

SZAKDOLGOZAT

Egyed Gyula - Szakdolgozat

Egyed Gyula

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Élelmiszer-mikrobiológia, -higiéncia és -biztonság Tanszék



Különböző évjáratú aszúbogyók mikrobiótájának
felmérése és jellemzése

Egyed Gyula Szakdolgozat

Egyed Gyula

Budapest

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Szak neve: BSc Biomérnöki

Modul neve: Alkalmazott biotechnológiai

Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Szakedolgozat készítés helye: Élelmiszer-mikrobiológia,-higiénia és -biztonság Tanszék

Hallgató: Egyed Gyula

A szakedolgozat címe: Különböző évjáratú aszúbogyók mikrobiótájának felmérése és jellemzése

Konzulens: Dr. Pomázi Andrea, egyetemi docens

Konzulens: Dr. Kovács Mónika, egyetemi docens

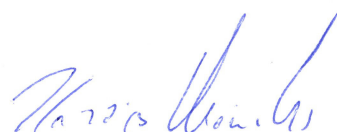
Beadás dátuma: 2023. május 9.



Mohácsiné Dr. Farkas Csilla
Élelmiszer-mikrobiológia,-higiénia
és -biztonság Tanszék vezetője



Dr. Pomázi Andrea
konzulens



Dr. Kovács Mónika
konzulens



Dr. Nguyen Duc Quang
Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék vezetője

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
2. CÉLKITŰZÉSEK	2
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
3.1 TOKAJI BORVIDÉK	3
3.2 BOTRYTIS CINEREA	5
3.2.1 A fonalas gomba taxonómiája	5
3.2.2 A fonalas gomba életciklusa.....	6
3.2.3 A fonalas gomba genetikai diverzitása.....	8
3.2.4 A fertőzés jó oldala: nemesrothadás.....	10
3.2.5 A fertőzés rossz oldala: szürkerothadás	11
3.3 SZŐLŐN ELŐFORDULÓ TOVÁBBI ÉLESZTŐ- ÉS FONALAS GOMBÁK	12
3.4 GOMBAFAJOK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATI LEHETŐSÉGEI.....	13
3.4.1 DNS vonalkódolás.....	13
3.4.2 PCR-RFLP	15
3.4.3 RAPD	16
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
4.1 VIZSGÁLT TÖRZSEK, TÖRZSGYŰJTEMÉNY LÉTREHOZÁSA	17
4.2 2022-ES ÉVJÁRATÚ MINTÁK GYŰJTÉSE ÉS FELDOLGOZÁSA.....	18
4.3 TÖRZSEK MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATA.....	19
4.4 NUKLEINSAV IZOLÁLÁS.....	19
4.4.1 Fenol-kloroformos eljárás	20
4.4.2 Nátrium-acetátos eljárás.....	20
4.4.3 Kálium-acetátos eljárás	21
4.5 MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	21
4.5.1 Agaróz gélelektroforézis	21
4.5.2 rDNS régiók amplifikálása polimeráz lánreakcióval	22
4.5.3 ARDRA	22
4.5.4 RAPD	23
4.5.5 Előkészítés szekvenálásra, szekvencia analízis.....	23
4.6 STATISZTIKAI SZOFTVEREK	24

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	25
5.1 IZOLÁTUMOK MORFOLÓGIAI JELLEMZÉSE	25
5.1.1 Élesztőgombák morfológiája.....	25
5.1.2 Fonalas gombák morfológiája.....	26
5.2 NUKLEINSAV IZOLÁLÁSI MÓDSZEREK ÖSSZEHASONLÍTÁSA	31
5.3 MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK	34
5.3.1 ARDRA.....	34
5.3.2 Szekvenálás	37
5.3.3 RAPD	40
6. ÖSSZEFOGLALÁS	43
7. IRODALMI HIVATKOZÁS	45

Egyed Gyula - Szakdolgozat

1. BEVEZETÉS

Az Északkelet-Magyarországon elterülő Tokaji borvidék a bortermelés hosszú és gazdag múltjára tekint vissza, egészen a 16. század elejéig. A régió éghajlata, talaja és domborzata különösen alkalmas különböző aszúszőlőfajták termesztésére, melyeket egyedülálló mikrobaközösség jellemez. A mikrobák közül kimagasló szereppel bír a *Botrytis cinerea* fonalas gomba, amely az általa okozott nemes-, illetve szürkerothadás jelenségről ismeretes. Míg a szürkerothadás az egész évi szőlőtermést veszélyeztetheti, a nemesrothadás a *Botrytis cinerea* fertőzés egy olyan formája, amely az érés késői szakaszában érinti a szőlőt. A gomba behatol a bogyó belsejébe, és anyagcserevékenységével megváltoztatja annak kémiai összetételét és csökkenti a víztartalmát. A folyamat során koncentrálnak a cukrok, savak és ízanyagok az abból készült bornak rendkívül összetett és mély ízt kölcsönöznek.

Míg számos tanulmány vizsgálta a tokaji borokhoz kapcsolódó mikrobiális közösséget, korlátozott ismereteink vannak az érintett gombafajok genetikai változatosságáról. A dolgozatom fő célja, hogy betekintést nyújtson a Tokaji borvidék különböző évjáratú aszúsodott szőlőszemeiről izolált élesztők és fonalas gombák világába, elsődlegesen a *Botrytis cinerea* törzsek diverzitásába. Az eredményeim hozzájárulhatnak a nemesrothadás jelenségével összefüggő mikrobaközösség jobb megértéséhez, mely alapot adhat olyan jövőbeni vizsgálatokhoz, amelyek során a mikrobiális közösség genetikai diverzitása és az aszúborok íze és minősége közötti kapcsolat feltárása a cél.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Szaktervezésemben a Tokaji borvidék különböző geológiai és éghajlati adottságú területein fellelhető aszúszőlőfajták élesztő- és fonalas gomba diverzitásának vizsgálatát tűztem ki célul, melynek eléréséhez az alábbi feladatok teljesítése szolgált:

- a szüretet megelőzően aszúszemek gyűjtése intakt szőlőfürtökről,
- gombatorzsek izolálása,
- törzsgyűjtemény létrehozása korábbi években és a 2022-ben általam izolált élesztő- és fonalas gomba törzsekből,
- az izolátumok telep- és sejtmorfológiájának jellemzése,
- fonalas gombákból történő DNS izolálás optimalizálása,
- az élesztő- és fonalas gomba törzsekből genomi nukleinsav kivonása,
- a gomba izolátumok faj szintű azonosítása (identifikálása) az amplifikált rDNS restrikciós endonukleázzal történő emésztése alapján,
- *Botrytis cinerea* fajon belüli genetikai variabilitásának vizsgálata RAPD mintázat alapján,
- eltérő morfológiai és genetikai mintázatot mutató törzsek kiválasztása szekvenálásra és a kapott adatok összevetése szekvenciaadatbázisok típus-törzseivel.

Vizsgálataimat az „Objektív minősítési rendszer kidolgozása a tokaji borkülönlegességek megkülönböztetőségére” című, 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2020-00040 számú projekt keretein belül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszékének laboratóriumaiban végeztem, az ott található eszközpark és vegyszerek használatával. A DNS minták szekvenálása a Biomi Kft. (Gödöllő) munkatársainak köszönhető.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Tokaji borvidék

A Tokaji borvidék Magyarország északkeleti részén, a Zempléni-hegység lejtőin helyezkedik el mintegy 13000 hektáron, ebből több, mint 5500 hektár beültetett terület. A régióhoz tartozó 27 közigazgatási egység mindegyike sajátos terroir-ral és szőlőfajtákkal rendelkezik. Ezek közül a legfontosabbak Tokaj, Mád és Tállya, amelyek a legkiemelkedőbb minőségű borokat adják. A Tokaji borvidék tájképéről is nevezetes: meredek, teraszos szőlőültetvényekkel és festői falvakkal jellemezhető. Hagyományai szorosan kötődnek a helyi kultúrához és életmódhoz, a szőlőültetvények és borászatok pedig a régió történelmének és identitásának fontos részét képezik. 2002-ben a Tokaji borvidéket az UNESCO a világörökség részévé nyilvánította, elsősorban a borászat hosszú történelme és egyedülálló hagyományai miatt, melyek a 16. század óta nagyrészt változatlanok maradtak (Internet 1).

A Tokaji borvidék geológiája összetett és változatos, a különböző talajok hozzájárulnak a borok egyedi jellemzőihez. A régió vulkanikus sziklaalakzatokon fekszik, ásványi anyagokban gazdag, termékeny talajt biztosítva a szőlőműveléshez. Szilícium-dioxid tartalmukban különböző vulkáni kőzettípusok (dácit, riolit, zeolit, andezit, bazalt) széles palettája található meg a területen. Leggyakoribb talajtípusa a vulkáni hamuból képződött tufa különösen alkalmas a szőlőtermesztésre. Egyéb talajtípusai közé tartozik a lösz, az agyag és a homok, ezeknek szintén jelentős a szerepe a régióban termelt borok sokszínűségének kialakításában (Molnár et al., 2010).

A borvidék a szőlőtermesztés északi klimatikus határán terül el, amely elengedhetetlen tényezője a nagy savtartalomra épülő fehérbor készítésének. Éghajlatát tekintve kontinentális, hideg telekkel és forró nyarakkal. A régióban a hőmérséklet nagymértékű ingadozása tapasztalható, ami jelentős hatással van a szőlőérésére. Júliusban a napi középhőmérséklet 21 °C körül, míg a januárban átlagosan -3 °C körül alakul. Az éves csapadékmennyiség is jelentős, 500-700 mm közé tehető. Ez a nagy mennyiségű csapadék és őszi párás időjárás, a hűvös éjszakákkal és meleg nappalokkal kiegészülve, ideális feltételeket teremt a Tokaji borvidék édes borainak alapjául szolgáló *Botrytis cinerea* fonalas gomba terjedéséhez és fejlődéséhez (Dömötör et al., 1990; Mészáros et al., 2017).

Tokaj-Hegyalja domináns szőlőfajtái a furmint és a hárslevelű. A borvidék döntő hányadát, mintegy kétharmadát borítja furmint, amely nagy savtartalommal rendelkező magyar szőlőfajta, testes száraz és édes fehérborok előszeretettel használt alapanyaga. Későn érő laza

fürtjeit vastag héjú bogyó alkotják, erősen fogékony a botritiszes nemesrothadásra, valamint a peronoszpóra és lisztharmat fertőzésekre. A terület maradék egyharmadán javarészt hárslevelűt művelnek. Vékony héjú bogyói a furmintnál kisebb mértékben hajlamosak a nemesrothadásra. Széles körben alkalmazzák édes, de száraz és félszáraz borok készítéséhez is. A borvidék egyéb engedélyezett szőlőfajtái közé tartozik a sárgamuskotály, a kövérszőlő, a kabar és a zéta; a Tokaj oltalom alatt álló eredetmegjelölés csak ezen fajtákból készült borok esetében alkalmazható (Internet 2.; Robinson et al., 2013).

A tokaji késői szüretelésű borok a világ legösszetettebb és legkeresettebb desszertborai közé tartoznak, egyedülálló módszerrel készülnek. A nemesrothadáson átesett botritiszes szemeket, gondosan kézzel szüretelik és válogatják. Ez az aprólékos folyamat biztosítja, hogy csak a legjobb minőségű szőlő kerüljön felhasználásra az aszúbor készítéséhez. A válogatott szőlőt ezután kádakba helyezik, ahol állni hagyják őket. A kádak alján lévő csapokon csurog ki a bogyók saját tömege okozta préselődés eredményeként a tokaji borok talán legexkluzívabb és legritkább formája, az esszencia. A magas, literenkénti 500 g-ot meghaladó cukortartalom miatt az esszencia erjedési folyamata lassú, több évig is eltarthat. Az erjedési folyamat befejezése után az esszenciát tölgyfahordóban érlelik hosszabb ideig, gyakran akár egy évtizedig vagy még tovább. Ez a hosszan tartó érlelési folyamat az esszencia egyedi tulajdonságaival együtt rendkívül összetett és intenzív ízű bort eredményez. Az esszenciaborok hihetetlenül ritkák, és korlátozott elérhetőségük és magas árak miatt gyakran különleges alkalmakra vagy gyűjtőknek tartják fenn őket (Magyar, 2011; Robinson et al., 2013).

Mivel az aszúszemek nem, vagy csak kis mértékű nedvességtartalommal rendelkeznek, azokat azonos évjáratú furmint vagy hárslevelű szőlőfajtából készült mustban vagy újbortban áztatják néhány napig. Ez a maceráció lehetővé teszi a szőlőből a gazdag, koncentrált cukrok és aromák kivonását. Ezután préselik a szemeket, melyet akár hónapokig tartó erjesztés követ. Végül az így készült aszúborokat a törvényileg meghatározott ideig tölgyfahordóban érlelik, mielőtt palackozva forgalomba hoznák. Régen az aszúszemeket puttonynak nevezett dongás faedénybe gyűjtötték, melyhez egy gönci hordónyi, azaz 136 liter mustot vagy bort öntöttek. Az aszú puttonyszámát az alapborhoz adott aszúszőlő mennyiség határozta meg. Napjainkban ez a bor maradékcukor tartalmának függvénye, aszúbornak csak 120 g/l cukortartalmat meghaladó borok nevezhetőek (Magyar, 2011; Robinson et al., 2013).

A szamorodni borkészítési folyamata hasonlít az aszúéhoz, mivel itt is nemes rothadáson átesett szőlőt használnak fel. Az aszúborászattal ellentétben azonban a szamorodni eljárás során egészséges és botritiszes szőlőt is használnak. A szőlőt leszüretelik, majd együtt erjedni

hagyják, így az egészséges és a töppedt szőlő ízei kombinálódva, egységes ízprofilt hoznak létre. Az erjedés után a szamorodni bort legalább hat hónapig tölgyfahordóban érlelik. Ez az érlelési folyamat lehetővé teszi, hogy a bor kifejlessze jellegzetes ízvilágát, amely a száraz és savanyútól az édes és zamatosig terjedhet, attól függően, hogy a borkészítés során milyen arányban használták fel az egészséges és a botritiszes szőlőt. Az aszúborokhoz hasonlóan a szamorodni borokat is palackozzák, és hagyják tovább érni, mielőtt forgalomba kerülnének (Magyar, 2011; Robinson et al., 2013).

A 2013-as borvidéki szabályozást követően megszűnt két bortípus a fordítás és a másolás, melyek a boltok polcain napjainkban igazi különlegességnek számít. A fordításnál az aszúszőlő préselése során visszamaradt aszútészta azonos évjáratú mustot vagy még erjedés alatt lévő bort öntöttek, melyet pár óráig ázni hagytak. Az aszúhoz viszonyítva magasabb csersavtartalommal rendelkezik, kevésbé édes, de még fellelhető benne az aszúszőlő egyedi botritiszes ízvilága. Másolás esetében a szamorodni vagy az aszúbor seprőjét musttal vagy borral felöntötték, erjesztették, majd fahordóban érlelték legalább egy évig (Internet 2.).

3.2 Botrytis cinerea

3.2.1 A fonalas gomba taxonómiája

A *Botrytis* nemzetséget először Pier Antonio Micheli botanikus írta le 1729-ben megjelent *Nova plantarum genera* kötetében. Mintegy 900 gombafaj eredetéről és növekedéséről közölt adatokat, és elsőként mutatott rá arra, hogy a gombák szaporítótesttel és spórákkal rendelkeznek (Ramsbottom, 1957). A *Botrytis cinerea* taxonómiája az évek során a molekuláris biológia és a genetikai vizsgálatok fejlődésének köszönhetően finomodott. E gomba azonosítása és osztályozása az elsődlegesen morfológiai jellemzők alapján történő azonosításról egy integráltabb, molekuláris és genetikai adatokat is magában foglaló megközelítésre tért át. Ez a váltás a faj genetikai sokféleségének és evolúciójának pontosabb megértését eredményezte. A *Botrytis cinerea* a gombák országába, az *Ascomycota* törzsbe, a *Leotiomycetes* osztályba, a *Helotiales* rendbe és a *Sclerotiniaceae* családba tartozik. A több, mint 30 különböző fajt magába foglaló *Botrytis* nemzetségre az aszexuális spóratermelés, úgynevezett konídiumképződés mellett az ivaros folyamatok is jellemzőek. A nemzetség legismertebb és gazdaságilag legjelentősebb faja széles gazdanövénykörének és globális elterjedésének köszönhetően a *B. cinerea* (Garfinkel, 2021).

3.2.2 *A fonalas gomba életciklusa*

A pleomorfizmus kifejezés egyes fitopatogén gombák azon képességére utal, hogy környezetétől vagy növekedési körülményeitől (pl. hőmérséklet, páratartalom, a gazdanövény érzékenysége) függően többféle morfológiai (pleomorf) formát képes kialakítani, ami hozzájárul genetikai sokféleségükhöz. A *Botrytis cinerea* név a gomba ivartalan (anamorf) alakjára utal, míg ivaros (teleomorf) formáját *Botryotinia fuckelina*-ként ismerik. Fontos azonban megjegyezni, hogy a kettős nomenklatura rendszerét nem használják általánosan, és sok gombát ma már egyetlen binominális néven írnak le (Kövics, 2015).

A *B. cinerea* anamorf állapotát ivartalan spórák, konídiumok képződése jellemzi, melyek nagy számban képződnek a fertőzött növényi szöveteken. Szétszóródásuk után több hétig is fennmaradhatnak a talajban, növényi törmeléken és más felületeken. Amikor a *B. cinerea* konídiuma a növény felszínére kerül, kicsírázik és csíratömlőt alkot. A csíratömő egy keskeny, hosszúkás szerkezet, amely a konídiumból emelkedik ki és a növény felszíne felé növekszik, behatol annak szöveteibe, differenciálódik, majd mitózissal szomatikus hifákat hoz létre. Kedvező körülmények között a vegetatív sejtek egy részének növekedése leáll és ivartalan fejlődésbe kezd. Ennek során kis ovális vagy hengeres alakú konídiumok keletkeznek az egyenes vagy elágazó konidiofórok csúcsán (González et al., 2016).

A *B. cinerea* párosodási rendszerét először Groves és Loveland (1953) vizsgálta, akik megállapították, hogy a gomba heterotallikus, vagyis zigóta képzéséhez két különböző párosodási típusú törzs jelenlétére van szükség. Faretra munkatársaival (1988) 213 szántóföldi *B. cinerea* izolátumot vizsgáltak. Párosítási kísérleteik során az izolátumokat egy kivétellel két kompatibilitási csoportba sorolták csoporton belüli sterilitásuk és csoportok közötti termékenységük alapján. Arra a következtetésre jutottak, hogy *B. cinerea*-nál a párosodási típus egyetlen lókuszt, melyet MAT1-nek neveztek el, két alléljének szabályozása alatt áll. A SAS56 törzset MAT1-1 párosodási típusúnak, míg a SAS405 törzset MAT1-2 típusúnak azonosították, ezeket referencia törzsként használták a vizsgálatban résztvevő többi törzs párosodási típusának meghatározásához. Ezt a megfigyelést továbbá alátámasztja a 24 aszkospórából származó MAT1-1 és MAT1-2 típusú törzs 1:1 arányú szegregációja a keresztezési vizsgálatok során. Néhány izolátum azonban szexuálisan kompatibilitást mutatott mindkét referenciatörzs esetében, ezeket a tenyészeteket MAT1-1/2-nek nevezték el, melyek gyakran öntermékenyek (homotallikusak) voltak. Nem találtak összefüggést az izolátumok párosodási típusa, morfológiája vagy szkleróciumot és apotéciumot növesztő képessége között. Az eredmények azt mutatták, hogy az egyes makrokonídium eredetű tenyészetek homotallikusak (MAT1-1/2)

vagy heterotallikusak (MAT1-1 vagy MAT1-2) is lehetnek (Faretra et al., 1988). A közelmúltban végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a *MAT* gén a *Botrytis cinerea* aszexuális szaporodásának szabályozásában is szerepet játszik, kifejeződése befolyásolja a konídiumok termelését (Wang et al., 2017).

