

Debreceni Egyetem

Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és

Környezetgazdálkodási Kar

Élelmiszertudományi Intézet

**A NEMES ROTHADÁS KÖRÜLMÉNYEINEK HATÁSA A
BOTRYTIS CINEREA MORFOLÓGIÁJÁRA, VALAMINT A
GOMBA ALTERNATÍV OXIDÁZ ENZIMÉNEK
AKTIVITÁSÁRA ÉS KIFEJEZŐDÉSÉRE**

Gombkötő Balázs

Élelmiszermérnök BSc, III. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Karaffa Erzsébet Mónika

egyetemi docens

Dr. Bérczesné Szojka Anikó

PhD hallgató

Debrecen

2014

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	1
1. Témafelvetés.....	2
2. Szakirodalmi áttekintés.....	3
2.1. Taxonómia	3
2.2. Rendszertani besorolás.....	3
2.3. Morfológia	4
2.4. Fejlődésmenet.....	4
2.5. Kártétel	6
2.6. A Botrytis cinerea I és II csoportjainak bemutatása.....	8
2.7. Az alternatív oxidázzról.....	8
2.8. Northern analízis - a Northern blot elve.....	10
3. Anyag és módszer	12
3.1. Törzsek.....	12
3.2. Morfológiai vizsgálat	12
3.2.1. A vizsgálat menete	12
3.3. Légzésaktivitási vizsgálat	14
3.3.1. A vizsgálat menete	14
3.4. Northern analízis	16
3.4.1. A vizsgálat menete	16
4. Eredmények	23
4.1. Morfológiai vizsgálat eredménye	23
4.1.1. Makroszkópos morfológiai vizsgálat eredménye.....	23
4.1.2. Mikroszkópos morfológiai vizsgálat eredménye	26
4.2. Légzésaktivitási vizsgálat eredménye	31
4.3. Northern analízis eredménye.....	33
5. Következtetés	34
Összefoglalás	36
Szakirodalom jegyzék.....	37
Függelék.....	41
NYILATKOZAT	44
Köszönetnyilvánítás	45

Bevezetés

A *Botrytis* genuszt Micheli állította fel 1729-ben, és azóta ebbe a nemzetségbe közismerten olyan fonalas gomba fajok tartoznak, melyek fitopatogének és gazdaságilag jelentős kárt tudnak okozni. Ez a megállapítás helytálló, mind a genus tagjaira tekintve együttesen, mind a *Botrytis cinerea* esetében önmagában is.

A patogén gombáknak köszönhető veszteségek évről évre változnak, de óvatos felmérések szerint az átlagos évi terméshozam 5-10%-al való csökkenése általános a fejlett ipari országokban (JAMES, 1974.).

A *B. cinerea* leginkább a mérsékelt égövön terjedt el, és ott nagyszámú, eddig bizonyítottan 235 gazdanövényen képes a szürkerothadás (pouriture grise) nevű betegséget kiváltani (JARVIS, 1977.). A *B. cinerea* gomba rendkívül polifág, sokgazdanövényű (a legtöbb termesztett kétszikű növényt képes megfertőzni). A termesztett növények közül megtalálható a szántóföldi kultúrákban, az üvegházi kultúrákban, de károsítja a dísnövényeket, a bogyós gyümölcsűeket, köztük a szamócát és a szőlőt, valamint számos egyéb nagyjelentőségű gyümölcsfajtát is. Sok egyéb növénykultúra is veszélyeztetett, azonban kisebb gazdasági jelentőségük miatt nem kerülnek a figyelem középpontjába (COLEY-SMITH et al., 1980.). Hidegtűrő képességük miatt, a nagymértékű tárolási veszteségeket okozó mikroorganizmusok közt is számon tartjuk, a termékek raktározása és szállítmányozása során okozhat jelentős problémákat.

Kártételének (mely ezen a téren, élelmiszeripari szempontból az egyik legkiemelkedőbb jelentőségű növény) rendkívül nagy szerepe van a szőlőtermesztésben. A szőlőfajták közül, az amerikai szőlőfajták ellenállóak, viszont a *Vitis rupestris* fogékony, a *Vitis vinifera* pedig nagyon fogékony. A betegségre való hajlam függ a bogyó bőrszövetének vastagságától, az azon lévő viaszréteg kémiai összetételétől, és a fürt jellegétől. A tömött fürtű, felrepedésre hajlamos bogyójú fajták a legérzékenyebbek (BARTÓK, 2004.).

A kórokozó gomba változatos túlélési stratégiákkal rendelkezik, szaporodhat mind szexuális, mind aszexuális módon. Kedvező körülmények között a spóracsírázás, fertőzés, micélium növekedés és a bőséges sporuláció igen gyorsan megtörténik a nemzetség legtöbb tagjánál. A gomba spórák fertőzhetnek helyben, de akár nagy távolságra való szétszóródásra is képesek esőcseppek, szél, vagy ízeltlábú vektorok segítségével. A betegség a környezeti körülményektől függően az érési idő előtt vagy alatt is megjelenhet.

1. Témafelvetés

Ahhoz, hogy a növényeket megvédhessük a károsítóktól, ismernünk kell azok felépítését, biológiáját, az általuk okozott tüneteket és az alkalmas védekezési módokat.

A szőlőn megjelenő szürkepenész jelentős termés kiesést okozhat, emellett ronthatja a bor minőségét is (MARTINEZ et al., 2003.). Azonban, megfelelő körülmények között (szőlőfajta, klimatikus tényezők), az érett szőlőszemekben nemes rothadás is (pouriture noble) kialakulhat.

Meglehet, hogy a *Botrytis* nemzetség tagjait betegségeket okozó mikroorganizmusokként tartjuk számon, de a *Botrytis cinerea*, szőlőbogyókon nagy jelentőségű és elősegítendő folyamatokat eredményezhet.

A *Botrytis cinerea*-nak köszönhetőek egyes évjáratokban speciális botritisz bukéval rendelkező aszú boraink, melyek későn szüretelt, válogatott aszú szemek feldolgozásával készülnek, kimagasló minőségűek, és amelyek Tokaj-Hegyalja világhírét megalapozták.

Kísérleteink során a *Botrytis cinerea* gomba tanulmányozásával az a célunk, hogy a szürke- és nemes rothadás modellezésével megfigyelhessük a különböző differenciáló körülmények hatását a gomba élettani tulajdonságaira nézve, mint például a morfológiai sajátosság változását, a gomba alternatív oxidáz enzimének esetleges aktivitásváltozását, valamint a hatást az előbb említett enzimet kódoló gén kifejeződésére.

Makroszkópos és mikroszkópos morfológiai vizsgálatainkkal választ szerettünk volna kapni arra, hogy növekvő stressz hatására milyen mértékű növekedésgátlást érünk el, a stressz hatás mennyire befolyásolja a törzsek mikroszkópos és makroszkópos tulajdonságainak (hifaszövedék sűrűsége, hifaátmérő, vakuólumozottság, szaporító képletek mennyisége) változását, így ismerve meg a rezisztensebb törzseket növekedésgátlásban bekövetkezett különbségük alapján.

Légzésaktivitási vizsgálatok során arra kerestük a választ, hogy a növekvő stressz hatására, hogyan változik a légzési elektrontranszport láncban, főként az alternatív utakon keresztül történő elektronszállítás a terminális oxidáció színhelyére. A méréseket Clark típusú polarográfiás elektródával végeztük el.

Majd molekuláris biológiai vizsgálatokkal (Northern-analízis) kívántuk bizonyítani, hogy az alternatív utakon történő transzporthoz szükséges enzimet kódoló gén valóban ki is fejeződik-e.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Taxonómia

A *Botrytis* = bótrys (βοτρύς), görög eredetű szó, melynek jelentése szőlőfürt. A *Botrytis* nemzetség elnevezése a gomba botrioblasztokonídiumainak fürtszerű formájára utal (KÖVICS, 2009., VAJNA 1987.). Innen kapta a fürtös penész elnevezést, bár a köztudatban inkább a szürkepenész, vagy a szürkerothadás (pouriture grise) elnevezés az elterjedtebb.

A nemzetséget először P.A. Micheli írta le 1729-ben, melyet C. H. Persoon validálta 1794-ben. A legismertebb típusfaja a *Botrytis cinerea*, melyet Persoon 1821-ben írt le, és E. M. Fries 1832-ben megerősített (COLEY-SMITH et al., 1980.). 1869-ben először, a *Botrytis cinerea* teleomorf alakját A. de Bary *Peziza fuckeliana* néven közölte, melyet de Bary ex de Bary 1884-ben *Sclerotinia fuckeliana* elnevezésre módosított. Ezen elnevezést H. H. Whetzel legitimálta 1945-ben, és *Botryotinia fuckeliana* néven a *Botryotinia* genusba helyezte el (VÁZY et al., 2008.).

2.2. Rendszertani besorolás

A kórokozó teleomorf neve a *Botryotinia fuckeliana*, de a természetben a konídiumos (anamorf) alak, a *Botrytis cinerea* fordul elő a leggyakrabban, ezért általában a szakirodalmakban is ezzel az elnevezéssel találkozhatunk (1. táblázat).

1. táblázat: A *Botrytis cinerea* (Pers.: Fr. *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) rendszertani besorolása (WILLIAMSON et al., 2007.)

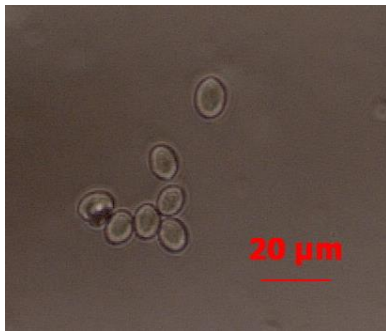
Királyság	Fungi
Divízió	Ascomycota
Osztály	Discomycetes
Rend	Helotiales
Család	Sclerotiniaceae
Génusz	<i>Botryotinia</i> / <i>Botrytis</i>
Faj	<i>Botryotinia fuckeliana</i> / <i>Botrytis cinerea</i>

A *Botrytis cinerea* tulajdonképpen egy gyűjtőfaj, melyen belül több faj létezik, de az általuk okozott tünet és a hasonló életmódjuk miatt nem szokták elkülöníteni a morfológiailag különbséget nem mutató fajokat (KÖVICS, 2011., UBRIZSY, 1965.). A törzsek között nagy variabilitás tapasztalható, mely nem csak ültetvényen belül, de ugyanazon gyümölcsről begyűjtött izolátumok között is megfigyelhető (ASADOLLAHI et al., 2013.).

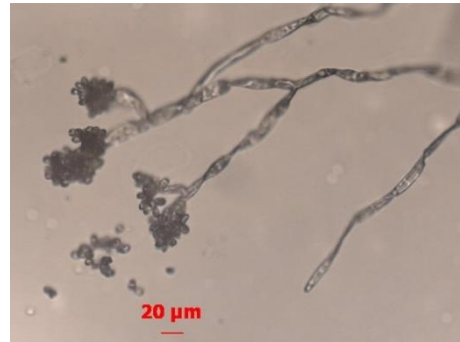
2.3. Morfológia

A *Botryotinia fuckeliana* makroszkleróciumot képez, mely mérete 1-5 mm. E gombának meglehetősen kemény a sztrómája, mely meghatározott alakú, ebbe hifák ágyazódtak. A *Botriotynia* nemzetségbe tartozó fajok nyitott termőtesttel rendelkeznek, nyeles típusú apotéciumot képeznek.

A *Botrytis cinerea* természetben előforduló leggyakoribb alakja a konídiumos forma. A konídiumtartók szabadon (vagyis nem termőképletben), a kúszó vegetatív hifákra merőlegesen helyezkednek el, rendszerint fa elágazásúak, szürke vagy (főként az öregebb képletek) világosbarna színűek. A tartók ágain, kis fürtszerű csomókban (2. kép) helyezkednek el az egysejtű, tojásdad vagy gömbölyded alakú konídiumok, melyek 9-12x6,5-10 µm nagyságúak (1. kép), kémiai anyagokkal szemben ellenállóak.



1. kép: A *Botrytis cinerea* tojásdad alakú konídiumai



2. kép: A *Botrytis cinerea* szőlőfürt alakú konídium-tartójának fénymikroszkópos képe 20x-os nagyításban

Forrás: Szerző

A kórokozó a *hyalosporae* csoportba tartozik, ami azt jelenti, hogy a képződő konídiumok hyalinok, vagyis színtelenek, de ezek az érésük folyamán füst- vagy olajsínűekké válnak (KÖVICS 2011., MUDICH, 1988., UBRIZSY, 1965.).

2.4. Fejlődésmenet

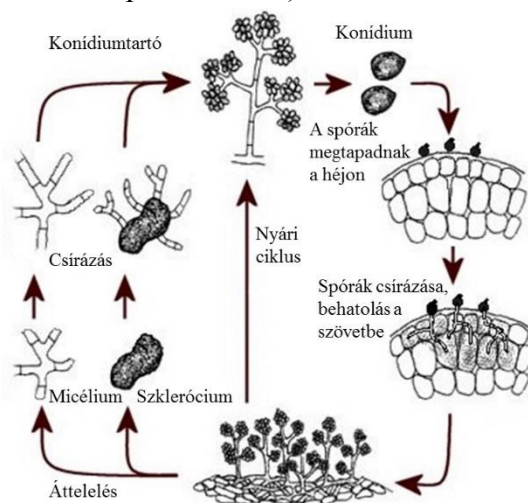
A szürkepenész által megfertőzött növényi részeken a kórokozó számára kedvezőtlen körülmények átvészelésére, ősszel - október környékén képződnek a szabálytalan alakú szkleróciumok, melyek átmérője 2-5 mm, és fekete színűek. A szkleróciumok egy módosult gombafonalakból álló, néhány mm-es, kissé feldomborodó kitartó képletek, melyek egy belső fehér színű gél állományból (medulla) és egy kemény, külső fekete kéregből (cortex) tevődnek össze. Ezek különbözőek aszerint, hogy homogén állományú vagy gomolyos hifaszövedékből keletkeznek, ezáltal állományuk lehet lazább vagy tömöttebb. Ez a kitartó képlet vészeli át a téli kedvezőtlen időjárást (élő vagy elhalt növényi részeken, vagy a talajban), majd tavasszal a

nyelek felületén képződnek az 1-2 cm hosszú tálka vagy csésze alakú apotéciumok, melyek tölcsér alakúak és átmérőjük 1-5 mm.

Az apotéciummal kezdetét veszi az ivaros szaporodás. A termőtestekben kialakul a női aszkogónium és a hím jelleget képviselő anterídium. Az aszkogónium párzófonalat fejleszt, mely által kialakul az aszkogén (aszkuszképző) hifa, majd a tömlősgombákra jellemző horogképződmény útján megtörténik a kariogámia és többszöri osztódás (redukciós és ekvációs osztódás) után kialakulnak az aszkuszok, bennük az askospórák. Az askospórák egysejtűek, ovális alakúak, 9-11x5-6 μm nagyságúak és színtelenek (VAJNA, 1987.). Az askospóra csírázása révén pedig további szomatikus hifák képződnek. Ezt az igen ritka fejlődési utat nevezzük ivaros szaporodásnak (KÖVICS, 2011., UBRIZSY, 1965.).

