



**Borászati élesztőtörzsek identifikálása és molekuláris biológiai  
elemzése**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Csoma Hajnalka

Debreceni Egyetem  
Természettudományi Doktori Tanács  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
Debrecen, 2008.



Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács, Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, A bioreguláció molekuláris és fiziológiai szerveződése és biotechnológiai vonatkozásai programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (Ph.D) fokozatának elényerése céljából.

Debrecen, 2008. április 10.

Csoma Hajnalka  
doktorjelölt

Tanúsítom, hogy Csoma Hajnalka doktorjelölt 2003-2006 között a fent megnevezett Doktori Iskola, A bioreguláció molekuláris és fiziológiai szerveződése és biotechnológiai vonatkozásai, programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2008. április 10.

Dr. Sipiczki Mátyás  
témavezető

## Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b>	<b>6</b>
<b>2. Célkitűzés</b>	<b>8</b>
<b>3. Irodalmi áttekintés</b>	<b>9</b>
3.1. A <i>Botrytis cinerea</i> által okozott nemesrothadás	9
3.2. A szőlő élesztőbiótája	11
3.3. Szőlészeti és borászati vonatkozású <i>Candida</i> fajok	14
3.4. Borászati élesztőgombák identifikálására használt módszerek	17
3.5. A Szarvas, Király és Bakonyi dűlők jellemzése	20
<b>4. Anyagok és módszerek</b>	<b>22</b>
4.1. Táptalajok	22
4.2. Reagensek és oldatok	23
4.3. Felhasznált törzsek	26
4.4. Módszerek	31
4.4.1. Szőlőszemek gyűjtése	31
4.4.2. A szőlőszemek feltárása	32
4.4.3. Mintavétel borokból	33
4.4.4. Az élesztőtelepek izolálása	33
4.4.5. Konvencionális fajmeghatározási módszerek	33
4.4.6. Molekuláris taxonómiai vizsgálatok	36
4.4.7. Az élesztőtörzsek fiziológiai vizsgálatai	40
<b>5. Eredmények</b>	<b>42</b>
5.1. Mintagyűjtés	42
5.2. Az élesztőgombák izolálása szőlőről	43
5.3. Az izolátumok csoportosítása konvencionális taxonómiai módszerekkel	44
5.3.1. Telep-, és sejtmorfológiai vizsgálatok	48
5.3.2. Spórázás	51

5.4. Szőlőről izolált élesztőgombák molekuláris taxonómiai vizsgálatai	53
5.4.1. PCR-RFLP eredmények	53
5.4.2. Szekvenciaelemzés eredményei	57
5.5. A szőlőről izolált élesztőgombák előfordulása	60
5.6. A <i>Candida</i> élesztőgombák taxonómiai vizsgálata	64
5.6.1. Molekuláris taxonómiai vizsgálatok	64
5.6.2. Morfológiai vizsgálatok	70
5.6.3. Növekedési és asszimilációs tesztek	72
5.6.4. Fermentációs képesség vizsgálata	72
5.7. Fiziológiai vizsgálatok eredményei	77
5.7.1. Kénhidrogén-termelés, valamint savtermelés vizsgálata	77
5.7.2. Alkoholtolerancia vizsgálata	80
5.7.3. Cukortolerancia	84
<b>6. Eredmények megbeszélése</b>	<b>88</b>
<b>7. Összefoglalás</b>	<b>105</b>
<b>8. Summary</b>	<b>109</b>
<b>9. Köszönetnyilvánítás</b>	<b>113</b>
<b>10. Irodalomjegyzék</b>	<b>114</b>
<b>11. A doktori munka során megjelent publikációk</b>	<b>130</b>
<b>12. Mellékletek</b>	<b>133</b>

## 1. BEVEZETÉS

Tokaj-hegyalján a borkultúra több száz éves múltra tekint vissza. A borvidék hírnevét a kiváló minőségű aszúboroknak köszönheti. Ezen borok minőségét a táj adottságai, a szőlő fajtája, az elkészítés módja, egyedülálló ízvilága és nem utolsósorban az erjedésükben résztvevő mikroorganizmusok biztosítják.

A bor alkoholos erjedése szinte kizárólag élesztőgombáknak köszönhető. Ezek az egysejtű eukarióta szervezetek nagy hatékonysággal képesek a glükózt és a fruktózt etanollá alakítani, magas cukor- és alkoholkoncentráció jelenlétében is.

A bor minősége szempontjából alapvető fontosságú, hogy milyen élesztőfajok, és milyen arányban fordulnak elő a mustban az erjedés folyamán. Vannak olyan fajok, melyek anyagszere folyamatai során keletkezett anyagok kifejezetten kedvezőtlenek, de a kedvező hatású fajok között is vannak olyanok, melyek bizonyos törzsei nem egyforma mértékben előnyösek.

A hagyományos erjesztési folyamatok során a természetes élesztőpopuláció végzi az alkoholos erjesztést. Ennek összetétele nagyon sok tényezőtől függ, így a bor megfelelő minősége érdekében igen nagy odafigyelést igényel.

A biotechnológia rohamos fejlődésének és a borászatban való egyre nagyobb térhódításának köszönhetően, mind nagyobb hangsúlyt fektetnek az erjedésben résztvevő élesztőgombák megismerésére, szelektálására és még hatékonyabb törzsek kifejlesztésére. A modern borászati technológiákban igyekeznek az esetleges hibákat minőségi élesztőkészítmények hozzáadásával kiküszöbölni. A beoltáshoz használt terméket „starter kultúrának” nevezzük. Ez szárított élesztősejtek és hordozóanyagok keveréke. Az ilyen „fajélesztőket” a természetes populációból izolált törzsek alkotják, melyek megfelelnek a velük szemben támasztott általános és hagyományos elvárásoknak. Felhasználásukkal irányíthatóvá és ellenőrizhetővé válik az erjedés. Minden borvidék és bortermő hely rendelkezik a maga saját élesztőpopulációjával, mely az évszázadok során

adaptálódott a helyi sajátságokhoz, így jótékony, esetleg negatív hatásait itt tudja leginkább kifejteni.

