonya-dextróz folyékony kultúrában (20 ml) növesztettük szobahőmérsékleten, rázógép segítségével 3 napon át 130 rpm-en.

A feltárás előtt a mintát speciális szűrőkendő, *Miracloth* (Merck) segítségével leszűrtük, majd desztillált vízzel kétszer átmoszuk a mintát. A mosás után sima szűrőpapírra ráhelyeztük a gomba micéliumot és a sejtfeltárást -20°C -on tároltuk.

A gombasejtek feltárását folyékony nitrogénben, dörzsmozsárban végeztük.

A DNS kinyeréséhez *NucleoSpin® Plant II* (MACHEREY-NAGEL) kitet alkalmaztunk a gyártó leírása szerint (**1. függelék**).

Az izolált DNS-t 0,8 %-os agaróz gélben (TAE pufferrel) futtattuk.

3.3.2. PCR reakció az ITS amplifikációjához

A PCR reakció kivitelezéséhez *MyGenie 96 Thermal Block* (Bioneer, Korea) gradiens PCR készüléket alkalmaztunk. Az ITS1 és ITS2 szakaszokat tartalmazó riboszómális DNS régiót ITS4 és ITS5 primerek (White et al, 1990) segítségével amplifikáltuk. A PCR reakcióban GoTaq Green Master polimerázt (Promega) használtunk. A PCR reakciót 25 μl térfogatban végeztük el, amely 12,5 μl GoTaq Green Master polimeráz enzimet (Promega), 0,4-0,4 nmol/ μl ITS4 és ITS5 (IBA, Germany) primereket, valamint a 12-50 ng templát DNS-t tartalmazott. A gradiens PCR program 12 lépésből állt. Az első denaturáció 95°C -on, 5 percig tartott, majd ötször ismétlődött a denaturáció 95°C -on, 1 percig, az anelláció: 58°C -on, 1 percig, végül a polimerizáció: 72°C -on, 1 perc 30 másodpercig. A GoTaq Green Master magas hőmérséklet hatására viszonylag gyorsan inaktiválódik, ezért a reakció kezdeti ciklusaiban alkalmazott 95°C denaturációs hőmérsékletet az ötödik ciklus után 90°C -ra csökkentettük, a többi körülményt pedig változatlanul hagyva harmincszor ismételtük a PCR ciklus lépéseit. A reakciót 72°C -on, 15 percig tartó polimerizáció zárta.

3.3.3. *A szekvenáltatás előkészítése (PCR termék tisztítása, koncentrációjának meghatározása)*

A PCR termék tisztítását *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel) segítségével, a gyártó leírása alapján végeztük (**2. függelék**).

A minták DNS koncentrációját *Nanodrop 2000* készülék (Thermo Scientific, USA) segítségével határoztuk meg 2 µl térfogatú izolált DNS-oldatból. A koncentráció arányában hígítottuk a beküldéshez szükséges mintákat.

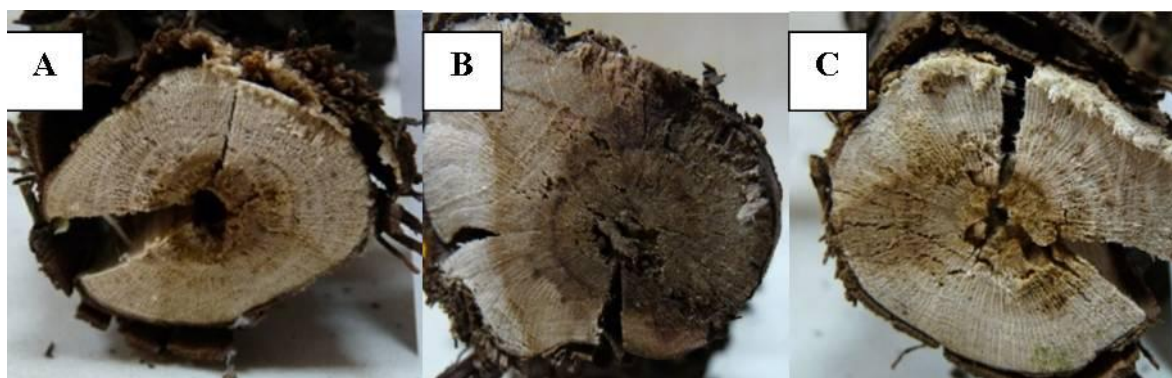
3.3.4. *A szekvenciák bioinformatikai analízise*

Az izolátumok taxonómiai besorolását a szekvenciák adatbázisba blasztolásával határoztuk meg. A *Boryosphaeriaceae* családba tartozó minták szekvenciáit a típustörzsek deponált ITS szekvenciáival is összehasonlítottuk. A szekvenciákat Clustal X program segítségével rendeztük össze. A törzsfát a MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011) programmal készítettük.

4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE

4.1. A fás részeken látható tőkeelhalás tünetei

A fás részeken jól látható nekrotikus részekkel jelentkező elhalások voltak megfigyelhetők (3. kép).



3. kép: Nekrotikus elhalások a szőlő fás részein

Forrás: Saját felvétel

A: 2/4 szőlőtőke keresztmetszeti képe, **B:** 2/5 szőlőtőke keresztmetszeti képe,

C: 2/7 szőlőtőke keresztmetszeti képe

4.2. Telepmorfológia alapján beazonosított izolátumok

Eddigi telepmorfológiai vizsgálatunk során találtunk egyértelműen a *Botryosphaeria*nak látszó, de ettől eltérő telepmorfológiát mutató fajokat is. A telepek alapján jól elkülöníthető volt a *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) az *Alternaria* sp., a *Fusarium* sp., a *Phomopsis* sp., valamint az *Epicoccum nigrum* (syn: *Epicoccum purpurascens*) fajok.

A telepmorfológia alapján az elhalt minták nagy részéből (80 %) kimutatható volt a szőlő tőkeelhalásában szerepet játszó *Botryosphaeria* csoportba tartozó gomba a telepmorfológia alapján. A minták negyedéből több mint egy féle endofita gomba jelenlétét tudtuk kimutatni.

Ebben a fejezetben ismertetem ezen fajok morfológiai jellegzetességeit, valamint a spóráképzését és a spóráknak az alakját is.

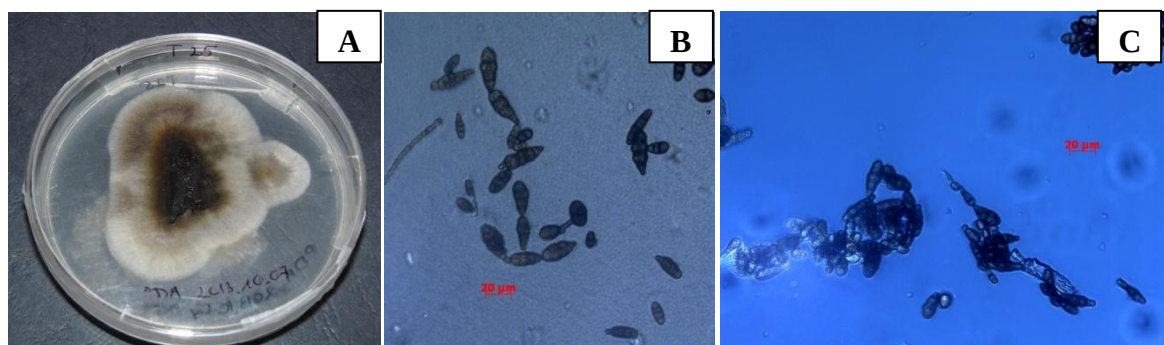
A *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) egy gyorsan növekvő, légmicéliumot képező, sötét pigmentet termelő faj. A spórái oválisak, sötétbarna színűek, néhányuk szeptált (ARZANLOU-DOKHANCHI, 2012).