A természetben az ivartalan szaporodás fordul elő gyakrabban, mely során nem képződik apotécium, női és hím ivarszerv, illetve aszkusz és askospóra. A vegetatív hifák konídiumtartókat képeznek, melyeken nagy számban konídiumok (botrioblasztokonídium) keletkeznek, (melyek biztosítják a tenyészedőszakban a gomba fennmaradását, terjedését (KÖVICS, 2011., UBRIZSY, 1965.). Üvegházi körülmények között a konídiumtartók és a konídiumok is áttelelhetnek.

A csírázás csíratömlővel történik, melynek hőmérsékleti optimuma 25 °C körül van. A csírázás 5-10 °C-os hőmérsékleten lelassul, míg 40 °C felett meg is szűnik, sőt a tartós szárazság a gomba ivartalan spóráit károsítja. A konídiumok kedvező körülmények (20-25 °C-os léghőmérséklet és ~95%-os relatív páratartalom) esetén rendkívül gyorsan 6-8 óra alatt kifejlődnek (1. ábra).



1. ábra: A *B. cinerea* szaporító képleteinek fejlődésmenete (Forrás: Internet (11))

2.5. Kártétel

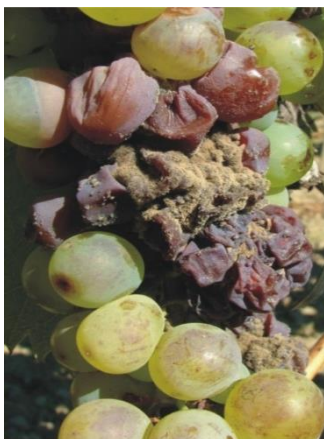
A növénypatogén *Botrytis* gomba számos termesztett növényünkön előfordul. Legfőbb gazdanövényei közé sorolhatók az *Allium*, *Alnus*, *Amaryllis*, *Apium*, *Asparagus*, *Aster*, *Beta*, *Brassica*, *Calendula*, *Cannabis*, *Capsicum*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Cyclamen*, *Cydonia*, *Daucus*, *Dianthus*, *Erigeron*, *Fragaria*, *Gerbera*, *Gladiolus*, *Glycine*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Orpbanche*, *Pelargonium*, *Petroselinum*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Prunus*, *Pyrus*, *Ribes*, *Rosa*, *Saintpaulia*, *Solanum*, *Trifolium*, *Tulipa*, *Vicia*, *Vitis*, *Zea*, *Zinnia* nemzetségbe tartozó fajok (KÖVICS, 2000.).

Elsősorban szőlőn, szamócán és málnán okoz hatalmas károkat, de sok egyéb növénykultúra is veszélyeztetett, azonban vagy a kisebb kártétel vagy a kisebb gazdasági jelentőségük miatt ezek nem vonnak akkora figyelmet magukra.

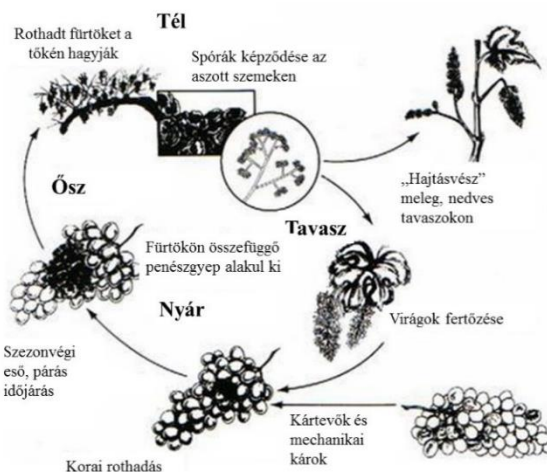
Az okozott kár szamócán már a termesztés ideje alatt is megfigyelhető, főleg a talajjal közvetlenül érintkező bogyók esetében. Azonban nem elhanyagolható a szamóca tárolása során megjelenő penészedés sem. Málnán, csapadékos időjárás viszonyok között, a megtámadott részekben kialakul a dús, szürke penészgyep. Raktározás során történő fertőzésre a legjobb példa a vöröshagyma, mely már a termőföldön megfertőződhet, de a kártétel a tárolás során tovább súlyosbodhat (GLITS et al., 1997., KÖVICS, 2012.).

A gomba a vegetatív és a generatív részeket egyaránt megfertőzheti.

A szőlő (*Vitis vinifera*) esetében, legjellemzőbb tünet a gyümölcsrothadás, a kórokozó nyár végén, ősszel jelentkezik. A bogyókon ovális, barna foltok jelennek meg, melyek fokozatosan növekednek. A barnulás később a fürt egy részére, vagy egészére is kiterjedhet, majd a fürtön kialakul a jellegzetes szürkésfehér penészgyep (3. kép, 2. ábra).



3. kép: Kezdetleges fázisú szürkerothadás
(Forrás: Dr. Karaffa Erzsébet)



2. ábra: A *B. cinerea* fejlődési ciklusa (Forrás: Internet (12))

Előfordulhat virágfertőződés is, mely során a fertőzött virág megbarnul és elszárad, így növelve a későbbi kontakt infekció esélyét, vagyis az elhalt virágmaradványokon keresztüli fertőződést (2. ábra). Ritkább esetben a zsendülő fürtökön a fürtnyél vagy kocsány fertőződésekor a szállító edénynyalábok elhalnak, tápanyag ellátási zavarok révén okozva terméskiesést. Súlyos esetben a levelet is megtámadhatja, miáltal a levélszöveten sárga szegélyű barnulás figyelhető meg, de ez igen ritka (GLITS et al., 1997., SZŐKE, 1996., TÓTH, 2008.).

A *Botrytis cinerea* növénybe történő behatolása legtöbbször (jégverés, csapadékos időjárás hatására bekövetkező bogyórepedés vagy kártevők által okozott) sebekon keresztül történik (2. ábra), de a fertőzésre hajlamos fajtáknál a sztomákon, vagy akár az ép bőrszöveten keresztül is behatolhat, de ennek esélye igen kicsi, mivel 20 órán át tartó folyamatos nedvességre lenne szükség a fertőzés bekövetkezéséhez. A kutikula feltörése mechanikusan, míg a sejtfalakon való áthatolás enzimatikusan történik. A szövetekbe jutva intercellulárisan növekszik, a sejtfal pektin anyagát felbontva, a szövet puhulását és rothadását idézi elő.

Hajlamosító tényezők közé sorolhatók a magas légnedvesség, a túl sűrű sortávolságú növényállomány, a tőkék lombszerkezetének zsúfoltsága, de mindenféleképpen döntő jelentőségű az egyes fajták botrytis-érzékenysége is (pl. felrepedésre való hajlam jelentősen növeli a kockázatot). Szürkerothadásra fogékony fajták - Cardinal, Ezerjő, Leányka, Rizlingszilváni, Kadarka - bogyóhéja általában könnyebben reped. Nem érzékenyek a szürkerothadásra pl.: Tramini, Chasselas, Kékfrankos, Bianca, Kunleány, Zala gyöngye, Medina, Pölöskei muskotály (Forrás: Internet (I3)).

A szőlőn nem minden esetben okoz kárt a *Botrytis*. A Tokaj-hegyaljai borvidéken az érett szőlőszemek cukor-, ásványi anyag- és szerves savtartalma olyan magas, hogy a *Botrytis cinerea* csak lassan tud növekedni és terjedni az ép bogyó felületén. A gomba növekedése során képes a szem nedvességtartalmát elpárologtatni, így a bogyó beltartalmának töményedése figyelhető meg. Eközben a bogyó szerves és ásványi anyagait is csökkenti, valamint új vegyületek is szintetizálódnak. Ennek a kialakulásához azonban érett szőlőszem szükséges, amely nem kap vízutánpótlást a tőkétől (ROMHÁNY, 2001.). Ezt a folyamatot nevezzük nemes rothadásnak (4. kép).



4. kép: Nemes rothadás (noble rot) (Forrás: Dr. Karaffa Erzsébet)

2.6. A *Botrytis cinerea* I és II csoportjainak bemutatása

Legutóbbi kutatások eredményei alapján, a *Botrytis cinerea* fajkomplex legalább két rejtett fajt (cryptic species) foglal magába (FOURNIER et al., 2005.), *B. cinerea* sensu stricto (II. csoport) és *B. pseudocinerea* (I. csoport), melyek közé tartozó törzsek genetikai alapon elkülöníthetőek, a két faj között nincs génáramlás (gene flow). Különböznek patogenitásukban és eltérő módon tolerálják a különböző növényvédőszerket (fungicideket) (ASADOLLAHI et al., 2013.). Fenológiai különbség, hogy az I csoport csak tavasszal, míg a II csoport tavasszal és ősszel is megtalálható a szőlőn, valamint az I csoport esetében szűkebb gazdanövény kört találtak, mint a II csoport tagjainál.

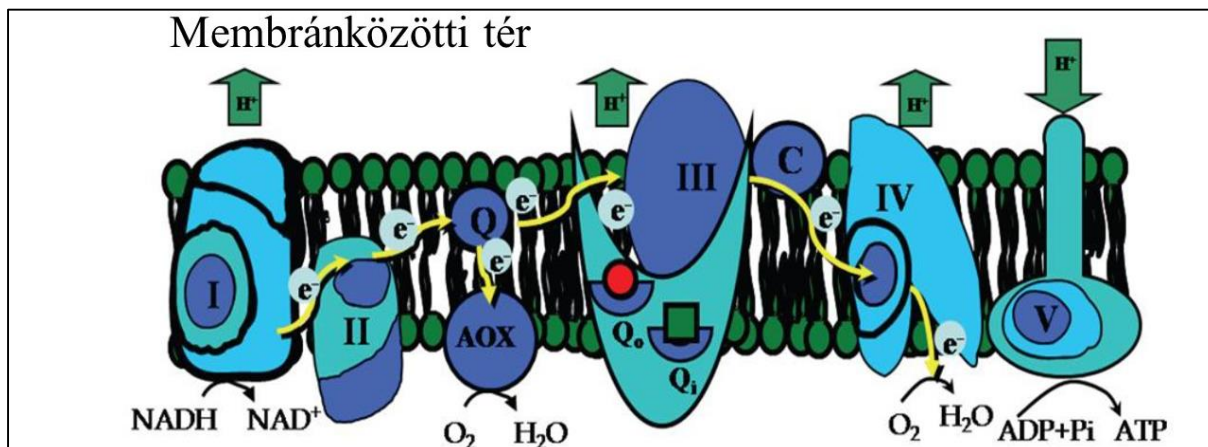
A két csoportot rendkívül nehéz klasszikus rendszertani módszerekkel megkülönböztetni, elkülönítésük csak molekuláris markerek felhasználásával lehetséges.

2.7. Az alternatív oxidázról

A *B. cinerea* ellen történő védekezés a mezőgazdaságban főként kemikáliákkal történik, melyek között megtalálhatók a légzési elektrontranszportláncot gátlók is, mint pl. a strobilurinok közé tartozó azoxystrobin. Azonban a *Botrytis* nagyfokú variabilitásának köszönhetően gyorsan kialakulnak a rezisztens törzsek, melyek már nem (vagy nem elegendő mértékben) gátolhatóak ezekkel a fungicidekkel. Ezen felül az alternatív oxidáz által kialakított légzési útvonal is szerepet játszik a gomba túlélésében, így okozva óriási kockázatot a növényvédelemben.

A legtöbb eukarióta mitokondrium elágazó légzési láncsal rendelkezik. Az oxidatív foszforilálással szorosan kapcsolatos elektronszállító lánc utolsó tagja, a citokróm oxidáz (COX),

mely cianiddal (CN) specifikusan gátolható. Azonban, már 1929-ben azt tapasztalták, hogy a növények légzése nem gátolható teljes mértékben citokróm oxidáz inhibitorokkal, mert a cianid jelenlétében mért légzésben az elektronszállítás elkerüli a citokrómokat (PETHŐ, 1993.). Az erre irányuló kutatások egy alternatív mitokondriális légzési útvonalat azonosítottak a növényekben, mely az ubikinonnál ágazik el, az elektronokat szintén az oxigénre szállítja, víz keletkezése közben, valamint a cianidra érzékeny citokróm oxidáz útvonallal ellentétben CN rezisztens (HENRY-NYNS, 1975.).



3. ábra: A mitokondriális mátrix sematikus ábrázolása (ahol: I, II, III és IV - a különböző komplexek az elektrontranszport láncban; V - az ATP szintetáz komplex; Q - ubikinon; C - felületi citokróm c fehérje; a sárga nyilak mutatják a membránon belül az elektronáramlás irányát (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008).

Az alternatív cianidrezisztens légzés, kulcsenzime az alternatív oxidáz (AOX) (McDONALD-VANLERBERGHE, 2005.). Az AOX fehérje a légzési láncban található terminális kinon oxidáz, a divas karboxilát fehérjecsalád tagja, a mitokondrium belső membránjában helyezkedik el (3. ábra). Az AOX rezisztens több olyan vegyületre, melyek gátolják a citokróm oxidázt (komplex IV), vagy a komplex III-at. A citokróm *b* gátlása esetén az elektronok az alternatív útvonalon keresztül jutnak a terminális oxidáció színhelyére (WOOD-HOLLOMON, 2003.). Az AOX képes az oxigént vízzé redukálni (3. ábra), miközben a képződő energia hő formájában szabadul fel (BERTHOLD-STENMARK, 2003.). Az AOX képes a légzési elektrontranszport lánc túlredukálódását is megelőzni és ezáltal csökkenti a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződésének valószínűségét (MAXWELL et al., 1999., MÖLLER, 2001.).

Ellentétben a citokróm *c* oxidáz útvonallal, ahol a protonpumpák a mitokondrium belső membránján keresztül grádienszt hoznak létre, s ATP képződik, az AOX számos protonpumpát elkerül (3. ábra), ezáltal nem tesz lehetővé nagy mennyiségű ATP szintézist, tehát nem energia megőrző ága a légzési elektrontranszport láncnak (MOORE-SIEDOW, 1991.).

Ezáltal feltevődik a kérdés, hogyha az alternatív légzés során az energia nem raktározódik ATP formájában, akkor ugyan miért rendelkeznek az élőlények ezzel a pazarló légzési úttal? Az AOX enzim expressziója gyakran megnő biotikus és abiotikus stressz hatására, emiatt a légzési elektrontranszport láncnak az AOX egyfajta flexibilitást biztosíthat, ami különösen előnyös a gyakori stressznek kitett élőlények különböző körülményekhez való alkalmazkodása során, különösképpen a citokróm reakcióút hatékonyságát korlátozó feltételek közt élő mikroorganizmusok számára (JUSZCZUK-RYCHTER, 2003., BORECKY et al., 2006., CASTRO-GUERRERO et al., 2008.). Több mint 40 patogén fajt találtak, melyek rendelkeznek AOX-al. Ennek oka lehet, hogy a gazdaszervezetek védelmi válaszaik során ROS-t vagy mérgeket, például CN-t termelhetnek, így próbálva megelőzni a kórokozó behatolását és szaporodását (McDONALD-VANLERBERGHE, 2005.). Az AOX hatékony gátlószerei a szalicil-hidroxámsav (SHAM) és az n-propil-gallát (nPG) (YIP-VANLERBERGHE, 2001.).