A mustok erjesztésében részt vevő mikroorganizmusok elsődlegesen a szőlőről származnak. Meglétük, illetve populációdinamikai változásuk nagymértékben függ az ültetvény geográfiai, illetve klimatikus adottságaitól, valamint a szőlő művelésmódjától. A szőlő érése során bekövetkező biokémiai változások, és az egyéb, jelenlévő patogén gombafajok szintén hatást gyakorolnak az élesztőbióta összetételére. A legmarkánsabb hatást a *Botrytis cinerea* gyakorolja, mely speciális feltételek mellett a szőlők nemes rothadásáért felelős fakultatív parazita penészgomba.

Az aszúsodott szőlők és borok mikrobiotájáról számos közlemény született már (pl. Domerque, 1957; Minarik, 1963; Le Roux és mtsi., 1973; Magyar, 1996; Kalmár és mtsi., 1999; Mills és mtsi., 2002; Antunovics és mtsi., 2003), de munkánk kezdetéig kevés volt azoknak a száma, melyek a Tokaji borvidék szőlőinek élesztőbiotájával foglalkoznak (Bene és Magyar, 2002).

## 2. CÉLKITŰZÉS

A kísérleti munka célja, hogy tanulmányozzuk a Tokaji borvidéken az aszúsodás folyamata során, a szőlőbogyó felszínén lévő élesztőbiótát, és megállapítsuk a benne előforduló élesztők taxonómiai hovatartozását, meghatározzuk a domináns fajokat.

Vizsgálataink során az izolátumok között gyakran előfordult a *Candida zemplinina*, egy közelmúltban leírt faj. Ezzel szemben soha sem találtunk *Candia stellata*-t. Az utóbbi hiánya meglepő volt, mert korábbi hazai és külföldi adatok szerint gyakori botrytizált szőlőn és botrytizált, erjedő mustokban. Az ellentmondásból arra következtettünk, hogy a szakirodalomban *C. stellata* néven jellemzett törzsek esetleg a *C. zemplinina*-hoz tartoznak. A kérdés eldöntésének érdekében ennek a két fajnak kiemelt figyelmet szenteltünk, és újraidentifikáltuk a hazai és nemzetközi gyűjteményekben megtalálható *C. stellata* törzseket, illetve a szőlőszemekon kívül, tokaji borokból is izoláltunk *C. stellata*-nak tűnő törzseket. Ezek részletes taxonómiai és élettani vizsgálata is munkánk egyik célja volt.

Munkánk távlati célja, hogy minél átfogóbb képet kapjunk ezen borvidék természetes élesztőpopulációjáról, hogy a későbbiekben más borvidékekkel összehasonlítva az esetleges sajátságokra, egyediségekre rávilágíthassunk.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A *Botrytis cinerea* által okozott nemesrothadás

A *Botrytis cinerea* fakultatív parazita penészgomba. Mivel kifejezetten a termést, azaz a szőlőfürtöt károsítja, a borminőségre gyakorolt hatása az egyéb kórokozókéhoz képest kiemelkedő. Többnyire súlyos kártevő (szürkerothadás, „grey rot”), de speciális körülmények esetén szerepe kedvező is lehet (nemesrothadás, „noble rot”).

A világ néhány területén (pl. Sauternes-Barsac, Coteaux du Layon, Tokaj, Burgerland, Rajna, Mosel egyes területei) adódnak össze olyan feltételek, melyek lehetővé teszik a *B. cinerea* által okozott nemesrothadás kifejlődését az érett szőlőn. Ilyen feltétel a talaj, mely anyagánál fogva jól elvezeti a vizet, a szőlőfürt szerkezete, mely lehetőleg laza legyen, hogy minél nagyobb felületen érje a napsugárzás, és megfelelő legyen a szellőzése, valamint a terület mikroklímája (Ribéreau-Gayon és mtsi., 2000). Az alapvető feltételek mellett fontos szerepe van a szőlőfajtának is. Az aszúsodásnak a túl vékony, sérülékeny bogyóhéj és a tömött fürt nem kedvez, mert a folyamat könnyen szürkerothadásba torkollik.

A fertőzés folyamata az egészséges szőlőtől a nemesen rothadt szőlőig a környezeti feltételektől függően kb. 5-15 napig tart. Ebben az időszakban váltakozva követik egymást rövid, nedves periódusok (3-4 nap), és hosszabb, szárazabb periódusok (kb. 10 nap). Az előző a spórák csírázásának kedvez, az utóbbi lehetővé teszi a szőlő anyagainak koncentrációját és kémiai átalakulását. Ha a vegetatív szövetek felületét víz éri, és a hőmérséklet elérte a 18 °C-ot a rezisztens forma csírázásnak indul, és micéliumokat hoz létre. Amikor a micéliumok teljesen behatolnak a sejtfalba, a fehér szőlőszemek jellegzetes „csokoládé” színárnyalatot kapnak (Ribéreau-Gayon és mtsi., 2000; Donéche, 1993). A micélium hífái átszakítják a szőlőszem felszínét, konidiofórákat hoznak létre, és tovább fertőzik a szomszéd szemeket (Donéche, 1993). A vegetatív szövetek sejtfalai erősen módosulnak, nem képesek többé ellátni feladatukat. A

sejtek vízellátása tovább nem szabályozható, az epidermisz sejtek citoplazmája megszűnik, ennek köszönhetően a cukor koncentrációjuk jelentőssé válik. A magas ozmózisnyomás miatt a gomba nem tud tovább fennmaradni, fejlődése leáll. Minőségi nemesrothadás akkor megy végbe, ha a folyamat gyors és a szőlő érett (Ribéreau-Gayon és mtsi., 2000).