Ivaros szaporodás akkor történik, amikor a gomba kompatibilis párosodó törzsei (MAT1-1 és MAT1-2) érintkeznek egymással, és plazmogamián mennek keresztül, amely során a két párosodó törzs citoplazmája összeolvad. Ennek eredményeképpen heterokarion hifa jön létre, ahol a két párosodó törzs magja egyazon a citoplazmában található. A szaporodás következő szakaszában a heterokarion hifa aszkogén hifává differenciálódik, amely ezután kariogamián, azaz két kompatibilis sejtmag összeolvadásán megy keresztül. Ez az összeolvadás egy diploid zigóta mag kialakulásához vezet, melyet meiózis, majd mitózis követ, nyolc haploid sejtmag kialakulását eredményezve. Ezek a haploid sejtmagok ezután aszkospórákká érnek, amelyeket egy zsákszerű struktúra, az askusz zár be. Az askuszok az apotéciumnak nevezett, csésze alakú termőtestekben fejlődnek ki. Ha a környezeti feltételek kedvezőek, az érett askospórák kiszabadulnak az apotéciumokból, és a levegőben terjednek, majd a fogékony növényi szöveteken megtapadnak, kicsírázhatnak és apresszóriumnak nevezett struktúrákat hozhatnak létre, amelyek áthatolnak a növényi sejtfalon és megkönnyítik a gomba számára a gazdaszövetek kolonizációját. A fertőzés előrehaladtával a gomba áttérhet ivartalan szaporodásra, konídiumokat termelhet, amelyek tovább segítik a kórokozó terjedését a gazdanövényen belül és más közeli növényeken. Az aszexuális szaporodás során genetikailag azonos utódok jönnek létre mitotikus sejtosztódás útján. Ez a folyamat lehetővé teszi a gomba számára, hogy gyorsan kolonizálódjon és terjedjen a gazdanövényen belül, ami a betegség jellegzetes tüneteinek, például a levélfoltoknak, az elhalásnak és a szövetek bomlásának kialakulásához vezet (González et al., 2016).

A szkleróciumnak nevezett struktúrák a micéliumok kemény, tömör tömegei. Képesek túlélni az olyan zord környezeti feltételeket, mint a szárazság és a hideg hőmérséklet, lehetővé téve a gomba számára, hogy a talajban vagy a növényi törmelékben fennmaradjon, amíg a csírázáshoz és a fertőzéshez kedvező feltételek nem alakulnak ki. Képződését olyan környezeti tényezők váltják ki, mint a tápanyag elérhetősége, a hőmérséklet és a páratartalom. A szkleróciumok fejlődése összetett folyamat, amely magában foglalja a hifák differenciálódását, a tápanyagok felhalmozódását és a külső stresszel szembeni védelmet biztosító melanin termelését. Miután a szklerócium teljesen kialakult, több hónapig vagy akár évekig is nyugalmi

állapotban maradhat, várva a megfelelő körülményekre, hogy kicsírázzon és új fertőzési ciklust indítson el (Backhouse és Willetts, 1984).

3.2.3 *A fonalas gomba genetikai diverzitása*

A *Botrytis cinerea* genetikai sokféleségének egyik legfontosabb jellemzője a nagyfokú polimorfizmus, amelyre a több allél vagy génváltozat jelenléte utal egy populáción belül. Ez lehetővé teszi a gomba számára a gyors fejlődést és alkalmazkodást a különböző környezeti feltételekhez és gazdanövényekhez, elősegítve a túlélését és terjedését. A kutatók számos molekuláris markert azonosítottak, például mikro- és miniszatelliteket, valamint transzpozonokat, amelyek felhasználhatók a *B. cinerea* genetikai sokféleségének és populációszerkezetének tanulmányozására. A polimorfizmus mellett a *B. cinerea* genomja nagyfokú plaszticitást is mutat, ami lehetővé teszi, hogy a környezeti jelzésekre és a gazdaszervezet védekezésére reagálva gyors változásokon menjen keresztül. Ezt a plaszticitást nagyrészt a transzpozonok jelenléte határozza meg, amelyek mobil genetikai elemként képesek a genomban mozogni és genetikai variációt létrehozni. Aktivitásuk a gomba virulenciáját és alkalmazkodóképességét fokozó új génváltozatok létrehozásához és új tulajdonságok megjelenéséhez vezethet (Martinez et al., 2005).

A transzpozonok jelentős szerepet játszanak a *Botrytis cinerea* genetikai variabilitásában és evolúciójában. A Boty egy olyan LTR-retrotranszpozon, amely széles körben elterjedt a *B. cinerea* genomjában, hosszú terminális ismétlődései (LTR: long terminal repeat) és a reverz transzkriptáz és integráz fehérjéket kódoló gének jelenléte jellemzi, amelyek elengedhetetlenek a genomon belüli mobilitásához. Ezenkívül a Boty elemek jelenlétét molekuláris markerként használták a gomba különböző izolátumainak megkülönböztetésére. Egy másik DNS-transzpozon, a Flipper szintén gyakran fellelhető a *B. cinerea* genomjában. Ezt az elemet a terminális fordított ismétlődések (TIR: terminal inverted repeat) és a transzpozáz fehérjéket kódoló gének jelenléte jellemzi, melyek közvetítik a genomon belüli áthelyeződést. Kimutatták, hogy a Flipper szerepet játszik a virulenciafaktorok evolúciójának elősegítésében. A Botyhoz hasonlóan a Flipper elemeket is molekuláris markerként használták a *Botrytis cinerea* populációszerkezetének és genetikai variabilitásának tanulmányozására (Fávaro et al., 2005; Martinez et al., 2005).

A nukleáris ugráló gének molekuláris vizsgálatait azt mutatták, hogy a *B. cinerea*-populáció két alcsoportba sorolható. A transzpozonok tekintetében az I. csoport (*vacuma* típus) izolátumai azok teljes hiányát mutatták, egy vegetatív kompatibilitási csoporthoz (VCG: vegetative

compatibility group) tartoztak és fenhexamid rezisztenciát mutattak. A II. csoport (*transposa* típus), Boty és Flipper elemeket tartalmazott, több VCG-hez sorolhatóak és fenhexamid-érzékenyek voltak (Tanovic et al., 2014). A *B. pseudocinerea* a *B. cinerea*val közeli rokonságban álló faj, amely szintén szürkepenészes betegséget okoz számos gazdanövényen. A morfológiai hasonlóságok és az átfedő gazdanövénykör miatt kihívást jelenthet e két gombafaj megkülönböztetése hagyományos módszerekkel, például mikroszkópiával és tenyésztésen alapuló technikákkal. A molekuláris technikák azonban, különösen a genetikai markerek használatával, igen hatékonyan bizonyultak a *B. cinerea* és a *B. pseudocinerea* megkülönböztetésében. Bár a *B. pseudocinerea* törzseket eredetileg *vacuma*-típusúnak írták le (Giraud et al., 1999), későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy a faj törzsei eltérő transzpozon-tartalommal rendelkeznek (Fekete et al., 2012; Johnston et al., 2014).

A mikro- és miniszatellitek olyan ismétlődő DNS-szekvenciák, amelyek számos szervezet genomjában széles körben elterjedtek, beleértve a *Botrytis cinerea*-t is. Ezeket a szekvenciákat ismétlődő motívumaik jellemzik, amelyek a mikroszatellitek esetében 2-6 bázispár, a miniszatellitek esetében pedig akár 100 bázispár hosszúságúak is lehetnek. Nagyfokú polimorfizmusuk és molekuláris technikákkal való könnyű kimutatásuk miatt a mikro- és miniszatelliteket széles körben használják genetikai markerként különböző szervezetek, köztük a *B. cinerea* diverzitásának, populációszerkezetének és evolúciójának tanulmányozására. A mikroszatellitek, más néven egyszerű szekvenciaismétlődések (SSR-ek) különösen hasznos markerek a *B. cinerea* genetikai sokféleségének tanulmányozására, mivel nagyfokú polimorfizmusuk az ezeken az ismétlődő szekvenciákon belüli gyakori inzerciók és deléciónak miatt alakul ki. A kutatók mikroszatellita markereket alkalmaztak a különböző földrajzi régiókból és gazdanövényekből származó *B. cinerea* izolátumok genetikai diverzitásának és populációszerkezetének értékelésére. Vizsgálataik során jelentős mértékű genetikai variabilitást, valamint a populációk terjeszkedésére utaló bizonyítékokat tártak fel (Isenegger et al., 2008). A miniszatellitek, más néven változó számú tandemismétlődések (VNTR: variable number tandem repeat), az ismétlődő DNS-szekvenciák egy másik típusa. Bár a miniszatellitek általában kevésbé polimorfak, mint a mikroszatellitek, mégis értékes információkkal szolgálhatnak a gomba genetikai diverzitásáról és populációs szerkezetéről. A *B. cinerea* ATP-szintázát kódoló gén intronjában egy változatos ismétlődést mutató AT gazdag, MSB1-nek elnevezett miniszatellit azonosították, mely a gomba genomjában csak egyetlen lokuszban található meg (Giraud et al., 1998). Az MSB1 sajátos felépítése, hogy a variánsok minden allélban azonos fizikai sorrendben következnek, a leginkább hasonlóak kerülnek egymás

közelébe. Az ismétlődések számát befolyásoló mutációk ritkán fordulnak elő, a nagymértékű variabilitás a replikáció során végbemenő csúszás (SSM: slipped strand mispairing) eredményeként jön létre, ahol az újonnan replikálódott szál hibásan párosul az előző ismétlés homológ részével. Az *Botrytis* nemzetségen kívül egyetlen másik nemzetségben sem találtak MSB1 miniszatellit, még a legközelebbi rokonságban álló *Sclerotinia* esetében sem (Levinson és Gutman, 1987; Giraud et al., 1998).

3.2.4 A fertőzés jó oldala: nemesrothadás

A *Botrytis cinerea* felelős adott szőlőültetvényeken a közönséges szőlőt a világ leghíresebb és legkeresettebb borainak kincset érő alapanyagává változtató nemes rothadás jelenségéért. A gombának speciális körülményekre van szüksége ahhoz, hogy növekedjen és létrehozza ezt az átalakulást. Ezen feltételek közé tartozik a páratartalom, a hőmérséklet és a szőlőfajta kombinációja. A *B. cinerea* növekedéséhez az ideális környezet a párás légkör, reggeli köddel, majd meleg, száraz délutánokkal. A páratartalom és a meleg váltakozása lehetővé teszi a fejlődését, ugyanakkor megakadályozza más, nemkívánatos, szőlőtőkét károsító penészgombák növekedését. A világ leghíresebb nemes rothadáson átesett szőlőből készült borai, mint a magyar Tokaji Aszú és a francia Sauternes, olyan régiókból származnak, ahol ilyen egyedülálló éghajlati viszonyok uralkodnak. A hőmérséklet döntő szerepet játszik a fertőzés kialakulásában. Bár a gomba a hőmérséklet széles skáláján képes túlélni, szaporodásához az enyhe és meleg körülmények, jellemzően 15°C és 25°C közötti hőmérséklet az optimális. Az ezen tartományon kívüli hőmérséklet gátolhatja növekedését, ami a nemes rothadás teljes kialakulását akadályozhatja, ezzel potenciálisan csökkentheti a kapott bor minőségét. Végül, de nem utolsósorban a szőlőfajta alapvető fontosságú a *B. cinerea* sikeres növekedése szempontjából. A gomba az olyan vékonyabb héjú, magas nedvességtartalmú szőlőfajtákat kedveli, mint a Semillon, a Sauvignon Blanc és a Furmint, így ezek a nemes rothadású borok előállításához elsődlegesen használt szőlőfajták (Magyar, 2011).

A szőlő *Botrytis cinerea* általi átalakulása összetett folyamat, amely számos biológiai és kémiai változást foglal magában. A gomba jellemzően a szőlő héján rovarok, mechanikai sérülés vagy természetes öregedés során keletkezett sebeken vagy nyílásokon keresztül fertőzi meg a szőlőt. Amint behatolt a szőlő héjába, proteázokat, cellulázokat és pektinázokat termel, amelyek lebontják a szőlősejtek sejtfalát és egyéb komponenseit, elősegítve a bogyók vízvesztését. Ez, illetve anyagcsere folyamatai során felvett víz a bogyók kiszáradását, valamint cukrok és egyéb vegyületek koncentrációját eredményezi. A cukorkoncentráción kívül a

nemes rothadás a szőlő különböző savainak koncentrációját is növeli. Ezek a savak, köztük a borkósav, az almasav és a citromsav hozzájárulnak a bor savasságához, és kiegyensúlyozó elemként szolgálnak a bor édességéhez. A folyamat egyedi és összetett ízprofilú szőlőt eredményez, amelyet a borászok nagyra értékelnek. A keletkező borok jellemzően édesek, magas maradék cukor-tartalommal, és olyan mély íz- és illatvilággal rendelkeznek, amelyhez fogható a nem fertőzött szőlőből készült borok nem tudnak felmutatni (Ribereau-Gayon et al., 1980).

A fertőzés hatására a szőlő sztilben vegyületeket is termel, amelyekről úgy vélik, hogy fokozzák a szőlő ellenálló képességét a gombával szemben. Ezek, köztük a rezveratrol, antioxidáns és gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek hozzájárulhatnak a mérsékelt borfogyasztással járó egészségügyi előnyökhöz (Iriti et al., 2004).

A *Botrytis cinerea* egyik legjelentősebb hatása a bor textúrájára a glicerin termelődése, amely a gomba anyagcseréjének mellékterméke. A glicerin hozzájárul a bor viszkozitásához és szájízéhez, gazdag, sima és bársonyos textúrát adva neki. A nemes rothadás során különböző illékony vegyületek is keletkeznek, köztük terpének, észterek és alkoholok, amelyek hozzájárulnak a bor összetett aromaprofiljához. Ezek a vegyületek virágos, gyümölcsös és fűszeres jegyeket, valamint földes és gombás jegyeket kölcsönözhetnek, amelyek a nemes rothadású borok sajátjai. A folyamat emellett a szőlő fenolos vegyületeit, köztük a tanninokat és az antociánokat is befolyásolja, melyek koncentráció növekedése elsősorban bor színéhez, de szájízéhez és ízprofiljához is hozzájárulnak (Collado és Viaud, 2016).

3.2.5 A fertőzés rossz oldala: szürkerothadás

A *Botrytis cinerea* rendkívül alkalmazkodó és opportunistá gomba, így a növényfajok széles körét képes megfertőzni. A leggyakoribb gazdanövények közé tartoznak a különféle gyümölcsök, zöldségek és dísznövények, például a szőlő, az eper, a paradicsom, a saláta és a rózsa. A gazdanövények ilyen változatos skálája miatt a szürkerothadás pusztítást végezhet mind a kereskedelmi, mind az otthoni kertekben. A gyümölcs kultúrákban a szürkerothadás jelentős termés kiesést okozhat, és csökkentheti a termés minőségét. Bár a szürke- és a nemes rothadást ugyanaz a gomba okozza, de nagyon eltérő hatással vannak a szőlőre és az abból készült borokra. A rothadás két formája közötti legfontosabb különbség abban rejlik, hogy a fertőzés milyen körülmények között következik be. Míg a nemes rothadás kialakulására a hűvösebb időjárás jellemző, kevés csapadékkal, de magas páratartalommal, a gomba lassú növekedése mellett, addig a szürkerothadás inkább meleg, nedves körülmények között fejlődik

ki. Ilyen körülmények között a gomba gyorsan növekedhet, és a szőlőt szürke, penészes micéliumtömeg borítja. Hasonlóképpen, a szamócában és a paradicsomban a szürkepenész gyümölcsrothadáshoz vezethet, ami a gyümölcsöt fogyasztásra alkalmatlanná teszi. A dísznövények, például a rózsák és más virágos fajok szintén fogékonyak a szürkerothadásra. Ezeken a növényeken a gomba megfertőzheti a szirmokat, leveleket és szárazakat, ami elszíneződéshez, hervadáshoz és végül elhaláshoz vezet. Ez nemcsak a növény esztétikáját befolyásolja, hanem a növény általános egészségi állapotát is gyengítheti, és így fogékonyabbá válik más betegségekre és kártevőkre (Dean et al., 2012).

3.3 Szőlőn előforduló további élesztő- és fonalas gombák

A szőlőn fellelhető élesztőgombák sokféleségének vizsgálata világszerte számos kutatócsoport elsődleges célkitűzései között szerepelt. Különböző mintavételezési technikák és analitikai módszerek alkalmazásával arra a következtetésre jutottak, hogy a szőlőszemek domináns élesztőközösségét az *Ascomycota* törzshöz tartozó három faj alkotja: *Hanseniaspora uvarum* (anamorf: *Kloeckera apiculata*), *Metschnikowia pulcherrima* (anamorf: *Candida pulcherrima*) és *Candida stellata* (Beltran et al., 2002; Clemente-Jimenez et al., 2004). Azonban, hűvösebb éghajlatú területekről származó minták a *Cryptococcus*, *Rhodotorula* és *Aureobasidium* nemzetségbe tartozó bazídiumos élesztőgombák dominanciáját mutatták (Prakitchaiwattana et al., 2004; Yanagida et al., 1992). Nem tenyésztésen alapuló, hanem közösségi nukleinsav kivonást követően a 26S riboszómális RNS-t kódoló gén vizsgálata során a kutatók 22 különböző nemzetségbe tartozó 52 élesztőfajt azonosítottak a szőlőbogyó felszínéről (Renouf et al., 2007). Nem meglepő, hogy egy ilyen változatos mikrobaközösség tagjai között nagyfokú versengés alakulhat ki az élettérért. Egyes törzsek (*S. cerevisiae*, *Candida spp.*, *Pichia spp.* és *Hanseniaspora spp.*) killer toxinnak nevezett exotoxinokat termelnek, melyek más azonos vagy közeli nemzetségbe tartozó élesztők sejtfolyamatainak gátláshoz, apoptózisához vagy membrán permeabilitásának megváltozásához, ezzel pusztulásához vezethetnek (Magliani et al., 1997). A *M. pulcherrima* antimikrobiális hatása pulcherriminsav termelő aktivitásával hozható összefüggésbe, mely sziderofór vegyületként megköti a tápközegben fellelhető vasat, vörös pigmentként megfigyelhető pulcherrimin formájában. Mivel a vas a legtöbb élő szervezet számára nélkülözhetetlen mikroelem, a környezetében lévő mikrobákra antagonistá hatással rendelkezik (Sipiczki, 2006; Mažeika et al., 2021).

A 3.2 fejezetben részletezett *Botrytis cinerea*-n kívül a szőlőn más, annak romlásáért felelős tömlősgombák (*Ascomycota*) törzsébe tartozó nemzetségek is előfordulhatnak. A szőlőbogyó elsődleges kártevői az *Alternaria* és *Cladosporium* nemzetséghez tartoznak. Az *Alternaria alternata* által okozott rothadás apró vízcseppel borított területen, de akár 100%-os relatív páratartalom mellett is bekövetkezhet. A *Cladosporium*-rothadás jellemzően betakarítás után alakul ki a termésen, de a szüret előtt is megjelenhet hosszan tartó csapadékdús időjárási viszonyok mellett. A szőlő héjának mechanikai vagy mikrobiális tevékenység okozta sérülése másodlagos fertőzések táptalaja lehet. Az *Aspergillus* nemzetség különböző fajtái – *A. alliaceus*, az *A. carbonarius*, az *A. niger* és az *A. ochraceus* – a fűrt rothadásán kívül, glükóz-oxidáz enzimük révén glükonsavat termelnek, mely nemcsak a bor érzékszervi minőségromlását okozhatja, hanem közvetve annak alkoholtartalmát is csökkenti (Ramachandran et al., 2006). A *Penicillium* nemzetségbe sorolható *P. expansum* megjelenése általában meleg és párás évekre jellemző, főként a zárt fűrtű fajták fogékonyak a fertőzésre, melynek előrehaladott állapotában a bogyók száraz körülmények között is tovább rohadnak.