2.8. Northern analízis - a Northern blot elve

Alkalmazását specifikus RNS molekulák (pl. mRNS) kimutatására, méretüknek és mennyiségüknek megközelítő meghatározására, valamint szövet és differenciáció specifikus génműködés kimutatására használják, összetett (pl. egy sejt típus összes mRNS-ét tartalmazó) mintában.

A blottolás (blotting) angol eredtű szó, jelentése pácázás, ami egy membrán felszínén található nukleinsav folt vizsgálatára utal. A módszer a nukleinsav szekvencia specifikus hibridizációján alapul. Amikor a DNS denaturált, vagyis a kettős szála szét van választva, akkor a szimpla DNS szálak képesek hibrid kettős szálat alkotni más, szimpla szálú DNS vagy RNS molekulával a komplementaritás szabályainak megfelelően. Ezt nevezik nukleinsav hibridizációnak. A komplementer szekvenciájú nukleinsav szálak hidrogén hidakkal kapcsolódnak egymáshoz, a kapcsolódás specifikitása lehetővé teszi, hogy megfelelő módon jelzett nukleinsav próbákkal az általunk keresett génfragmentumot vagy mRNS-t detektáljuk.

A DNS vizsgálatára alkalmas módszert Sir Edwin Southern dolgozta ki, munkásságáért 1975-ben Nobel-díjjal jutalmazták. A módszert róla nevezték el Souther blot-nak. Később vezették be az RNS szekvenciák kimutatására alkalmas módszert, melyet Northern blot-nak neveztek.

Nagyon fontos, hogy a vizsgálat teljes ideje alatt RNA-áz mentes körülményeket biztosítsunk, ugyanis az RNS nagyon bomlékony. Mivel a vizsgálni kívánt mRNS szálak megfelelő méretűek, ezért nincs szükség restrikciós emésztéssel azok további darabolására.

Ezzel szemben el kell végezni az mRNS szálak denaturálását, hogy a molekulák alakja ne befolyásolja a méret szerinti szétválasztást. A méret szerinti szétválasztást agaróz gélelektroforézissel kell elvégezni. Ezután a sávok membránra történő átvitele után már nem szükséges további denaturációs lépés elvégzése, elegendő a mintázat fixálása. A hibridizációs eljárások során fontos a membrán aspecifikus kötőhelyeinek lefedése/prehibridizálása, mely közömbös DNS (lazac vagy hering spermából kinyert genomi DNS vagy az olcsóbb tyúkvérből nyert DNS) tartalmú oldattal történik. Ezt követően az általunk keresett génre specifikus próbát öntünk a membrán felszínére és megfelelő körülményeket biztosítunk a szekvencia specifikus hibridizáció lejátszódásához. A feleslegben lévő próba eltávolítása után, megfelelő módszerrel a membrán felszínén kimutatható a vizsgált gén. Ezt az utolsó lépést hívjuk detektálásnak (BÍRÓ-DOMBRÁDI, 2011.).

3. Anyag és módszer

3.1. Törzsek

Munkánk során a *Botrytis* nemzetségbe tartozó *Botrytis cinerea* sensu stricto (II. csoport) és *B. pseudocinerea* (I. csoport) törzsekkel dolgoztunk, melyeket az 2. táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat: A kísérletek során vizsgálni kívánt, a DE törzsgyűjteményében lévő *B. cinerea* és *B. pseudocinerea* izolátumok jellemzői

	Fungicidre* érzékeny	Kis rezisztenciájú	Nagy rezisztenciájú
I.csoport	8005	8002, 8032	
II.csoport	9015	8021	8022

*fungicid: azoxistrobin

Ezen felül felhasználtam még az alacsony patogenitást mutató T4-es és a magas patogenitást mutató B05.10-es típustörzset, valamint e két törzs Ku (Ku70 és Ku80) mutánsait (CHOQUER et al., 2008.).

A 8005, 8002, 8032, valamint a 9015, 8021 és 8022 *Botrytis* törzsek a Debreceni Egyetem TTK Biomérnöki Tanszékének, valamint a MÉK Élelmiszertudományi Intézetének közös tulajdonát képező törzsgyűjteményéből származó saját izolátumok. A B05.10 izolátum benomilos kezelés után szőlőről (*Vitis vinifera*) izolált és deponált (BÜTTNER et al., 1994., QUIDDE et al., 1998.), feltehetőleg haploid törzs. A T4 egy üvegházi paradicsom növényről származó törzs (LEVIS et al., 1997.).

3.2. Morfológiai vizsgálat

Kísérletünkben, a 10 kiválasztott törzs morfológiai tulajdonságait vizsgáltuk különböző körülmények között: két hőmérsékleten (9, és 22 °C) és eltérő ozmotikus körülmények modellezésével (10 és 250 g/l glükóz). A vizsgálatokat makroszkópos mérésekkel és fénymikroszkópos vizsgálattal végeztük el.

3.2.1. A vizsgálat menete

A törzseket 3 napig burgonya-dextróz táptalajon (photato-dextrose-agar) növesztettük (PDA→24 g/l burgonya-dextróz és 15 g/l agar, pH=5,1 (Scharlab, Spanyolország)), ezután a növekedési zónából dugófúróval vett telepet ráoltottam a Gamborg minimál táptalajra (1.

függelék) (GAMBORG et. al., 1968.). Ezen a táptalajon növesztve a törzseket, modellezhetjük a kívánt differenciáló körülményt. Egyik esetben a „Normál körülmény”, vagyis a szürkerothadás kialakulása számára legideálisabb 22 °C és 1%-os glükóz koncentráció mellett növesztettük a tenyészeteket. Az „Aszú körülmény”, azaz a nemes rothadás kialakulásának modellezésére 25%-os, magas glükóz koncentrációt – mely jellemző a bogyókra az aszúsodás bizonyos szakaszában – és alacsony, 9 °C-os hőmérsékletet alkalmaztunk. Október környékén, amikor az aszúsodás folyamata játszódik le a szőlőszemekben, gyakorta fordul elő ilyen alacsonyabb hőmérsékletű időjárás.



5. kép: Átoltáshoz használt eszközök



6. kép: A makroszkópos méréshez használt eszközök

Forrás: Szerző

Az átoltásokat minden esetben, steril környezetben (lamináris box), kellő gondossággal, steril eszközök segítségével végeztük el (5. kép). Törzsenként 3 ismétléssel dolgoztunk, hogy az eredmények statisztikai kiértékelésével hiteles végeredményt kaphassunk.

A makroszkópos méréseket a leoltást követően 19-, 42-, 54-, 66-, 78- és 90 óra elteltével, vonalzó segítségével végeztük el (6. kép). Ez egy egyszerű vizsgálat, mely során megmértem a tenyészetek átmérőjét, az értékeket pedig jegyzőkönyvbe vezettem be. A két differenciáló körülmény micéliális növekedésének összehasonlítását gátlási %-ban adtuk meg a következő képlet használatával. $I = (C - T/C) \times 100$ ahol, I= gátlási %, C= telepátmérő normál körülmény esetén, T= telepátmérő aszúsodást modellező körülmény esetén. Kiszámoltuk az átlagos micéliális növekedési rátát mm/h-ban kifejezve, a $(C_{\text{első}} - C_{\text{utolsó}})/t$ képlet alkalmazásával: $C_{\text{első}}$ = telepátmérő az első méréskor mm-ben kifejezve, $C_{\text{utolsó}}$ = telepátmérő az utolsó méréskor mm-ben kifejezve, t= eltelt idő órában kifejezve (PERVEEN-BOKHARI, 2012.).

A mikroszkópos méréseket a Növényvédelmi Intézet laboratóriumában lévő, AxioCam MRc5 (Carl Zeiss) kamerával rendelkező Zeiss AxioImager (Carl Zeiss) fénymikroszkóp segítségével végeztük el. A mikroszkópkamera, kábellel számítógéphez van kapcsolva, melyen

előre telepített speciális program lehetőséget nyújt a mikroszkóp lencsében látottakról fotók készítését, majd azok statisztikai értékelését, mint például a hifa átmérőjének változását törzsenként valamint differenciáló körülményenként. Az eredménykiértékelés céljára az elkészült digitális képek szolgálnak.

3.3. Légzésaktivitási vizsgálat

A kísérlet során összehasonlítottuk a 10 kiválasztott törzs alternatív oxidáz (AOX) aktivitását. Megfigyeltük, a különböző hőmérsékleten -és ozmotikus körülmények között növesztett tenyészeteknél kiváltott stressz miatt fellépő változásokat a légzésaktivitásban. A vizsgálatok során a citokróm útvonalat KCN-al, az alternatív légzési útvonalat pedig SHAM-al gátoltuk. Az AOX aktivitást az oxigén felhasználást követő, Clark típusú polarográfiás elektródával mértük. A kapott eredményeket statisztikai értékeléssel támasztottuk alá.

3.3.1. A vizsgálat menete

A törzsek fenntartása és a kísérletekhez spóráképzés céljából történő növesztése Borsó-Agar táptalajon (BAROFFIO et al., 2003.) történt: 160 g/l fagyasztott, pürésített zöldborsó, 5 g/l glükóz, 15 g/l agar desztillált vízben oldva, pH= 6.0. A törzsek 4-5 napon keresztül történő növesztése után, a konídiumokat spóramosó oldatban (10 g/l glükóz, 1,5 g/l K₂HPO₄, 2 g/l KH₂PO₄, 1 g/l (NH₄)₂SO₄, 5 g/l MgSO₄, 2 g/l yeast, 0,5 g/l Tween víz:glicerín 1:1 keverékében oldva) gyűjtöttük össze a telepek felszínéről, melyet steril üvegyapoton átszűrve, megkaptuk a micéliumoktól mentes spóraoldatot. Ezt a felhasználásukig (maximum 4 napig) +4 °C-on tároltunk. Leoltás előtt a spóraszámot Bürker-kamra segítségével határoztuk meg.

A spóraszámlálást követően, törzsenként körülbelül 10⁶ db spórát külön-külön 500 ml-es Erlenmeyer lombikban lévő 100ml, előre elkészített steril Gamborg (GAMBORG et. al., 1968.) táplevesbe pipettáztuk, mely a kísérleti beállításoknak megfelelően eltérő mennyiségben tartalmazott glükóz szénforrást.

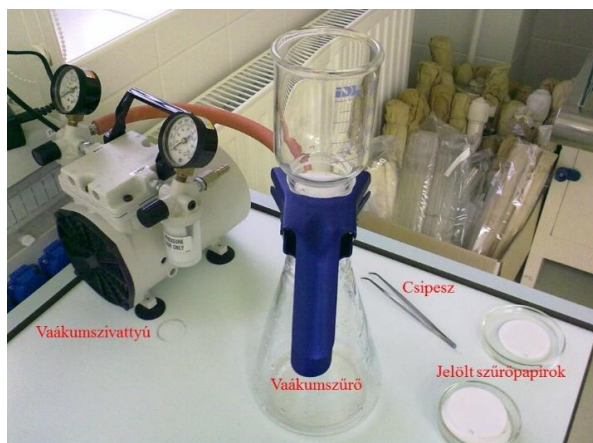
A tenyészeteket eltérő körülmények között inkubáltuk. Egyik esetben a szürkerothadás számára ideális 22 °C-on, 1%-os glükóz koncentráció mellett növesztettük a tenyészeteket. Az aszúsodás (nemes rothadás) körülményeinek modellezésére 25%-os, magas glükóz koncentrációt és alacsony, 15 °C-os hőmérsékletet alkalmaztunk. 24 órás inkubálást követően, a gomba exponenciális növekedési szakaszában végeztük el a vizsgálatainkat.

A méréseket SI1302 oxigénmérő elektródával (Strathkelvin Instruments) végezzük RC350 mérőcellában (Strathkelvin Instruments) 782 2-Channel Oxygen System version 1.0

Egy két csatornás oxigénmérő eszköz
 Számítógép
 Témosztát, az aszu körülmény vizsgálatához szükséges hőmérsékletre beállítva
 Kálium-Clamid
 Elektroda
 Folyadékkeverés
 Légzésmérő kamra
 Mágneses keverő

Forrás: Szerző

15



9. kép: A vákumszűrés során felhasznált eszközök

Forrás: Szerző

3.4. Northern analízis

A B05.10 *B. cinerea* sensu stricto, magas patogenitást mutató típustözs esetében vizsgáltuk, hogy az idő elteltével és a szénhidrátforrás emelkedő koncentrációjával, hogyan változik az AOX enzimet kódoló *aox* gén expressziója. Az expresszió vizsgálatát Northern analízissel végeztük el.

3.4.1. A vizsgálat menete

3.4.1.1. Légzésaktivitás vizsgálat

A B05.10-es törzs spóráit hozzávetőlegesen azonos mennyiségben, külön-külön 500 ml-es Erlenmeyer lombikban lévő 100ml, előre elkészített steril Gamborg (GAMBORG et. al., 1968.) táplevesbe pipettáztuk, mely a kísérleti beállításoknak megfelelően eltérő mennyiségben (0,1%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%) tartalmazott glükóz szénforrást. Az inkubációs hőmérséklet minden esetben az aszú körülmény modellezésére szolgáló alacsony, 15 °C volt.

A légzésaktivitási vizsgálatokat az inkubálás megkezdésétől számított 3h, 6h és 12h elteltével végeztük el. A légzésmérés megkezdése előtt az oxigénmérő eszközt ismét kalibráltuk. Minden minta esetében 3,5 cm³ térfogatú szuszpenziót pipettáztunk a légzésmérő kamrába, majd azt mágnessel kevertetve, az elektróda segítségével elvégeztük a mérést. A szuszpenzióhoz 0.2 ml (10mM) KCN-t adagoltunk, majd megfigyelhettük, hogy a gomba oxigénfogyasztása nem állt le, az elektronok transzportja az alternatív utakon folytatódott. Ezzel a méréssel bizonyosodtunk meg, hogy a mintánk alkalmas a Northern analízisre, az AOX valószínűleg megtalálható benne. Ezután, a kamrában lévő szuszpenziókat feliratozott műanyag falkonokba pipettáztuk át, lezárásuk után, folyékony N₂ tartalmazó edénybe eresztettük be.

3.4.1.2. RNS izolálás

Az RNS izolálást megfelelő protokoll (2. függelék) alapján kell elvégezni. Az izolálás megkezdése előtt a szükséges előkészületek a következők:

Munkaterület és eszközök (pipetták, mozsarak, kesztyűk) RNáz ERASE-zal való tisztítása. Az RNS-hez speciálisan sterilizált pipetta hegy is szükséges. Ez azért nagyon fontos, mert a vizsgálat teljes ideje alatt RNáz mentes körülményeket kell biztosítanunk, ugyanis az RNS nagyon bomlékony. A mintafeltárás folyékony N₂ jelenlétében, dörzsmozsárban történt. A homogenizált, porított sejtörmelék mintánként 3-3 (1.5 ml-es) eppendorf csőbe kanalztuk, melyekbe előzőleg belemértük a lízis puffert (350 µl RA1 + 3.5 µl β-ME), és tetejüket kilyukasztottuk. A lyuk az eppendorf tetején, a maradék folyékony N₂ szabad elpárolgását szolgálta. A porított sejtörmelék mennyiségétől függően, mintánként 1-2-3 eppendorfnyi lizátumot készítettünk.