4. kép: A *Diplodia seriata* Burgonya-dextróz agaron

Forrás: Kovács Csilla felvétele

A **4. képen** a T29 izolátum *Diplodia seriata*-nak azonosított fajt láthatjuk PDA-agaron. A kórokozó gomba ezen a képen 10 napos és már jól láthatóak a képzett légmicéliumok. *Alternaria* genusba sorolható fajokat is azonosítottunk. Telepeik gyorsan nő, fekete vagy olajzöld-szürkés színűek. A spórái elágazó láncokban kapcsolódnak egymáshoz, melyek harántfalakkal tagoltak és a kötözött sonkához hasonló alakot mutatnak.



5. kép: *Alternaria alternata*

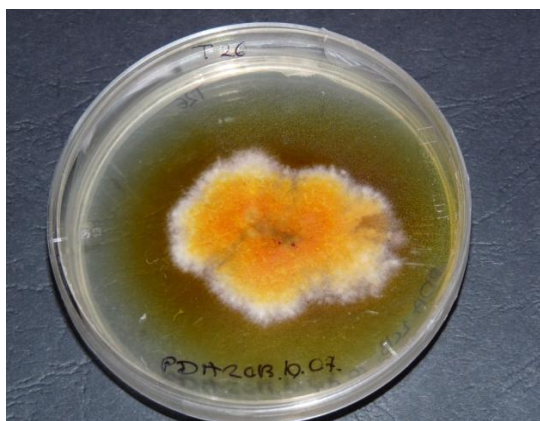
A: *Alternaria alternata* telep Burgonya-dextróz táptalajon, **B és C:** *Alternaria* spórák mikroszkópi képe

Forrás: Kovács Csilla és Dr. Karaffa Erzsébet felvétele

Az **5. képen (A kép)** a T25 izolátum *Alternaria* sp. faja látható PDA-agaron. A sötét színű telepeket megfigyelhetjük a képen, a tenyészet 10 napos volt a kép készítésekor. A másik két

képen a spórái láthatók, melyet fénymikroszkóppal készítettünk. Jól látható (**B és C képek**) a spórák láncokba kapcsolódása (ROTEM, 1994).

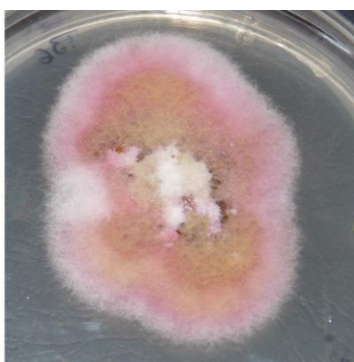
Izolátumaink telepmorfológiai analízise során *Epicoccum* nemzetségbe tartozó fajokat is sikerült beazonosítanunk. Ezen fajokra is a gyorsan növekvő pelyhes telepek képzése jellemző, valamint erős narancssárga színű pigmentet termelnek, mely a PDA táptalajon jól látható. A konídiumok nem speciálisak, enyhén pigmentált konidiofórok láthatóak rajta. A konídiumok gömb alakúak, 5-25 µm átmérőjűek. A **6. képen** 10 napos fajt (T26 izolátum) láthatunk PDA táptalajon. Jól megfigyelhető a pigment termelés (I5).



6. kép: *Epicoccum nigrum* telep Burgonya-dextróz táptalajon

Forrás: Kovács Csilla felvétele

Néhány tenyészetünk a *Fusarium tricinctum* fajként lett azonosítva az ITS szekvenciák alapján. A *Fusarium*ok fehérés színű telepeket képeznek, vörös színű pigmentet termelnek, bőséges mikrokonídium termelő fajok. A makrokonídiumokra a sarló alak jellemző (CARRIERI et al., 2012). A **7. képen** a T36 izolátumról azonosított 10 napos *Fusarium tricinctum* fajt láthatunk PDA-táptalajon. Jól látható a termelt vöröses-rózsaszínes pigment.



7. kép: *Fusarium tricinctum* telep Burgonya-dextróz táptalajon

Forrás: Kovács Csilla felvétele

A vizsgált 44 izolátumból csupán egy izolátum (T42) volt a *Phomopsis* genusba sorolható. Az izolátum pelyhes, sima krém-fehér, bézs-barna telepeket képez. A törzseket növekedési gyűrű jellemzi, és fekete piknídiumokat képez, melyek 12-17 napos inkubáció után jelennek meg. Utána krémszerű cseppeket tartalmazó spórákat kezd termelni. A spórái átlátszóak, oválisak, az α -spórák a fajoknál különbözőek lehetnek (KRÓL, 2005). A **8. képen** a T42 izolátumot láthatjuk PDA-agaron 10 naposan, a telepképzése során a gyűrűs mintázatú növekedés jól látható a képen.



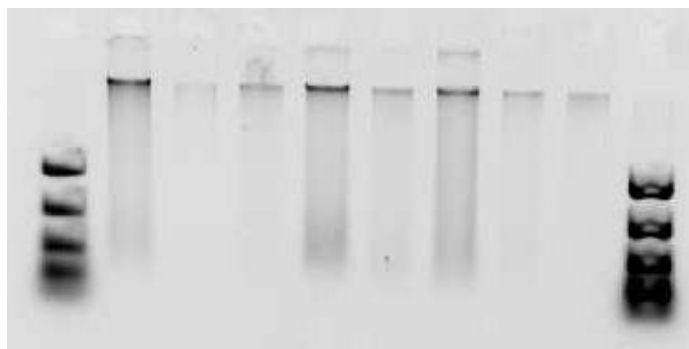
8. kép: *Phomopsis mali* a PDA-agaron

Forrás: Kovács Csilla felvétele

4.3. A gombák molekuláris identifikálása

4.3.1. A DNS izolálása

Eddig 148 gombából izoláltunk DNS-t. Az izolált DNS-ek koncentrációja 1280 ng/ml között volt a nanodroppal történt mérések alapján. Az izolált DNS nem tartalmazott RNS-t, és a töredezettség mértéke sem volt jelentős (**9. kép**).