A szőlő fonalas gomba kártevőinek másik csoportját a járomspórás gombák (*Zygomycota*) törzse képviseli. A *Rhizopus* fajok okozta rothadásnak meleg, nedves éghajlatú szőlészetek a legkitettebbek. Nedves időjárási körülmények között a gomba áttérjedhet a fűrt összes bogyójára, annak egészének rothadását okozva. A *Mucor*-rothadás általában betakarítás utáni betegségként fordul elő a gyümölcsökön, beleértve a szőlőt is, bár ritka a bortermelésre szánt fajták esetében. A nemzetség fajaira jellemző, hogy hűvös, 5 °C-on történő tárolási körülmények között is növekedhetnek (Wilcox et al., 2017).

3.4 Gombafajok molekuláris vizsgálati lehetőségei

A molekuláris biológia világában az élőlények pontos azonosítása és osztályozása kulcsfontosságú a különböző ökoszisztémákban betöltött szerepük megértéséhez és a populációk kezelésére irányuló stratégiák kidolgozásához. Az egyik fontos kutatási terület, amely ilyen azonosítást és osztályozást igényel, a mikológia, amely a gombák tanulmányozására összpontosít. A gombák számos ökoszisztémában jelentős szerepet játszanak, mivel szaprofita, kórokozó, sőt, más szervezetekkel kölcsönösen együttműködő (szimbionta) szervezetként is funkcionálhatnak.

3.4.1 DNS vonalkódolás

Új, eddig ismeretlen fajok azonosítása klasszikus módszerekkel gyakorta nagy kihívást jelentett a rendszerbiológusok, taxonómusok és evolúciobiológusok számára, így szükség volt

egy olyan eljárás kifejlesztésére, mely lehetővé tette a gyors, meghízható és reprodukálható fajmeghatározást. A DNS vonalkódolás technikájának segítségével egy vizsgált törzsről megállapítható, hogy mely taxonómiai kategóriába tartozik, illetve még be nem azonosított fajok rendszertani besorolását is nagy mértékben megkönnyíti. Mint nevéből is következik, a módszer az adott organizmusból származó DNS szekvencián alapul, mely összehasonlításra kerül a korábban, ismert fajok szekvenciáiból felépített referencia könyvtárakban tárolt információkkal. Ez a DNS vonalkódnak nevezett szekvencia többnyire rövid, 400-800 bázispár hosszú, melyet a sejtekből, szövetekből kivont genomi DNS egy szakaszának amplifikálásával állítanak elő specifikusan tervezett primerpárok használatával polimeráz láncreakció (PCR: polymerase chain reaction) segítségével. A reakció végtermékeként kapott amplikonokat ezután Sanger vagy új generációs módszerekkel szekvenálják, majd az így kapott nukleotidsorrendet összevetik nyilvános adatbázisokban, például az INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration) vagy a gombák esetében az UNITE adatbázisban található referencia szekvenciákkal (Kress és Erickson, 2012).

A mitokondriális citokró-m-oxidáz I (COI) gén lókusának univerzális DNS vonalkódként való használata az állatvilágban azon alapul, hogy adott faj törzsei között erősen konzervált szekvenciával rendelkeznek, míg eltérő fajok esetében jelentősen különbözik (Hebert et al., 2003). Az állatokkal ellentétben a gombák mitokondriális genomja nagyobb variabilitást mutat, emellett egyes gombafajok egyedi mitokondriális mérettel és szerkezettel rendelkeznek, melyek jelentősen eltérnek az állatoknál megfigyelhető "standard" mitokondriális genom felépítésétől. Mivel a mitokondriális DNS-markerek (beleértve a COI-t is) kevésbé konzerváltak és kevésbé megbízhatóak a gombák azonosítása során, mint az állatok esetében, a kutatók ehelyett a gombák más DNS-vonalkód markereire összpontosítottak (Lang et al., 2007; Dentinger et al., 2011).

Élesztők esetében a fajok karakterizálására a riboszómális DNS nagy alegységének D1/D2 régióját már jóval azelőtt használták, hogy bevezették a DNS vonalkód fogalmát. Kurtzman és Robnett (1998) részletes adatbázist készített mintegy 500 tömlősgomba törzsbe tartozó élesztőfajra vonatkozóan, melyek szekvencia-divergenciája elegendő volt a közeli rokon fajok megkülönböztetéséhez. Bazídiumos élesztőgombák legtöbb faja is megkülönböztethető a D1/D2 domén szekvenciája alapján, azonban kimutatták, hogy általában, a fonalas gombákat is figyelembe véve, a riboszómális 18S és 26S rDNS szekvenciák között elhelyezkedő ITS (Internal Transcribed Space) régió jobban alkalmas erre a célra, mint a D1/D2 domén. Emellett azt találták, hogy a riboszómális gének között elhelyezkedő, át nem íródó IGS (Intergenic

Spacer) régió is használható fajok, illetve az egy fajba tartozó törzsek identifikálására (Fell et al., 2000; Schoch et al., 2012). Figyelembe véve univerzalitását, amplifikálhatóságának egyszerűségét, illetve, hogy már rendelkezésre állt egy nagy méretű és megbízható szekvencia adatbázis, a kutatók arra a konszenzusra jutottak, hogy az ITS régiót választják a gombák elsődleges vonalkódjának (Schoch et al., 2012).

3.4.2 PCR-RFLP

A restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP: restriction fragment length polymorphism) analízis egy olyan molekuláris biológiában alkalmazott technika, mely a homológ DNS-szekvenciák polimorfizmusának jellemzésére az amplifikált általában gén vagy génszakasz hasítási mintázatait használja, ami a választott szekvenciától függően alkalmas lehet fajok, illetve törzsek megkülönböztetésére. A módszer specifikus, 4-6 bázispár hosszú szekvenciákat ún. restrikciós helyeket felismerő enzimek, restrikciós endonukleázok használatán alapul. A PCR-RFLP során egy meghatározott DNS szakaszt polimeráz láncreakció segítségével amplifikálnak, majd az amplifikált DNS-t restrikciós enzimekkel emésztik, amelyek a felismerési szekvenciájuk alapján meghatározott helyeken vágják el a DNS-t. Használható egynukleotid-polimorfizmusok (SNP: single nucleotide polymorphism) vagy más mutációk kimutatására, amelyek megváltoztatják a restrikciós enzim felismerőhelyét. Egy adott restrikciós hely jelenléte vagy hiánya határozza meg a keletkező fragmentumok számát és méretét, amelyek gélelektroforézissel láthatóvá tehetők. A technikát széles körben használják genetikai variációk tanulmányozására. A módszer egyik korlátja, hogy nem tud különbséget tenni két szekvencia között, ha az enzim felismerőhelyét nem érinti a mutáció. Ezenkívül a PCR-RFLP időigényes lehet, és gondos optimalizálást igényel a reprodukálható eredmények eléréséhez. E korlátok ellenére továbbra is széles körben használt technika a genetikai kutatásban és a diagnosztikában (Gherbawy és Voigt, 2010).

Az amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízis (ARDRA) egy másik hatékony technika, amely az RFLP elveire épül, gyors és hatékony eszközt kínálva a genetikai variációk elemzésére. Az ARDRA a riboszómális RNS (rRNS) génekre összpontosít, amelyek a különböző szervezetek között nagymértékben konzerváltak, mégis elegendő szekvencia-variációt mutatnak ahhoz, hogy lehetővé tegyék a közeli rokon fajok megkülönböztetését. Az ARDRA számos előnyt kínál más molekuláris technikákkal szemben. Először is, ez egy rendkívül megbízható és reprodukálható módszer, mivel az rRNS-gének több példányban vannak jelen a genomban, és PCR segítségével könnyen amplifikálhatók. Másodszor, a

konzervált gének használata lehetővé teszi a szervezetek széles körének elemzését, így az ARDRA sokoldalú eszközzé válik a genetikai diverzitás és a különböző taxonok közötti filogenetikai kapcsolatok tanulmányozására. Végül a módszer viszonylag egyszerű és költséghatékony, mivel nem igényel speciális felszerelést vagy kiterjedt szakértelmet. A molekuláris biológiában az ARDRA-t különböző alkalmazásokban használták, többek között a környezeti mintákban lévő mikroorganizmusok azonosítására, a különböző ökoszisztémákban lévő mikrobiális diverzitás tanulmányozására és a mezőgazdaságban előforduló gombás kórokozók jellemzésére. A taxonómia és a filogenetika területén az ARDRA értékes eszköznek bizonyult a közeli rokonságban álló fajok közötti kapcsolatok feloldásában és a populációkon belüli genetikai diverzitás értékelésében (Gherbawy és Voigt, 2010).

3.4.3 RAPD

Egy másik, PCR-alapú technika, a RAPD (random amplified polymorphic DNA), amelyet széles körben alkalmaznak különböző szervezetek, köztük gombák osztályozására és filogenetikai elemzésére. A reakció során használt primerek rövid (általában 10 nukleotid hosszúságú), tetszőleges szekvenciák, amelyek a DNS-templát több helyéhez is kötődhetnek. Ezek a primerek nem specifikusak egy adott szekvenciára, mivel a DNS véletlenszerű szakaszainak amplifikálására tervezték őket. A PCR-t ezekkel a primerekkel végezve, több különböző méretű DNS-amplifikátumot hozunk létre, amelyek minden egyes organizmus esetében egyedi ujjlenyomatot vagy sávós mintázatot mutatnak. Ez a mintázat láthatóvá tehető gélelektroforézis segítségével. A RAPD módszer más molekuláris tipizálási technikákhoz képest viszonylag egyszerű, mivel nem igényel előzetes ismereteket a vizsgált szervezet DNS-szekvenciájáról, ennek eredményeképpen a gombafajok széles körére könnyen alkalmazható. A RAPD-technikával kapcsolatos egyik fő probléma az eredmények reprodukálhatósága. A tetszőleges primerek használata és a PCR-reakció érzékenysége néha következtelen sávozási mintázatokhoz vezethet, ami megnehezíti az eredmények összehasonlítását a kísérletek között. E probléma leküzdése érdekében a kutatóknak gondosan standardizálniuk kell a PCR körülményeket, és megfelelő kontrollokat kell alkalmazniuk annak érdekében, hogy az eredmények megbízhatóak és következetesek legyenek. Bár a RAPD egyedi DNS-ujjlenyomatokat képes létrehozni a különböző fajok esetében, a technika felbontóképessége nem feltétlenül elegendő ahhoz, hogy egy fajon belül megkülönböztesse a közeli rokonságban álló törzseket vagy izolátumokat. A kapott adatok elemzése kihívást jelenthet, mivel több mintán keresztül bonyolult sávozási mintázatokot kell összehasonlítani, ehhez számos szoftver áll rendelkezésre, de ezek pontossága eltérő lehet (Gherbawy és Voigt, 2010).

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Vizsgált törzsek, törzsgyűjtemény létrehozása

Vizsgálataimba a projekt keretein belül különböző tokaji borászatokból, 2020 és 2021-es évjáratú szőlőről és aszúszemekről származó 8 élesztőgomba, illetve 19 fonalas gomba izolátumot (1. táblázat) vontam be. A 2020 évjáratú minták feldolgozása, illetve az izolált mikroorganizmusok előzetes vizsgálata megtalálható Kovács B. (2021), Mihályfi Cs. (2021) és Salma, A. (2021) szak-, illetve diplomadolgozatában.

1. táblázat: A vizsgálatokba bevont törzsek származási helye és típusa

Törzs azonosítója	Mintagyűjtés ideje	Borászat	Termőhely (dűlő)	Szőlő fajta/ Minta típusa
BCY 44/2	2020.10.20.	Disznókő	Lajosok	Furmint
BCY 44/6	2020.10.20.	Disznókő	Lajosok	Furmint
BCY 53/5	2020.10.17.	Grand Tokaj	Szentvér	Aszú II. osztály
BCY 54/2	2020.10.21.	Tokaj-Hétszőlő	Hétszőlő	Aszú II. osztály
BCY 55/6	2020.10.28.	Tokaj-Hétszőlő	Hétszőlő	Aszú II. osztály
BCY 55/7	2020.10.28.	Tokaj-Hétszőlő	Hétszőlő	Aszú II. osztály
BCY 56/7	2020.10.28.	Tokaj-Hétszőlő	Hétszőlő	Aszú II. osztály
BCY 56/8	2020.10.28.	Tokaj-Hétszőlő	Hétszőlő	Aszú II. osztály
BC 4/2	2020.09.29.	Grand Tokaj	Szentvér	Hárslevelű (ép bogyó)
BC 30/1	2020.10.12.	Tokaj-Hétszőlő	Nagyszőlő	Furmint (töppedt bogyó)
BC 34/5/1	2020.10.13.	Disznókő	Lajosok	Furmint (Aszú I. osztály)
BC 35/1/1	2020.10.13.	Disznókő	Kapi/Hangács	Zéta (Aszú I. osztály)
BC 35/1/S1	2020.10.13.	Disznókő	Kapi/Hangács	Zéta (Aszú I. osztály)
BC 40/1	2020.10.19.	Tokaj Oremus	Serédy-Vay	Furmint
BC 55/4	2020.10.28.	Tokaj-Hétszőlő	Hétszőlő	Aszú II. osztály
BC 56/2	2020.10.28.	Tokaj-Hétszőlő	Hétszőlő	Aszú II. osztály
BC 60/2	2021.09.21.	Tokaj-Hétszőlő	Hétszőlő	Furmint (ép bogyó)
BC 61/5	2021.09.21.	Tokaj-Hétszőlő	Hétszőlő	Hárslevelű (ép bogyó)
BC 62/1	2021.09.22.	Disznókő	Kapi	Furmint (ép bogyó)
BC 62/10	2021.09.22.	Disznókő	Kapi	Furmint (ép bogyó)
BC 62/2	2021.09.22.	Disznókő	Kapi	Furmint (ép bogyó)
BC 62/3	2021.09.22.	Disznókő	Kapi	Furmint (ép bogyó)
BC 62/4	2021.09.22.	Disznókő	Kapi	Furmint (ép bogyó)
BC 62/5	2021.09.22.	Disznókő	Kapi	Furmint (ép bogyó)
BC 64/1	2021.09.22.	Patricius Borház	Várhegy	Hárslevelű (ép bogyó)
BC 65/1	2021.09.24.	Tokaj Oremus	Gyopáros	Furmint (ép bogyó)
BC 78/1	2021.09.30.	Gróf Degenfeld	Soós/Galambos	Zéta (töppedt bogyó)

A tanszéki törzsgyűjteményből származó törzsekből saját törzsgyűjteményt hoztam létre. Az izolátumok átoltása érdekében YEPD (0,5% pepton, 0,5% élesztő kivonat, 1% glükóz, 1,5% agar), illetve MEA (3% maláta kivonat, 1,5% agar) táptalajokat készítettem. Összemérést követően az elegyet az agar oldódásáig felmelegítettem, majd a tápközegből 5-5 ml-t

kémcsövekbe mértem, és 121 °C-on autoklávoztam. A kémcsövek tartalmát ferdítve hagytam megdermedni. Ezután a lemeztenyészet formájában kapott törzseket élesztők esetében YEPD, míg fonalas gombáknál MEA ferde agarra oltottam és 25 °C-on inkubáltam. A törzseket időszakos áttöltés mellett ferde agaron tartottam fenn. Hosszútávú tárolás céljából a friss telepekből 20%-os glicerin oldatot tartalmazó kriocsőbe két oltókacsnyi sejtet/micéliumot mértem, majd a csöveket -80 °C-ra helyeztem.

4.2 2022-es évjáratú minták gyűjtése és feldolgozása

Törzsgyűjteményem további *Botrytis cinerea* izolátumokkal történő bővítése céljából különböző termőhelyekről és aszúszőlőfajtákról származó aszúsodott szőlőfürtök (1. ábra) begyűjtését végeztem a Tokaji borvidék Mád és Mezőzombor közé eső dűlőin (2. táblázat) 2022.10.21-én. A mintagyűjtés során lelángolt ollót, steril gyűjtőtasakot és mintavételezésenként új gumikesztyűt használva törekedtem az aszeptikus munkavégzésre. A szőlőfürtöket kevesebb, mint 72 óráig 4 °C-on hűtve tároltam további felhasználásig.

2. táblázat: Mintagyűjtési helyek és szőlő fajták

Minta sorszám	Borászat	Termőhely (dűlő)	Szőlő fajta
1	Balassa	Betsek	Kövérszőlő
2	Balassa	Szent Tamás	Furmint
3	Balassa	Betsek	Zengő
4	Balassa	Betsek	Sárga muskotály
5	Balassa	Nyúlászó	Furmint
6	Disznókő	Illésházy	Furmint
7	Disznókő	Kapi	Zéta
8	Disznókő	Kapi	Hárslevelű



1. ábra: Szent Tamás dűlőn aszúsodó furmint fürt, illetve *Botrytis*-szel fertőzött szőlőbogyók (saját kép)

Az aszúszemek felszínének sterilizálása érdekében centrifugacsövekbe 2%-os nátrium-hipoklorit oldatot töltöttem, majd a bogyókat 2 percig áztattam, óvatos rázogatós mellett. Ezután steril desztillált vízzel kétszer öblítést végeztem. Lelángolt szikével a bogyókat megnyitottam, vágási felszínnel lefelé az előzőleg gyártói leírás alapján készített Rose-Bengal - Chloramphenicol agart (Biolab, Magyarország) tartalmazó Petri-csészék közepére helyeztem és egy hétig 25 °C-on inkubáltam azokat. Ezzel párhuzamosan a kezeletlen bogyók felszínén fellelhető, szabad szemmel is látható *Botrytis cinera* telepekből is mintát vettem, majd hasonló feltételek mellett tenyésztettem. A kinövő telepekből malátás lemezeken tiszta tenyészeteket hoztam létre, majd azonos összetételű ferde agarra oltottam, illetve -80 °C-ra letettem.

4.3 Törzsek morfológiai vizsgálata

A morfológiai vizsgálatokhoz a törzsgyűjtemény törzseiből friss tenyészetet készítettem: élesztőknél YEPD, illetve WL Nutrient (élesztő kivonat 4.0 g/l, kazein 5.0 g/l, dextróz 50.0 g/l, kálium-foszfát 0.55 g/l, kálium-klorid 0.425 g/l, kalcium-klorid 0.125 g/l, magnézium-szulfát 0.125 g/l, vas-klorid 0.0025 g/l, mangán-szulfát 0.0025 g/l, brómkrezol-zöld 0.022 g/l, agar 20.0 g/l) tápagart, fonalas gombáknál MEA tápagart alkalmaztam. Az élesztőtelepek és fonalas gomba törzsek makromorfológiáját szabad szemmel és sztereomikroszkóp használatával vizsgáltam öt, illetve tíz nap elteltével. Az élesztők sejtmorfológiáját fénymikroszkóppal 600x-os nagyításon elemeztem, melyhez tárgylemezre desztillált vizet cseppentettem, majd egy kacsnyi élesztősejtet szuszpendáltam benne, melyet fedőlemezzel borítottam. Fonalas gombák mikroszkopikus struktúrájának vizsgálatát cellux preparátum készítésével végeztem a tenyésztés 14. napján. Ehhez tárgylemezre laktofenol gyapotkék festékek cseppentettem, melynek összetevői segítik a gombaszerkezetek megőrzését (Larone et al., 2018), majd egy cellux csíkot a tenyészet felszíni struktúráihoz érintettem és belesimítottam a tárgylemezen lévő festékbe. A preparátumokat fénymikroszkóp 600x-os nagyításán vizsgáltam.