A *B. cinerea* jelentős kémiai változásokat okoz az egész szőlőben (Puchen-Planté és Mercier, 1983). A szürkerothadáshoz képest a nemesrothadásnál nagy különbséget jelent, hogy az érett szőlőben kialakult a fajtának megfelelő cukor- és savtartalom. A túlérés során a fűrtekocsány elfásodásával megszűnik az anyagáramlás a tőke és a bogyó között, így az elpárolgott víz nem tud pótlódni. Ennek eredményeként a bogyó oldott anyagainak nagymértékű bekoncentrációja megy végbe. Ezek a változások főleg a cukrokat és a szerves savakat érintik. A glükóz és a fruktóz asszimilációja a környezeti viszonyoktól és az érettség mértékétől függ. Mivel a *Botrytis* előnyben részesíti a glükózt a fruktózzal szemben, a glükóz: fruktóz arány 1 alá csökken. A gomba a poliszacharidok és pektinanyagok lebontásával jelentősen megnöveli a borokban az egyéb hexózok (ramnóz, galaktóz, mannóz), a pentózok (arabinóz, xilóz), valamint a galakturonsav mennyiségét is (Kerényi, 1977; Sponholz és Dittrich, 1985). A savak lebomlása nagyobb mértékű: a borkósav 70-90 %-a, az almasav 50-70 %-a degradálódik (Ribéreau-Gayon és mtsi., 2000). A pH-ja magasabb (3.5-4.0), jelezvén más összetevők koncentrációját is, mint pl. a kálium ionokét (Pineau, 1978; Fregoni és mtsi., 1986). Ezek ellenére az ezekből a szőlőkből származó must cukortartalma igen magas, savtartalma pedig közel azonos az egészséges szőlőből származó mustéval. A gomba a szőlőszem belsejében a glükózt glükonsavvá oxidálja, miközben glicerol szabadul fel. Mivel ezeket az egészséges szőlő mustja csak nyomokban tartalmazza, mindkét vegyület a nemesrothadás minőségi indexét képezi (Ribéreau-Gayon és mtsi., 2000; Eperjesi és mtsi., 1998).

Az aroma anyagok szintén nagymértékben módosulnak a fertőzés során (Shimizu és mtsi., 1982). A nemesrothadáson átesett szőlő legfőbb értékét a megnövekedett cukortartalom mellett a jellegzetes botrytiszos illat- és zamatanyagok képezik. Közülük jelentős szerepet játszanak a furfurool, a benzaldehid, a fenilacetaldehid és a benzilcianid, valamint az ún. gomba alkohol (1-okten-3-ol) (Eperjesi és mtsi., 1998). A *B. cinerea* által termelt szotolon (3-hidroxi-4,5-dimetil-2 (5H) furanon) egyike a legfontosabb összetevőknek, amely a jellegzetes „aszús” aromát adja (Ribéreau-Gayon és mtsi., 2000).

### 3.2. A szőlő élesztőbiótája

A borkészítés során előforduló élesztők különböző forrásokból származhatnak. Ilyenek a szőlő felszínéről származó élesztők, a borkészítéshez használt eszközökről, berendezésekről eredő élesztők, melyek valószínűleg a szőlőről kerültek oda korábban, valamint a starter kultúraként felhasznált élesztőkészítmények törzsei. Ezen utóbbi élesztők a *Saccharomyces cerevisiae*, és a *S. bayanus* borászati élesztőfaj képviselői és azok fiziológiai változatai.

A szőlőbogyókon előforduló élesztők típusát és számát számos tényező határozza meg. Ezek lehetnek a szőlő fajtája, földrajzi fekvése, az éghajlat, a szőlő érettségi foka, fizikai sérülésének foka, valamint az agrokemikáliák alkalmazásának mértéke (pl. Combina és mtsi, 2005; Raspor és mtsi., 2006). A szőlőültetvényen az élesztők származhatnak a talajból, a levegőből, a szél által szállított porból, a környező növényzetről, az esőből, valamint a szőlőnövény leveléről (Fleet és mtsi., 2002).

Az élesztők közül olyan fajok fordulhatnak elő a talajban, mint amilyen például a *Cryptococcus albidus*, *Cr. tereus*, *Cr. curvatus* és a *Metschnikowia pulcherrima*, valamint *Sporobolomyces* és *Candida* fajok. A fermentatív élesztők, mint a *S. cerevisiae* hiányoznak, vagy nagyon kis populációban fordulnak elő ebben a közegben (Fleet és mtsi., 2002).

Az élesztőknek csupán kis populációit tudták azonosítani a levegőből. Közülük a legszignifikánsabbak a *Sporobolomyces* fajok (Gregory, 1973), de *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Cryptococcus* és *Rhodotorula* fajokat is izoláltak már szőlőültetvényeken, és más mezőgazdasági területeken gyűjtött levegőmintákból (Ingram és Lüthi, 1961; Benda, 1964; Adams, 1964; Davenport, 1974).

Egyes kutatók úgy gondolják, hogy szoros összefüggés van a szőlő befertőzése és a rovarok között. Számos rovar - beleértve a méheket, darazsakat, legyeket, muslicákat - látogatja a szőlőnövényt. Ezek testéről és emésztőrendszeréből különböző élesztőket izoláltak, mint például *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Saccharomyces* és *Pichia* törzseket (Phaff és Starmer, 1987; Benda, 1982).

Az elmúlt 100 évben számos kutató leírta azokat az élesztőfajokat, amelyek kifejezetten a szőlőbogyóhoz köthetőek. Azonban ezen leírások jó része minőségi meghatározást nyújt, arra nem adnak választ, miért éppen azon fajok a dominánsak, és milyen hatások befolyásolják azok előfordulását.

A szőlő érését megelőző állapotban nem izolálható sok élesztőtörzs. A teljes populáció mérete alapvetően kevesebb, mint  $10^3$  cfu/g. A nem-fermentáló fajok közül a *Rhodotorula* (*Rh. glutinis*, *Rh. mucilaginososa*, *Rh. rubra*), *Cryptococcus* (*Cr. albidus*, *Cr. laurentii*, *Cr. magnus*, *Cr. orientalis*) és a *Candida* (*C. diffluens*, *C. famata*, *C. pulcherrima*) fajok a dominánsak. Jóllehet *Sporobolomyces* (*Sp. roseus*), *Sporidiobolus*, *Rhodosporidium* és *Aureobasidium* fajokat is találtak, sőt néhány esetben *Kloeckera apiculata/Hanseniaspora uvarum*-ot és *M. viticola/C. kofuensis*-t is (Fleet és mtsi., 2002; Prakitchaiwattana és mtsi., 2004; Péter és mtsi., 2005).

Ahogy a szőlő halad előre az érési folyamatban, az élesztők egyre gyakoribbak lesznek, a számuk  $10^4$ - $10^6$  cfu/g-ra növekszik. Az éretlen állapotra jellemző fajok nagy része ekkor is izolálható, de a *K. apiculata* és teleomorf változata a *H. uvarum* tekinthető dominánsnak, a teljes populáció 70%-át is

elérhetik (Fleet és mtsi., 2002). Az érett szőlő domináns fajai közé tartozik még a *M. pulcherrima* (Fleet és mtsi., 2002). Raspor és mtsi (2006) érett szőlőről izoláltak *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, valamint *Debaryomyces* fajokat is.