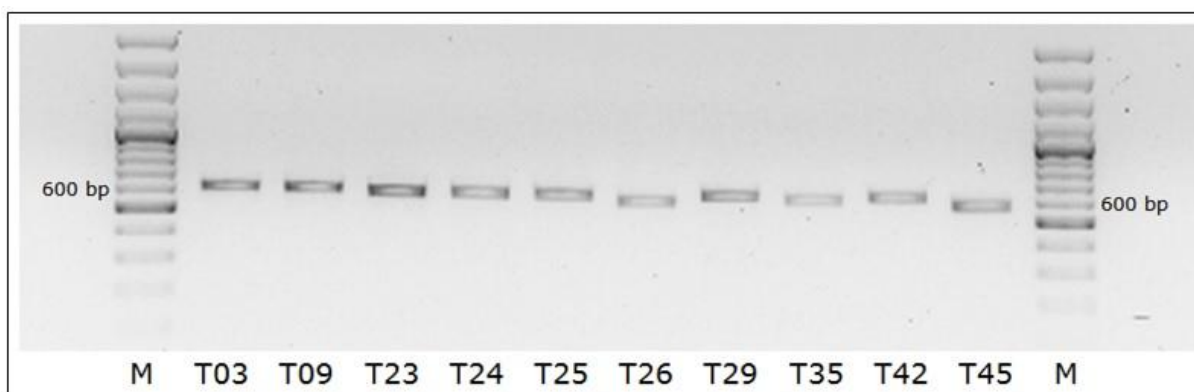


9. kép: A gomba izolátumok DNS-ének futtatása 0,8%-os agaróz gélben

Első és utolsó sáv: DNS marker (FastRuler High Range DNA Ladder, Fermentas). Többi sáv balról jobbra: T11-18 mintákból izolált DNS)

4.3.2. A PCR termék ellenőrzése gélelektroforézissel

A PCR reakció során kapott ITS régiókat is tartalmazó rDNS fragment nagysága körülbelül 600 bázispár volt. A látható különbségek a futtatás során az egyes izolátumok ITS régiójának szekvenciahossz különbségeket jelezték. Ezek az eltérések más-más fajokat jelenthetnek. A gélképen néhány izolátum ITS1 és ITS2 szakaszait is tartalmazó rDNS régiójának agaróz gélelektroforézis képét mutatja (**10. kép**).



10. kép: Néhány szőlőtőkéről származó endofita gomba ITS1 és ITS2 szakaszait is tartalmazó rDNS fragmentum agaróz (1, 5%) gélelektroforézis képe.

M: *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas), T03-T45: szőlőtőkéből izolált endofita gombák izolátum száma

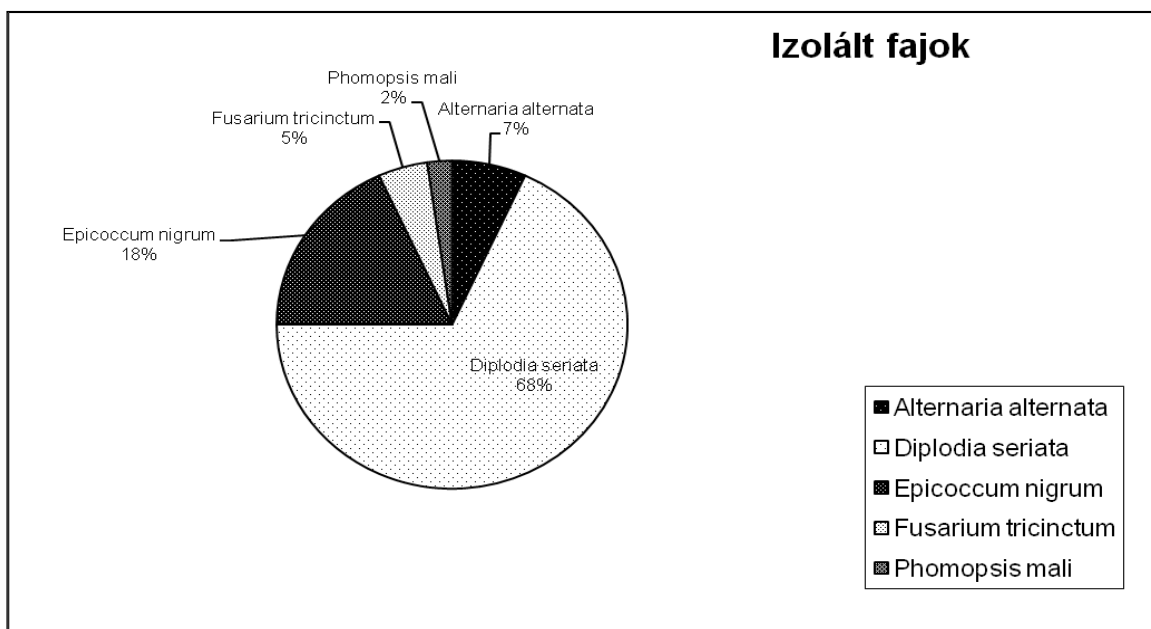
Az M (létra) a felvitt markert jelöli, mely PCR termék futtatása esetén 100 bázispár nagyságú *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* fajsúlynövelő markert alkalmaztunk (3 µl). A létra a DNS fragment nagyságának ellenőrzésére alkalmas. A 6X-os *Orange Loading Dye* a minta futás közbeni nyomonkövetését és a zsebek telítését segíti, mert festéket tartalmaz és fajsúlynövelő. A mintához a 6X-os töménységű *Loading Dye*t kihígítottuk. A zsebekbe 6µl mennyiség került (1 µl minta, 4µl nukleázmentes víz és 1µl *Loading Dye*).

Az öt faj, melyet elkülönítettünk a *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) (T03, T09, T29), az *Epicoccum nigrum* (T26, T45), a *Phomopsis mali* (T42), a *Fusarium tricinatum* (T35) és az *Alternaria alternata* (T23, T24, T25) volt.

4.4. Gombák azonosítása az ITS régiók szekvenciája alapján

A gombák azonosítását a gombáknál legelterjedtebben használt molekuláris marker, az ITS régiók szekvenciái (SCHOCH et al., 2012) alapján végeztük el. A húsz mintából kitenyésztett gombák közül összesen 44 izolátum ITS régióját tartalmazó rDNS szekvenciáját sikerült eddig meghatározni. A szekvenciák adatbázisba blasztolása után öt csoportot tudtunk meghatározni. Az izolátumok többsége (66%) *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) volt. Ezen kívül *Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium* és *Phomopsis* gombák voltak beazonosíthatóak. A morfológiai azonosítás során az izolátumok családokba és nemzetségekbe való besorolását tudtuk eldönteni. A táblázatban referenciaként feltüntettük azokat az ID számokat, melyek leközölt törzsgyűjteményből származó izolátumokat jelölnek, morfológiailag is megfelelőképpen identifikáltak, illetve referencia törzsek (**1. és 2. táblázat**). Az izolátumaink szekvenciái a **3. függelékben** találhatóak. Az összerendezés eredményeit a **4. függelék** mutatja.

A **3. ábrán** láthatjuk a két tökekötegből izolált fajok megoszlását. Megfigyelhető, hogy a legnagyobb arányban a *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) fajok vannak (68 %).



3. ábra: A tökekötegekből izolált fajok megoszlása

Az **1. táblázat**ban az 1. területről (Dorgó-dűlő) származó mintáinkból kitenyészett izolátumok telepmorfológia és ITS szekvenciájuk alapján történő besorolását láthatjuk.