4.4 Nukleinsav izolálás

A genommal kapcsolatos molekuláris biológia vizsgálatok előkészítése érdekében a létrehozott élesztő- és fonalagomba gyűjtemény törzseiből nukleinsav extrakcióra volt szükség. Ehhez a 4.1-es fejezetben alkalmazott, azokkal megegyező összetételű YEPD, illetve maláta kivonatot tartalmazó lemez táptalajokat készítettem, melyeket a vizsgált törzsekkel inokuláltam. A Petri-csészéket 25 °C-on inkubáltam élesztőknél két, fonalas gombák esetében öt napig.

Az ismert módszerek közül három módszert választottam ki és hasonlítottam össze az alapján, hogy mennyire alkalmasak fonalas gombákból történő nukleinsav kivonásra. Élesztők esetében a fenol-kloroformos eljárást alkalmaztam DNS extrakcióra.

4.4.1 Fenol-kloroformos eljárás

1,5 ml-es Eppendorf csőbe 300 µl I-es lízis pufferhez (2% Triton-X-100, 1 w/v% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH=8) két kacsnyi friss tenyészetet/micéliumot adtam, majd 0,3 g üvegyöngy jelenlétében 3 percig maximális intenzitással vortexeltem. Két percig tartó centrifugálást követően (12000 rpm, 20 °C) a felülúszót új Eppendorf csőbe pipettáztam, hozzámértem 150 µl fenolt, 150 µl kloroform:izoamilalkoholt (24:1) és 200 µl TE puffert (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH=8), majd erőteljesen összeráztam. Azonos paraméterek mellett történő centrifugálást követően a felülúszó vizes fázist új Eppendorf csőbe pipettáztam, hozzáadtam 150 µl kloroform:izoamilalkoholt (24:1), erőteljes összerázást követően újabb centrifugálási lépés következett. A felülúszót új Eppendorf csőbe pipettáztam, majd annak kétszeresével megegyező térfogatú 96%-os etilalkoholt mértem hozzá, majd néhány átfordítással összekevertem. A teljes precipitáció érdekében 20 percig -20 °C-on inkubáltam. Ezután 15 percig (12000 rpm, 4 °C) centrifugáltam, majd az etanolt leöntöttem a pellettől. A pelletet gázláng mellett megszáritottam és 50 µl TE pufferben visszaoldottam. További felhasználásig az extraktumokat -20 °C-on tároltam.

4.4.2 Nátrium-acetátos eljárás

1,5 ml-es Eppendorf csőben 400 µl II-es lízis pufferhez (200mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) 2 nagy kacsnyi micéliumot adtam. A mintákat szárazblokk termosztátban 65 °C-on inkubáltam 10 percig, majd pellettörő segítségével homogenizáltam. (Az optimalizáció érdekében a homogenizáció alternatívájaként 0,3g üvegyöngyöt használva 30 másodperces vortexelés mellett végeztem el az eljárást). 130 µl Na-acetátot (3 M, pH=5.2) adtam a mintákhoz, majd 30 másodpercig maximális intenzitással vortexeltem. A lizátumot ezt követően 10 percig -20 °C-on inkubáltam, majd 15 percig centrifugáltam (13000 rpm, 4 °C). A felülúszót új Eppendorf csőbe pipettáztam, és azonos térfogatú izopropil-alkoholt mértem hozzá, alapos összekeverést követően 10 percig -20 °C-on inkubáltam, majd ismételt centrifugáltam 10 percig (12000 rpm, 4 °C). A pelleteket 700 µl 96%-os alkohollal, majd 700 µl 70%-os alkohollal mostam. A pelletet gázláng mellett megszáritottam és 50 µl TE pufferben visszaoldottam. További felhasználásig az extraktumokat - 20°C-on tároltam (Osama et al., 2011).

4.4.3 Kálium-acetátos eljárás

1,5 ml-es Eppendorf csőben 500 µl III-as lízis pufferhez (400mM Tris HCl pH=8, 60mM EDTA pH=8, 150mM NaCl, 1% SDS) 2 nagy kacsnyi steril fogpiszkálóval feldarabolt micéliumot adtam, majd szobahőmérsékleten (25 °C) 10 percig állni hagytam. Hozzáadtam 150 µl K-acetátot (60 ml 5M K-acetát, 11,5 ml jégcet, 28,5 ml desztillált víz; pH=4,8). 1 perc vortexelést követően, 1 percig centrifugáltam (12000 rpm, 20 °C). A felülúszót új Eppendorf csőbe pipettáztam, majd ismételten centrifugáltam. A felülúszóhoz megegyező térfogatú izopropil alkoholt mértem hozzá. A csövet párszor átforgattam, majd a kicsapódott nukleinsav ülepitése érdekében 2 percig centrifugáltam (12000 rpm, 20 °C). A felülúszót leöntöttem, és a pelletet 300 µl 70%-os etanollal mostam. 1 percig centrifugáltam (10000 rpm, 20 °C), ezt követően a felülúszót leöntöttem. A pelletet gázláng mellett megszáritottam és 50 µl 1x-es TE pufferben visszaoldottam. További felhasználásig az extraktumokat -20 °C-on tároltam (Liu et al., 2000).

A nukleinsav koncentrációját és tisztaságát minden esetben Nanodrop 2000TM (Thermo Fisher Scientific Inc.) spektrofotométerrel ellenőriztem. Az extrakciót követően az extraktumokat DN-áz és proteináz mentes RN-áz A-val (Thermo Fisher Scientific, USA) emésztettem az RNS molekulák degradációja érdekében. Ehhez mintánként 2 µl TE pufferből és 1 µl (10 mg/ml) RN-áz A-ból reakciómixet készítettem, majd 3-3 µl-t mértek a nukleinsav izolátumokhoz, melyeket 1 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam termosztát szekrényben.

4.5 Molekuláris vizsgálati módszerek

4.5.1 Agaróz gélelektroforézis

A DNS izolálást követően, illetve a különböző PCR alapú molekuláris vizsgálatok során az egyes nukleinsav amplikonok, illetve fragmentumok jelenlének és méretének meghatározását agaróz gélelektroforézissel végeztem. A módszer során agarózból (Promega, USA) 1-1,5%-os gélt készítettem 0,5x TBE puffer (45 mM Tris-bázis, 45 mM bórsav, 1 mM Na₂-EDTA) felhasználásával. A komponenseket Erlenmeyer-lombikba mértem, majd mikróhullámú sütőben az agaróz teljes oldódásáig melegítettem. Ezt követően 45 °C-ra hűtöttem, majd 3,3 µl GR Green festéket (New England Biolabs, USA) mértem hozzá, és a géltálcába öntöttem. Egy speciális „fésű” segítségével a DNS minták befogadására alkalmas „zsebeket” hoztam létre. A gél dermedését követően a futtató kádba 0,5X TBE puffert öntöttem, majd belehelyeztem a gélt tartalmazó tálcát. RAPD esetén az első és utolsó zsebbe 5 µl MidRanger létrát (Norgen, Canada)

mértem [marker: 300, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 bp], míg egyéb esetekben az első zsebbe 2 µl 100 bp-os létrát (New England Biolabs, USA) adagoltam [marker: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1517]. A többi zsebbe 3 µl 3X-osra hígított Gel Loading Buffer (New England Biolabs, USA) és DNS minták (ARDRA és RAPD esetében 10 µl, különben 3 µl) elegyét mértem. A gélt vizsgálattól függően 60-120 percig 120 V-on futtattam. Az eredmények kiértékeléséhez a gélt UV transzluminátor segítségével világítottam meg, láthatóvá téve a DNS band-eket.

4.5.2 rDNS régiók amplifikálása polimeráz láncreakcióval

A törzsek riboszómiális konzervatív szekvenciáinak (D1/D2 domén, illetve ITS1/5,8S rDNS/ITS2 régió) felszaporításához a régióra specifikus primerpárokat használtam. Élesztőgombák esetében a D1/D2 domén amplifikálásához az NL1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' és NL4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3', míg fonalas gombáknál ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' és ITS4: 5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3' primereket alkalmaztam. A PCR reakciót OneTaq® DNS polimerázzal (New England BioLabs, USA) végeztem el 30 µl végtérfogatban (3. táblázat). A reakciómix mintánként 6 µl (5x) enzim puffert, 0,84 µl (25 mM) magnézium-kloridot, 0,1 µl (25 mM) dNTP-t, 1-1 µl (10 µM) forward és reverse primert, 0,2 µl (5U/µl) DNS polimerázt, 19,86 µl nukleáz mentes desztillált vizet, illetve 1 µl nukleinsavat tartalmazott.

3. táblázat: PCR reakció paraméterei A) NL1-NL4, B) ITS1-ITS4 primerpárok használata esetén. A 2-4. lépés ciklusainak száma: 35.

Lépés	Hőmérséklet		Idő
	A	B	
1. Elődenaturáció	95 °C		5 perc
2. Denaturáció	95 °C		0,5 perc
3. Anellálás	53,5 °C	51 °C	0,5 perc
4. Lánchosszabbítás	72 °C	68 °C	1 perc
5. Végso lánchosszabbítás	72 °C	68 °C	5 perc

4.5.3 ARDRA

Az amplifikált rDNS régiókat élesztők esetében *Hae*III, fonalas gombáknál *Hae*III és *Msp*I (Promega, USA) különböző felismerő és hasítóhellyel rendelkező (2. ábra) restrikciós enzimekkel emésztettem. Ehhez mintánként 3 µl amplitikonhoz 0,2 µl enzimet, 1 µl enzimpuffert (Promega, USA) és 5,8 µl desztillált vizet mértem, majd 37 °C-on 4 órán át inkubáltam. A fragmentumok számát és méretét gélelektroforézis segítségével elemeztem.



2. ábra: A) *Hae*III és B) *Msp*I enzimek felismerési és hasítási helyei

4.5.4 RAPD

A tanszéken korábban végzett *Botrytis cinerea* törzsek genetikai diverzitását vizsgáló RAPD optimalizálási kísérletek (Takács D., 2018) során változatos mintázatot adó OPE20 primer mellett további hármat (OPE1, OPE19 és P5) vontam be kutatásomba (4. táblázat).

4. táblázat: A RAPD reakció során alkalmazott primerek szekvenciái

Primer	Szekvencia
OPE1	5' CCCAAGGTCC 3'
OPE19	5' ACGGCGTATG 3'
OPE20	5' AACGGTGACC 3'
P5	5' AACGCGAAC 3'

A PCR reakciót (5. táblázat) Taq DNS polimerázzal (New England BioLabs, USA) végeztem el 30 µl végtérfogatban. A reakciómix mintánként 3 µl (10x) enzim puffert, 0,2 µl (25 mM) dNTP-t, 1 µl (10 µM) primert, 0,15 µl (5 U/µl) DNS polimerázt, 24,65 µl nukleáz mentes desztillált vizet, illetve 1 µl nukleinsavat tartalmazott.

5. táblázat: PCR reakció paraméterei RAPD primerek használata esetén. A 2-4. lépés ciklusainak száma: 35.

Lépés	Hőmérséklet	Idő
1. Elődenaturáció	95 °C	5 perc
2. Denaturáció	95 °C	0,5 perc
3. Anellálás	34 °C	0,5 perc
4. Lánchosszabbítás	68 °C	2 perc
5. Végso lánchosszabbítás	68 °C	5 perc

A PCR reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem, az amplikonok méretét GelAnalyzer szoftver segítségével becsültem. A kapott mintázat alapján az adatokon XLSTAT szoftverrel klaszteranalízist végeztem és dendrogramot szerkesztettem.

4.5.5 Előkészítés szekvenálásra, szekvencia analízis

Az ARDRA analízissel azonos mintázatot mutató törzsek közül csoportonként kiválasztottam néhányat szekvenálásra, mely a csoport tagjait reprezentatívan képviseli. A törzseket a 4.6.2. fejezetben leírtak szerint amplifikáltam élesztőgombák esetében NL1-NL4,

míg fonalas gombák esetében ITS1-ITS4 primerpárok alkalmazásával. A PCR reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem, az amplikonok méretét GelAnalyzer szoftver segítségével becsültem.

Ezután a PCR termékeket Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (New England BioLabs, USA) használatával tisztítottam. Mintánként 1,5 ml-es Eppendorf csőbe 25 µl amplikonhoz 5x-ös mennyiségű (125 µl) kötő puffert (DNA Cleanup Binding Buffer) mértem, majd pipetázással alaposan elkevertem. Az oszlopokat a mellékelt gyűjtőcsövekbe helyeztem, majd azokra 150-150 µl-t mértem az elegyből. 1 percig szobahőmérsékleten 13000 rpm-en centrifugáltam, majd a gyűjtőcsövek tartalmát eltávolítottam. Az oszlopokra ezt követően 200 µl mosó puffert (DNA Wash Buffert) pipetáztam. Centrifugálást követően megismételtem a mosási lépést. Az oszlopot 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztem, 20 µl elválasztó puffert (DNA Elution Buffer) mértem az oszlop közepére és egy percig állni hagytam. A tisztított DNS eluálásához 1 percig centrifugáltam a csöveket.

A minták koncentrációját és tisztaságát Nanodrop 2000™ (Thermo Fisher Scientific, USA) spektrofotométerrel ellenőriztem, majd a Biomi Kft.-hez szállítottam. A szekvenálás Sanger módszerrel, élesztőgombák esetében NL1 primerrel, míg fonalas gombáknál ITS4 primerrel történt. A kapott szekvenciák minőségét SnapGene Viewer szoftverrel ellenőriztem, mellyel szekvencia elején és végén lévő zajt is szűrtem. A szekvenciarészletek összehasonlítását lokális illesztéssel (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool), végeztem a GenBank nukleotidszekvencia adatbázisában (Internet 3.) szereplő típusörzseken, melynek eredményéből megállapítható a vizsgált törzs rokonsági foka az adatbázisban szereplő más fajokhoz viszonyítva. Az illesztés minőségére különböző statisztikai mérőszámokból következtettem. Az illesztés pontszáma (Score) azt mutatja, hogy mennyire jó az összerendezés, minél magasabb, annál jobb. Az E-érték (expect value) megadja, hogy az adatbázisban történő keresés az adott illesztéshez várhatóan hány közel azonos pontszámmal rendelkező találatot eredményez a véletlennek köszönhetően. A P-érték (probability) pedig annak a valószínűsége, hogy az adott illesztés a véletlennek műve. Mind az E, mind a P érték esetében az alacsonyabb érték jelenti a jobb találatot (Higgins és Taylor, 2000).

4.6 Statisztikai szoftverek

A dolgozat statisztikai elemzéseit, kiértékeléseit RStudio (Posit, USA) segítségével végeztem. A grafikus elemek közül a dobozdiagramok létrehozásában a Minitab (Minitab, UK), míg a dendrogram szerkesztésénél az XLSTAT (Lumivero, USA) szoftverek segédkeztek.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

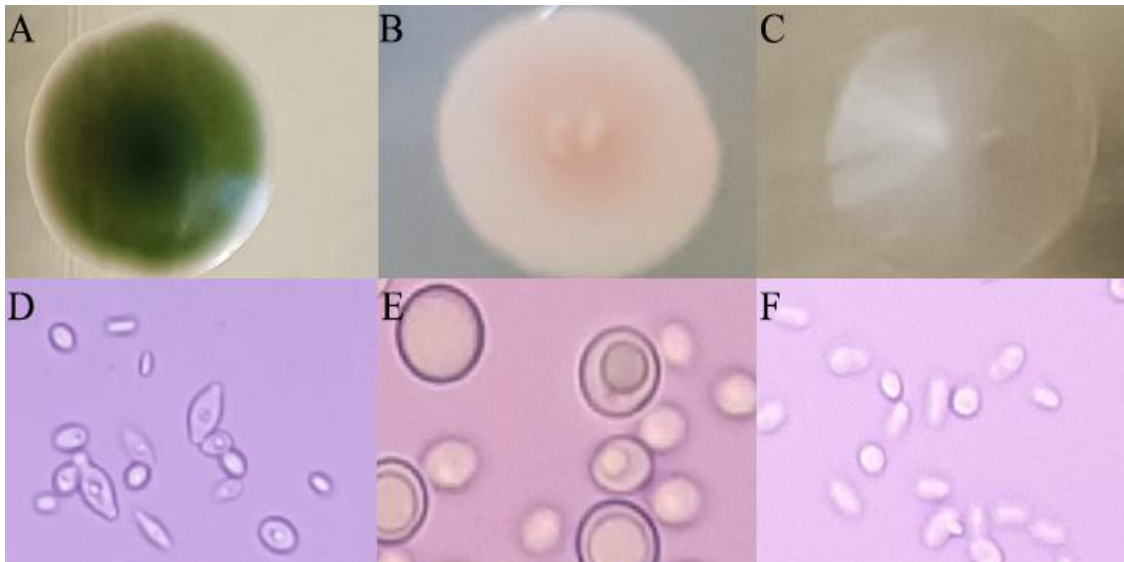
5.1 Izolátumok morfológiai jellemzése

5.1.1 Élesztőgombák morfológiája

A molekuláris vizsgálatok megkezdése előtt jellemeztem az élesztő izolátumok telep- és sejt morfológiáját. Ezen célból elvégeztem tenyésztésüket YEPD és WL Nutrient tápközegeken. Az izolátumok telepmorfológiáját sztereomikroszkóppal vizsgálva YEPD esetében homogén krémszínű, illetve barnás/rózsaszínes pigmenteket tartalmazó különböző méretű telepet figyeltem meg. WL Nutrient tápközegnél a telepek a zöld szín különböző árnyalatait mutatták. Egyes tenyészeteken belül eltérő méretű és színű, helyenként fehér, nem pigmentált telepek is megjelentek. Az eltérő telepmorfológiájú telepeket izoláltam és tisztítottam, mely során a BCY 44/2 azonosítójú törzsből BCY 44/2/A és B izolátumot, míg a BCY 56/8 törzsből BCY 56/8/A, B és C izolátumokat különítettem el. Így a korábbi nyolc izolátum helyett tizenegy törzssel dolgoztam tovább. A sejt morfológia tekintetében – azokat fénymikroszkóppal vizsgálva – bipoláris sarjadzást mutató citrom, kis méretű hosszúkás, körte, illetve olajcseppszerű képletet tartalmazó ovális, kerekded alakú sejteket láttam. A morfológiai vizsgálatok alapján a 11 törzset három csoportba soroltam (6. táblázat, 3. ábra). Az első csoportba a BCY 44/2/A és B, BCY 44/6, BCY 55/6, illetve a BCY 56/8/A, B és C törzsek tartoztak. A második csoportot a BCY 53/5, BCY 54/2 és BCY 56/7 törzsek alkották. A harmadik csoport egyedüli tagja a BCY 55/7-es izolátum volt.