A túlérett bogyó héja elveszti sértetlenségét, és így a belső szövetekben található tápanyagok hozzáférhetővé válnak a mikroorganizmusok számára. Ennek köszönhetően az élesztőpopuláció száma meghaladja a  $10^6$  cfu/g értéket (Fleet és mtsi., 2002). Hasonlóan magas számot érnek el az ecetsavbaktériumok, tejsavbaktériumok és fonalas gombák.

A szőlő gombás fertőzöttsége jelentősen módosítja az élesztőbiótát (pl. Gandini, 1973). Különböző rothadási folyamatok indulnak be, melyek során megnő a *C. stellata*, *C. krusei*, *M. pulcherrima* fajok populációja, ugyanakkor csökken az oxidatív anyagcseréjű, alacsony alkoholtoleranciájú fajok száma, mint a *Rhodotorula*, a *Sporidiobolus* és a *Cryptococcus*. Az aszúsodott szőlőn a fermentatív, cukortűrő fajok, mint a *Saccharomyces*, *Torulaspota* és *Zygosaccharomyces* szintén dominánsak a *C. stellata* mellett, a *Kloeckera* populáció itt visszaszorul (Domerque, 1957; Magyar, 1996; Bene és Magyar., 2002, 2004; Fleet és mtsi., 2002; Magyar és Bene, 2006). Esetenként *C. stellata* és *S. bayanus* alkotják a mikrobióta 80 %-át (Sipiczki, 2001). Ezek a fajok jól alkalmazkodnak az alacsony őszi hőmérsékletre és az aszúsodás során bekövetkezett cukorkoncentráció növekedéséhez (Sipiczki, 2001).

Egészséges és botrytiszos szőlőről egyaránt izoláltak *Issatchenkia terricola* és *H. opuntiae* élesztőket is (Nisiotou és Nychas, 2007). Az aerob élesztőszerű fonalas gomba, vagy más néven „fekete élesztő” az *Aureobasidium pullulans* szintén izolálható egészséges és rothadt, valamint éretlen és érett szőlőszemekről (Prakitchaiwattana és mtsi., 2004; Raspor és mtsi., 2006).

Régebben a *S. cerevisiae* különböző változatait is a szőlőbogyó domináns élesztői közé sorolták, de a kutatók nagyobb része nem ért egyet ezzel az állítással az utóbbi évtizedekben elvégzett vizsgálatok alapján. A jelenlegi

módszerekkel vagy nem izolálhatók, vagy csak jelentéktelen számban, mely nem haladja meg az 50 sejt/g értéket, de ennél lényegesen alacsonyabb is lehet (Eperjesi és mtsi., 1998; Fleet és mtsi., 2002). A lehetséges izolátumok száma növekedhet a szőlő érésének előrehaladtával (Török és mtsi., 1996; Fleet és mtsi., 2002). Az érett, egészséges szőlőszemek erjedése során kisebb számban mutathatók ki, mint a túlérlett, sejtfalstruktúrájukat veszített szőlőszemek fermentációja esetén. Bizonyos tanulmányok arra hívják fel a figyelmet, hogy az éghajlati tényezők, mint az esőzés, hőmérséklet és a mezőgazdaságban használatos vegyszerek befolyásolhatják az előfordulásukat és a túlélési esélyeiket (Martini és mtsi., 1996; Fleet és mtsi., 2002). Mortimer és Polsinelli (1999) szerint a különböző adatokat az eredményezi, hogy az egyes szőlőszemekben található élesztők számára eltérő ökológiai feltételek adóttak a szőlőfürtökön belüli helyüktől függően. Eredményeik alapján a *S. cerevisiae* törzsek előfordulása a szőlőszemen 1 az 1000-hez. A legújabb kutatások alapján tehát elmondható, hogy a borélesztők előfordulása az ültetvényen belül ritka, ugyanakkor a borászati üzemek, pincészetek felületeiről, berendezéseiről nagy gyakorisággal izolálhatók *Saccharomyces* törzsek, amelyek a pincészet állandó, szelekciós hatásokra lassan módosuló, specifikus élesztőbiótáját képezik. A mustok spontán erjedését valószínűleg ez a helyi populáció végzi (Martini, 1993; Martini és mtsi., 1996).

### 3. 3. Szőlészeti és borászati vonatkozású *Candida* fajok

Az elmúlt években számos borászati mikroorganizmusokkal foglalkozó kutatócsoport vizsgálta a szőlőn és a borokban előforduló *Candida* élesztőfajokat. A kutatások rámutattak arra, hogy a Tokaji borvidéken olyan gyakori *C. stellata*-n kívül más *Candida* fajok is előfordulhatnak, ilyen például a *C. zemplinina* (Sipiczki, 2003).

Több, *C. stellata* élesztőtörzs fiziológiai és borászati tulajdonságait vizsgáló cikk egymásnak ellentmondó eredményt közölt. Ezek alapján e faj vagy igen

heterogén törzseket foglal magába, vagy összetévesztették a hasonló fiziológiai tulajdonságokkal rendelkező rokonfajokkal. A konvencionális taxonómiai tesztek, valamint az ITS régió PCR-RFLP analízisének rutinszerű alkalmazása nem teszik lehetővé a pontos taxonómiai hely meghatározását. Így például a *C. stellata* borászati tulajdonságainak vizsgálatához leggyakrabban felhasznált törzs a DBVPG 3827 a legújabb eredmények alapján egy másik, közelrokon faj a *Starmerella bombicola* törzse (Sipiczki és Csoma, 2005).

A *Candida* nemzetség az ismeretlen ivaros szaporodású, imperfekt élesztőgombák legnagyobb, és leginkább heterogén, rokonsági kapcsolatokat többé-kevésbé nélkülöző mesterséges nemzetsége.