1. táblázat: Az 1. területről származó telepmorfológia és ITS szekvencia alapján beazonosított izolátumok

Tőke száma	Izolátumok kódja	Besorolás morfológia alapján	Besorolás ITS szekvencia alapján	Referenciatörzsek deponált szekvenciáinak génbanki azonosító száma
1. terület				
1/1	T01	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T04			
	T03			
	T08			
1/2	T24	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>	AY625056, HQ263343
1/3	T25	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>	AY625056, HQ263343
	T26	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	GU014946, GU014950
1/4	T27	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T28			
1/5	T29	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
1/6	T31	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T45	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	GU014946, GU014950
	T46	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
1/7	T32	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T33	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	GU014946, GU014950
1/8	T35	<i>Gibberella</i>	<i>Fusarium tricinctum</i>	AB587028
	T36	<i>Gibberella</i>	<i>Fusarium tricinctum</i>	AB587028
	T37	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
1/9	T38	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>	AY625056, HQ263343
1/10	T40	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T41	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	GU014946, GU014950
	T47	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	GU014946, GU014950
	T48	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892

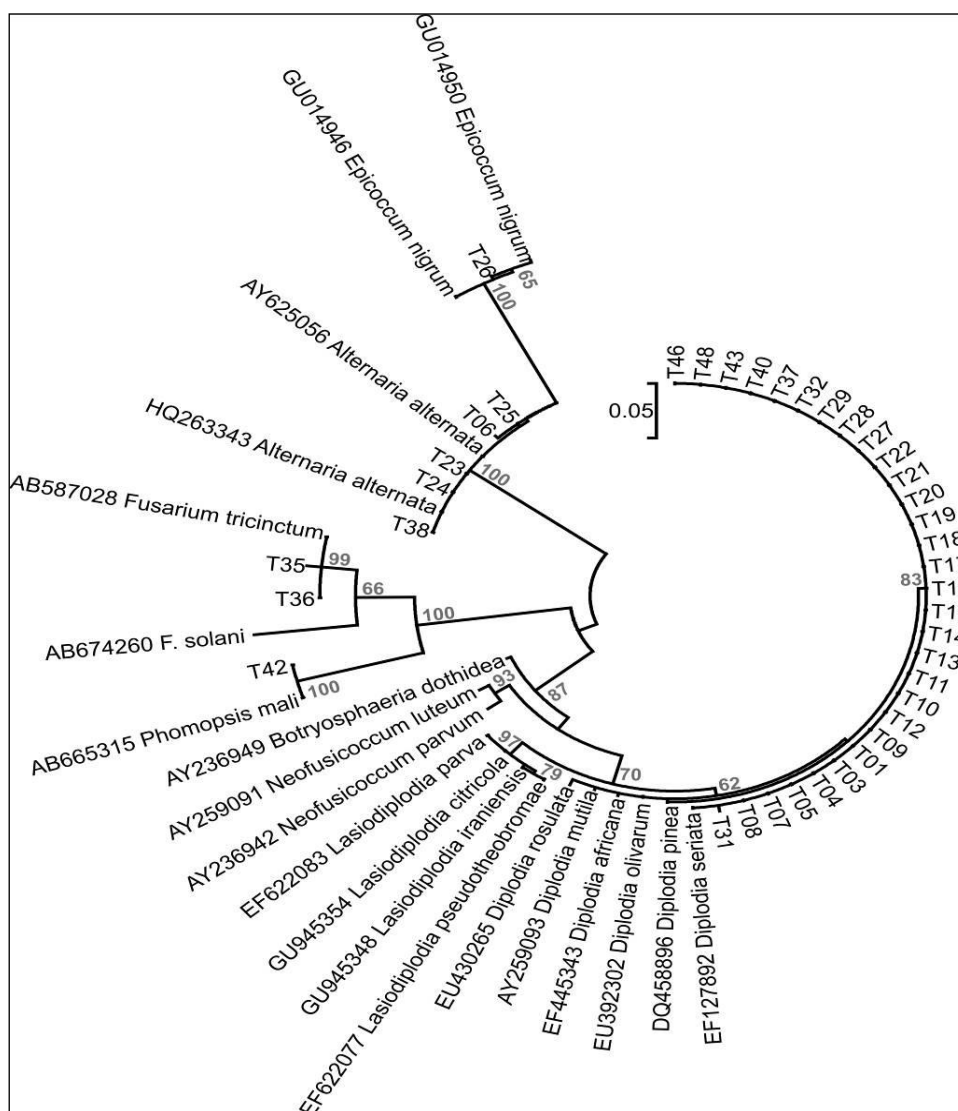
A **2. táblázat**ban a 2 területről (Szemere-dűlő) származó mintáinkból kitenyészett izolátumok telepmorfológia és ITS szekvenciájuk alapján történő besorolásuk található.

2. táblázat: A 2. területről származó telepmorfológia és ITS szekvencia alapján beazonosított izolátumok

Tőke száma	Izolátumok kódja	Besorolás morfológia alapján	Besorolás ITS szekvencia alapján	Referenciatörzsek deponált szekvenciáinak génbanki azonosító száma
2. terület				
2/1	T05	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T06		<i>Epicoccum nigrum</i>	GU014946, GU014950
	T07		<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
2/2	T09	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T10			
	T11			
2/3	T12	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T13			
2/4	T14	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
2/5	T15	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
2/6	T16	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
2/7	T17	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T18			
2/8	T19	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T42	<i>Phomopsis</i>	<i>Phomopsis mali</i>	AB665315
	T43	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T44	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	GU014946, GU014950
2/9	T20	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T21			
2/10	T22	<i>Botryosphaeriaceae</i>	<i>Diplodia seriata</i>	EF127892
	T23	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>	AY625056, HQ263343

A **4. ábrán** az elhalt szőlőtőkéről izolált gombák riboszómális DNS régiójának szekvenciája alapján beazonosított izolátumokat láthatjuk, melyet a „Maximum Likelihood” módszerrel szerkesztett törzsfá szemléltet. Az elemzést a MEGA 5 programmal (TAMURA et al., 2011) végeztük. A törzsfát azért készítettünk, hogy vizuálisan szemléltessük az eltérő

taxonómiai csoportokat. Továbbá az is jól látszik, hogy a *Botryosphaeriák*on belül a *Diplodia seriata*-hoz (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) állnak legközelebb az izolátumok.