6. táblázat: Élesztőtörzsek morfológiai csoportosítása

Csop.	Telepmorfológia	Sejtmorfológia
I.	YEPD: nagy, kör alakú, domború, krémszínű telepek WL: eltérő árnyalatú, „kokárdás” zöld telepek	citrom alakú, bilaterálisan sarjadzó sejtek
II.	YEPD: krémszínű, szabálytalan alakú, hullámos szélű telepek, aljukon barna/rózsaszín pigmenttel WL: közepén csúcsos, barna aljú telepek	különböző érési fázisban lévő, eltérő méretű kerek/ovális sejtek, közepén olajcseppel
III.	YEPD: nagy, kör alakú, párnaszerűen feldomborodó krémszínű telepek WL: apró, méregzöld telepek, fehér peremmel	ovális/körte alakú sejtek



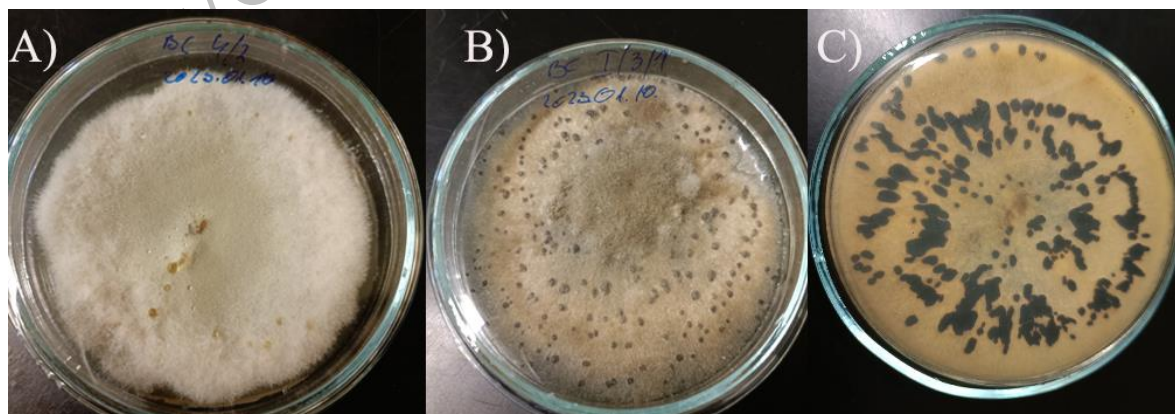
3. ábra: Az I., II., III. csoportba tartozó törzsek telep (A-C) és sejtmorfológiájának (D-E) szemléltetése

5.1.2 Fonalas gombák morfológiája

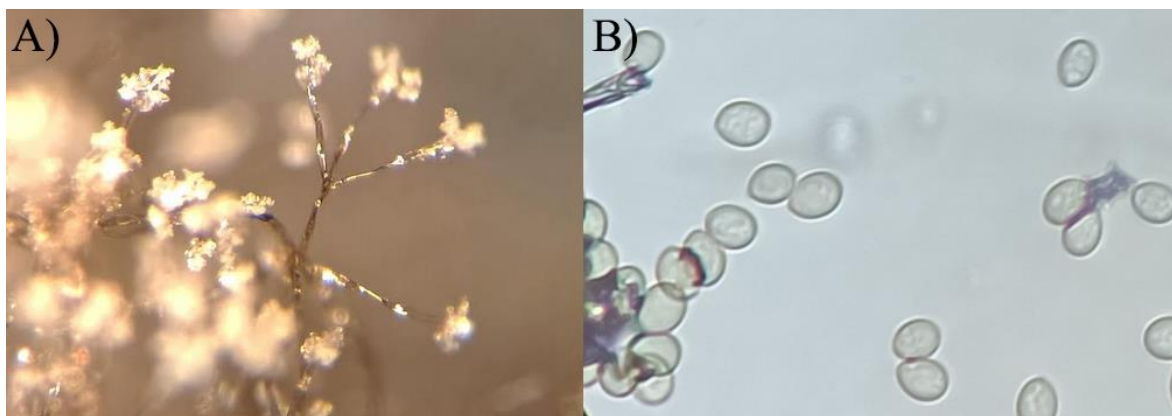
A korábbi évjáratú különböző szőlőfajtákról származó tanszéki törzsgyűjteményből választott három (BC 35/1/S1, BC 4/2, BC 40/1) *Botrytis cinerea*-ként azonosított törzs mellett két 2020-as (BC 62/2, BC 62/4), és 23 nátrium-hipokloritos felszíni fertőtlenítést követő aszúbogyó belsejéből izolált vizuálisan *B. cinerea*-nak feltételezhető törzs morfológiai jellemzését végeztem. Az izolátumok telepmorfológiájának változásait MEA táptalajon 25 °C-on történő inkubáció mellett követtem nyomon. A telepek kezdetben fehér színűek voltak és a többitől fejlődésben jelentősen alulmaradó BC I/8/3-as törzs kivételével hasonló növekedési tendenciát mutattak. Egy hét inkubációt követően a telepek jelentős színbeli eltéréseket mutattak, többségében a szürke különböző árnyalatait, de számos törtfehér és bézs telepet is megfigyeltem (8. táblázat). Szerkezetüket tekintve a törzsek közel fele-fele arányban alakítottak ki tömör, illetve laza, vattaszerű micéliumot; ettől elérő volt a BC I/5/1 azonosítójú törzs telepmorfológiája, mely sokkal kompaktabb szerkezettel rendelkezett. Három törzset leszámítva (BC 4/2, BC 35/1/S1 és BC I/7/4), ahol nem tapasztaltam szkleróciumképződést, igen változatos alakú, méretű és elhelyezkedésű képleteket mutattak (7. táblázat, 4. ábra). Emellett fény- és sztereomikroszkóppal megfigyelve a konídiumokat (BC I/7/4 kivételével, mely nem termelt), erősen elágazó konidiofórokon kialakuló ellipszoid struktúrákat figyeltem meg (5. ábra).

7. táblázat: *B. cinerea* törzsek szkleróciumainak karakterisztikája

Azonosító	Méret	Alak	Elhelyezkedés
BC 4/2	nincs	-	-
BC 35/1/S1	nincs	-	-
BC 40/1	közepes	szabálytalan	szabálytalan
BC 62/2	közepes	kerek	szabálytalan
BC 62/4	közepes	kerek	szabálytalan
BC I/1/1	kicsi	kerek	egyenletesen elszórt
BC I/1/2	közepes	kerek	körben, koncentrikus
BC I/1/3	közepes	kerek	szélén koncentrikus
BC I/2/4	nagy	kerek	körben, koncentrikus
BC I/3/1	közepes	kerek	egyenletesen elszórt
BC I/3/2	közepes	szabálytalan	egyenletesen elszórt
BC I/3/3S	közepes	kerek	egyenletesen elszórt
BC I/3/4	nagy	kerek	egyenletesen elszórt
BC I/4/1	kicsi	kerek	egyenletesen elszórt
BC I/5/1	nagy	szabálytalan	szabálytalan
BC I/5/2	nagy	kerek	szabálytalan
BC I/6/1	közepes	ovális	sugárirányú
BC I/6/2	nagy	kerek	középen
BC I/6/3A	nagy	szabálytalan	körben, koncentrikus
BC I/6/3B	közepes	kerek	középen és szélén koncentrikus
BC I/7/1	közepes	ovális	szabálytalan
BC I/7/2	közepes	kerek	középen és szélén koncentrikus
BC I/7/3A	nagy	szabálytalan	középen
BC I/7/3B	kicsi	kerek	szabálytalan
BC I/7/4	nincs	-	-
BC I/8/1	nagy	kerek	szabálytalan
BC I/8/2	nagy	kerek	szabálytalan
BC I/8/3	nagy	kerek	középen



4. ábra: A) Szkleróciumot nem képző BC 4/2 törzs, B) egyenletesen elszórt, kerek szkleróciumok (BC I/3/1), illetve C) sugarasan szimetriát mutató ovális szkleróciumok (BC I/6/1)



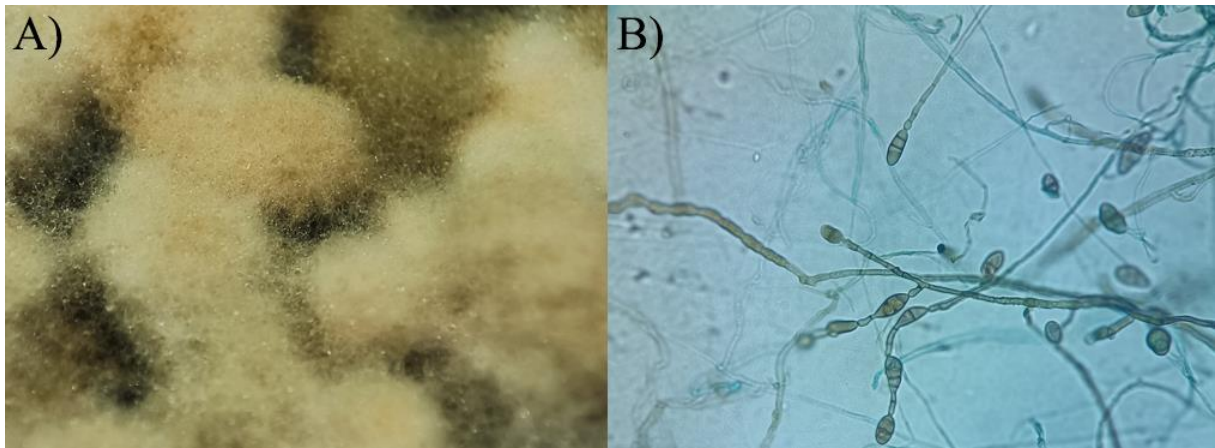
5. ábra: A) Elágazó konidiofór és B) lefűződött konídiumok

8. táblázat: *B. cinerea* törzsek telepmorfológiai vizsgálata

Azonosító	Micélium szerkezete	Telep színe	Azonosító	Micélium szerkezete	Telep színe
BC 4/2	tömör	törtfehér	BC I/5/1	nagyon tömör	világosszürke
BC 35/1/S1	tömör	törtfehér	BC I/5/2	tömör	sötétszürke
BC 40/1	laza	sötétszürke	BC I/6/1	tömör	világosszürke
BC 62/2	laza	sötétszürke	BC I/6/2	tömör	világosszürke
BC 62/4	laza	sötétszürke	BC I/6/3A	laza	világosszürke
BC I/1/1	laza	bézs	BC I/6/3B	tömör	bézs
BC I/1/2	laza	sötétszürke	BC I/7/1	tömör	világosszürke
BC I/1/3	laza	sötétszürke	BC I/7/2	laza	világosszürke
BC I/2/4	tömör	sötétszürke	BC I/7/3A	laza	világosszürke
BC I/3/1	tömör	bézs	BC I/7/3B	laza	sötétszürke
BC I/3/2	tömör	sötétszürke	BC I/7/4	tömör	világosszürke
BC I/3/3S	laza	világosszürke	BC I/8/1	laza	sötétszürke
BC I/3/4	tömör	bézs	BC I/8/2	tömör	sötétszürke
BC I/4/1	laza	sötétszürke	BC I/8/3	laza	világosszürke

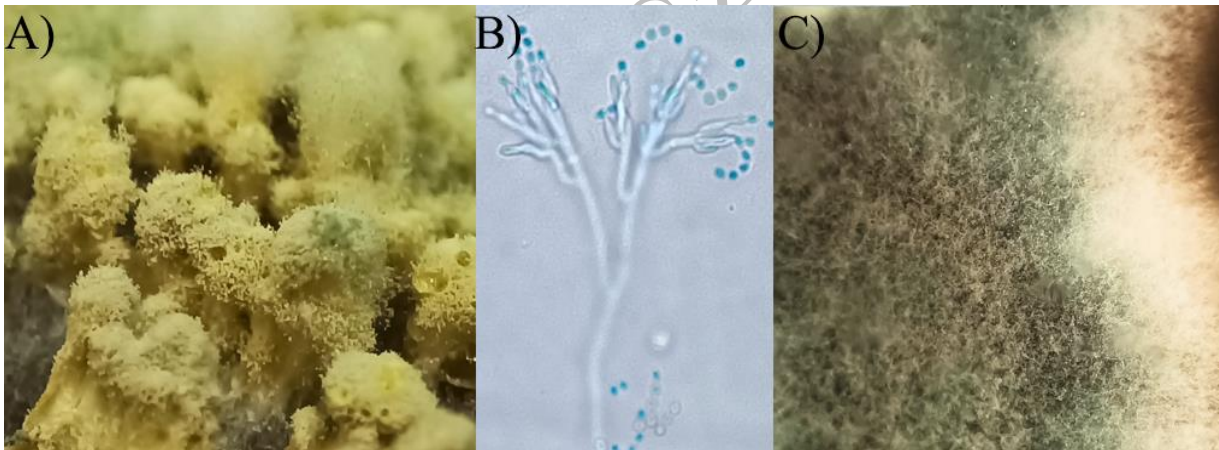
A morfológiai jellemzők alapján feltételezhetően *B. cinerea* törzsek mellett számos egyéb makro- és mikroszkóposan is eltérő morfológiát mutató fonalas gomba izolátumot figyeltem meg, melyeket közös tulajdonságaik alapján csoportosítottam.

Fiatalon fehér vattakorongra emlékeztető alakú és textúrájú szövedék jellemző a BC 30/1, BC 62/3, BC 62/5, BC 64/1 és BC 78/1 azonosítójú törzsekre. Míg a BC 30/1 és BC 62/3 törzs az idő múlásával sárgásbarnás árnyalatot mutatott, a csoport többi tagja továbbra is fehér színű maradt. Kezdeti kompaktabb szerkezetüket lazább, habosabb micéliumhálózat váltotta. Mikroszkópos képük ovális, egyik végükön elkeskenyedő, barna színű konídiumokat mutatott, keresztirányú barazdáltsággal, melyek a konidiofór végén egyedül álltak vagy többtagú láncolatot alkottak (6. ábra). Ez a jellegzetes konídium az *Alternaria* nemzetségre jellemző.



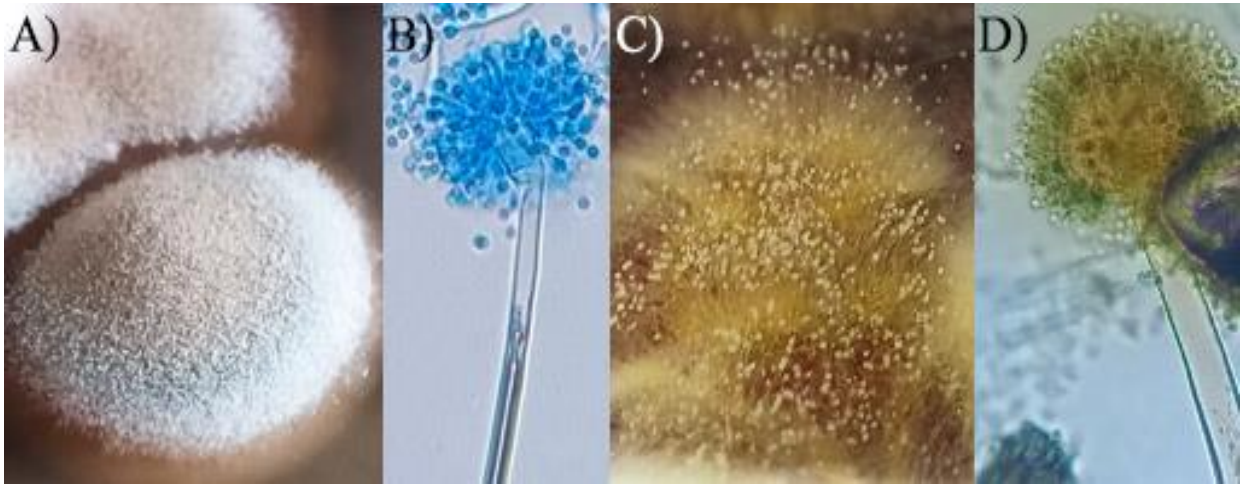
6. ábra: A) BC 62/3-as törzs színesedő fonalai és B) BC 78/1 törzs konídiumai mikroszkóp alatt

A *Penicillium* nemzetség általános ismertetőjegyeit mutatta két izolátum (BC 55/4, BC 56/2). A BC 55/4 törzs világoszöld karfiolrózsára emlékeztető kiemelkedéseket képzett, míg a BC 56/2 törzs inkább elterülő, sötétzöld telepként növekedett, szélén fehér sávval (7. ábra). Mikroszkóposan hosszú elágazó konídiofór látszódott mindkét törzsnél, a fialidok végén konídiumok láncolatával.



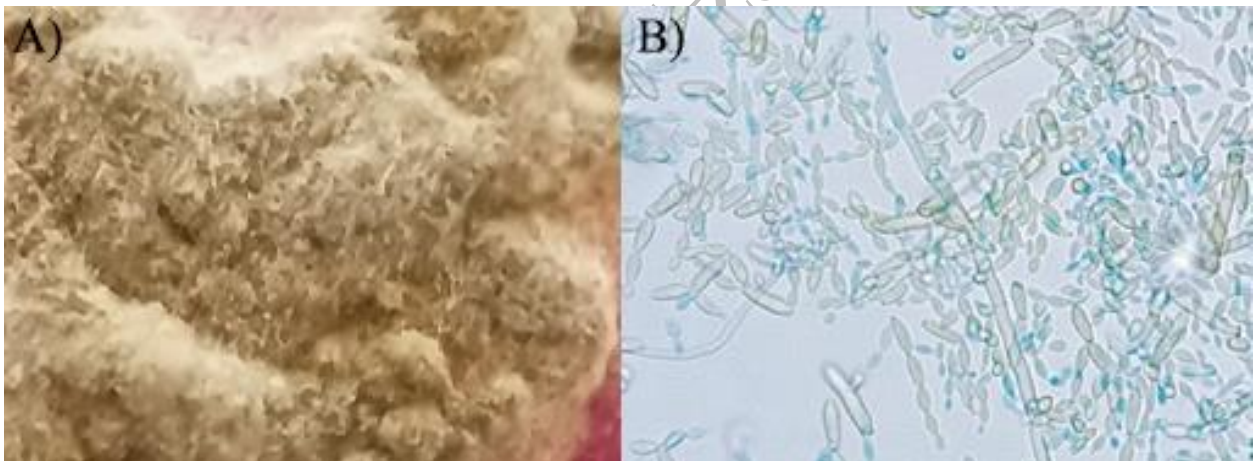
7. ábra: A) BC 55/4 és C) BC 56/2 törzsek makroszkópos, illetve B) ecetszerű elágazást mutató mikroszkópos képe

Fiatalon fehértől sárgáig terjedő micéliumhálózatot figyeltem meg a BC 34/5/1 törzs esetében, melyet idővel elfed a fekete konídiumok sokasága. Mikroszkóppal vizsgálva nagy, gömb alakú kiszélesedő vezikulumban végződő, el nem ágazó konidiofórokat figyeltem meg. A vezikulumokhoz kapcsolódó elnyúlt, palack alakú fialidokon konídiumok láncolata mutatkozott. Eltérő morfológiát tapasztaltam a BC 62/10-es törzs esetében. Fehér szegélyű, zöld színű telepei elszórt kisebb szigetekként helyezkedtek el. Emellett a vezikulum nem nagyméretű, kifejlett gömbként, inkább csak megvastagodásként jelentkezett (8. ábra). A morfológiai jegyek alapján vélhetően mindkét törzs az *Aspergillus* nemzetséghez tartozik.