A *Candida* fajnév hallatán általában mindenkinek a humán patogén fajok jutnak eszébe. Az opportunistá *Candida* fajok immunszuppresszív, daganatos betegeknél okoznak nyálkahártya és szisztémás fertőzéseket. Az infekciók gyakorisága, tekintettel a *Candida* megbetegedésekre, számos járványtani tanulmány készítésére ösztönözte a kutatókat (pl. Clemons és mtsi., 1997; Sullivan és mtsi., 1996). A *C. albicans* jelentős humán patogén gomba, ami számos szervrendszerben okozhat súlyos problémákat.

De a *Candida*-knak élelmiszeripari vonatkozásai is vannak. Számos faj előfordul különböző italokban és élelmiszerekben. Szőlőről, és borból eddig 21 fajt izoláltak. Szőlőről izolálták a *C. apicola*, *C. intermedi*, *C. sorbosivorans*, *C. bombicola*, *C. kofuensis*, *C. stellata*, *C. zemplanina*, *C. catenulata*, *C. paludigena*, *C. cantarelli* fajokat (Rosini és mtsi., 1982; Barnett és mtsi., 1990; Eperjesi és mtsi., 1998; Bene és Magyar, 2002, 2004; Nisiotou és Nychas, 2007). Mustból a *C. apicola*, a *C. cantarelli*, a *C. diversa*, a *C. incommunis*, a *C. vinaria*, a *C. veronae*, *C. zemplanina* és a *C. stellata* fajokat mutatták ki (Fleet és mtsi., 1984; Barnett és társai, 1990; Mills és mtsi., 2002; Sipiczki, 2003; Clemente-Jimenez és mtsi., 2004). Borban a *C. boidinii*, a *C. sake*, a *C. stellata*, a *C. sorboxylosa*, *C. valida*, a *C. vini*, a *C. zemplanina*, *C. mesenterica*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides*, *C.*

*diversa* és *C. intermedia* fajokat figyelték meg (pl. Barnett és mtsi., 1990; Eperjesi és mtsi., 1998; Sipiczki, 2003).

A *C. stellata* egyes borvidékeken a szürkerothadásos, ill. aszúsodott szőlő, valamint az ezekből készült borkülönlegességek mikrobiótájában gyakori, esetleg domináns lehet (pl. Le Roux és mtsi., 1973; Rosini és mtsi., 1982; Antunovics és mtsi., 2003; Magyar és Bene, 2006). Ennek a fajnak eredetileg két típusát izolálták Németországban, túlérett szőlőből készült mustból („Troockenbeerenauslese”) (Lodder és Kreger-van Rij, 1952; Kreger-van Rij, 1984). Az egyik típust *S. bacillaris*-nak nevezték, jóllehet ivaros szaporodásra utaló spórákat nem figyeltek meg nála. A másik a *S. stellatus* nevet kapta, mivel folyékony tápközegben csillagszerű sejtláncolatot alkotott. Ettől függetlenül Olaszországban szőlőről izoláltak egy harmadik típust is, ez volt a *Brettanomyces italicus*. Ezt a három típust egyesítették végül a *C. stellata* név alatt.

A tanszéken vizsgált, *C. stellata*-nak vélt izolátumok fiziológiai vizsgálatai során bizonyos törzsek cukor- (50%, 60% glükóz) és hidegtűrése (10°C) kiemelkedő volt. Ezen törzsek rRNS-ének 26S és 5.8S-ITS régiójának nukleotid szekvencia elemzése alapján új fajt írtak le *C. zemplinina*-ként (CBS9494<sup>T</sup>) (Sipiczki, 2003). A *C. stellata* típus-törzs (CBS 157<sup>T</sup>) sejtjei kerek, kevésbé cukortűrők, alkoholtűrők és hidegtűrők, mint az ovális sejtekkel rendelkező *C. zemplinina* (CBS 9494<sup>T</sup>) (Sipiczki, 2003, 2004).

A botrytizált szőlőszemeket a Tokaj borvidéken gyakran napokig, hetekig tárolják a borászati üzemek területén. Tanulmányok azt igazolják, hogy a *C. stellata*, *C. zemplinina* élesztőtörzsek a tárolása során válnak dominánssá, nem feltétlenül a szőlőültetvényeken (Bene és Magyar, 2004; Magyar és Bene, 2006).

A *C. stellata/zemplinina* a spontán erjedés korai fázisában jelenlévő élesztőbióta jellemző tagja, az alkoholos erjedés során tovább képes túlélni, mint a legtöbb nem-*Saccharomyces* élesztőfaj (Mínarik és mtsi., 1978; Sipiczki 2001; Antunovics és mtsi., 2003). A bor aroma-összetételére gyakorolt hatása nem pontosan tisztázott. Számos publikáció született erről, melyek úgy találták, hogy

jelenléte feltehetőleg összefügg a bor komplexebb és jobb aroma tartalmával. Specifikus aromakomponenseket (Soden és mtsi., 2000), nagy mennyiségű glicerint (Ciani és mtsi., 2000; Soden és mtsi., 2000), borostyánkősavat (Ciani és Maccarelli, 1998), ecetsavat, acetaldehidet és észtereket termel (Shimizu és Watanabe, 1981; Romano és mtsi., 1997). Más szerzők ezzel ellentétben úgy találták, hogy kevés glicerint (Clemente-Jimenez és mtsi., 2004), illetve kevés ecetsavat (Povhe és Raspor, 2005) állítanak elő.

Azonban ezen törzsek legtöbbje nem botrytizált borokból származott és időközben más fajokba lettek átsorolva, mint például a DBVPG 3827 *C. stellata* törzs, mely a *St. bombicola* fajba tartozik (Sipiczki és mtsi., 2005). Nehéz elkülöníteni, hogy melyik adat, melyik *Candida* faj törzseihez tartozik.

Multistarter készítményekben *S. cerevisiae*-vel együtt egymás erjedésre gyakorolt hatását pozitívan egészítik ki. A glükóz és a fruktóz fogyasztásban kiegészítik egymást, a *S. cerevisiae* hasznosítja a *C. stellata* által termelt többlet acetoint és acetaldehidet, ami hozzájárul a végső bor glicerintartalmának növekedéséhez (Ferraro és mtsi., 2000). Mivel azonban növekedési rátája jelentősen alacsonyabb, mint a *S. cerevisiae*-nek a rátája (Sipiczki, 2004), és sejtjei érzékenyek az etanolra (Constanti és mtsi., 1998), az alkoholtoleránsabb *Saccharomyces* törzsek általában túlnövik.