Az RNS izolálásánál a továbbiakban a gyártó előírása szerint jártunk el (2. függelék).

3.4.1.3. Jelölt DNS próba létrehozása

A vizsgált génnek megfelelő DNS fragmentumot DIG-es módszerrel jelöljük (3. táblázat). Egy jelölt és egy kontroll PCR reakció (4. táblázat) összeállítása szükséges.

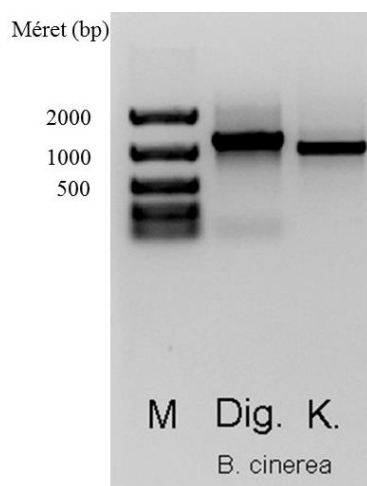
3. táblázat: PCR reakció kivitelezéséhez szükséges összetevők

1x jelölt PCR		1x kontroll PCR	
PCR buffer 10×konc. MgCl ₂ -al	5 µl	PCR buffer 10×konc. MgCl ₂ -al	5 µl
PCR DIG Labeling Mix	5 µl	dNTP stock solution	5 µl
Templát DNS Ku 70-es törzsből izolált genomi DNS	2 µl	Templát DNS Ku 70-es törzsből izolált genomi DNS	2 µl
Primer F BcAOX-F:5'-TCACATCACATCAACTCAG-3'	2 µl	Primer F BcAOX-F:5'-TCACATCACATCAACTCAG-3'	2 µl
Primer R BcAOX-R:5'-CTAAATAACCTCATCCCTC-3'	2 µl	Primer R BcAOX-R:5'-CTAAATAACCTCATCCCTC-3'	2 µl
Enzim mix (polimeráz)	1 µl	Enzim mix (polimeráz)	1 µl
Nukleáz mentes víz	33 µl	Nukleáz mentes víz	33 µl
Végtérfogat	50 µl	Végtérfogat	50 µl

4. táblázat: A beállított PCR program

Szakaszok	Hőmérséklet (°C)	Ciklusok	Idő (min)
Denaturáció	95.0	1x	03.00
Denaturáció	90.0	30x	01.00
Anelláció	50.4		01.00
Polimerizáció	72.0		01.50
Végső polimerizáció	72.0	1x	5.00
Hűtés	12.0	1x	több óra

A PCR lefutása után a terméket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük le (10. kép). Az ehhez szükséges gél 1 g/l agarózból, 1xTAE Buffer-ből és etídium-bromidból állítottuk össze. Mintafelvétel előtt 1 µl PCR terméket és 4 µl nukleázmentes vizet keverünk össze viaszpapíron, majd ezt installáljuk a gélbe. Agaróz gélelektroforézis során a DNS fragmentek egy erősen térhálós szerkezetű agaróz mátrixon keresztül vándorolnak elektromos áram hatására. Oldatban a DNS molekula negatív töltésű ezért a pozitív pólus felé vándorol. A futás sebessége fordítottan arányos a molekulasúly tízes alapú logaritmusával, ezért a kisebb molekulasúlyú fragmentek gyorsabban, míg a nagyobbban lassabban haladnak a gélben. Az elektroforézist 70V-os feszültségen körülbelül 1 órán keresztül hagytuk futni.



10. kép: PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) segítségével létrehozott jelölt DNS próba (M: molekulasúly marker (EasyLadder I, BIOLINE), DIG.: Jelölt PCR, K.: Kontroll PCR)

Forrás: Szerző

3.4.1.4. RNS minták felvitele gélbe

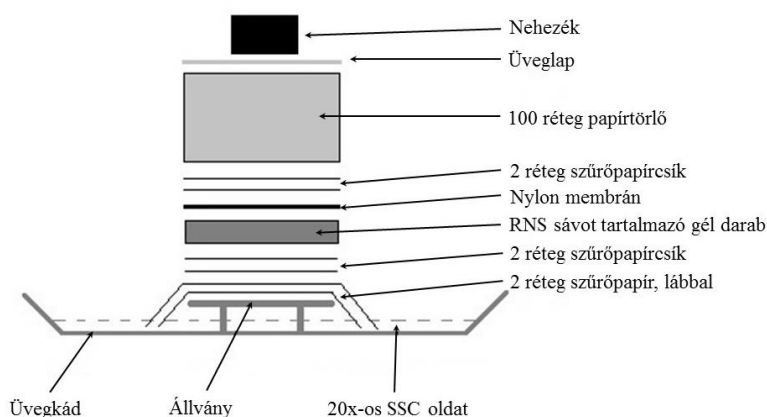
Az izolált RNS minták koncentrációját NanoDrop 2000 (Thermo) UV-Vis spektrofotométerrel határoztuk meg, 2 µl térfogatnyi mintából. A vizsgálatához szükséges 5 µg RNS-t tartalmazó mintát kétszeres mennyiségű Loading pufferrel (3. függelék) hígítottuk. Összemérés után a mintákat vortexeltük, majd jégen tároljuk. Amint az utolsó is elkészült, 20 percen keresztül, 65 °C inkubáltuk azokat. Ezalatt, az RNS futtatásához szükséges gél is elkészítettük, mely 141,9 ml 1x-es koncentrációjú MOPS-ot (3. függelék), 1,6 g agarózt és 8,1 ml 37%-os formaldehidet tartalmazott. A denaturálást követően minták teljes mennyiségét felvittük a gélbe. A futtatást 1x-es koncentrációjú MOPS-ban 60 V feszültségen, 1,5 órán keresztül végeztük (80 V feszültségen a gél túlságosan felmelegedne, ami az RNS degradálódásához vezetne).

Az eredmények ellenőrzését, majd az RNS-t tartalmazó sáv kivágását a gélből UV fény alatt végeztük el.

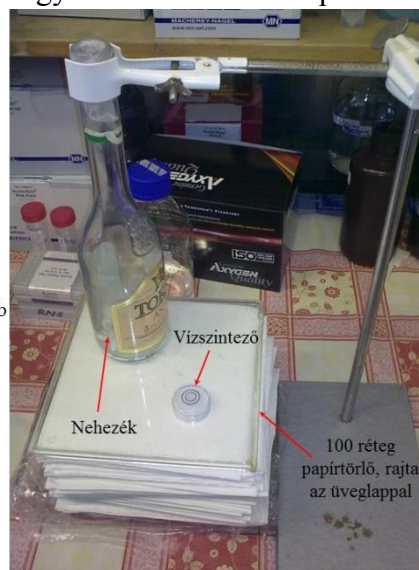
Az RNS-t tartalmazó gél kivágása után, nagyon fontos, hogy a gélben lévő formaldehidet kimossuk, mert az zavarhatja a blottolás folyamatát. A mosást kádban lévő 20x SSC pufferben (3. függelék), 2x15 percen keresztül végeztük rázógépen.

3.4.1.5. Blottolás a membránra

Az RNS sávok agaróz gélből nylon membránra történő átvitelére a kapilláris transzfer módszert alkalmaztuk (4. ábra, 11. kép). A nylon membrán nagy nukleinsav kötő kapacitással rendelkezik. Szigorúan csak csipesszel szabad megfogni!



4. ábra: A blottolás folyamatának elméleti ábrázolása



11. kép: A blottolás gyakorlati alkalmazása

Forrás: Szerző

A nagy sótartalmú oldatot (20x SSC) a szűrőpapír rétegek vezetik az agaróz gélhez, majd a géltre fektetett membránra, a felette található vastag papírtörő réteg szívó hatása révén mosódnak át a sávok. Fontos, hogy a szűrőpapír lábai jól érjenek bele az SSC oldatba, valamint hogy a szűrőpapírt celofánnal letakarjuk, ott ahol nincs gél, így a szívóhatás csak ott érvényesül, ahol a gél van. A vastag papírtörő réteg tetejére üveglapot, majd annak a tetejére súlyt helyeztünk, hogy az egészet szorosan tartsa. Valamint a rendszer vízszintezésére is ügyelni kellett.

A módszer nagy előnye az egyszerűsége, olcsósága és megbízhatósága. Egyetlen hátránya, hogy a blotolás folyamata egy egész éjszakán át tart.

3.4.1.6. Fixálás, prehibridizálás, hibridizálás

A fixálás előtt a membránból el kell távolítani a nagy mennyiségű sót, mely a 20x SSC-ből maradt vissza. A mosást 2x SSC-vel 5-10 percen keresztül üveglapban, rázóasztalon végeztük (20x SSC DEPC vízzel hígítva). Szűrőpapírból „borítékot” hajtogatunk, beletesszük a membránt, oldalait leragasztjuk klónozó szalaggal. Ezután 120 °C-on szigorúan 30 percig hőkezeljük, hogy az mRNS kovalensen kötődjön a membránhoz.

Előhibridizálás során gátoljuk meg, hogy a vizsgált génnek megfelelő DNS aspecifikusan kötődjön a membrán reaktív kötőhelyeihez. Ezért indifferens DNS tartalmú, nagy sűrűségű prehibridizációs oldattal (25 ml DIG Easy Hyb Granules - hering sperma genomi DNS) előhibridizáltuk a membránt. A hibridizáló csőbe öntöttük az előhibridizáló oldatot, a hibridizátort előfűtöttük 50 °C-ra, a csöveket előmelegítettük benne, hogy átvegye az 50 °C-t mire belekerül a membrán. A membránt belehelyeztük és 1 órán keresztül végeztük az előhibridizálást.

Az előhibridizálás után a 25 µl előzetesen DIG-gel jelölt DNS szekvenciát kiegészítettük 50 µl DEPC vízzel, majd 95 °C-on 7 percig denaturáltuk, ezáltal a DNS szálak kiegyenesednek és a hibridizálás során lehetővé válik a kötődésük a komplementer RNS szálakhoz. A melegítés után jégre helyeztük a DIG-gel jelölt DNS próbát, majd hozzápipettáztuk a prehibridizációs oldathoz. A hibridizálás 14-16 órán át 50 °C-on történt.

3.4.1.7. Mosás két oldatban

A mosás célja a feleslegben lévő, a membránhoz kötött nukleinsavhoz nem kötődő próba eltávolítása. Először alacsony szigorúsági fokú (3. függelék) mosást (LSW-Low Stringency Washing) végeztünk 2x100 ml LSW oldattal 2x15 percig szobahőmérsékleten. Ezután hajtottuk végre a magas szigorúsági fokú (3. függelék) mosást (HSW- High Stringency Wash) 2x100 ml

HSW oldat felhasználásával 2x15 percen keresztül 68 °C-on, hibridizátorban. Fontos a HSW oldat és a hibridizáló csövek 68 °C-ra való előmelegítése.

3.4.1.8. Kemilumineszcens detektálás

A következő mosást üvegcádban Washing Buffer (WB) segítségével végeztük el. Az oldatunk 3 ml (DEPC vízzel 30 ml-re hígított) Washing bufferből és 27 ml (DEPC vízzel 270 ml-re hígított) maleinsav pufferből áll (Dig Wash and Block Buffer Set (Roche)). 100 ml oldat felhasználásával, 5 percig szobahőn mosattuk a membránt, majd leöntöttük a WB-t.

Ezután, fehérjeoldattal blokkoljuk az inert DNS-eket, nehogy az antitestek azokhoz kötődjenek. 5 ml fehérjeoldatot 45 ml 10x koncentrációjú maleinsavval töltünk fel (Dig Wash and Block Buffer Set (Roche)). A mosást szobahőmérsékleten 1 órán keresztül üvegcádban, ezzel a hígított fehérjeoldattal végeztük el.

Az antitest oldat hozzáadása előtt 5 ml fehérje oldatot ismét hígítottunk 10x maleinsavval, hozzápipettáztunk 5 µl antitest oldatot (Anti-Digoxigenin-AP), majd ezzel az oldattal, szobahőmérsékleten 30 percig mosattuk a membránt.

A következő mosást az előzőekben már említett módszerrel elkészített WB oldattal végeztük el, 2x100 ml oldat felhasználásával 2x15 percen keresztül, szobahőmérsékleten. A mosáshoz új, tiszta üvegcádat kellett használnunk, ugyanis az antitestek kitapadhatnak az üvegcád falára így befolyásolva a mosás sikerességét.

A következő lépés, hogy a membránt 5 percig a Dig Wash and Block Buffer Set-ben (Roche) található detektáló oldatban mostuk, amelyet a mosás előtt 10x koncentrációra hígítottunk.

A mosás lépései után 2-3 ml detektáló oldatot tartalmazó légmentesen lezárható műanyag zacskóba helyeztük a membránt, majd szubsztrát oldatot csepegtettünk hozzá (DIG-Northern Starter Kit 2039672 CDP Star Ready to Use). A buborékok eltávolítása után a zacskót lezártuk úgy, hogy ne erresszen (12. kép).