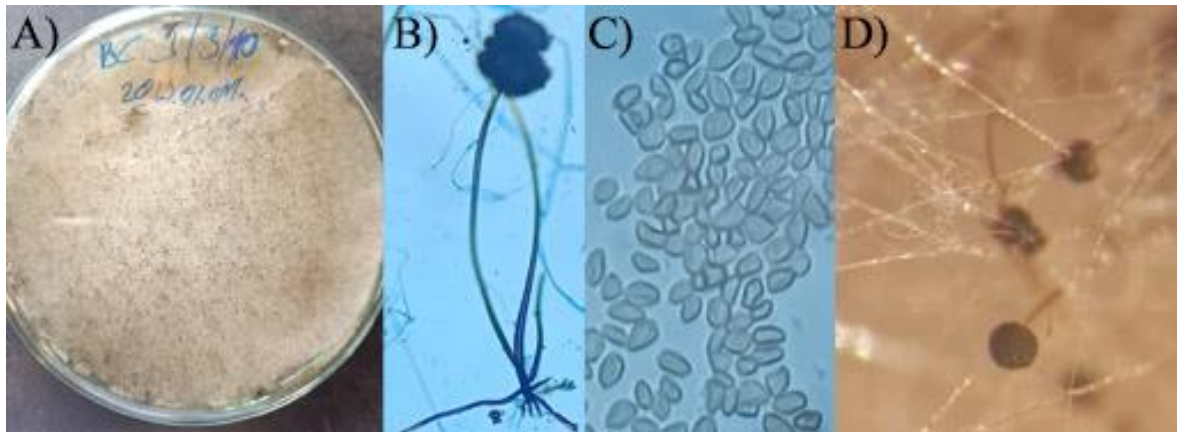
8. ábra: BC 62/10 (A, B) és BC 34/5/1 (C, D) törzsek makroszkópos és mikroszkópos képe

A BC 35/1/1 és BC 61/5 törzsek poros textúrájú, olíva-zöld telepekkel jellemezhetőek. Mikroszkóposan vastag, hengeres, helyenként szeptált, illetve citrom alakú különálló konídiumok vagy azok el nem ágazó láncolát figyeltem meg (9. ábra), mely a *Cladosporium* nemzetség jellemzője.



9. ábra: BC 61/5 törzs A) zöld színű telepe és B) mikroszkóppal megfigyelt konídium láncai

A *Rhizopus* nemzetség morfológiai sajátosságait figyeltem meg a BC I/3/10, BC I/5/10 és BC I/8/10 izolátumokon (10. ábra). A rendkívül gyorsan növekvő micéliumok fehérek, a magasra növekvő, el nem ágazó sporangioforok végükön egy-egy gömbölyű sporangiummal barna színt mutattak. A sporangiospórák szabálytalan sokszög alakúak voltak. A sporangioforok táptalajjal érintkező oldalán elágazó rizoidok mutatkoztak.



10. ábra: BC I/3/10 törzs A) makroszkópos B-C) mikroszkópos és D) sztereomikroszkópos képe

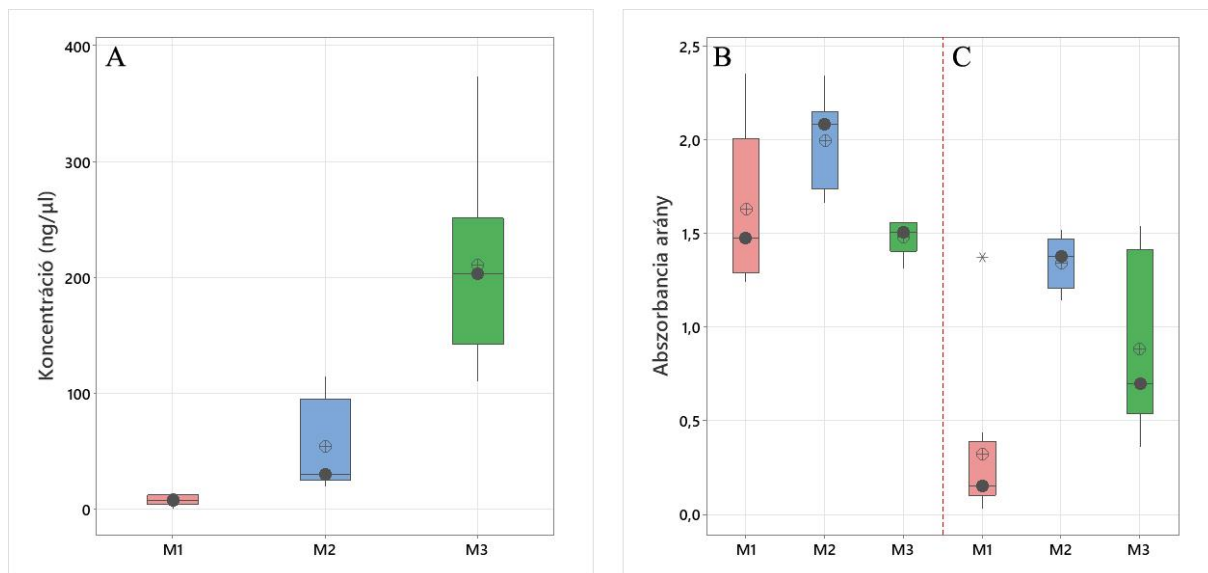
Morfológiai sajátosságai alapján nem sikerül egy kategóriába sem sorolni a BC 53/4, BC 60/2, BC 62/1 és BC 65/1 azonosítójú törzseket. Általánosságban elmondható, hogy BC 65/1 halvány rózsaszín telepe kivételével, a többi törzs esetében mind a fiatal, mind az idősebb telepek is fehér színűek, változatos textúrával. Mikroszkóp alatt szemügyre véve csak hifák hálózatát figyeltem meg, egyéb jellegzetes struktúrák és képletek nem voltak azonosíthatóak.

5.2 Nukleinsav izolálási módszerek összehasonlítása

Mivel előzetes, fenol-kloroformos eljárással fonalas gombákból történő nukleinsav izolálási próbálkozások nem eredményeztek elfogadható mennyiségű és minőségű nukleinsav hozamot, a 4.4. pontban ismertetett három (fenol-kloroformos [továbbiakban M1], nátrium-acetátos [továbbiakban M2], illetve kálium acetátos [továbbiakban M3]) izolálási módszer statisztikai összehasonlítását végeztem különböző fonalas gomba nemzetségbe (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Botrytis*) tartozó törzsek bevonásával.

A választott három nukleinsav izolálási módszer hatékonyságának összehasonlítását egytényezős varianciaanalízissel (ANOVA) végeztem. Ez egy olyan statisztikai teszt, amely három vagy több csoport átlagainak összehasonlítására használható, segítségével megállapítható, hogy az egyes változók tekintetében szignifikáns különbségek vannak-e a csoportok átlagai között (Witte és Witte, 2011).

A teszt eredménye alapján megállapítható, hogy mind a nukleinsav hozamot $[F(2, 21) = 32,64; p = 3,60E-07]$, mind a tisztaságot 260/280 $[F(2, 21) = 5,70; p = 0,010]$ és 260/230 abszorbancia arány $[F(2, 21) = 14,62; p = 1,05E-04]$ esetében is szignifikánsan befolyásolta a nukleinsav izolálási módszer. A módszerek összehasonlítása dobozdiagram segítségével a 11. ábrán látható.



11. ábra: M1, M2, M3 módszerrel kapott A) koncentrációk és B) 260/280 és C) 260/230 abszorbancia arányok

Mivel varianciaanalízis eredménye statisztikailag szignifikáns különbséget mutatott a csoportátlagok között, annak elvégzése után Tukey HSD post-hoc tesztet alkalmaztam, hogy megállapítsam, mely csoportpárok különböznek egymástól (Witte és Witte, 2011).

Koncentráció tekintetében a Tukey-féle HSD-teszt eredménye alapján az M1 és az M3 módszer ($p = 1,03E-05$, 95% C.I. = [136.5 – 269.0]), illetve az M2 és az M3 módszer ($p = 2,85E-05$, 95% C.I. = [90.4 – 222.9]) átlagértéke szignifikánsan különbözött. Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség az M1 és M2 módszer között ($p=0,209$).

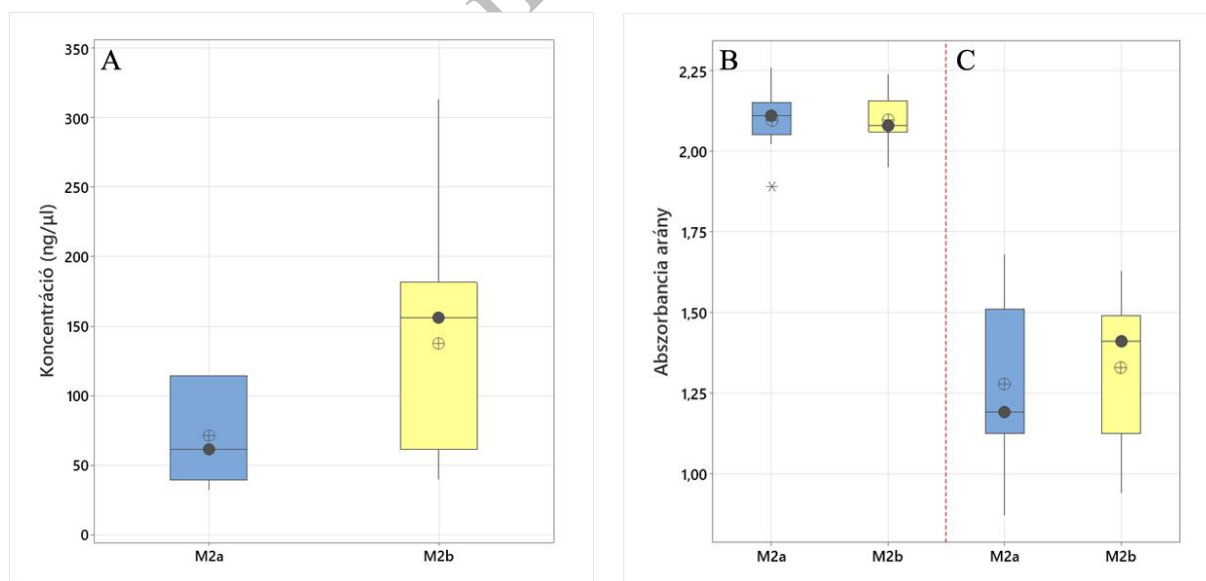
Tisztaságra vizsgálva 260/280 abszorbancia aránynál szignifikáns különbség mutatkozott az M1 és az M2 módszer ($p = 0,035$, 95% C.I. = [0,026 – 0,744]), illetve az M2 és az M3 módszer ($p = 0,014$, 95% C.I. = [-0,803 – -0,084]) között. Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség az M1 és M3 módszer között ($p=0,911$). 260/230 abszorbancia arány esetében az M1 és a M2 módszer ($p = 7,67E-05$, 95% C.I. = [0,544 – 1,496]), illetve az M1 és az M3 módszer ($p = 0,019$, 95% C.I. = [0,084 – 1,036]) között jelentős különbség mutatkozott. Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség az M2 és M3 módszer között ($p=0,060$).

Megállapítható, hogy a három nukleinsav izolálási módszer közül az kálium-acetátos módszerrel volt a legnagyobb hozam elérhető, de a nátrium-acetátos eljárás esetében is elfogadható nukleinsav koncentrációt sikerült elérni. Azonban a kálium-acetátos módszer tisztasága jelentősen alulmarad a nátrium-acetátoshoz képest, ezért utóbbit választottam további izolálások alapjául.

Emellett teszteltem, hogy a nátrium-acetátos módszer hozama növelhető-e, ha a homogenizációs lépés alkalmával a pellettőrő (továbbiakban M2a) helyett üvegyöngyöket (M2b) használok.

Az eredmények értékelésére előzetes Shapiro-Wilk tesztet végeztem annak megállapítására, hogy a mérési eredmények normál eloszlást követnek-e. A teszt eredménye alapján ($p > 0,05$) megállapítható, hogy a teszt nem szignifikáns, a nullhipotézist ($\alpha = 0,05$ szignifikanciaszint mellett) megtartottam, vagyis a mért értékek normál eloszlást követnek.

A páros t-próba eredménye alapján nukleinsav koncentráció tekintetében $t(8) = 2,729$, $p = 0,026$, az M2a izolálási módszer ($M = 71,067$, $SD = 34,777$) szignifikánsan eltér az M2b módszertől ($M = 137,422$, $SD = 86,954$). Az izolálás tisztaságára nézve 260/280 abszorbancia aránynál $t(8) = 0,067$, $p = 0,949$, M2a ($M = 2,097$, $SD = 0,102$) az M2a módszer nem tér el szignifikánsan az M2b ($M = 2,098$, $SD = 0,082$) módszertől, 260/230 arány esetében is $t(8) = 0,596$, $p = 0,568$, megegyezik az M2a ($M = 1,278$, $SD = 0,253$) módszer tisztasága M2b-jével ($M = 1,328$, $SD = 0,240$) az átlagok különbségét vizsgálva. A módszerek összehasonlítása dobozdiagram segítségével a 12. ábrán látható. Összességben elmondható, hogy az M2b módszerrel nagyobb hozam érhető el az M2a módszerhez képest, tehát további fonalas gombákból történő nukleinsav izolálásnál az üvegyöngyök használatával kiegészített nátrium-acetátos eljárást alkalmaztam.



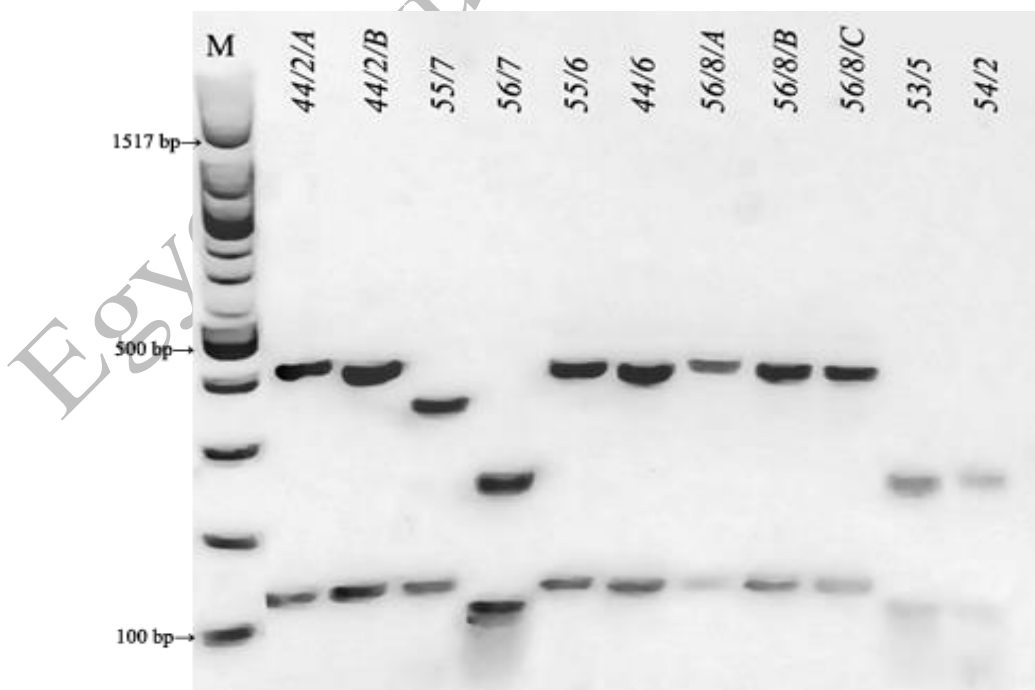
12. ábra: M2a, és M2b módszerekkel elért A) koncentrációk és B) 260/280 és C) 260/230 abszorbancia arányok

5.3 Molekuláris vizsgálati eredmények

Az élesztőgomba törzsek a projektben részt vevő más törzsekkel együtt MALDI-TOF tömegspektrometriás vizsgálatnak alávetve előidentifikálásra kerültek. A vizsgálat eredményeként kapott pont (score) érték alapján a BC 56/7 törzs *Metschnikowia pulcherrima*, a BC 56/8/A, B, C törzsek *Hanseniaspora uvarum* fajként voltak azonosíthatóak. További két törzs (BC 54/2 és BC 53/5) esetében az eredmény nemzetség szinten (*Metschnikowia*) volt elfogadható. A többi törzs esetében nem született megfelelő megbízhatóságú eredmény, ezért további molekuláris vizsgálatok elvégzésére volt szükség.

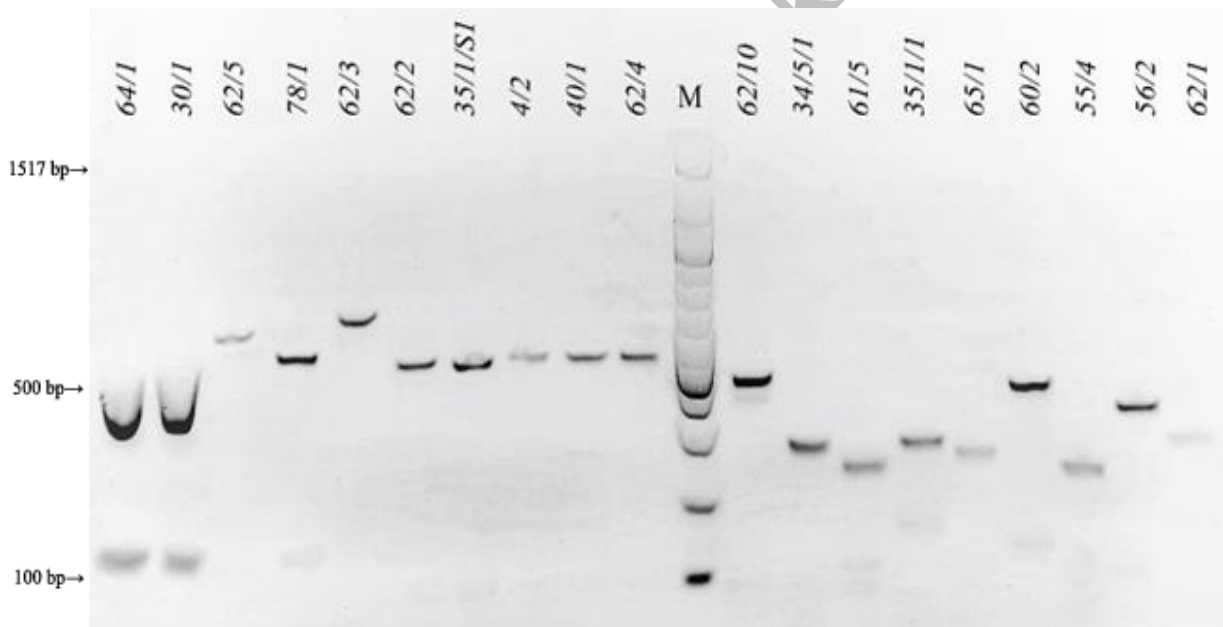
5.3.1 ARDRA

A 11 élesztő törzs rDNS-ének D1/D2 doménjét NL1-NL4 primerekkel amplifikáltam, ez minden esetben kb. 700 bp hosszúságú amplikonokat eredményezett. *Hae*III restrikciós enzimes emésztésük gélképe alapján (13. ábra) a törzseket három csoportba (I: 450, 140 bp; II: 250, 130 bp; III: 350, 140 bp méretű fragmentek) soroltam, melyek teljes mértékben megfeleltethetők voltak a morfológiai vizsgálat során kialakított csoportokkal. Az első csoportba a BC 44/2/A, BC 44/2/B, BC 55/6, BC 44/6, BC 56/8/A, BC 56/8/B, BC 56/8/C törzsek, a másodikba a BC 56/7, BC 53/8, BC 54/2 törzsek, míg a harmadikba a BC 55/7 azonosítójú törzs tartozott.