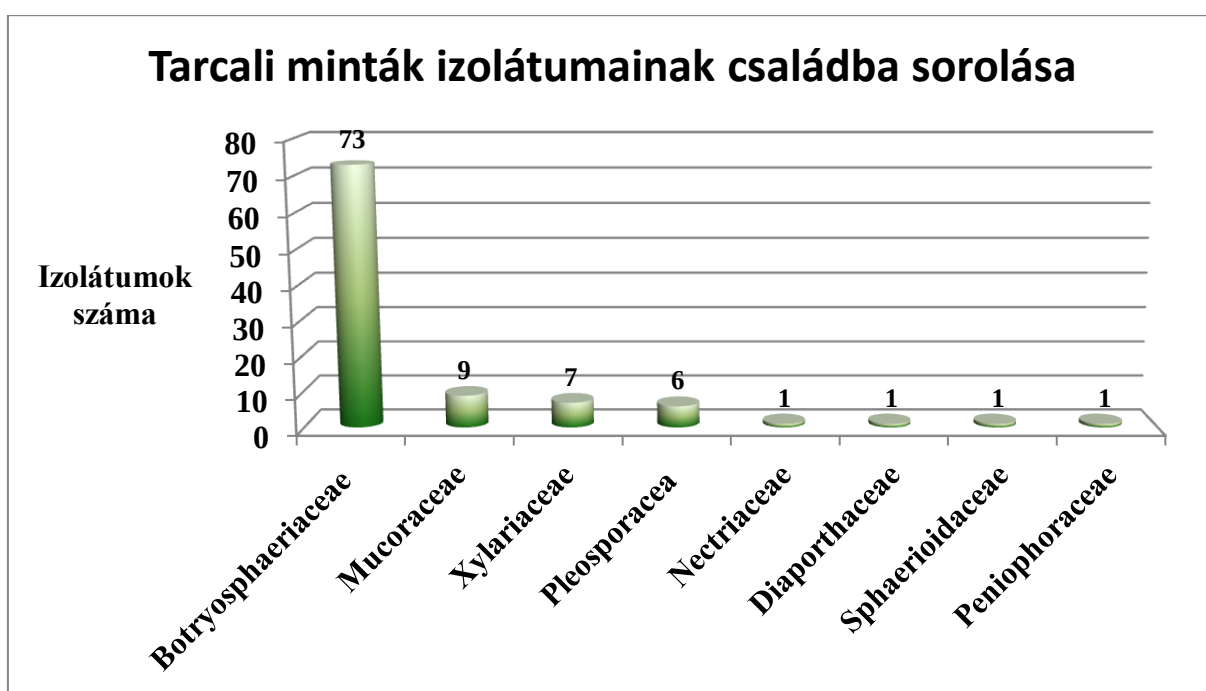


4. ábra: Az elhalt szőlőtőkéről izolált gombák riboszómális DNS ITS régiójának szekvenciája alapján, „Maximum Likelihood” módszerrel szerkesztett törzsfá.

T01-T48: az elhalt tőkéből származó izolátumok. Az elágazások hossza arányos a nukleotid eltérések számával, a skála felül, középen található. Az elágazások melletti szürke szám a bootstrap analízis (1000 ismétlés) eredményét mutatja (Csak az 50%-nál nagyobb értékeket jelöltük).

A tarcali területről származó minták izolátumai közül a fajok 8 családba voltak sorolhatóak. A *Botryosphaeriaceae* családba tartozók fordultak elő a legnagyobb arányban (73 faj), melyből 66 izolátumot *Diplodia seriata*-nak (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*)

azonosítottunk. *Botryosphaeria stevensii* (anamorf: *Diplodia mutila*) 6 izolátumból lett azonosítva. A *Nectriaceae* családból csak egy *Gibberella zeae* (anamorf: *Fusarium graminearum*) fajt találtunk. A *Diaporthaceae* családból egy *Phomopsis* volt kimutatható. A *Sphaerioidaceae* családból egy *Phoma*-t találtunk. A *Pleosporaceae* családba tartozó fajok közül 2 *Alternaria alternatát*, 3 egyéb *Alternaria* fajt és egy *Epicoccum nigrum* (syn: *Epicoccum purpurascens*) fajt azonosítottuk. A *Peniophoraceae* családból is előfordult egy faj. 9 *Mucor ramosissimust* is azonosítottunk a *Mucoraceae* családból. A *Xylariaceae* családba tartozó *Xylaria*-t 4 izolátum, míg egyéb családba tartozó fajt 3 izolátum esetén találtunk (5. ábra).



5. ábra: A fás szövetekből izolált különböző endofita gombák családokba sorolása

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A Tokaji borvidékről begyűjtött, elhalt tőkék mindegyikéből sikerült endofita gombákat kitenyészteni. Az izolátumok között döntő többségében a *Botryosphaeriaceae* családba tartozó gombák voltak kimutathatóak a tenyészetek morfológiai vizsgálata alapján. Az rDNS régió alapján történt molekuláris azonosítás megerősítette, hogy ezek a minták *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) fajhoz tartoznak, mely a tőkeelhalásban szerepet játszó gombaként tartanak számon.

A többi, ITS szekvencia alapján beazonosított izolátumot is leírták már a szőlőtőkéről (BERTSCH et al., 2012). Ezek közül az *Epicoccum nigrum* (syn: *Epicoccum purpurascens*), és az *Alternaria alternata* esetében más patogénekkal szembeni antagonista hatást is leírtak a szőlő esetében (KORTEKAMP, 1997; MUSETTI et al., 2006).

A morfológiai és molekuláris vizsgálatok során voltak olyan izolátumok, melyeket egyértelműen meg lehetett határozni (*Diplodia seriata*), azonban voltak olyan izolátumok is, melyek faj szintű azonosítását nem tudtuk elvégezni a telepmorfológia alapján csak az ITS szekvenciájuk vizsgálata során. Ezeket a tenyészeteket családokba soroltuk a telepképzésük alapján, melyet szakirodalom alapján végeztünk el (Az irodalom a telepmorfológia alapján beazonosított izolátumok fejezetben található.). Az egyértelműen *Botryosphaeriaceae* családba tartozó *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) fajokat típustörzsek deponált szekvenciáival is összehasonlítottuk.

További vizsgálataink során a TEF markerszekvencia alkalmazását, valamint a hagyományos módszerek kibővítését is célul tűztük ki a pontosabb fajazonosítás érdekében.

ÖSSZEFOGLALÁS

A tőkeelhalás napjainkban a szőlőültetvények egyik legsúlyosabb betegsége világszerte, mely a magyarországi szőlőkben is megtalálható. A magyarországi borvidékeken a tőkeelhalás kialakításában szerepet játszó kórokozók előfordulásáról azonban nagyon kevés adat található, a Tokaji borvidéken pedig nincsenek ismereteink arról, hogy jelenleg milyen kórokozók találhatók meg az ültetvényekben.

Kutatómunkánk célja a Tokaji borvidéken észlelt fertőző tőkeelhalás néven összefoglalt egyes betegségtípusok helyzetének felmérése, a helyi szakemberek közreműködésével, továbbá a beteg tőkéből izolálható kórokozók morfológiai és genetikai alapon történő azonosítása.

A vizsgált, elhalt tőkék mindegyikéből sikerült endofita gombákat kitenyészteni. Többféle gombát sikerült azonosítani. Az izolátumok között döntő többségében a *Botryosphaeriaceae* családba tartozó *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) volt kimutatható a tenyészetek morfológiai és az rDNS régió alapján történt molekuláris azonosítása alapján. Egyéb endofita gombákat is izoláltunk a fás szövetekből, például *Alternaria*, *Epicoccum nigrum*, *Gibberella zeae* (anamorf: *Fusarium graminearum*), *Mucor ramosissimus*, *Phoma*, és *Phomopsis* fajokat.