12. kép: A kész membrán, előhívásra várva

Forrás: Szerző

3.4.1.9. Előhívás

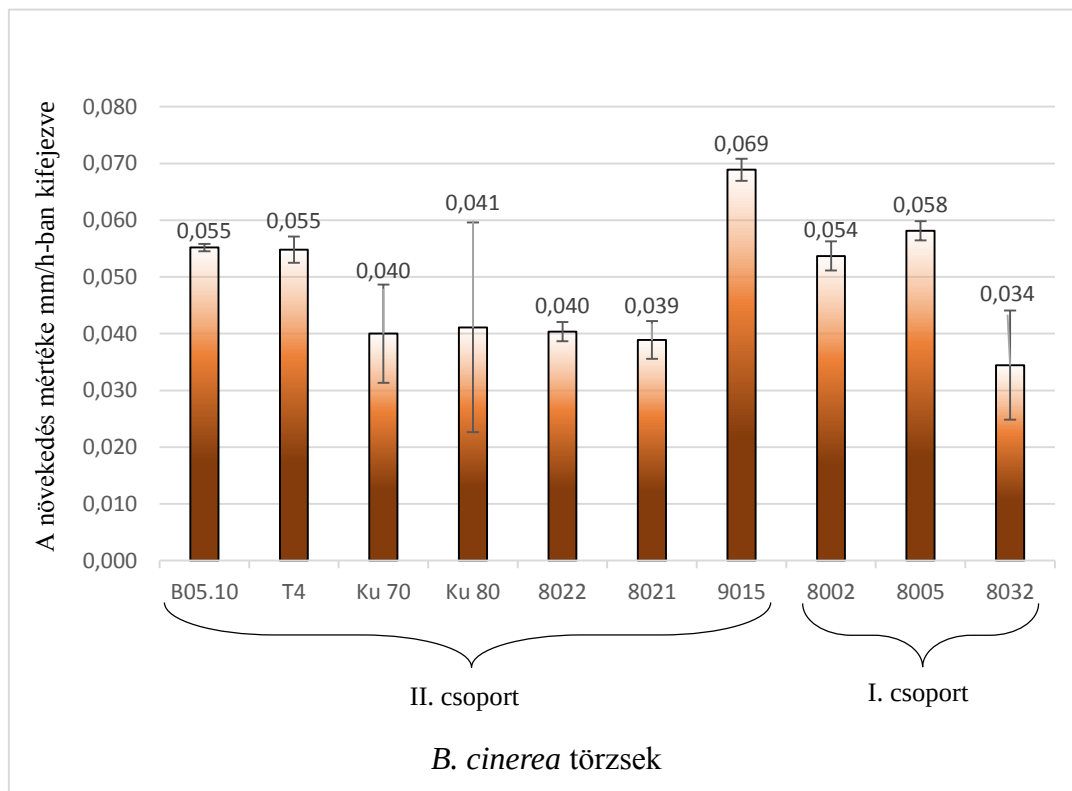
Az előhívás során a membránra sötét szobában filmet helyeztünk, majd 4-6 órás expozíciós időt követően előhívtuk. Az elkészült filmet sötét szobában először ezüst-nitrát oldatban (110 ml ezüst-nitrát + 500 ml desztillált víz) mostuk 2-3 percen keresztül, majd vízzel leöblítettük, ezután szintén 2-3 percig ecetsav oldatban (110 ml ecetsav + 500 ml desztillált víz) mostuk, s végül csapvízzel alaposan lemostuk.

4. Eredmények

4.1. Morfológiai vizsgálat eredménye

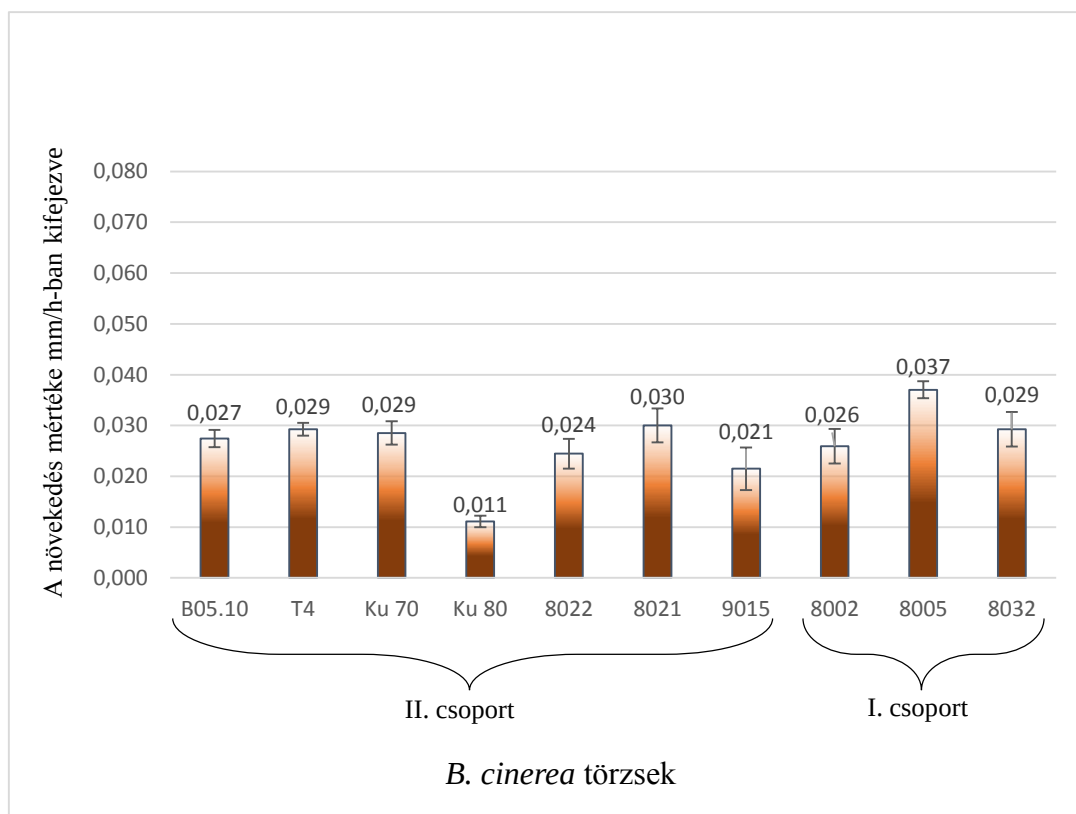
4.1.1. Makroszkópos morfológiai vizsgálat eredménye

A feljegyzett telepátmérőkből átlagos micéliás növekedést (mm/h) számoltunk.



1. diagram: Különböző *B. cinerea* törzsek átlagos micéliás növekedése a szürkerothadás kialakulásának kedvező körülmények között (1% glükóz; 22 °C)

Az 1. diagramot értékelve, megfigyelhető, hogy alacsony glükóz koncentráción és optimális hőmérsékleten növesztett törzsek esetén a leggyengébb micéliás növekedést a Ku törzsek eredményezték, bár értékük megközelítőleg megegyező volt a 8022 és 8021-es törzs értékeivel, azonban szórásuk igen nagy, növekedési ütemük tág határok közt mozgott, ezért gyengébbnek mondhatóak a többinél. Leggyengébb növekedést az I. csoportba tartozó 8032-es törzs mutatta, 0,034 mm/h átlagos sebességgel, legerőteljesebben pedig a 9015-ös törzs nőtt, számszerűsítve 0,069 mm/h-val. Az I-es és II-es csoportba tartozó törzsek növekedési ütemük közt nem állapítható meg egyértelmű különbség.



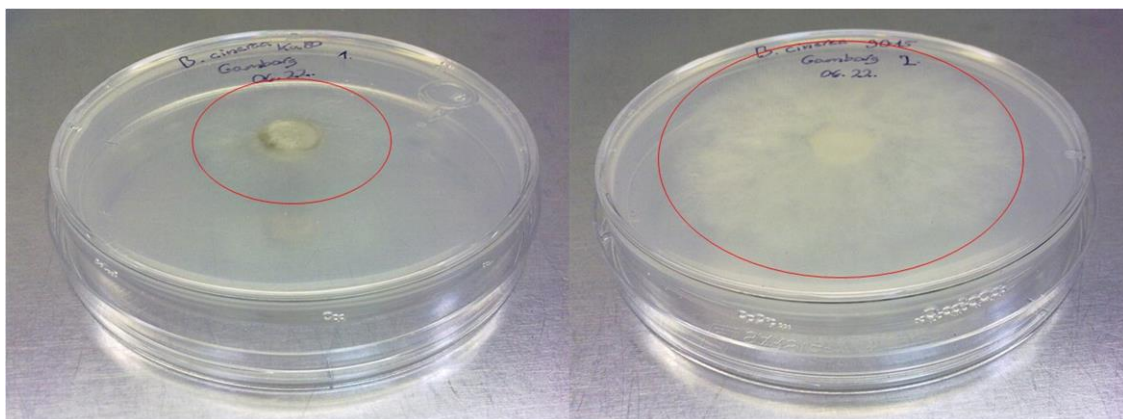
2. diagram: Különböző *B. cinerea* törzsek átlagos micéliás növekedése a nemes rothadás kialakulásának kedvező körülmények között (25% glükóz; 9 °C)

A nemes rothadásnak kedvező körülmények között az értékeken látszik (2. diagram), hogy a törzsek növekedési erélye sokkal kisebb volt, mint a szürkerothadást modellező körülmények közt növesztett tenyészeteké. Megközelítőleg felére tehető a növekedés sebesség abiotikus stressz hatására, ugyanis normál körülményen átlagosan 0,049 mm/h-ra tehető a törzsek növekedése, míg stressz hatására átlagosan a törzsek csak 0,026 mm-t nőttek óránként. Ahogyan az a Petri csészék szemrevételezésekor is látszódott, a Ku 80-as törzs gombafonalainak növekedési sebessége volt a legkisebb (0,011 mm/h). Legkiemelkedőbb növekedést a II. csoportba tartozó 8005-ös törzs ért el 0,037 mm/h értékkel, a többi törzs csak pár ezred milliméternyi különbséggel marad le azonban kicsiny eltéréssel, megközelítőleg egymáshoz hasonló értékeket mutattak.

Az I-es és II-es csoportba tartozó törzsek növekedési erélyében aszúsodást modellező körülmények esetén sem volt megfigyelhető semmiféle különbség.

A makroszkópos mérések során elvégzett szemrevételezések is bizonyították, hogy normál körülmények közt növesztett tenyészetek esetében a mutáns Ku 70 és Ku 80-as törzsek

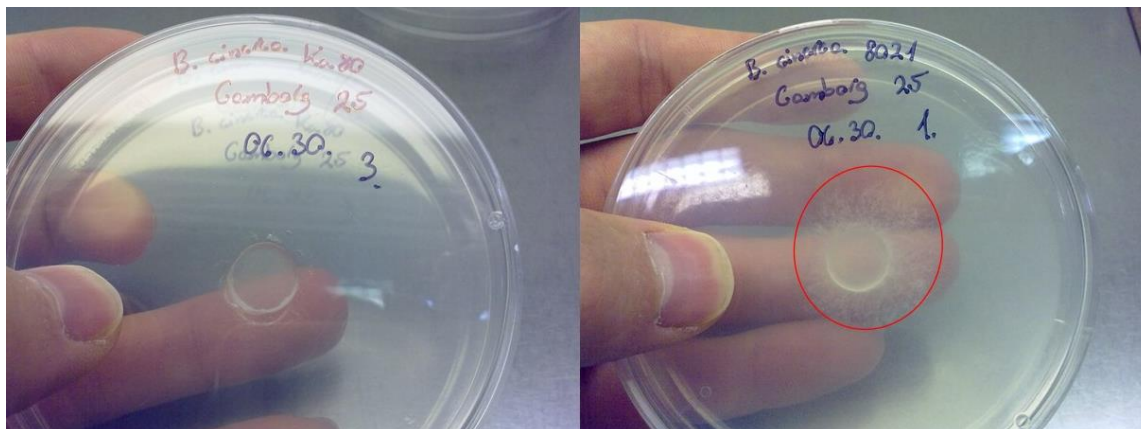
enyhébb micéliás növekedést produkáltak. Ezzel szemben a 9015-ös típustörzs erőteljesen növekedett (13. kép) azonos körülmények között.



13. kép: A Ku80 és 9015 típustörzs közti növekedéskülönbség szemléltetése a leoltást követő 78. óra elteltével normál körülmény modellezésekor

Forrás: Szerző

Aszú körülmény modellezésekor a Ku mutáns törzsek szintén rendkívül gyenge micéliás növekedést eredményeztek. A Ku 80-as törzsek növekedésében alig lehetett jelentős változást feljegyezni a leoltást követő első két mérés során. Összességében elmondható, hogy egyik törzs esetében sem lehet dús hifa szövédéket megemlíteni, még a normál körülmény közt agresszívanabban növő 9015 és B05.10-es törzs esetében sem (14. kép).



14. kép: Leoltást követő 42 óra elteltével növekedést mutató 8021 (jobbra) és növekedést nem mutató Ku 80-as törzsek (balra) közti különbség szemléltetése nemes rothadás kialakulásának kedvező körülmény esetén

Forrás: Szerző

A stressz hatás miatt, a két differenciáló körülmény esetén vizsgált törzsek növekedésben fellépő változás mértékét gátlási %-al (5. táblázat) jellemezzük.

5. táblázat: Különböző *B. cinerea* törzsek stressz hatásra kialakult gátlási százalékanak mértéke

Gátlási %	
B05.10	46,03
T4	42,04
Ku 70	26,98
Ku 80	53,10
8022	35,56
8021	9,89
9015	62,06
8002	49,73
8005	45,06
8032	18,83

A gátlási % kifejezi, hogy a növekedéshez optimális alacsony cukorkoncentráció és magas hőmérséklethez képest, magas cukorkoncentráción és alacsony hőmérsékleten hány százalékkal kisebb a tenyészetek növekedési erélye.

A 9015-ös típus törzs esetén figyelhető meg a legnagyobb mértékű növekedésgátlás, kicsit több mint 62 %, ami köszönhető annak, hogy optimális körülmények hatására erőteljes a növekedési hajlam, azonban stressz tényező fellépésekor jelentősen visszaesik a gomba terjedése a táptalajon. Stressz hatást jobban toleráló törzsek a 8021 és 8032, e törzseknek esik vissza a növekedésük a legkevésbé (20 % alatti tartomány). Összességében a növekedésgátlás 9,89-62,06 % közti tartományban mozog, mely jelentős mértékűnek tekinthető. Kijelenthető, hogy az I. és II. csoportba tartozó törzsek közt gátlási %-ban sem figyelhető meg különbség.

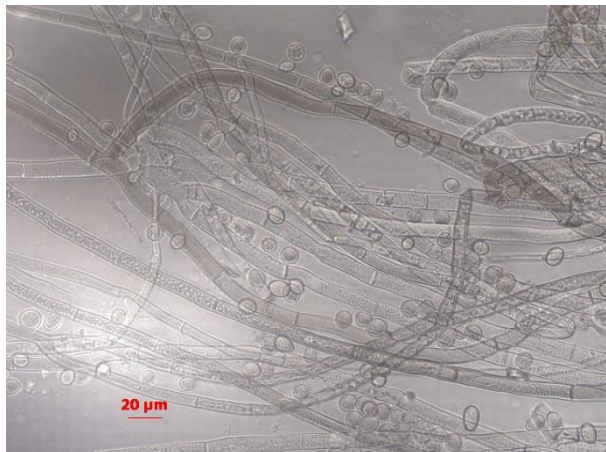
4.1.2. Mikroszkópos morfológiai vizsgálat eredménye

A mikroszkópos vizsgálatokat a leoltást követően körülbelül 96 óra, azaz 4 nap elteltével végeztük el.

A két differenciáló körülmény közt növesztett tenyészetekből vett mikroszkópos mintákon a makroszkópos vizsgálatokkal ellentétben nem volt látható szembetűnő eltérés. A minták mikroszkópos képén mindkét körülmény esetén hasonló sűrűségű micéliumozottság figyelhető meg (15., 16., és 17., 18. kép). Eltérést csak a konídiumok számában van, ugyanis a szürkerothadásnak kedvező körülmények közt növesztett tenyészetek mikroszkópos képén a hifaszövedékek közt megtalálhatóak a szőlőfürt alakú konídiumtartók (19. kép), valamint a rengeteg elszórt konídium is (15. kép), amely „tünet” nemes rothadás körülményei közt nem

jelentkezik (17. és 18. kép). Ez magyarázhatja meg, hogy a Petri csészében lévő 3-4 napos tenyészeteknél megfigyelhető volt a gombatelep enyhe szürkés színezettsége (20. kép), amely az öregebb konídiumtartók fekete színének köszönhető.