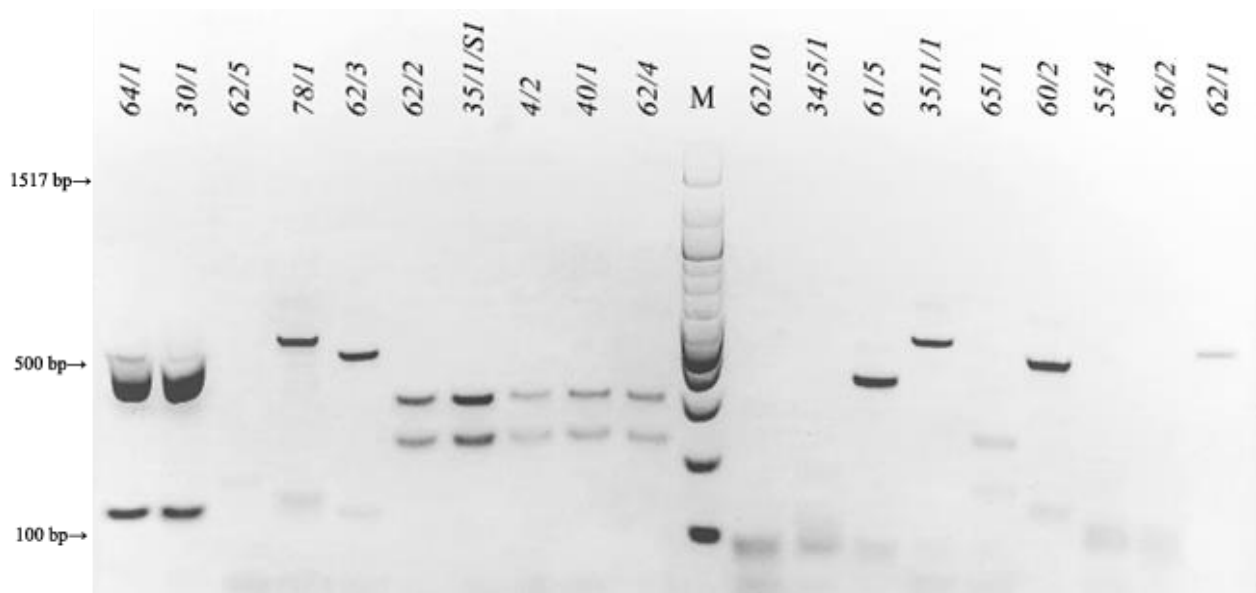


13. ábra: Élesztő törzsek D1/D2 doménjének *Hae*III enzimmel történő emésztése

Tizenkilenc korábbi és 26 2022 évjáratú fonalas gomba törzs ITS1/5,8S rDNS/ITS2 régiójának ARDRA analízisét végeztem el *Hae*III és *Msp*I (14. és 15. ábra) restrikciós endonukleáz enzimek használatával. A kiértékelés során a fragmentumok méretét GelAnalyzer szoftver segítségével számszerűsítettem (9. táblázat), mely során 16 eltérő mintázat mutatkozott. A BC 64/1 és BC 30/1 törzsek emésztésével mindkét enzimmel megegyező méretű fragmentumokat kaptam. Azonos mintázat volt megfigyelhető a BC I/5/10 és BC I/8/10 izolátumok között is. A projekt keretein belül szekvenálással *Botrytis cinerea*-ként azonosított (Salma, 2021) BC 35/1/S1 törzs morfológiai leírása és ARDRA mintázata teljes egyezést mutatott a vizsgált BC 4/2, BC 40/1, BC 62/2, BC 62/4, illetve a 2022-es izolátumokkal, kivéve a BC I/3/10, BC I/5/10, BC I/8/10 jelűeket, így megállapítható, hogy ezen törzsek a *Botrytis cinerea* fajhoz tartoznak.



14. ábra: Fonalas gomba törzsek ITS1/5,8S rDNS/ITS2 régiójának *Hae*III enzimmel történő emésztése



15. ábra: Fonalas gomba törzsek ITS1/5,8S rDNS/ITS2 régiójának *MspI* enzimmel történő emésztése

9. táblázat: Az ITS1 és ITS4 primerpárral amplifikált szekvenciák, illetve azok restriktív emésztésével kapott fragmentek becsült hosszai. A 100 bp alatti fragmentek nem kerültek feltüntetésre.

Törzs azonosító	ITS amp. (bp)	<i>HaeIII</i> frag. (bp)	<i>MspI</i> frag. (bp)
BC 30/1	700	400, 120	420, 110
BC 34/5/1	700	2×340	
BC 35/1/1	700	360, 180	580
BC 35/1/S1	670	670	380, 240
BC 4/2	670	670	380, 240
BC 40/1	670	670	380, 240
BC 55/4	750	2×300	
BC 56/2	750	460, 100	
BC 60/2	730	520, 140	500, 100
BC 61/5	640	300, 100	440
BC 62/1	830	370, 170	530
BC 62/10	700	530	
BC 62/2	670	670	380, 240
BC 62/3	700	700	530, 110
BC 62/4	670	670	380, 240
BC 62/5	700	680	170
BC 64/1	700	400, 120	420, 110
BC 65/1	690	2×330	260, 160
BC 78/1	700	600, 100	580, 120
BC I/1-8 törzsek*	670	670	380, 240
BC I/3/10	1300	730, 260, 190	780, 170
BC I/5/10	800	680	650
BC I/8/10	800	680	650

*2022 évjáratban izolált törzsek, a BC I/3/10, BC I/5/10 és BC I/8/10 törzsek kivételével

5.3.2 Szekvenálás

Élesztőgombák esetében a morfológiai vizsgálatok és a restriktív emésztés során kialakított csoportokból néhány törzset kiválasztottam szekvenáltatásra. A szekvenanciaanalízis eredménye alapján három élesztőtörzs (BCY 44/2/A, BCY 44/6, BCY 56/8/A) *Hanseniaspora uvarum*, a BCY 55/7 törzs *Starmerella bacillaris*, míg a BCY 53/5 törzs *Metschnikowia pulcherrima* fajként volt azonosítható (10. táblázat). Tehát a morfológia alapján felállított csoportok izolátumai a *Hanseniaspora uvarum* (I. csoport: BCY 44/2/A, BCY 44/2/B, BCY 44/6, BCY 55/6, BCY 56/8/A, BCY 56/8/B, BCY 56/8/C), *Metschnikowia pulcherrima* (II. csoport: BCY 53/5, BCY 54/2, BCY 56/7), *Starmerella bacillaris* (III. csoport: BCY 55/7) fajba tartoznak. A kapott eredmények összhangban vannak a MALDI-TOF vizsgálat során kapottakkal.

A morfológiai és molekuláris vizsgálatok alapján kilenc fonalgomba törzset választottam ki szekvenanciaanalízisra. A szekvenanciaadatok faj szintű azonosítást tettek lehetővé a BC 35/1/1 (*Cladosporium cladosporioides*), BC 55/4 (*Penicillium expansum*), BC 56/2 (*Penicillium glabrum*), BC 62/1 (*Acremonium sclerotigenum*), BC 62/2 (*Botrytis cinerea*), BC I/7/4 (*Botrytis cinerea*) és BC I/8/10 (*Rhizopus arrhizus*) törzsek esetében.

Hat izolátum esetében a szekvenanciaillesztés több fajra adott hasonló minőségű találatot. A szőlőbogyót mint fonalgombák gazdaszervezetét vizsgáló szakirodalmi adatok és a törzsek morfológiai tulajdonságai alapján valószínűsíthető, hogy a BC 30/1 és BC 60/2 törzsek *Alternaria arborescens* (Tančinová et al., 2016), a BC 34/5/1 *Aspergillus niger*, a BC 62/10 *Aspergillus versicolor* (Klich, 2002), míg a BC 62/5 törzs a *Cladosporium herbarum* (Briceño and Latorre, 2008) fajba tartozik. Mivel vizsgálatok a szőlőn számos *Fusarium* nemzetséghez tartozó faj jelenlétét kimutatták (Diaz, 2005), így a BC 65/1 törzset csak nemzetség szinten tudtam azonosítani. A BC I/3/10 törzs esetében nem érkezett kellő minőségű szekvenanciaadat, így annak szekvenancia alapú azonosítását nem tudtam elvégezni. Morfológiáját tekintve nagymértékű hasonlóságot mutat a BC I/8/10 törzsszel, így feltehetőleg a *Rhizopus* nemzetségbe tartozik.

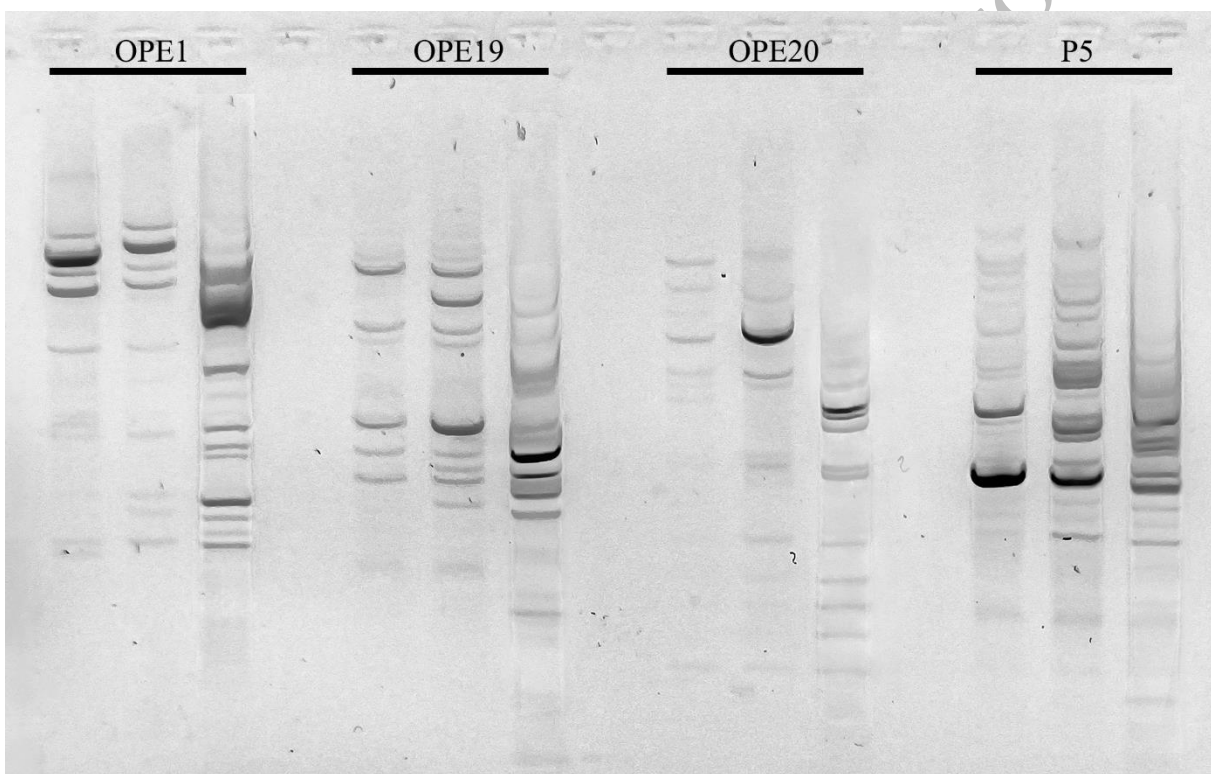
10. táblázat: BLAST illesztés eredménye

Törzs ID	Szekv. hossz (bp)	Faj	Referencia törzs	E érték	%-os azonosság	Hozzáférési szám
BCY 44/2/A	579	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CBS314	0.0	100,00%	KY107844
BCY 44/6	578	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CBS314	0.0	100,00%	KY107844
BCY 56/8/A	580	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CA314	0.0	100,00%	KY107844
BCY 53/5	509	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	NRRLY7111	0.0	98,93%	NG_075437
BCY 55/7	486	<i>Starmerella bacillaris</i>	CBS843	0.0	100,00%	AY394855
BC 30/1	551	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	CBS118809	0.0	100,00%	NR_163686
		<i>Alternaria doliconidium</i>	HKAS100840	0.0	100,00%	NR_158361
		<i>Alternaria destruens</i>	ATCC204363	0.0	100,00%	NR_137143
		<i>Alternaria arborescens</i>	CBS102605	0.0	100,00%	NR_135927
BC 34/5/1	583	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	CBS139.54	0.0	100,00%	NR_137513
		<i>Aspergillus foetidus</i>	CBS121.28	0.0	100,00%	NR_163668
		<i>Aspergillus niger</i>	ATCC168888	0.0	100,00%	NR_111348
BC 35/1/1	535	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	CBS112388	0.0	100,00%	NR_119839
BC 55/4	569	<i>Penicillium expansum</i>	ATCC7861	0.0	99,81%	NR_077154
BC 56/2	1029	<i>Penicillium glabrum</i>	CBS125543	0.0	100,00%	MH863551
BC 60/2	562	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	CBS118809	0.0	100,00%	NR_163686
		<i>Alternaria doliconidium</i>	HKAS100840	0.0	100,00%	NR_158361

		<i>Alternaria destruens</i>	ATCC204363	0.0	100,00%	NR_137143
		<i>Alternaria arborescens</i>	CBS102605	0.0	100,00%	NR_135927
BC 62/1	567	<i>Acremonium sclerotigenum</i>	CBS124.42	0.0	100,00%	NR_149332
BC 62/2	536	<i>Botrytis cinerea</i>	CBS140599	0.0	100,00%	KX710078
BC 62/5	540	<i>Cladosporium herbarum</i>	CBS121621	0.0	100,00%	NR_119656
		<i>Cladosporium macrocarpum</i>	CBS175.82	0.0	100,00%	NR_119657
		<i>Cladosporium versiforme</i>	CBS140491	0.0	100,00%	NR_152297
		<i>Cladosporium variable</i>	CBS121636	0.0	100,00%	NR_119663
BC 65/1	550	<i>Fusarium concentricum</i>	NRRL25181	0.0	99,79%	NR_111886
		<i>Fusarium fujikuroi</i>	CBS221.76	0.0	99,79%	NR_111889
		<i>Fusarium annulatum</i>	CBS258.54	0.0	99,58%	NR_138275
		<i>Fusarium acutatum</i>	CBS402.97	0.0	99,37%	NR_111142
BC 62/10	556	<i>Aspergillus sydowii</i>	CBS593.65	0.0	99,37%	NR_131259
		<i>Aspergillus versicolor</i>	ATCC9577	0.0	98,76%	NR_131277
		<i>Aspergillus jensenii</i>	NRRL58600	0.0	98,74%	NR_135444
		<i>Aspergillus protuberus</i>	NRRL3505	0.0	98,73%	NR_135353
BC I/7/4	526	<i>Botrytis cinerea</i>	CBS140599	0.0	100,00%	KX710078
BC I/8/10	619	<i>Rhizopus arrhizus</i>	CBS112.07	0.0	100,00%	NR_103595

5.3.3 RAPD

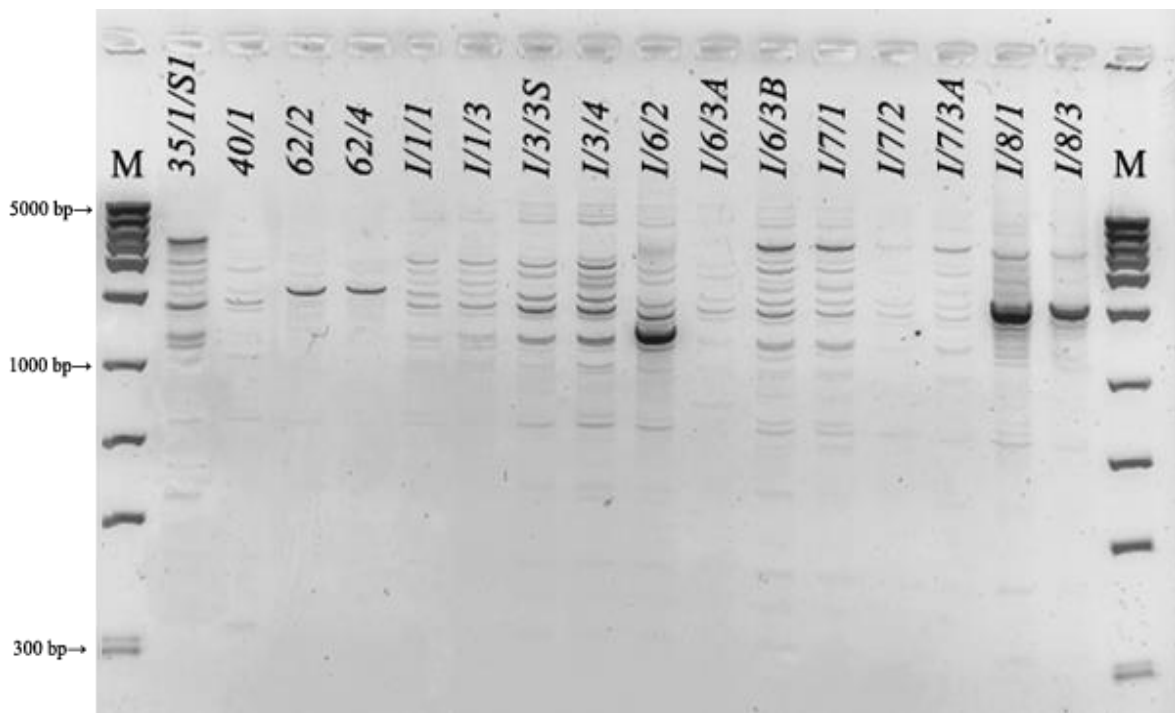
Dolgozatom célkitűzései között szerepelt törzsgyűjteményem 28 *B. cinerea* törzsének molekuláris megkülönböztetése RAPD segítségével. Ennek eléréséhez előzetesen kiválasztottam egy korábban is alkalmazott, *B. cinerea* esetében mintázatot adó primert (OPE20), melyet másik három (OPE1, OPE19, P5) véletlenszerűen választott primer mellett kipróbáltam. Ehhez három morfológiailag különböző *B. cinerea* törzs genom DNS-ét amplifikáltam a primerek segítségével. Ahogyan a 16. ábrán is látható, változatos mintázatot kaptam mind a négy primer esetében, így alkalmasnak bizonyultak további mérések kivitelezéséhez.



16. ábra: RAPD primerek alkalmasságának vizsgálata *B. cinerea* törzsek (BC 35/1/S1, BC 62/4, BC I/1/1) esetében

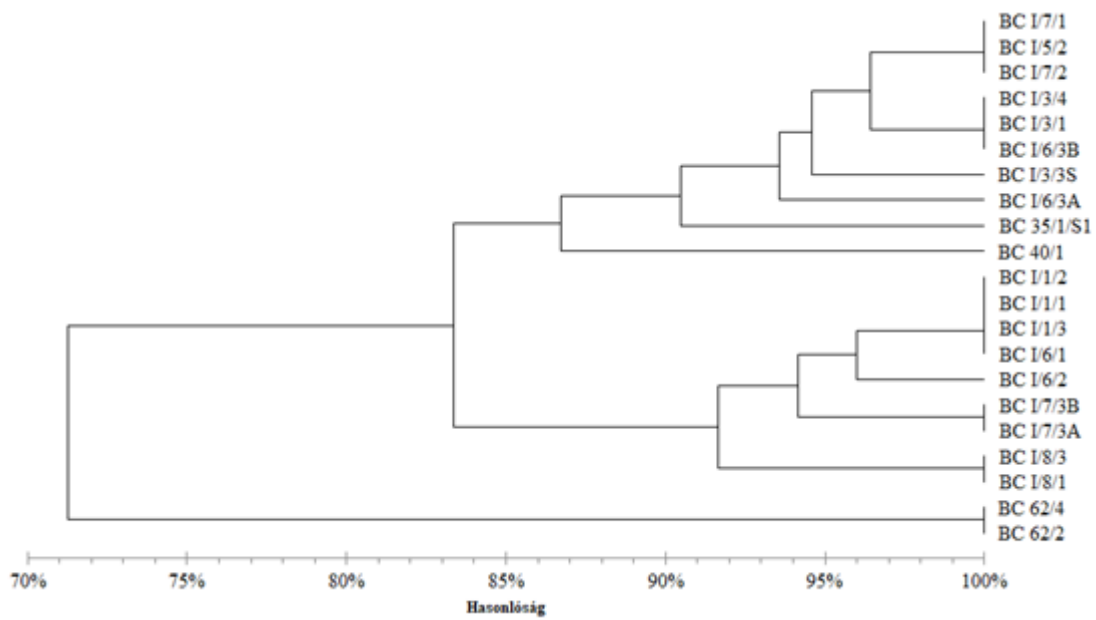
A reakció és a mintázat reprodukálhatóvá tétele érdekében a DNS mintákat egységesen 100 ng/μl koncentrációra hígítottam, majd primerenként mind a 28 törzssel amplifikáltam a szekvenciákat. OPE1 és OPE19 primerek használata mellett azt tapasztaltam, hogy az optimalizálás előtt tapasztalt eltérő mintázatot nem sikerült reprodukálni, csak minimális különbségeket lehetett megfigyelni. A hígítás előtti magasabb DNS-koncentráció esetén a RAPD nem reprodukálható amplifikációt eredményezhetett. Az OPE20 (17. ábra) és P5 primerekkel 21 törzs esetében változatos, reprodukálható mintázatot kaptam, azonban hét

törzsnél a PCR reakció különböző (magnövelt) koncentrációjú DNS minta esetén sem eredményezett amplikont. Így a klaszteranalízist csak 21 törzsen tudtam elvégezni.