SZAKIRODALOM JEGYZÉK

- ABREO E. – MARTINEZ S. – BETTUCCI L. – LUPO L.: 2013. Characterization of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology*, 42. 241-249 p.
- AMBORABE' B. E. - FLEURAT-LESSARD P. - BONMORT J. - ROUSTAN J. P. – ROBLIN G.: 2001. Effects of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, on plant cell plasma membrane: possible subsequent implication in disease development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39. 1. 51-58 p.
- ANDOLFI A. – MUGNAI L. – LUQUE J. – SURICO G. – CIMMINO A. – EVIDENTE A.: 2011. Phytotoxins Produced by Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases. *Toxins*, 3. 1569-1605 p.
- ARZANLOU M. – DOKHANCHI H.: 2012. Morphological and molecular characterization of *Diplodia seriata*, the causal agent of canker and twig dieback disease on mulberry in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46. 6. 682–694 p.
- BERTSCH C. - RAMÍREZ-SUERO M.- MAGNIN-ROBERT M.- LARIGNON, P.- CHONG, J.- ABOU-MANSOUR E.- SPAGNOLO A.- CLÉMENT C.- FONTAINE F.: 2012. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62. 2. 243-265 p.
- CARRIERI R. – RAIMO F. – PENTANGELO A. – LAHOZ E.: 2012. *Fusarium proliferatum* and *Fusarium tricinctum* as causal agents of pink rot of onion bulbs and the effect of soil solarization combined with compost amendment in controlling their infections in field. *Crop Protection* 43. 31-37 p.
- CHENNA R. – SUGAWARA H. – KOIKE T. – LOPEZ R. – GIBSON T.J. – HIGGINS D. G. – THOMPSON J. D.: 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, 31. No. 13. 3497–3500 p.
- DENMAN S. - CROUS P.W. - TAYLOR J.E. – KANG J. CH. - PASCOE I. - WINGFIELD M.J.: 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a reevaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, 45. 129–140 p.
- DÍAZ G. A. – LATORRE B. A.: 2013. Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection* 46. 106-112 p.

- DOMBRÁDI V.:2004. Molekuláris Biológiai módszerek. Egyetemi jegyzet. DOTE, Debrecen, 284 p.
- DULA B.NÉ.: 2011. Korai szőlőtőke-pusztulást okozó, szaporítóanyaggal terjedő kórokozó gombák. Növényvédelem, 47. 461-468 p.
- DULA B.NÉ.: 2012. Kordonkar-elhalást és korai tőkepusztulást okozó betegségek. In: Diagnosztikai és szőlővédelmi kézikönyv. 2012. Szerk. DULA B.-NÉ - KÜRTI A.- RÁCZ I. Bp. DuPont Magyarország Kft, 76-87 p.
- ESSAKHI S. – MUGNAI L. - CROUS P. W. - GROENEWALD J. Z. - SURICO G.: 2008. Molecular and phenotypic characterisation of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca. Persoonia, 21. 119-134. p.
- FISCHER M.: 2002. A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress*, 1. 315-324 p.
- FISCHER M.: 2006. Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea*, 45. 30–42 p.
- FISCHER M. – KASSEMAYER H.: 2003. Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis*, 42. 3. 109–116 p.
- GRAMAJE D. – ARMENGOL J.: 2010. Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process: Potential Inoculum Sources, Detection, Identification, and Management Strategies. *Plant disease*, 1040-1055 p.
- HIGGINS D. G. - SHARP P. M.: 1988. "CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer". *Gene* 73 (1): 237–244. p.
- SZÉCSI Á. – ÉRSEK T. – VARGA J.: A gombák filogenetikai rendszerezése. In: Mikológia. 2003. Szerk. JAKUCS E.-VAJNA L. Bp. Agroinform Kiadó, 71-132 p.
- KENDALL J. M. RYGIEWITCZ P.T.: 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 11 p.
- KORTEKAMP A.: 1997. *Epicoccum nigrum* LINK: A biological control agent of *Plasmopara viticola* (BERK. et CURT.) BERL. et DE TONI? *Vitis* 36. 4. 215-216 p.
- KÖVICS GY.: 2009. Növénykórtani vademecum. Magyar-angol angol-magyar szakkifejezés szótár. 107. p. NOFKA, Debrecen. 470 p.
- KRÓL E.: 2005. Identification and differentiation of *Phomopsis spp.* isolates from grapevine and some other plant species. University of Agriculture, Department of Plant Pathology, 151-156 p.

- LEHOCZKY J.: 1974. Black dead arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 9. 319–327 p.
- LIMA M. R. M. - MAFALDA L. – FELGUEIRAS – GRACÇA G. – RODRIGUES J. E. A. BARROS A. – GIL ANA M. - DIAS A. C.: 2010. NMR metabolomics of esca disease-affected *Vitis vinifera* cv. Alvarinho leaves. Journal of Experimental Botany, 61. 14. 4033-4042 p.
- LUINI E. – FLEURAT-LESSARD P. – ROSSEAU L. – ROBLIN G. – BERJEAUD J. M. 2010. Inhibitory effects of polypeptides secreted by the grapevine pathogens *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on plant cell activities. Physiological and Molecular Plant Pathology, 74. 5-6. 403-411 p.
- LUQUE J. - MARTOS S. - PHILLIPS A. J. L.: 2005. *Botryosphaeria viticola* sp. nov. on grapevines: a new species with *Dothiorella* anamorph. Mycologia, 97. 1111–21 p.
- MARTOS S. - ANDOLFI A. - LUQUE J. - MUGNAI L. – SURICO G. - EVIDENTE A.: 2008. Production of phytotoxic metabolites by five species of *Botryosphaeriaceae* causing decline on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. European Journal of Plant Pathology, 121. 451–61 p.
- MIKULÁS J.: 2008. Korai tőkeelhalással (Esca) kapcsolatos feladatok szüret környékén. Agroforum: a növényvédők és növénytermesztők havilapja, 19. évf. 10. sz. 42-45 p.
- MUSETTI R.- VECCHIONE A.- STRINGHER L.- BORSELLI S.- ZULINI L.- MARZANI C.- D'AMBROSIO M.- SANITÁ DI TOPPI L.- PERTOT I.: 2006. Inhibition of sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata*. Phytopathology, 96. 689-698 p.
- NICHOLAS, K.B. - NICHOLAS H.B. - Jr.-DEERFIELD, D.W. II.: 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. Embnew. News 4:14 p.
- PHILLIPS A.J.L.: 1998. *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal. Journal of Phytopatology 146. 327-332 p.
- PHILLIPS A.J.L., 2000.: *Botryosphaeria populi* sp. nov. and its *Fusicoccum* anamorph from poplar trees in Portugal. Mycotaxon 91. 1001–1007 p.
- PHILLIPS A.J.L.: 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. Phytopathologia Mediterranea, 41. 3–18 p.
- PHILLIPS - A.J.L. – CROUS P.W. – ALVES A.: 2007. *Diplodia seriata*, the anamorph of „*Botryosphaeria*” *obtusa*. Fungal Diversity, 25, 141-155 p.