A mikroszkópos képeken megfigyelhető volt a micéliumok erős vakuólumozottsága (15., 16., és 17., 18. kép), mely szintén az idősebb képletek jellegzetessége, azonban ez mindkét differenciáló körülmény esetén ugyanúgy jelentkezett.

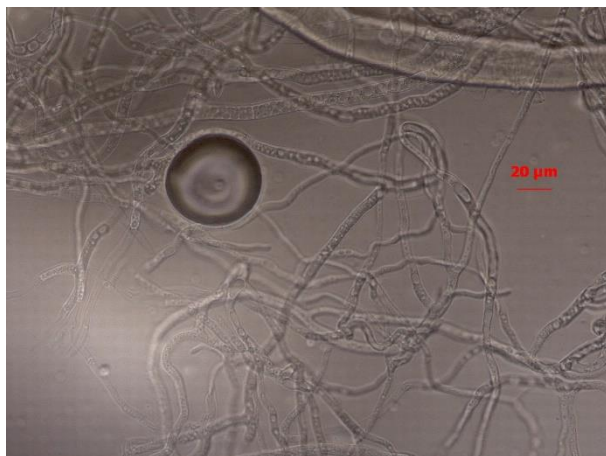


15. kép: 8032-es törzs sűrű hifa szövete, erős konídium szóródással, szürkerothadás körülményein (nagyítás: 40x)



16. kép: 8002-es törzs sűrű hifa szövete, erős vakuólumozottsága szürkerothadás körülményein (nagyítás: 40x)

Forrás: Szerző

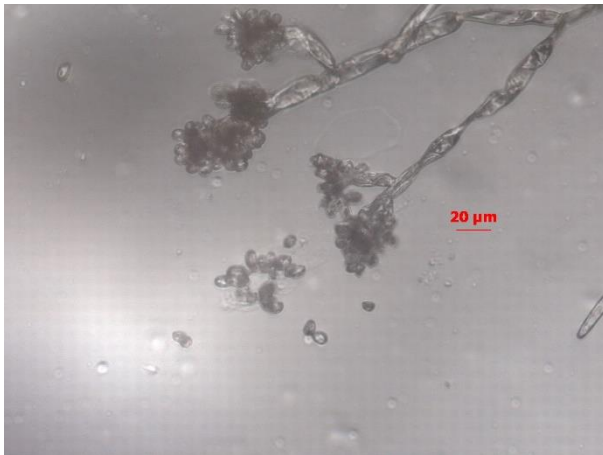


17. kép: 8022-es törzs sűrű hifa szövete, erős vakuólumozottsága, konídiumok nélkül, nemes rothadás körülményein (nagyítás 40x)

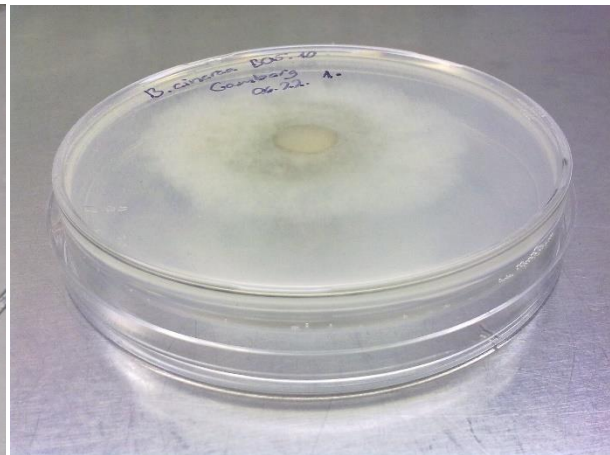


18. kép: B05.10-es törzs sűrű hifa szövete, erős vakuólumozottsága, konídiumok nélkül, nemes rothadás körülményein (nagyítás 40x)

Forrás: Szerző



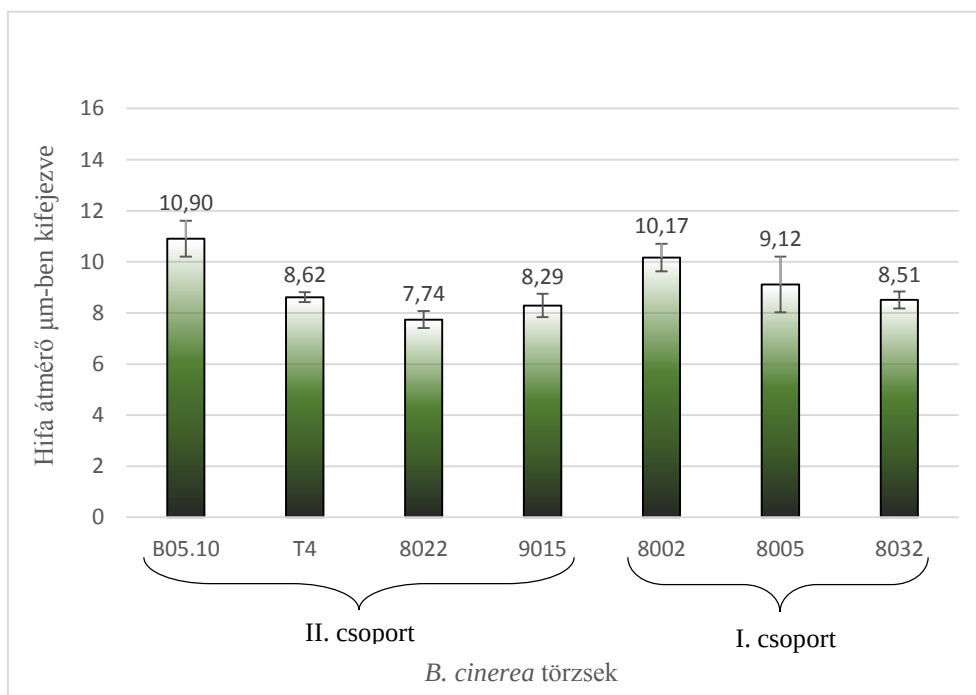
19. kép: 8032-es törzs szürkerothadást modellező körülmények közt kialakult konídiumtartója 40x-es nagyításban



20. kép: A B05.10-es törzs konídiumos színezettsége a szürkerothadás körülményei közt

Forrás: Szerző

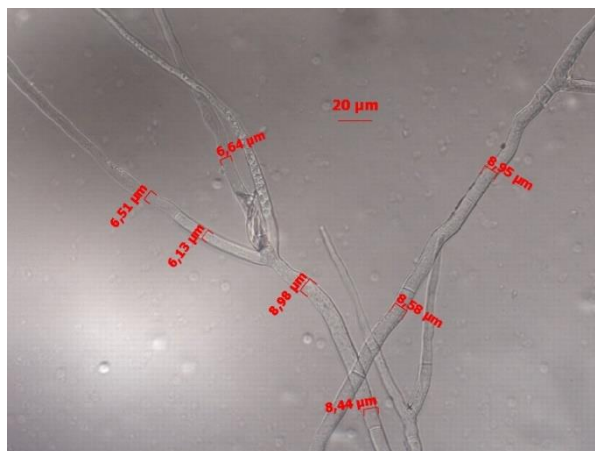
Azt, hogy tényleg van-e különbség a differenciáló körülmények közt növesztett törzsek között, az átlagos hifa átmérő értékelésével döntöttük el. Sok esetben nem sikerült minden törzsről értékelhető mikroszkópos képet készíteni, így a hifa átmérő vizsgálat néhány törzs esetében hiányzik.



3. diagram: Különböző *B. cinerea* törzsek átlagos hifa átmérő vizsgálatának értékei a szürkerothadásnak kedvező körülmények esetén (1 % glükóz; 22 °C)

A normál körülményt ábrázoló diagram sávjain (3. diagram) egyértelműen látható, hogy a vizsgált I. és II. csoportba tartozó törzsek között nem lelhető fel semmilyen különbség, az értékek hasonlóak. A B05.10 és 8002 törzsek hifáinak átmérője meghaladta a 10 μm-t és egyik

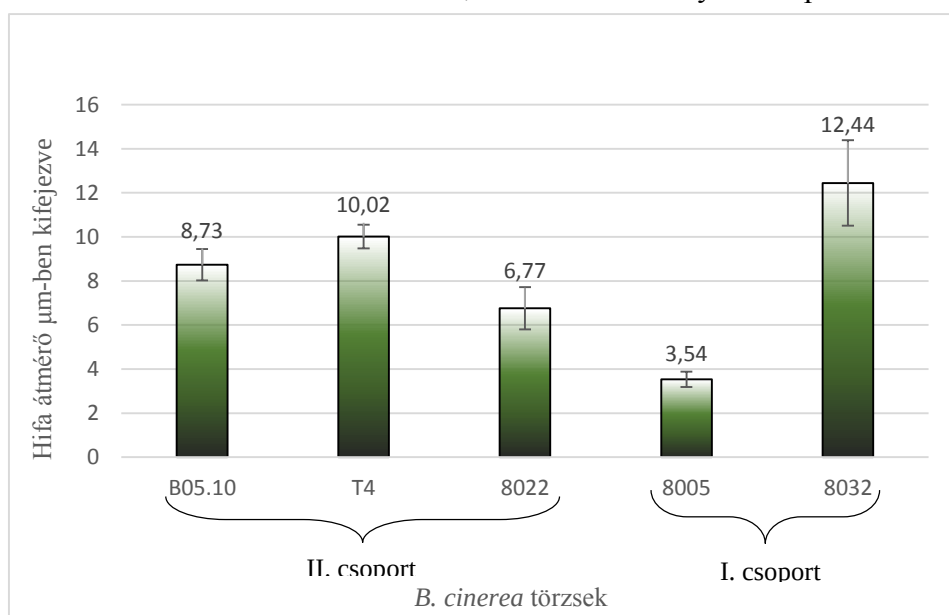
törzs értékei sem estek 7,5 μm alá. Egy törzsön belül, a szórási értékek például hifa elágazódás miatti mellékág vékonyodásoknak tudhatóak be. Ahogyan az a 21. képen is látszik, a hifa elágazódása révén a mellékágak körülbelül 2 μm -rel vékonyodnak el.



21. kép: 9015-ös törzs hifa elágazódásának mikroszkopikus képe a szürkerothadásnak kedvező körülmények között (nagyítás: 40x)

Forrás: Szerző

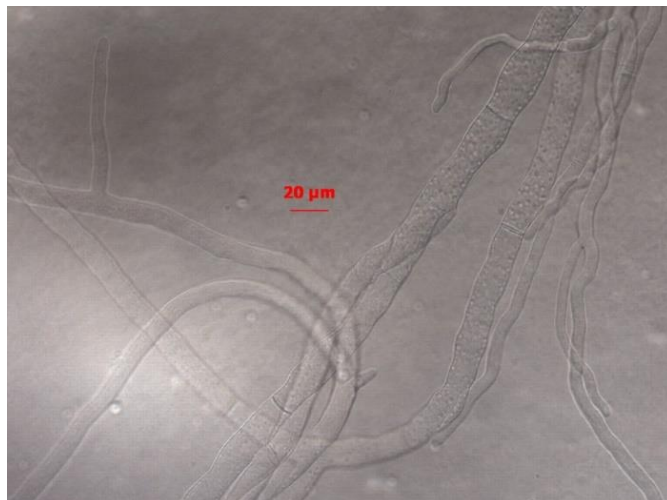
A nemes rothadás kialakulásának kedvező körülményen a vizsgált törzsek értékeit (4. diagram) összehasonlítva az előző értékekkel, érdekes eredményeket kaptunk.



4. diagram: Különböző *B. cinerea* törzsek átlagos hifa átmérő vizsgálatának értékei a nemes rothadásnak kedvező körülmények esetén (25 % glükóz; 9 °C)

A kedvezőbb körülményekhez képest, stressz hatásra a B05.10, 8022 és 8005-ös törzsek hifa átmérője sokkal vékonyabb lett. Utóbbi törzsé jelentős mértékben elvékonyodott, átlagosan 5,6 μm -el, bár az előbbi 2 törzs értékei is hozzávetőlegesen 1-2 μm -el mutattak kevesebbet. Azonban úgy tűnik, a T4 és 8032-es törzs nagyobb hifa átmérőt növesztett stressz tényező

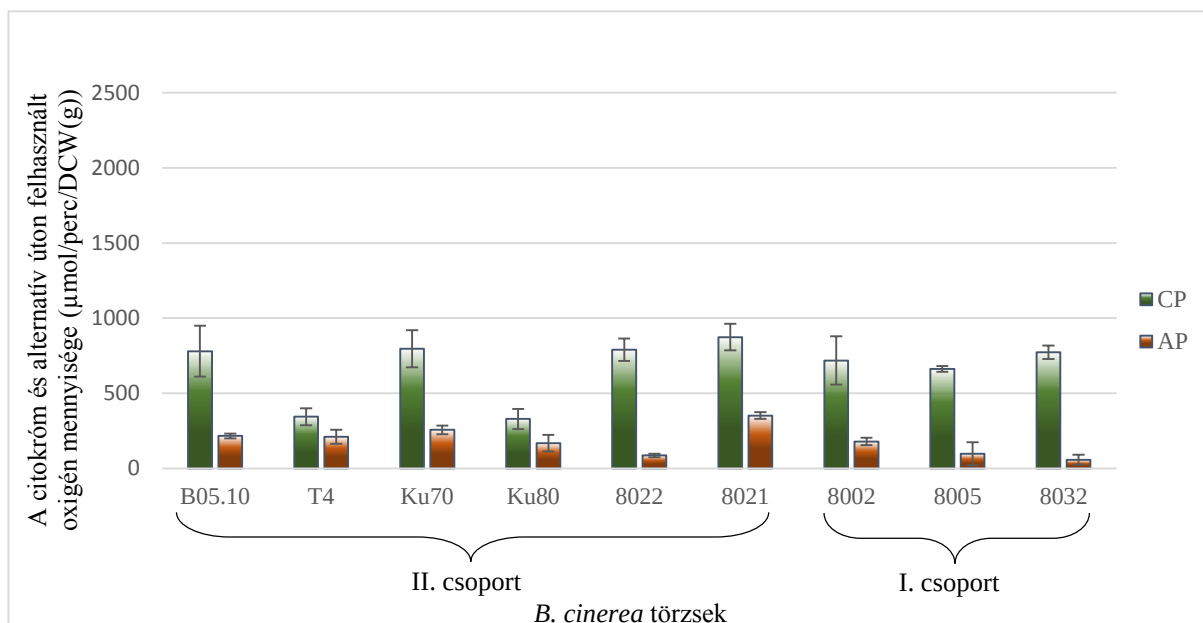
hatására, amely igen erősen vakuólizált. A 8032-nél voltak megfigyelhetőek a legvastagabb hifák (22. kép), átlagosan 12,44 μm -es átmérővel, nagy szórással, ami átlag 3,9 μm -el volt nagyobb, mint a normál körülmény esetében növesztett 8032-es törzsek hifa átmérője. A T4-es törzs értékei átlagosan 1.4 μm -el haladták meg a normál körülményen mért értékeket, de a mikroszkópban még ez is szembetűnő különbséget produkált. Az I-es és II-es csoportba tartozó törzsek között ebben az esetben sem volt fellelhető különbség.