17. ábra: OPE20 primer által létrehozott változatos mintázat

A RAPD mintázatok alapján Jaccard-féle hasonlósági együtthatók kiszámításán alapuló hierarchikus, agglomeratív klaszteranalízissel dendrogramot készítettem (18. ábra). A törzsek többsége (19 törzs) 83%-os hasonlóság mellett két fő klaszterbe sorolható, míg a BC 62/2 és BC 62/4 azonosítójú (2021-es évjáratú) törzsek külcsoportot alkotva 71%-ban mutatnak hasonlóságot a többi törzsszel (2020 és 2022 évjárat). 95%-os hasonlóságnál a törzsek 9 klaszterbe sorolhatóak, ahol a BC 35/1/S1 és a BC 40/1 2020-ból származó törzsek egyedi mintázatot adtak, és az I. klaszterbe tartozó törzsekkel mutatnak nagyobb hasonlóságot. A klaszteranalízis eredményét összevetve az izolátumok származási helyével nem tudtam kimutatni egyértelmű korrelációt a klaszterek, illetve dűlök és szőlőfajták között.



18. ábra: *B. cinerea* törzsek RAPD analízisének dendrogramja

Egyed Gyula - Szakdo

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Dolgozatomban a Tokaji borvidékről származó különböző évjáratú aszúbor készítésre használt furmint, hárslevelű, sárga muskotály, kövérszőlő, zengő és zéta aszú szőlőfajtákról származó élesztő- és fonalas gombák izolálását, morfológiai és molekuláris biológiai analízisét tűztem ki célul.

Vizsgálataimba 11 élesztő, illetve 45 fonalas gomba törzset, összesen 56 izolátumot vontam be. Az élesztőgomba törzseket YEPD és WL Nutrient tápágarokon tenyésztve telep- és sejt morfológiájuk alapján három csoportba soroltam. Az első csoportba tartozó törzsekre citrom alakú, bilaterálisan sarjadzó sejtek voltak jellemzőek, a másodikat kerek, éretten nagy méretű olajcseppszerű képletet tartalmazó sejtekből álló telepek alkották, míg a harmadik csoportba egyetlen törzs tartozott, mely ovális/körte alakú sejtekkel volt jellemezhető. Az NL1-NL4 primerpárral amplifikált élesztő törzseket *HaeIII* enzimmel végzett ARDRA analízisük alapján három csoportba soroltam, ezek teljes átfedést mutattak a morfológiai vizsgálatok során kialakított csoportokkal. A csoportokból kiválasztott egy-egy törzs rDNS amplikonját szekvenáltattam. A D1-D2 doménre kapott szekvenciaadatok alapján fajszenen a három élesztőgomba törzset *Hanseniaspora uvarum* (I. csoport), *Metschnikowia pulcherrima* (II. csoport), *Starmerella bacillaris* (III. csoport) tudtam azonosítani.

A fonalásgombák tenyésztését MEA tápágaron végeztem. Mivel az aszúbogyón fellelhető mikrobióta közül a *B. cinerea* kiemelt szereppel bír a nemesrothadás jelenségének köszönhetően, ezen törzseket alaposabb vizsgálatnak vettem alá. A fiatal telepek fehér színűek voltak, majd főként a szürke különböző árnyalatait mutatták. A micéliumok a 28 törzs közel felénél kompakt szerkezetet alakítottak ki, az esetek másik felében laza, hálózatos rendezettséget mutattak. Szkleróciumpépzésükre is változatos formák, illetve elhelyezkedés volt jellemző. A *B. cinerea* törzsek mellett számos egyéb morfológiai sajátossággal rendelkező fonalás gomba is található az izolátumok között, melyek az *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, illetve *Rhizopus* nemzetségek tipikus jegyeit mutatták.

A molekuláris vizsgálatok első lépéseként a törzsekből nukleinsav izolálásra volt szükség. Élesztőgombáknál ezt fenol-kloroformos módszerrel végeztem, de mivel fonalás gombáknál nem kaptam kellő koncentrációjú és tisztaságú extraktumot, ezért a fenol-kloroformos módszer mellett két további nukleinsav izolálási módszert vizsgáltam, melyek közül az üveggyöngyök használatával optimalizált nátrium-acetátos módszer bizonyult leghatékonyabbnak, így ezzel a módszerrel folytattam a többi törzs esetében a nukleinsav kivonását.

Fonals gombák esetében, azokat ITS1-ITS4 primerekkel amplifikálva mind *HaeIII*, mind *MspI* enzimekkel változatos fragmenteket kaptam. Két *Alternaria* nemzetségbe tartozó törzs, két feltehetőleg *Rhizopus* nemzetségbe tartozó törzs és 26 *B. cinerea* törzs mutatott azonos mintázatot egymással.

A morfológiai és molekuláris vizsgálati módszerek során tapasztaltak alapján csoportonként kiválasztottam néhány eltérő törzset szekvenciára. Hét fonals gomba törzs a *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Penicillium glabrum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Acremonium sclerotigenum*, illetve a *Rhizopus arrhizus* fajokat képviselte. Több törzsnél a szekvenciaadatok több fajra is hasonló megbízhatóságú eredménnyel szolgáltak, így kellő bizonyossággal csak nemzetség szintű azonosítást tettek lehetővé (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* és *Fusarium* nemzetségek).

A *B. cinerea* törzsek fajon belüli változatosságát négy RAPD primmerrel vizsgáltam, ezek közül az OPE20 és P4 primerek esetében nagymértékű változatos mintázatot, míg OPE1 és OPE19 esetében csak finom eltéréseket tapasztaltam a törzsek között. A vizsgált 21 törzsből 19 törzs 83%-os hasonlóság mellett két fő klaszterbe csoportosultak. 95%-os hasonlóságnál a törzsek 9 klaszterbe sorolhatóak. Nem találtam korrelációt a klaszterek és az izolátumok származása között.

Mint eredményeimből látható, a szőlőbogyók változatos élesztő- és fonals gomba diverzitással rendelkeznek, melyek hatással lehetnek a borok minőségére. További kutatásokat javaslok a Tokaj-hegyvidéki szőlők mikrobiotájának lehetőleg minél több évjáratot és szőlőfajtát érintő nagyszámú izolátum bevonásával történő feltérképezésére (elsődlegesen különböző *Botrytis cinerea* törzsek tekintetében), arra a kérdésre keresve a választ, hogy mennyire befolyásolja mikrobióta, ezen belül az egyes *B. cinerea* törzsek genetikai diverzitása a nemesrothadt bogyókból készülő borok minőségét.

7. IRODALMI HIVATKOZÁS

- Backhouse, D., Willetts, H.J., 1984. A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Can J Microbiol* 30, 171–178. <https://doi.org/10.1139/m84-027>
- Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., Mas, A., 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Syst Appl Microbiol* 25, 287–293. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00097>
- Briceño, E.X., Latorre, B.A., 2008. Characterization of *Cladosporium* Rot in Grapevines, a Problem of Growing Importance in Chile. *Plant Dis* 92, 1635–1642. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-12-1635>
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Heras-Vázquez, F.J. Las, Rodríguez-Vico, F., 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol* 21, 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00063-7)
- Collado, I.G., Viaud, M., 2016. Secondary Metabolism in *Botrytis cinerea*: Combining Genomic and Metabolomic Approaches, in: *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, Cham, pp. 291–313. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_15
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13, 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dentinger, B.T.M., Didukh, M.Y., Moncalvo, J.-M., 2011. Comparing COI and ITS as DNA Barcode Markers for Mushrooms and Allies (Agaricomycotina). *PLoS One* 6, e25081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025081>
- Diaz, D.E. (Duarte E.), 2005. Colonization of grape berries by the genus *Fusarium* and toxigenity of the most common representatives 349.
- Dömötör T., Hoppál M., Barna G., 1990. Népszokás, néphit, népi vallásosság. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Faretra, F., Antonacci, E., Pollastro, S., 1988. Sexual Behaviour and Mating System of *Botryotinia fuckeliana*, Teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Microbiology (N Y)* 134, 2543–2550. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-9-2543>
- Fávaro, L.C. de L., Araújo, W.L. de, Azevedo, J.L. de, Paccola-Meirelles, L.D., 2005. The biology and potential for genetic research of transposable elements in filamentous fungi. *Genet Mol Biol* 28, 804–813. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000500024>
- Fekete É., Fekete E., Irinyi L., Karaffa L., Árnayasi M., Asadollahi M., Sándor E., 2012. Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary. *Microbiol Res* 167, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.10.006>
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A., 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2

- domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 1351–1371. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1351>
- Garfinkel, A.R., 2021. The History of *Botrytis* Taxonomy, the Rise of Phylogenetics, and Implications for Species Recognition. *Phytopathology* 111, 437–454. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-20-0211-IA>
- Gherbawy, Y., Voigt, K., 2010. Molecular Identification of Fungi. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-05042-8>
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Brygoo, Y., 1998. The Minisatellite MSB1, in the Fungus *Botrytis cinerea*, Probably Mutates by Slippage. *Mol Biol Evol* 15, 1524–1531. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025880>
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuglio, K., Brygoo, Y., 1999. Two Sibling Species of the *Botrytis cinerea* Complex, *transposa* and *vacuina*, Are Found in Sympatry on Numerous Host Plants. *Phytopathology* 89, 967–973. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.10.967>
- González, C., Brito, N., Sharon, A., 2016. Infection Process and Fungal Virulence Factors, in: *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, Cham, pp. 229–246. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_12
- Groves, J.W., Loveland, C.A., 1953. The Connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. Taylor & Francis, Ltd. 45, 412–425.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Higgins, D., Taylor, W., 2000. Bioinformatics: Sequence, structure, and databanks. Oxford University Press, New York.
- Internet 1. Tokaj Wine Region Historic Cultural Landscape <https://whc.unesco.org/en/list/1063/>
- Internet 2. A TOKAJ oltalom alatt álló eredetmegjelölés termékleírása [https://boraszat.kormany.hu/download/0/a2/b1000/TOKAJ_ver820korr%20\(aug5\)%20%C3%BAjram%C3%B3d.pdf](https://boraszat.kormany.hu/download/0/a2/b1000/TOKAJ_ver820korr%20(aug5)%20%C3%BAjram%C3%B3d.pdf)
- Internet 3. GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., Faoro, F., 2004. Benzothiadiazole Enhances Resveratrol and Anthocyanin Biosynthesis in Grapevine, Meanwhile Improving Resistance to *Botrytis cinerea*. *J Agric Food Chem* 52, 4406–4413. <https://doi.org/10.1021/jf049487b>
- Isenegger, D., Ades, P.K., Ford, R., 2008. Status of the *Botrytis cinerea* species complex and microsatellite analysis of transposon types in South Asia and Australia. *Fungal Divers* 29, 17–26.
- Johnston, P.R., Hoksbergen, K., Park, D., Beever, R.E., 2014. Genetic diversity of *Botrytis* in New Zealand vineyards and the significance of its seasonal and regional variation. *Plant Pathol* 63, 888–898. <https://doi.org/10.1111/ppa.12143>

- Klich, M.A., 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Köviics G., 2015. Let's talk about "One fungus One name". Changes in the fungal taxonomy. *Acta Agraria Debreceniensis* 11–14. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/66/1883>
- Kress, W.J., Erickson, D.L., 2012. DNA Barcodes. Humana Press, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6>
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 331–371. <https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>
- Lang, B.F., Laforest, M.-J., Burger, G., 2007. Mitochondrial introns: a critical view. *Trends in Genetics* 23, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.01.006>
- Larone, H.D., Walsh, J.T., Hayden, R.T., 2018. Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification, 6th ed. ASM Press, Washington.
- Levinson, G., Gutman, A., 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol.* <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040442>
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., Pedersen, J., 2000. Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol* 38, 471–471. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.1.471-471.2000>
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L., 1997. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* 10, 369–400. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.3.369>
- Magyar I., 2011. Botrytized Wines. Academic Press, Burlington, pp. 147–206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384927-4.00006-3>
- Martinez, F., Dubos, B., Fermaud, M., 2005. The Role of Saprotrophy and Virulence in the Population Dynamics of *Botrytis cinerea* in Vineyards. *Phytopathology* 95, 692–700. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0692>
- Mažeika, K., Šiliauskas, L., Skridlaitė, G., Matelis, A., Garjonytė, R., Paškevičius, A., Melvydas, V., 2021. Features of iron accumulation at high concentration in pulcherrimin-producing *Metschnikowia* yeast biomass. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 26, 299–311. <https://doi.org/10.1007/s00775-021-01853-z>
- Mészáros G., Nagymarosy A., Rohály G., 2017. Borkollégium bortankönyv 1. BorMatura Kft., Budapest.
- Molnár F., Nagymarosy A., Jeleň, S., Bačo, P., 2010. Minerals and wines : Tokaj Mts., Hungary and Slanské vrchy Mts., Slovakia . *Acta mineralogica-petrographica*.
- Osama, E.A., Mohamed, A.M., Abdel Rahim, M.A.E.S., Shaban, R.M.S., 2011. Non liquid nitrogen-based-method for isolation of DNA from filamentous fungi. *Afr J Biotechnol* 10, 14337–14341. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1401>
- Prakitchaiwattana, C., Fleet, G., Heard, G., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res* 4, 865–877. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.05.004>

- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., Larroche, C., 2006. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technol Biotechnol* 44.
- Ramsbottom, J., 1957. P. A. Micheli and His Nova Plantarum Genera. Bulletin du Jardin botanique de l'État a Bruxelles 27, 773. <https://doi.org/10.2307/3666906>
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 149–164. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0798-3>
- Ribereau-Gayon, J., Riberau-Gayon, P., Seguin, G., 1980. *Botrytis cinerea* in enology. Academic Press 251–274.
- Robinson, J., Harding, J., Vouillamoz, J., 2013. Wine Grapes. Penguin UK, London.
- Salma, A., 2021. Characterization and molecular identification of *Botrytis cinerea* isolates originated from botrytised grape berries. Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Budapest.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P.W., Miller, A.N., Wingfield, M.J., Aime, M.C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R.W., Begerow, D., Bergeron, M.-J., Blackwell, M., Boekhout, T., Bogale, M., Boonyuen, N., Burgaz, A.R., Buyck, B., Cai, L., Cai, Q. et al., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Sipiczki M., 2006. Metschnikowia Strains Isolated from Botrytized Grapes Antagonize Fungal and Bacterial Growth by Iron Depletion. *Appl Environ Microbiol* 72, 6716–6724. <https://doi.org/10.1128/AEM.01275-06>
- Tančinová, D., Mašková, Z., Rybárik, E., Felšöciová, S., Cíсарová, M., 2016. Colonization of grapes berries by *Alternaria* sp. and their ability to produce mycotoxins. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* 10, 7–13. <https://doi.org/10.5219/553>
- Tanovic, B., Hrustic, J., Mihajlovic, M., Grahovac, M., Delibasic, G., 2014. *Botrytis cinerea* in raspberry in Serbia I: Morphological and molecular characterization. *Pesticidi i fitomedicina* 29, 237–247. <https://doi.org/10.2298/PIF1404237T>
- Wang, Q., Wang, S., Xiong, C.L., James, T.Y., Zhang, X.G., 2017. Mating-type genes of the anamorphic fungus *Ulocladium botrytis* affect both asexual sporulation and sexual reproduction. *Sci Rep* 7, 7932. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08471-3>
- Wilcox, W.F., Gubler, W.D., Uyemoto, J.K., 2017. Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests, 2nd ed. The American Phytopathological Society, St. Paul.
- Witte, R., Witte, J., 2011. Statistics, 11th ed.
- Yanagida, F., Ichinose, F., Shinohara, T., Goto, S., 1992. Distribution of wild yeasts in the white grape varieties at Central Japan. *J Gen Appl Microbiol* 38, 501–504. <https://doi.org/10.2323/jgam.38.501>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Kutatómunkám és szakdolgozatom zárásaként szeretném megragadni az alkalmat, hogy köszönetet mondjak témavezetőimnek Dr. Pomázi Andreának és Dr. Kovács Mónikának, hogy lehetőséget biztosítottak az Élelmiszer-mikrobiológia, -higiénia és -biztonság Tanszéken folyó kutatásukban aktívan részt venni. Hálával tartozom a szakdolgozatom készítése során nyújtott megingathatatlan támogatásukért, útmutatásukért és türelmükért. Tudásuk, tapasztalatuk és a részletekre való odafigyelésük nagyban hozzájárult ahhoz, hogy mélyebben megérthessem kutatási témámat.

Szeretnék köszönetet mondani a Tanszék összes munkatársának, hogy bármilyen kérdéssel/kéréssel fordultam hozzájuk, mindig rendelkezésre álltak. Az „Objektív minősítési rendszer kidolgozása a tokaji borkülönlegességek megkülönböztetőségére” című, 2020-1.1.2-PIACI-KFI-2020-00040 számú projekt keretein belül a tanszék által biztosított erőforrások, támogatások és lehetőségek kritikus szerepet játszottak a dolgozat elkészítésében.

Köszönet illeti Mészáros Lászlót és Balassa Istvánt, hogy szőlőbirtokaikon fogadtak és lehetővé tették a kutatásomhoz nélkülözhetetlen mintagyűjtést.

NYILATKOZAT

szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Egyed Gyula
A Hallgató Neptun kódja: CZUBZJ
A dolgozat címe: Különböző évjáratú aszúbogyók mikrobiótájának felmérése és jellemzése
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék neve: Élelmiszer-mikrobiológia,-higiénia és -biztonság Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

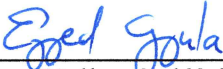
Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: Budapest, 2023. április 26.


Hallgató aláírása

KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Egyed Gyula (Neptun azonosító: CZUBZJ) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

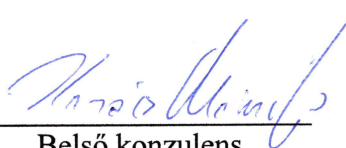
A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem²

Kelt: Budapest, 2023. április 26.



Belső konzulens
Dr. Pomázi Andrea



Belső konzulens
Dr. Kovács Mónika

¹ A megfelelő aláhúzendó.

² A megfelelő aláhúzendó.