- PETIT A.-N. - VAILLANT N. – BOULAY M. – CLÉMENT C. – FONTAINE F.: 2006. Alteration of Photosynthesis in Grapevines Affected by Esca. Ecology and Epidemiology, Phytopatology, 1060-1066 p.
- POSADA D.: 2009. Bioinformatics for DNA Sequence Analysis. Humana Press, 354p.
- RÁBAI A. - MORVAI SZ. – EMBER I. - FISCHL G.: 2005. Szőlő-tőkepusztulás Veszprém megyében. Növényvédelem, 10. 41. sz. 461-466 p.
- RAVAZ L.- VERGE, G.: 1925. Sur une maladie de la vigne, l'excoriose. - C.R. Séanc. Acad. Sci.180. 313-315 p.
- ROTEM J.: 1994. The genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology, and Pathogenicity. 326 p.
- SANTOS C. - FRAGOEIRO S. – OLIVEIRA H. – PHILLIPS A.: 2006. Response of *Vitis vinifera* L. plants inoculated with *Phaeoacremonium angustius* and *Phaeomoniella chlamydospora* to thiabendazole, resveratrol and sodium arsenite. Scientia Horticulturae, 107. 2. 131-136 p.
- SCHOCH C. L. – SEIFERT K.A.. – HUHDORF S. – ROBERT V. –SPOUGE J.L. – LEVESQUE C.A. – CHEN W. – FUNGAL BARCODING CONSORTIUM: 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. PNAS 109: 6241–6246 p
- SCRIBNER F.L. – VIALA P.:1888. Black rot (*Laestadia bidwellii*). United States Department of Agriculture, Botany Division, Vegetable Pathology Bulletin, 7. 1-29 p.
- SLIPPERS B. - CROUS P.W. - DENMAN S. - COUTHINO T.A. - WINGFIELD B.D. - WINGFIELD M.J.: 2004. Combine multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. Mycologia, 96. 83–101 p.
- SURICO G. – MUGNAI L. – L. MARCHI G.: 2006. Older and more recent observations on esca: a critical review. Phytopathologia Mediterranea, 45. 68–86 p.
- TAMURA K.- PETERSON D.- PETERSON N.- STECHER G.- NEI M.- KUMAR S.: 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution, 28. 2731-2739 p.
- TROUILLAS FP - PITT W. M. – SOSNOWSKI M. R. et al., 2011.: Taxonomy and DNA phylogeny of Diatrypaceae associated with *Vitis vinifera* and other woody plants in Australia. Fungal Diversity, 49. 203–223.
- ÚRBEZ-TORRES J.-R.: 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. Phytopatology Mediterranea, 5-45 p.

- VARGA Z.: 2009. *Vitis* fajok és fajták tőkepusztulásának összehasonlító vizsgálata és a védekezés lehetőségei. PhD dolgozat. 113 p.
- WHITE T. J. - T. BRUNS S. LEE - J. W. TAYLOR.: 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In:PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York. 315-322 p.
- WOO P.C.Y. - LAU S.K.P. - NGAN A.H.Y. - TSE H. - TUNG E.T.K - YUEN. K.Y. 2008.: *Lasiodiplodia theobromae* pneumonia in a liver transplant recipient. Journal of Clinical Microbiology, 46. 380–384 p.
- ZHOU S. - STANOSZ G.R.: 2001. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analysis of ITS and 5.8S rDNA sequences. Mycologia, 93. 516–527 p.

Internetes hivatkozások:

- I1:http://www.lelleujsag.hu/index.php?option=com_content&view=article&id=572:korai-szlelhalas&catid=80&Itemid=19 2013.08.31. 9.12 h.
- I2: <http://szolo.blogspot.hu/2007/10/szltke-megbetegedsei.html>, 2013.09.02. 12.45 h.
- I3: http://www.plantprotection.hu/modulok/magyar/grapes/esca_grap.htm, 2013.08.31. 10.08 h.
- I4: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>, 2013.08.29. 17.12 h.
- I5:http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_%28dematiaceous%29/Epicoccum/, 2013.10.12. 14.05 h.
- I6: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2013.10.12. 14.12 h.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg. A publikáció elkészítését a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú, valamint a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 számú projekt is támogatta. A kutatások a COST FA1303 keretében zajlottak.

Köszönetemet szeretném kifejezni konzulenseimnek, Dr. Karaffa Erzsébet Mónika egyetemi docensnek és Dr. Peles Ferenc Árpád egyetemi adjunktusnak, hogy tanácsaikkal segítettek a dolgozatom elkészítésében.

Továbbá szeretném megköszönni Xie Hongtaonak, Hajdú Grétának és Dr. Bérczesné Szojka Anikónak is a segítséget.

FÜGGELÉK

1. függelék: A DNS kinyerése NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) protokoll alapján

1. NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL) protokoll

Az izolálás megkezdése, a thermoshakert 65°C-ra kell beállítani

Az elúció előtt a nukleázmentes vizet fel kell melegíteni 70°C-ra

Sejt lízise PL1 pufferrel

- Kerámiagyöngyöket tartalmazó csövekbe 400 µl PL1 puffert mérünk (Roche Magyarország Kft.)
- A minták homogenizálása MagNaLyser készülékben 90 sec 5.000 rpm-en
- A homogenizátumokhoz 10 µl RNase A oldat adása, majd keverés vortexel
- A lizátumokat 10 percig 65°C-on thermoshakerben inkubáljuk

Homogenizátum tisztítása a Nucleospin oszlopon (lila gyűrűvel)

- NucleoSpin oszlopot gyűjtőcsőbe helyezzük és a feltárt mintákat felvisszük az oszlopra.
- Centrifugálás 2 percig 11000 x g-n. A tiszta alulúszó összegyűjtése (a NucleoSpin oszlopot nem használjuk tovább - kidobjuk)
- Az alulúszókat tiszta, 450 µl PC puffert tartalmazó Eppendorf csövekbe mérjük majd vortexel összekeverjük

DNS megkötése a Nucleospin szilikamembránon (zöld gyűrűvel)

- NucleoSpin Plant II oszlopot (zöld gyűrűs) új gyűjtőcsőbe helyezzük, és a mintákat (700 µl) az oszlopra pipettázzuk
- A mintákat 1 percig 11000 x g-n centrifugáljuk, majd eldobjuk az alulúszót, az oszlopot pedig visszatesszük a gyűjtőcsőbe

A szilikamembrán mosása:

- 400 µl PW1 mosó puffert pipetázunk az oszlopra
- Centrifugálás 1 percig 11000 x g-n, majd az alulúszót eldobjuk

A szilikamembrán mosása és szárítása:

1. mosás:

- 700 µl PW2 puffert pipetázunk az oszlopra
- Centrifugálás 1 percig 11000 x g-n, az alulúszót leöntjük

2. mosás:

- megismételjük az előző lépést 200 µl PW2 pufferrel
- A szilikamembrán szárítása, hogy a maradék etanol elpárologjon az oszlopról

Nagy tisztaságú DNS eluálása

- Az oszlopot egy új 1.5 ml-es centrifugacsőbe helyezzük
- 50µl 70°C-os nukleáz mentes vizet pipetázunk az oszlopra
- Az oszlopot 5 percig 70°C -on inkubáljuk thermoshakerben
- Centrifugálás 1 percig 11000 x g-n, (DNS eluálása)
- Az utolsó lépés megismételhető újabb 50 µl nukleázmentes vízzel.
- DNS tárolása -20 °C-on.