#### **3.4. Borászati élesztőgombák identifikálására használt módszerek**

Az előzőekből jól látszik, hogy számtalan élesztőfaj fordul elő a szőlőn és a must erjedése során. Ezen fajok identifikálására számos módszert dolgoztak ki. A taxonómusok először a morfológiai és fiziológiai tulajdonságaik alapján különítették el a fajokat egymástól. Ezeknek a tulajdonságoknak a köre bővült és manapság több összefoglaló munka áll rendelkezésre, melyek tartalmazzák az élesztők meghatározására szolgáló teszteket, ilyenek például Barnett és munkatársai (1990), valamint Kreger-van Rij (1984) által kiadott könyvek, de internetes adatbázis is segítheti a munkánkat ([www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl)). Vizsgálataink

során a konvencionális meghatározási tesztek ezen szakirodalmi adatok felhasználásával végeztük.

Kidolgozottságuk ellenére, ezen módszerek sok esetben félrevezető eredményekre vezethetnek. A fiziológiai tulajdonságok fajon belül, törzsenként változók lehetnek. Ezen kívül a tesztek idő- és munkaigényesek, gyakran 60-90 paraméter vizsgálatát jelentik, ami kiértékeléséhez 1-3 hét szükséges. Az elmúlt évtizedben, hogy javítsanak a konvencionális tesztek hatékonyságán, gyors kitéket fejlesztettek ki az élesztők meghatározására. Ezeket eredetileg a klinikai diagnosztikában alkalmazták, körülbelül 40-60, gyógyászati szempontból lényeges élesztőgomba faj meghatározására (Deák, 1993).

A molekuláris biológia fejlődésével új technikák jöttek létre, melyek a DNS, RNS, vagy a fehérjék hasonlóságai, vagy eltérései alapján identifikálták a fajokat. Ezen módszerek közé tartoznak az alloenzim mintázatok vizsgálata (Naumov és mtsi., 1997), DNS-DNS hibridizáció (pl. Vaughan Martini és Martini, 1985, 1987; Török és mtsi., 1993), elektroforetikus karíotipizálás (pl. Török és mtsi., 1993; Guillamon és mtsi., 1996; Sipiczki és mtsi., 2001; Antunovics és mtsi., 2005), valamint a random amplifikált DNS polimorfizmus (RAPD) vizsgálata mikroszatellitokkal, vagy azok nélkül (pl. Baleiras Couto és mtsi., 1996; Cadez és mtsi., 2002; Caruso és mtsi., 2002; Walczak és mtsi., 2007). Ilyen módszer még a kromozómális DNS, vagy a mitokondriális DNS megsokszorozása polimeráz láncreakcióval (PCR) és ennek hasítása restriktációs endonukleázokkal (RFLP), valamint a PCR termék denaturált grádiens gél elektroforézisének (PCR-DGGE) vizsgálata (Cocolin és mtsi., 2000; Mills és mtsi., 2002; Prakitchaiwattana és mtsi., 2004.).

A PCR technikán alapuló módszerek a legmegfelelőbbek a gyors és pontos élesztőfaj, illetve törzs meghatározáshoz. Kutatók kedvelt objektuma az RNS-t kódoló DNS (rDNS), mellyel a nagyon változatosan jelen lévő élesztők és gombák faji szinten való elkülönítésére is lehetőség nyílt (pl.: Baleiras és mtsi., 1995; Johnson és mtsi., 1994; O'Donnel és Gray, 1995; Williams és mtsi., 1995).

A megközelítés alapja a rDNS konzervatív mivolta: az egyazon fajhoz tartozó egyedek ugyanazzal, vagy nagyon hasonló szekvenciával rendelkeznek, míg a filogenetikai távolság mértékével az rDNS szekvencia-beli különbség nő.

A rRNS-t kódoló kromoszómális régió ITS1-5.8S rRNS-ITS2 (internal transcribed spacer) szakaszának polimeráz láncreakciója az egyik alkalmazott módszer (pl. Valente és mtsi., 1996; Guillamon és mtsi., 1998; Montrocher és mtsi., 1998; Esteve-Zarzoso és mtsi., 1999; Sipiczki, 2003, 2004). Ebben a régióban helyezkedik el az 5,8S rRNS-t kódoló konzerválódott gén, valamint a közrefogó nem-kódoló, variábilis transzkripció hézagok az ITS1 és az ITS2, melyek nagy interspecifikus méretbeli variabilitást, de kis intraspecifikus polimorfizmust mutatnak (pl. Granchi és mtsi., 1999). Ha különböző borélesztőket kell meghatároznunk, ezen analízis révén kapott PCR termékek a fajra specifikus méretet mutatnak (pl. Guillamon és mtsi., 1998; Esteve- Zarzoso és mtsi., 1999).

Más, sejtmagban található (*MET2*) (pl. Masneuf és mtsi., 1996; Nguyen és mtsi., 2000; Antunovics és mtsi., 2005; Le Jeune és mtsi., 2007) és mitokondriális (*ATP8*, *ATP9*, *SSU*, *COX2*) gének és régiók, mint az NTS2 PCR-RFLP analízise alkalmas a *Saccharomyces sensu stricto* csoportba tartozó fajok elkülönítésére (Groth és mtsi., 1999; González és mtsi., 2006).

Ha az amplifikátumokat restriktív endonukleázokkal is emésztjük, alaposabb módszerhez jutunk, amit PCR-RFLP-nek nevezünk (pl. Guillamon és mtsi., 1994; Oda és mtsi., 1997; McCulloch és mtsi., 1998; Granchi és mtsi., 1999; Fernandez-Espinar és mtsi., 2000; Clemente-Jimenez és mtsi., 2003; Nisiotou és mtsi., 2007). Az egyes enzimek a különböző eredetű PCR-termékeket különbözőképp vágják, amennyiben azok nukleotid sorrendje eltérő. Ennek köszönhetően, változó hosszúságú fragmenteket kapunk az egyes fajok esetében. Az ITS régió azonban fajon belül is lehet variábilis és előfordul az ellenkezője is, hogy az általánosan használt restriktív endonukleázok nem mutatnak ki különbséget eltérő fajok között sem.