22. kép: 8032-es törzs erősen vakuólizált, nagy átmérőjű hifa szálai, aszúsodást modellező körülmények között (nagyítás: 40x)

Forrás: Szerző

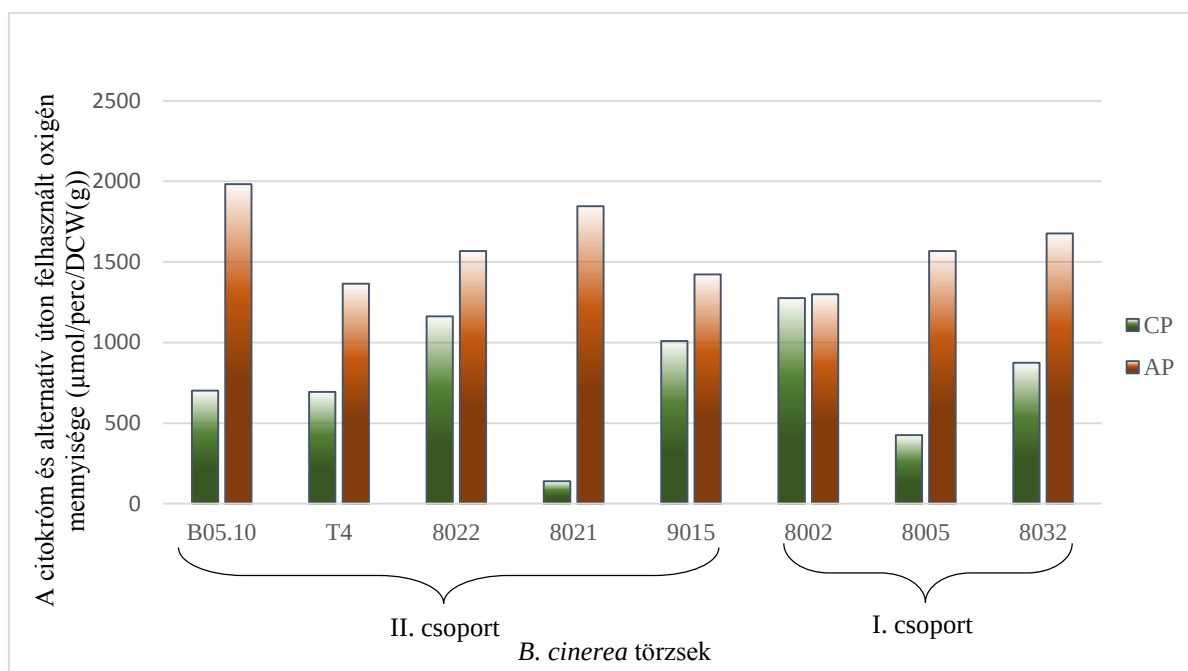
4.2. Légzésaktivitási vizsgálat eredménye



5. diagram: Különböző *B. cinerea* törzsek légzési aktivitása a citokróm úton (CP) ill. a cianid rezisztens alternatív légzési útvonalon (AP) a "szürkerothadás" körülményei között (1% glükóz; 22 °C)

Alacsony glükóz koncentráció és optimális hőmérséklet esetében (5. diagram), amely kedvező a szürkerothadás kialakulásához, az alternatív útvonal (AP) aktivitása minden esetben kisebb volt, mint a citokróm útvonalé (CP). A citokróm út (CP) aktivitása megközelítőleg azonos volt mindegyik esetben, kivéve a T4-es szülő törzset és Ku mutáns törzset, melynek 344 és 329 $\mu\text{mol/perc/DCW(g)}$ értéke jóval elmarad a többi 7 törzs 770 $\mu\text{mol/perc/DCW(g)}$ átlagos értékétől. Érdekes megjegyezni, hogy a fenotípusos jellemzőkben is hasonló Ku mutánsok és szülő törzsek légzésaktivitási eredményei, ahogy a diagramon is látszik, szinte tökéletesen azonosak. Általánosan elmondható, hogy a többi törzs értéke körülbelül 500-1000 $\mu\text{mol/perc/DCW(g)}$ között mozgott. Mivel a szürkerothadást kialakító körülmény esetében nem jelentkezik semmilyen stressz tényező, ezért az energiapazarló alternatív légzési ág (AP) aktivitása is kicsi volt, csak a 8021-es törzs esetében haladta meg a 350 $\mu\text{mol/perc/DCW(g)}$ értéket. A legalacsonyabb értéket a 8032-es törzs érte el, ez 57 $\mu\text{mol/perc/DCW(g)}$, majd ezt követte a 8022-es törzs 85 $\mu\text{mol/perc/DCW(g)}$ eredménnyel. A többi törzs AP aktivitása megközelítőleg 100-260 $\mu\text{mol/perc/DCW(g)}$ közé tehető. Említésre méltó, hogy az I. és II. csoportba tartozó törzsek légzésaktivitásai között nem volt megfigyelhető lényegi eltérés. A kapott értékek közt szignifikáns különbség állapítható meg.

Sajnos a technikai körülmények nem tették lehetővé a szürkerothadásnak kedvező körülmények között a 9015-ös törzs légzésaktivitási vizsgálatát.



6. diagram: Különböző *B. cinerea* törzsek légzési aktivitása a citokróm úton (CP) ill. a cianid rezisztens alternatív légzési útvonalon (AP) a "nemes rothadás" körülményei között (25% glükóz; 15 °C)

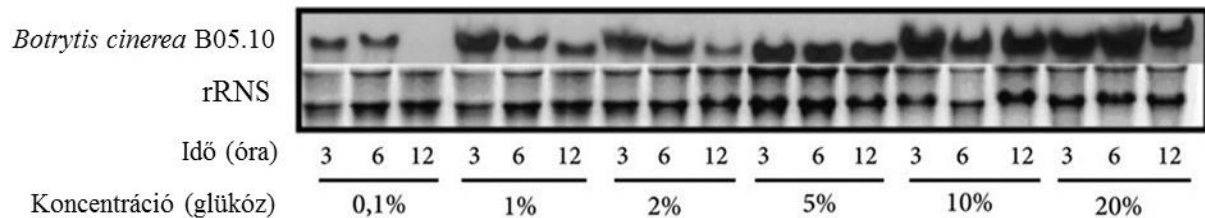
Az diagramokon (5. és 6. diagram) jól megfigyelhető, hogy nem csak a differenciáló körülmények között, de azokon belül, az egyes törzsek légzésaktivitása közt is különbségek voltak.

A nemes rothadást kialakító differenciáló körülmény esetében (6. diagram) is elmondható, hogy a törzsek eltérést mutattak egymás között, de nagyon jól látható, az előző esettel ellentétben, hogy az alternatív út (AP) légzésben betöltött szerepe a citokróm útnál sokkal nagyobbnak mutatkozott. Kiugró értékeket mértünk, törzstől függően 1299-1984 $\mu\text{mol/perc/DCW(g)}$ intervallumon belül, ahol a legkisebb értéket a 8002-es törzs, a legnagyobbat pedig a B05.10-es törzs képviselte. Mindez azt bizonyítja, hogy abiotikus tényezők hatására a légzés alternatív útján keresztül szállítódik az elektronok jelentős része az oxigénre. Stressz hatására, a 8021-es törzs esetében a citokróm út (CP) által elfogyasztott oxigén mennyisége jelentősen kisebb ($140 \mu\text{mol/perc/DCW(g)}$) értéket mutatott a többi törzs értékeihez viszonyítva, melyeknek $425-1275 \mu\text{mol/perc/DCW(g)}$ közé tehető a CP aktivitásuk. Ha párhuzamot húzunk a szürkerothadás körülményeinél kapott CP aktivitás értékekkel, akkor felismerhetjük, hogy az ott mért CP aktivitás is megközelítőleg $500-1000 \mu\text{mol/perc/DCW(g)}$ értékeket képviselt.

Mivel a szülő törzsek és a Ku mutánsok szürkerothadásos körülmények között mért légzésaktivitás eredményei is hasonlóak voltak ezért az aszúsodás körülményei között a Ku törzseket nem vizsgáltuk.

4.3. Northern analízis eredménye

A B05.10-es magas patogenitást mutató típustörzs Northern analízisét elvégezve, a fotó előhívását követően az 5. ábrán látható eredményt kaptuk.



5. ábra: Az *aox* enzim kifejeződése a cukorkoncentráció és az eltelt idő függvényében a riboszómális RNS mennyiségéhez viszonyítva

A mintáinkat azonos mennyiségű rRNS mintákhoz viszonyítjuk, így bizonyítva, hogy az erősebb tónusú vonalak nem azt jelentik, hogy nagyobb mennyiségű mintát vittünk fel a membránra.

A gén minden esetben kifejeződött, sőt magas cukorkoncentrációkon az *aox* enzim expressziója jelentősen emelkedett. Ez bizonyítja, hogy az *aox* szerepet játszik az élőlények különböző körülményekhez történő alkalmazkodási képességében.

Jól látható az ábrán, hogy a cukorkoncentráció növekedésével a vonalak tónusa is erősödött, ami arra utal, hogy az *aox*, a cukorkoncentráció emelkedésével arányosan, egyre nagyobb koncentrációban van jelen a mitokondrium belső membránjában. Az eredmény magyarázata a következő lehet: mivel a membránon nem az *aox* koncentráció látható, hanem az RNS koncentráció, arra lehet következtetni, hogy a magasabb cukorkoncentrációkon a stressz hatás miatt megnövekszik az átíródó mRNS-ek száma, ami az információt hordozza és lehetőséget ad az AOX képződésére.

0,1 % glükóz koncentráció esetében 12 óra elteltével nem látni kifejeződésre utaló sávot.

5. Következtetés

Az átlagos micéliás növekedés vizsgálatával bizonyítottuk, hogy az alacsony hőmérséklet és a magas cukorkoncentráció körülbelül a felére csökkentette vissza a törzsek növekedési erélyét az optimális körülményekhez képest. Azonban az I-es és II-es csoportba tartozó törzsek növekedési ütemében nem található különbség egyik differenciáló körülmény esetén sem. Kisebb-nagyobb eltérés észlelhető a törzsek között mindkét modellezett körülményen belül, de ez normális, a fenotípusos és genetikai különbségeknek köszönhetően. Nagyobb eltérés a mutáns törzsek és azok szülőtörzseinél fedezhető fel.

Már a kísérletek során végzett szemrevételezési vizsgálatokban is látszódott, hogy a sztrezzhatás nagyban visszaszorítja a gombák növekedését. Egyrészt a gátlási % meghatározásával, számszerűsítve is látszódott, hogy az abiotikus sztrezz hogyan hatott a gomba növekedésére, ám az I. és II. csoportba tartozó törzsek közt gátlási %-ban sem volt megfigyelhető különbség. Másrészt a mikroszkópos vizsgálatok során elkészített képek is bizonyították, hogy az optimális körülményekhez képest, a nemes rothadás kialakulásának kedvező körülmények között, a törzsek nem fejlesztettek konídiumtartós konídiumokat, a szaporodás vegetatív úton történt, a hifa szövetek fehér, elszíneződéstől mentes. Mivel a szürkerothadásnak kedvező körülmények esetében a szaporodásnak optimális feltételei adottak voltak, ezért a konídiumtartó fejlesztés, és konídiumtermelés is megfigyelhető volt, ezzel magyarázható a több napos tenyészetek enyhe szürkés színezettsége.

Az átlagos hifa átmérő vizsgálat után vegyes eredményeket kaptunk a két differenciáló körülmény összehasonlításakor, mely a törzsek stressz hatására kialakult különböző válaszreakcióinak volt köszönhető. Ezek alapján megkülönböztetünk olyan törzset, mely abiotikus korlátozó tényezők hatására a hifa elvékonyodásával reagáltak, de néhány törzs éppen ellenkezőleg a hifa megvastagodásával és erős vakuólumozottsággal reagált az alacsony hőmérsékletre, de főként a magas ozmotikus nyomásra. A kialakított stresszhatás ebben az esetben sem volt hatással az I-es és II-es csoport hifa átmérőjének változására, különbség nem állapítható meg a modellezett körülmények között.

Légzésaktivitási vizsgálatok során nem csak a differenciáló körülmények között, de azokon belül, az egyes törzsek légzésaktivitása közt is különbségek voltak, mely ugyancsak a törzsek genetikai variabilitásának köszönhetően adódtak. Mivel a szürkerothadást kialakító körülmény esetében nem jelentkezett semmilyen stressz tényező, ezért az alternatív légzési ág aktivitása sokkal kisebbnek bizonyult a citokróm útnál. A nemes rothadást kialakító körülmény esetében az alternatív út légzésben betöltött szerepe a citokróm útnál sokkal

nagyobbnak bizonyult, így alátámasztottuk a szakirodalomban lévő feltételezést, hogy abiotikus tényezők hatására a légzés alternatív útján keresztül szállítódik az elektronok jelentős része. Az I. és II. csoportba tartozó törzsek légzésaktivitásai között nem volt megfigyelhető lényegi eltérés a differenciáló körülményeken belül sem, s azok között sem.

A northern analízis során a megnövekedett cukorkoncentrációk esetén, megnövekedett *aox* expressziót fedeztünk fel, mely bizonyítja, hogy az *aox* szerepet játszik az élőlények különböző körülményekhez történő alkalmazkodási képességében.

A jövőben tervezzük a törzsek morfológiájának további tanulmányozását, főként mikroszkópos vizsgálatok elvégzésével, valamint a B05.10 és T4 szülő törzsek és Ku mutánsaik összehasonlítását.

Összefoglalás

A *Botrytis* genuszba tartozó fajok olyan fonalas gombák melyek fitopatogének és gazdaságilag jelentős kárt tudnak okozni. A *B. cinerea* leginkább a mérsékelt égövön terjedt el, és ott nagyszámú, eddig bizonyítottan 235 gazdanövényen képes a szürkerothadás (pouriture grise) nevű betegséget kiváltani. Megfelelő körülmények között (szőlőfajta, klimatikus tényezők), az érett, magas cukortartalmú szőlőszemekeken nemes rothadás (pouriture noble) is kialakulhat (JARVIS, 1977.).

Legutóbbi kutatások eredményei alapján, a *Botrytis cinerea* fajkomplex legalább két fajt foglal magába, *B. cinerea* sensu stricto (II. csoport) és *B. psudeocinerea* (I. csoport), melyek közé tartozó törzsek genetikai alapon elkülöníthetőek, különböznek a patogenitásukban és eltérő módon tolerálják a különböző fungicideket (ASADOLLAHI et al., 2013.).

Kísérleteink során a *Botrytis cinerea* gomba tanulmányozásával az volt a célunk, hogy a szürke- és nemes rothadás modellezésével megfigyelhessük a különböző differenciáló körülmények hatását a gomba élettani tulajdonságaira nézve, mint például a morfológiai sajátság változását, a gomba alternatív oxidáz enzimének esetleges aktivitásváltozását, valamint a hatást az előbb említett enzim kifejeződésére.