2. függelék: A PCR termék tisztítása NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) segítségével

- PCR termékhez kétszeres mennyiségű NTI puffert pipetázunk a PCR csőbe (esetünkben 60 µl PCR termékhez 120 µl NTI puffer + PCR termék kiegészítése, ha szükséges)
- A mintákat áthelyezzük szilikamembránnal ellátott oszlopokra. Az oszlopokat gyűjtőcsövekbe helyezzük, centrifugáljuk: 1 min, 11000 g (alulúszót eltávolítjuk)
- 700 µl NT3 puffert pipetázunk az oszlopokra, centrifugáljuk: 1 min, 11000 g (alulúszót eltávolítjuk)
- Megismételjük az előző lépést
- Üresen centrifugáljuk az oszlopokat: 1 min, 11000 g, hogy teljesen eltávolítsuk az NT3 puffert
- Eluálás: Az oszlopokat új 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe helyezzük. 20 µl NE puffert pipetázunk az oszlopokra, szobahőmérsékleten inkubáljuk: 1 min, majd centrifugáljuk: 1 min, 11000g (oszlopokat eltávolítjuk)

3. függelék: Telepmorfológia és ITS szekvencia alapján beazonosított izolátumok szekvenciái

Diplodia seriata

>T01_premix -- 33..567 of sequence

AGAAAGTTCAGAAGGTTTCGTCCGGCGGGCGACGCCAACCGCTCCAAAGCGAGGTGTATTCTA
CTACGCTTGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCTTTAAGGCGCGTCCGCAGAGAGGACGG
CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAA
TGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATT
ACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGT
TTTAGTTTATTAACCTTGTTTATCAGACGTCGACGTTTACTGACTGGAGTTTGAAGGTCCTCT
GGCAGAAAGCGCGCGGGGGGGCCCGCGAGGGCCTCCTCGCGGCAAAGAGCCGCCAAAGCAAC
AGAGGTATGTTCAAAAGGGTGGGAGATTTCGAGCCGAAGCCCGAGAACTCGGTAATGATCCT
TCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGATTTTTT

Epicoccum nigrum

>T26_premix -- 15..535 of sequence

CTGATCCGAGGTCAAGAGTGTA AAAATGTACTTTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCG
CGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGAGTCTACA
CGCAGAGGCGAGACAAACACCCAACACCAAGCAGAGCTTGAAGGTACAAATGACGCTCGAAC
AGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGA
ATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGA
GATCCGTTGTTGAAAGTTGTA ACTATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGG
TTTGAATGTTGTCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGAAGGTACTCAAAAGACATG
GGTAAGAGGTAGCAGACCGAAGTCTACAACTCTAGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCT
ACGGAAACCTTGTTACGATTTTTTAC

Alternaria alternata

>T24_premix -- 26..570 of sequence

GAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCGACT
TGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAA
GCTAGAGACAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGC
ATGCCCTTTGGAATACCAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTC
TGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATC
CGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTA
TGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGACAAGGGTG
AATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGAT
CCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTTTACTTCCC

Fusarium tricinctum

>T35_premit -- 18..565 of sequence

GATCGAGGTCACATTCAGAAGTTGGGGTTTTACGGCATGGCCGCGCCGCGTTCCAGTTGCGA
GGTGTTAGCTACTACGCAATGGAGGCTGCAGCGAGACCGCCAATGTATTTGCGGGGCGGCAC
CGCCCAGAAGGGCAGAGCCGATCCCCAACACCAAACCCGGGGGCTTGAGGGTTGAAATGACG
CTCGAACAGGCATGCCCCGCCGAATACCAGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGAT
TCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGA
ACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTGTTTTGTTTTACTCAGAAGTTACAATA
AGAAACATTAGAGTTTGGGTCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACGGGGCGCGGGCTGATCC
GCCGAGGCAACATTAAGGTATGTTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCC
TCCGCTGGTTTACCAACGGAGACCTTGTTACGATTTTTTTACTTCCAACCCCT

Phomopsis mali

>T42_premit -- 14..571 of sequence

ACTGATCGAGGTCAATTTTCAGAAGTTGGGGGTTTAACGGCAGGGCACCGCCAGGGCCTTCC
AGAGCGAGGGTTTAACTACTGCGCTCGGGGTCCTGGCGAGCTCGCCACTGAATTTAGGGCC
TGCTCTTGGGTAAAAGCAGTGCCCCATACCAAGCCAGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCG
AACAGGCATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAC
TGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCA
AGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATGTTTTATTCTCAGAGTTTCAGTGTA
ACAAGAGTTGGGTGGCCGCCGGCGGGCTGTCTCAACACCCGAGGGTGAGGGGCCCCGAAGG
ACCAGCTAGCGCCGAGGCAACAGTAAGGTATAAGTTCACAAAGGGTTTCTGGGTGCGCCTGG
GGCGCGTTCCAGCAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGATTTTTAC

4. függelék: ITS szekvenciák rendezése

4/a T08-T24 izolátumok szekvenciáinak rendezése

```
T08 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T09 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T10 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T11 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T12 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T13 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T14 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T15 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T16 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T17 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T18 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T19 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T20 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T21 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T22 : TA--TTCTACTACGCT-TGAGGGCTGAACAGCCACCGCCGAGGTCCTT-TAAGGCGCGTCCGC-----AGAGAGGACGG--CGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCC
T23 : CGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCGTAGGCCGGCTGCGCAATTACTT-TAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCT
T24 : CGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCGTAGGCCGGCTGCGCAATTACTT-TAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCT
```

4/b T26, T33, T35, T41, T44, T45, T47 izolátumok szekvenciáinak rendezése

```
T26 : TCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATAGCCCGGCTGCCAATTGTTT-TAAGGCGAGTCTACAC-GCAGAGGC-GAGACAA-ACACCCAACACCAAGCA---GAGCTTGAAGGTACAA
T33 : TCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATAGCCCGGCTGCCAATTGTTT-TAAGGCGAGTCTACAC-GCAGAGGC-GAGACAA-ACACCCAACACCAAGCA---GAGCTTGAAGGTACAA
T35 : GCGTT-CCAGTTGCCGAG-GTGCTAGCTTACTACGCAATGGAGGTTGCAGCGAGACCGGCAATGATTTC--CGGGGGGGGCACCGCCAGAGGGGAGAGCCGATCCCCAACACCAACCGGGGGCTTGAGGGTTGAA
T41 : TCGTTTGTGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATAGCCCGGCTGCCAATTGTTT-TAAGGCGAGTCTACAC-GCAGAGGC-GAGACAA-ACACCCAACACCAAGCA---GAGCTTGAAGGTACAA
T44 : TCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATAGCCCGGCTGCCAATTGTTT-TAAGGCGAGTCTACAC-GCAGAGGC-GAGACAA-ACACCCAACACCAAGCA---GAGCTTGAAGGTACAA
T45 : TCGTTTGTGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATAGCCCGGCTGCCAATTGTTT-TAAGGCGAGTCTACAC-GCAGAGGC-GAGACAA-ACACCCAACACCAAGCA---GAGCTTGAAGGTACAA
T47 : TCGTTTGTGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATAGCCCGGCTGCCAATTGTTT-TAAGGCGAGTCTACAC-GCAGAGGC-GAGACAA-ACACCCAACACCAAGCA---GAGCTTGAAGGTACAA
```

NYILATKOZAT

Kovács Csilla büntetőjogi és fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem és aláírással igazolom, hogy TDK dolgozat saját munkám eredménye. A felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem, az irodalmi források korrekt kezelésének módját a szabályzatból megismertem, a diplomamunkára vonatkozó jogszabályokat betartottam. Tudomásul veszem, hogy ezen követelmények megszegése esetén a dolgozatom visszautasításra kerül.

Debrecen, 2013.

.....

aláírás

Születési idő:1990.05.20.