Az egyértelműbb meghatározások érdekében a szakirodalom mind elterjedtebben támaszkodik a riboszóma nagy alegységében található 26S rRNS D1/D2 doménjét kódoló kromoszómális szakasz szekvencia elemzésére. A 26S rRNS evolúciós értelemben nagyon konzervált. Kurtzman és Robnett (1997) vizsgálatai szerint, ezen régió 1%-ot meghaladó szekvenciakülönbsége alapján a vizsgálandó törzsek már külön fajba sorolhatóak. Az aszkomicétesz élesztőfajok legtöbbszörénél, mint 'molekuláris ujjlenyomat'-ról beszélhetünk róla. Ennek megfelelően felhasználható a *Candida* fajok filogenetikai kapcsolatainak meghatározására is (pl. Rosa és Lachance, 1998; James és mtsi., 2001; Sipiczki, 2003; Sipiczki és mtsi., 2005; Csoma és Sipiczki, 2008).

Ugyanígy alkalmas a bazidiomicétesz élesztőgombák fajsztípus elkülönítésére (pl. Fell és mtsi., 2000; Sampaio és mtsi., 2001; Takashima és mtsi., 2003).

### **3.5. A Szarvas, Király és Bakonyi dűlők jellemzése (Müller István, állomásvezető, személyes közlése alapján)**

2002-2004 között a Tokaj borvidék három ismert szőlőültetvényén, a Szarvas, Király és Bakonyi dűlőkben, gyűjtöttünk szőlőszemeket, amiknek a későbbiekben megvizsgáltuk az élesztőbiótáját.

A Tarcfal határában fekvő Szarvas dűlő a történelem során kincstári birtokként szerepelt. 1950 végén a megalakult Szőlészeti és Borászati Kutató Intézet kezelésébe került át. Az államosítást követően bővült a terület, ebből a szőlőterület közel 50 ha lett. 1982-2004 között a Tokaj Kereskedőház látta el a kezelői teendőket. 2005-től a földterület tulajdonosa a Magyar Állam Nemzeti Földalapja. Az ültetvény tulajdonosa és kezelője a FVM Szőlészeti és Borászati Kutató Intézete, Kecskemét. Talajtípusát tekintve lösz talajképző kőzeten kialakult barna erdőtalaj. Déli kitétséggű a terület, lejtési szöge kisebb, mint 15%. A mintázási területen lévő ültetvényt 1985-ben telepítették újra, 3,5 x 1,0 m térállást alakítottak ki. Művelésmódját tekintve magas kordon. A vizsgált fajta a

Furmint volt, mely a borvidéken telepítésre engedélyezett egyik fajta. Tökéje erős, termőképessége kiváló, későn érlik, belőle magas cukor- és savtartalmú bor készíthető. Az egyik legjobban aszúsodó fajta Hegyalján.

A mádi szőlőterületekhez tartozó Királydűlő a II. világháború utáni államosítás révén került a Tarcali Állami Gazdaság kezelésébe, és 2005 óta az FVM Szőlészeti és Borászati Kutató Intézete, Kecskemét kezeli. Talajtípusát tekintve nyirok talajképző kőzeten kialakult barna erdőtalaj. Dél-délkeleti kiettségű a terület, lejtési szöge kisebb, mint 5%. 2,0 x1,0 m térállású, közép magas kordon művelésű, Furmint szőlő fajtájú ültetvényt alakítottak ki.

A Bakonyi dűlő a Kincstári Birtokhoz tartozó pince és uradalmi kastélyhoz tartozó terület, amely a megalakulás óta a tarcali Kutató Állomás központja. A szőlőterület jelenleg 1,86 ha. Löss alapkőzeten közép magas kordonművelés mellett természetesen szőlőt dél-délnyugati fekvésű területen. Az itt mintázott szőlőfajta Zéta volt.

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. Táptalajok

A kísérletek során felhasznált táptalajok összetételét a **1. táblázat** tartalmazza (Kreger-van Rij, 1984).

**1. táblázat:** A kísérletek során felhasznált táptalajok összetétele

Komplett táptalajok	Minimál táptalajok
<u>YEPL</u> pH: 5.0 1,0 g élesztőkivonat (Scharlau 07-079) 1,0 g pepton (Spektrum-3D M7155) 2,0 g glükóz (Spektrum-3D 3.07052)	<u>SML</u> 0,5 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Spektrum-3D 5.040400) 0,1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7,4 mM) (Spektrum-3D 3.11047) 0,05 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Spektrum-3D 5.390085) 1,0 g glükóz 100 µl Wickerham vitamin-oldat
<u>YEPA</u> pH: 5.0 100 ml YEPL 2,0 g por agar	<u>SMA</u> 100 ml SML 2,0 g por agar
Spóráztató táptalajok	
<u>acetát agar</u> 1,0 g K-acetát (Spektrum-3D 3.11036) 0,1 g élesztőkivonat 0,05 g glükóz 2,0 g por agar	<u>YM</u> pH: 5.5 0,3 g maláta kivonat (Sigma M0383) 0,3 g élesztőkivonat 0,5 g pepton 1,0 g glükóz 2,0 g por agar
<u>5% glükóz-maláta agar</u> pH: 5.4 3,0 g maláta kivonat 0,5 g pepton 5,0 g glükóz 1,5 g por agar	<u>burgonya-dextróz agar</u> pH: 5.6 39 g burgonya-dextróz agar (Spektrum-3D M.1483.0500)

**1. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

5% Glükóz-0,5% CaCO <sub>3</sub> agar	1%-os ecetsavat tartalmazó táptalaj
pH: 5.0 0,5 g élesztőkivonat 5,0 g glükóz 0,5 g CaCO <sub>3</sub> 2,0 g por agar	10 g glükóz 1,0 g tripton (Scharlau M7119) 1,0 g élesztőkivonat 2,0 g por agar 1ml jégecet (Spektrum-3D 5.010342)
Nickerson Agar (Biggy)	
pH: 6.8 1000 ml desztillált vízben 44 g Nickerson agar (Scharlau M1137)	

**4.2. Reagensek és oldatok**

A kísérletek során felhasznált reagensek és oldatok összetételét az **2. táblázat** tartalmazza (Sambrook és mtsi., 1989.; Barnett és mtsi., 1990; Kreger-van Rij, 1984).