Elsőként a *Botrytis cinerea* I-es és II-es fajcsoportjába tartozó, 10 kiválasztott törzs morfológiai tulajdonságait vizsgáltuk különböző körülmények között: két hőmérsékleten (9, és 25 °C) és eltérő ozmotikus körülmények modellezésével (10 és 250 g/l glükóz). A vizsgálatokat makroszkópos mérésekkel és fénymikroszkópos megfigyeléssel végeztük el. Eredményképpen kijelenthető, hogy a törzsek növekedése a nemes rothadás körülményei közt sokkal gyengébb volt, mint a szürkerothadás esetében, azonban mikroszkopikusan nem volt jelentős különbség a törzsek közt. Ezután összehasonlítottuk ugyanezen 10 törzs alternatív oxidáz (AOX) aktivitását is. Az eredmények alapján megállapítható, hogy abiotikus stressz (alacsony hőmérséklet -és magas ozmotikus nyomás) hatására, a nemes rothadást modellező körülmények esetén, az alternatív légzési útvonal aktivitása jelentősen megnőtt. Végül a B05.10 *B. cinerea* sensu stricto, magas patogenitást mutató típusú törzs esetében nyomon követtük, hogy az idő elteltével és a szénhidrátforrás emelkedő koncentrációjával, hogyan változik az *aox* expressziója. A vizsgálatot Northern analízissel végeztük el, végeredményképpen pedig kijelenthető, hogy magas cukorkoncentrációkon az *aox* enzim expressziója jelentősen emelkedett.

Szakirodalom jegyzék

- Asadollahi, M., Fekete, E., Karaffa L., Flippin M., Árnýasi M., Esmaeili, M., Váczy K.Z., Sándor E. (2013): Comparison of *Botrytis cinerea* populations isolated from two open-field cultivated host plants. *Microbiological Research*, 168: 379-388. p.
- Baroffio, C.A., Siegfried, W., Hilber, U.W. (2003): Long-term monitoring for resistance of *Botrytis fuckeliana* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole and hydroxylanilide fungicides in Switzerland. *Plant Disease* 87: 662-667. p.
- Bartók, K. (2004): A növénykórtan alapjai Ábel kiadó, Kolozsvár 138-140 p.
- Berthold, D.A., Stenmark, P. (2003): Membrane-bound diiron carboxylate proteins. *Annual Review of Plant Biology*. 54. 497-517. p.
- Biró S., Dombrádi V. (2011): Nukleinsav hibridizációs technikák. In: Dombrádi V. szerk. *Molekuláris biológiai módszerek*, Debreceni Egyetemi Kiadó, Debrecen, 93-98. p.
- Borecky, J., Nogueira, F.T., de Oliveira, K.A., Maia, I.G., Vercesi, A.E., Arruda, P. (2006): The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *Journal of Experimental Botany*. 57. 849-864. p.
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B., Tudzynski, P. (1994): Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics*. 25: 445–450.
- Castro-Guerrero, N. A., Rodríguez-Zavala, J. S., Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S., Moreno-Sánchez, R. (2008): Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under Cd²⁺ stress in *Euglena*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 40: 227–235.
- Choquer, M., Robin, G., Le Pêcheur, P., Giraud, C., Levis, C., Viaud, M. (2008): *Ku70* or *Ku80* deficiencies in the fungus *Botrytis cinerea* facilitate targeting of genes that are hard to knock out in a wild-type context. *FEMS Microbiol. Letter*, 289: 225-232. p.
- Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K., Jarvis, W. R. szerk. (1980) *The biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK. Daboussi, M. J., Capy, P. (2003) Transposable elements in filamentous fungi. *Ann. Rev. Microbiol.*, 57: 275-299. p.
- Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., De Vicente, A., Pérez-García, A. (2008): Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *Internat. Microbio.*, 11: 1-9. p.
- Fournier, E., Giraud, T. & Brygoo, Y. (2005): Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* 97: 1251–1267. p.

- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. (1968): *Experimental Cell Research* 50: 151-158. p.
- Glits, M., Horváth, J., Kurdi, G., Petróczi, I. (1997): *Növényvédelem*. Budapest. Mezőgazda Kiadó, 561-562. p., 596. p.
- Henry, M.F., Nyns, E.J. (1975): Cyanide-insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway. *Sub-Cellular Biochemistry*. 4: 1-6. p.
- James, W. C. (1974) Assessment of plant diseases and losses. *Annu. Rev. Phytopathology* 12: 27-48. p.
- Jarvis, W. R. (1977) *Botryotinia and Botrytis Species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity*. Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada.
- Juszczuk, I. M., Rychter, A. M. (2003): Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochimica Polonica*. 50: 1257–1271.
- Kövics, Gy. (2000): *Növénybetegséget okozó gombák névtára*. Mezőgazda kiadó, Budapest, 81-157. p.
- Kövics, Gy. (2009): *Növénykórtani vademecum. A növényvédelem Oktatásának Fejlesztéséért KözhASNÚ Alapítvány (NOFKA) kiadása*, Debrecen, 51 p., 329. p.
- Kövics, Gy. (2011): *Növénykórtan biológiai alapjai II. előadások*. Debrecen, Debreceni egyetem
- Kövics, Gy. (2012): *Részletes növénykórtan II. előadások*. Debrecen, Debreceni Egyetem
- Levis, C., Fortini, D., Brygoo, Y. (1997): Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Current Genetics*. 32: 157–162. p.
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., Feraud, M. (2003): Phenotypic differences between *vacuola nad transposon* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol*, 109: 479-488. p.
- Maxwell, D. P., Wang, Y., McIntosh, L. (1999): The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 8271–8276. p.
- McDonald, A. E., Vanlerberghe, G. C. (2005): Alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase in marine prokaryotes of the Sargasso Sea. *Gene*. 349: 15–24. p.
- Møller, I. M. (2001): Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology*. 52: 561–591. p.
- Moore, A. L., Siedow, J.N. (1991): The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophysica Acta*. 1059 121–140. p.

- Mudich, A. (1988): Növényvédelmi mikológia. Keszthely. ATEK Keszthelyi Mezőgazdaság tudományi Kar, 82. p., 138. p.
- Perveen, K., Bokhari, N. A. (2012): Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* isolated from soil of date palm field against *Fusarium oxysporum*. African Journal of Microbiology Research, 6: 3348-3353. p.
- Pethő, M. (1993): A növényélettan alapjai. Akadémia Kiadó, Budapest 111-112. p.
- Quidde, T., Osbourn, A. E., Tudzynski, P. (1998): Detoxification of α-tomatine by *Botrytis cinerea*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 52: 151–165. p.
- Rohány, G. (2001): Magyar borok könyve, Bp, Akó Gasztronómiai Tan. és kiadó Kft. 303. p.
- Szőke, L. (1996): A szőlő növényvédelme. Budapest. Mezőgazda Kiadó, 114-118. p.
- Tóth, M. (2008): Gyümölcsfélék és szőlő kiskerti védelme. Bp. Mezőgazda Kiad., 115-117. p.
- Ubrizsy, G. (1965): Növénykórtan II. Bp. Akadémiai Kiadó, 299-303. p., 724-726 p.
- Vajna, L. (1987): Növény patogén gombák. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 35 p., 124-170 p.
- Váczy, K., Sándor, E., Karaffa, L., Fekete, E., Fekete, É., Árnási, M., Czeglédi, L., Kövics, G., Druzhinina, I. S. and Kubicek, C. P. (2008): Sexual Recombination in the *Botrytis cinerea* Population in Hungarian Vineyards. Phytopathology. Volume 98, Number 12. Pages 1312-1319. p.
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., J. A. L. VAN KAN (2007): *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease, Molecular Plant Pathology, Volume 8, Issue 5, pages 561–580. p.
- Wood, P. M.–Hollomon, D. W. (2003): A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. Pest Management Science. 59: 499–511. p.
- Yip, J. Y., Vanlerberghe, G. C. (2001): Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake. *Physiologia Plantarum*. 112. 327-333. p.

Interneten elérhető források:

I1: http://m.cdn.blog.hu/sz/szolo/image/200712/botrytis_cinerea_cycle.gif

2014.10.11. 14.20 h

I2: <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/GARDEN/IMAGES/INVERT/bunchrotlc.jpg>

2014. 10. 11. 14.25 h

I3: <http://www.uni-corvinus.hu/index.php?id=p1001763>

2014. 10. 15. 21.45 h

Függelék

1. függelék:

Gamborg B5 táptalaj összetevők	(g/L)
KNO ₃	2,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,134
CaCl ₂ x2H ₂ O	0,15
MgSO ₄	0,122
NaH ₂ PO ₄	0,13042
MnSO ₄ x2H ₂ O	1
H ₃ BO ₃	0,3
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,025
KI	0,075
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,0025
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,0025
FeSO ₄ x7H ₂ O	2,78
ZnSO ₄ x7H ₂ O	0,2
Na ₂ -EDTAx2H ₂ O	3,73
glükóz	a kísérlet beállításától függ
agar (csak szilárd táptalaj esetén)	15
pH	4.00

2. függelék

RNS izolálás szövetféleségből NucleoSpin® RNA Plant protokoll alapján.

1. <u>A minta homogenizálása</u> Minta porítása folyékony N ₂ segítségével.	 Sejtfeltárás
2. <u>Sejtek roncsolása (lízis)</u> 350 µl RA1 puffert és 3,5 µl β-mercaptoetanolt adunk a mintákhoz és erőteljesen vortexeljük.	 + 350 RA1 + 3,5 µl β-ME
3. <u>A lizátum szűrése</u> A lizátum tisztítása 11.000 fordulat/perc sebességgű, 1 percig tartó centrifugálással.	 11.000 x g  1 perc
4. <u>RNS kötő feltételek beállítása</u> A lizátumot 350 µl 70%-os etanollal elkeverjük.	 + 350 µl 70% os etanol Keverés
5. <u>DNS kötése</u> Kovasav membránon keresztül centrifugáltatjuk a lizátumot 30 másodpercen keresztül 11.000 ford./percen.	 11.000 x g  30 másodperc
6. <u>Kovasav membrán sótlanítása</u> 350 µl MDB-t pipetázunk a membránra és 11.000 ford./percen, 1 percen keresztül szárítjuk a membránt.	 + 350 µl MDB  11.000 x g, 1 perc
7. <u>DNS emésztése</u> 95 µl DNáz reakció keveréket pipetázunk a kovasav membránra. 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.	 + 95 µl DNáz oldat reakciókeverék, Szobahőmérséklet, 15 perc
8. <u>Kovasav membrán mosása és szárítása</u> <u>1. mosás:</u> 200 µl RAW2 pufferrel centrifugálunk 11.000 ford./percen; 30 másodpercig. <u>2. mosás:</u> 600 µl RA3 pufferrel centrifugálunk 11.000 ford./percen; 30 másodpercig. <u>3. mosás:</u> 250 µl RA3 pufferrel centrifugálunk 11.000 ford./percen; 2 percig, hogy a membránt teljesen kiszárítsuk.	 + 200 µl RAW2 11.000 x g, 30 mp  + 600 µl RA3 11.000 x g, 30 mp  + 250 µl RA3 11.000 x g, 2 perc
9. <u>RNS leoldása a membránról</u> 60 µl RNáz mentes vízzel centrifugálunk 11.000 ford./perc sebességgel 1 percig.	 + 60 µl RNáz mentes H ₂ O, 11.000 x g, 1 perc

3. függelék

A northern analízis során alkalmazott oldatok elkészítési módjai

Loading puffer készítése:

250 µl 100 %-os formamid
83 µl 37 %-os formaldehid
50 µl 10x MOPS
50 µl 100%-os glicerol (Rnáz mentes)
53 µl DEPC víz
4 µl Etilium-bromid (EtBr)
10 µl Brómfenol-kék

Össz.: 500 µl

Eppendorfban összemérjük, vortexeljük, spineljük, majd jégre helyezzük a felhasználásáig.

10x koncentrációjú MOPS oldat készítése:

41,85 g MOPS MW: 209,3 g/M
6,8 g Na-acetát x 3H₂O MW: 136,08 g/M
Feltöltjük 800 ml-re DEPC vízzel
5,845 g (20 mM) EDTA (az oldat pH: 4,3)
pH beállítása NaOH-al 7,0-ra
Feltöltjük 1000 ml-re DEPC vízzel
A jó oldódás érdekében kevertetjük
Sterilizálás sterilstoppal (az autoklávban besárgul)
Hűtőszobában 4 °C-on kell tartani
(1x-es koncentráció készítése: 100 ml-t feltöltünk 900 ml DEPC vízzel)

20x-os koncentrációjú SSC oldat készítése:

175,32 g (3M) NaCl-ot és 88,23 g (0,3 M) Na-citrát-ot belemérünk 1l DEPC vízbe. A pH-t HCl-al 7,0 re állítjuk be, majd autoklávban sterilezzük.

LSW (Low Stringency Washing - Alacsony szigorúsági fokú) oldat készítése:

100 ml oldat készítéséhez, 10 ml 20x SSC-t, 80 ml DEPC vízzel töltjük fel, majd hozzáadunk 1 ml 10%-os SDS-t és DEPC vízzel jelre töltjük (az SSC és az SDS nem mérhető össze közvetlenül, mert csapadék képződik).

HSW (High Stringency Washing - Magas szigorúsági fokú) oldat készítése:

100 ml oldat készítéséhez 0,5 ml 20x SSC-t, 80 ml DEPC vízzel töltünk fel, majd 1 ml 10%-os SDS-t adunk hozzá és DEPC vízzel jelig töltjük. (a csapadékképződés megelőzésére ismételt figyelmet kell fordítani).

NYILATKOZAT

Gombkötő Balázs büntetőjogi és fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem és aláírással igazolom, hogy a szakdolgozat saját munkám eredménye. A felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem, a diplomamunkára vonatkozó jogszabályokat betartottam.

Gombkötő Balázs

Aláírás

Születési idő: 1991.02.18.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni a Debreceni Egyetem TTK Biomérnöki Tanszékének, valamint a MÉK Élelmiszertudományi Intézetének, hogy a laboratóriumokban lehetőséget nyújtottak szakdolgozatomhoz szükséges vizsgálatok elvégzéséhez.

Külön köszönetemet fejezem ki Dr. Karaffa Erzsébet Mónika egyetemi docensnek, hogy szakmai tudásával és önfeláldozó, segítőkész oktatói munkájával segítette a dolgozatom elkészülését. Valamint köszönöm Dr. Bérczesné Szojka Anikó PhD hallgatónak, hogy a sok jó tanáccsal, a kísérletekben nyújtott segítségével hozzájárult dolgozatomhoz.

Külön köszönetet érdemel Dr. Mojtaba Assadollahi kutató, laboratóriumi munkája, mellyel nagyban segítette dolgozatom elkészülését.

Köszönettel tartozom Kovács Csilla PhD hallgatónak, a morfológiai vizsgálatban és annak kiértékelése során nyújtott segítségéért.

Végül köszönöm szüleim kitartó támogatását és segítségét.

A kutatás a TÁMOP-4.2.2. A-11/1/KONV-2012-0043 számú ENVIKUT projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Szojka Anikó publikációt megalapozó kutatása 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 keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.