**2. táblázat:** A kísérletek során alkalmazott reagensek és oldatok összetétele

<u>1×TE</u> 100 ml desztillált vízben, pH: 8 1 ml 1 M Trisma Base (Sigma T 6066) 2 ml 0,5 M EDTA (Sigma E 5134)	<u>1×TBE</u> 990 ml millipore vízben, pH: 8 10 ml 10×TBE
<u>10×TBE</u> 1000 ml millipore vízben, pH: 8 109,0 g Trisma Base (Sigma T 6066) 55,6 g Bórsav (BioRad 161-0751) 40,0 ml 0,5 M EDTA	<u>0,65 M-os KCl oldat</u> 1000 ml millipore vízben, pH: 8 48,45 g KCl (Spektrum-3D 56750)
<u>5 M-os K-acetát oldat</u> 1000 ml millipore vízben, pH: 8 490,7 g K-acetát (Spektrum-3D 3.11036)	<u>3 M-os Na-acetát oldat</u> 1000 ml millipore vízben, pH: 8 246 g Na-acetát (Sigma S-7899)

**2. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

<u>10%-os SDS</u> 100 ml desztillált vízben 10 g Na-dodecil-szulfát (Sigma L-5750)	<u>3 M-os Na-acetát oldat</u> 1000 ml millipore vízben, pH: 8 246 g Na-acetát (Sigma S-7899)
<u>Lízis puffer</u> 100 ml desztillált vízben 10 mM Tris (BioRad 161-0719) pH:8 0,45 M EDTA (Sigma E 5134) pH:8 1% SDS (Sigma L 5750)	<u>0,5 M EDTA</u> 1000 ml desztillált vízben 23 g NaOH (Spektrum-3D 3.14054) 186,1 g EDTA (Sigma E 5134)
<u>T1 oldat</u> 100 ml desztillált vízben 1M szorbit (Spektrum-3D 3.19106) 0,1 M EDTA. (Sigma E 5134) pH:8	<u>T2 oldat</u> 100 ml desztillált vízben 50 mM Tris/HCl pH:7,5 20 mM EDTA (Sigma E 5134) pH:8
<u>CPE</u> 100 ml desztillált vízben 40 mM citromsav (Spektrum-3D 3.03125) 120 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM EDTA	<u>CPES</u> 100 ml desztillált vízben 40 mM citromsav 120 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Spektrum-3D 3.14038) 20 mM EDTA 1,2 M szorbit
<u>0,1 %-os Cikloheximid</u> 100ml desztillált vízben 0,1 g cikloheximid (Sigma C-7698) 2,5 ml acetone (Spektrum-3D 3.01037) 6,7 g Difco-N-base (Difco™ 239210) 10 g glükóz	<u>Gél-festő puffer</u> 100 ml desztillált vízben 0,25 g brómfenol-kék (Spektrum- 3D 5.070125) 0,25 g Xilén cianol FF (Sigma X- 2751) 0 g szacharóz (Sigma S-0389)

**2. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

Wickerham vitamin-oldat

1000 ml desztillált vízben

0,2 mg folsav

0,2 mg biotin (Reanal 02097)

40 mg Ca-pantotenát (Reanal 11014)

200 mg inozitol

40 mg niacin

20 mg p-amino-benzoésav

40 mg piridoxin.HCl (Reanal 16040)

40 mg aneurin.HCl /tiamin/ (Sigma T-44562)

20 mg riboflavin

### 4.3. Kísérletek során felhasznált élesztőtörzsek

#### 3. a. táblázat: A vizsgálatok során felhasznált saját izolátumok

Tanszéki gyűjteményben	Törzs megnevezése	Származás
11-81	4a.4.16.	2003, szőlő
11-82	4a.4.42.	2003, szőlő
11-83	5a.2.35.	2003, szőlő
11-84	5a.4.16.	2003, szőlő
11-85	6a.4.1.	2003, szőlő
11-88	T1.3.29.	2003, szőlő
11-89	T1.3.46.	2003, szőlő
11-90	12.2.39.	2002, szőlő
11-91	12.2.46.	2002, szőlő
11-92	12.2.52.	2002, szőlő
11-93	12.2.57.	2002, szőlő
11-94	12.3.84.	2002, szőlő
11-95	12.5.12.	2002, szőlő
11-96	13.5.1.	2002, szőlő
11-97	14.1.15.	2002, szőlő
11-98	15.2.23.	2002, szőlő
11-99	15.3.65.	2002, szőlő
11-100	16.3.1.	2002, szőlő
11-101	16.4.20.	2002, szőlő
11-102	17.3.1.	2004, szőlő
11-103	2.1.59.	2002, szőlő
11-104	2.3.75.	2002, szőlő
11-105	7.2.31.	2003, szőlő
11-106	10.2.42.	2003, szőlő

**3. a. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

<b>Tanszéki gyűjteményben</b>	<b>Törzs megnevezése</b>	<b>Megjegyzés</b>
11-107	10.5.11.	2003, szülő
11-108	6b.1.3.	2003, szülő
11-109	6b.4.46.	2003, szülő
11-110	2.1.55.	2002, szülő
11-111	15.2.2.	2002, szülő
11-112	3.2.31.	2002, szülő
11-113	3.2.32.	2002, szülő
11-114	4.1.37.	2002, szülő
11-115	6.2.11.	2002, szülő
11-116	6.3.60.	2002, szülő
11-117	T1.2.30.	2003, szülő
11-118	4.3.34.	2003, szülő
11-119	4.3.35.	2003, szülő
11-120	4.3.56.	2003, szülő
11-121	4.3.57.	2003, szülő
11-122	5.1.32.	2003, szülő
11-123	5.1.33.	2003, szülő
11-124	T2.3.1.	2003, szülő
11-125	T2.3.3.	2003, szülő
11-126	10.5.12.	2003, szülő
11-127	5.3.51.	2003, szülő
11-128	5.3.52.	2003, szülő
11-129	17.1.1.	2004, szülő
11-130	17.1.8.	2004, szülő
11-131	18.5.1.	2004, szülő
11-132	30.1.1.	2004, szülő

**3. a. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

<b>Tanszéki gyűjteményben</b>	<b>Törzs megnevezése</b>	<b>Származás</b>
11-133	30.1.34.	2004, szőlő
11-134	31.4.46.	2004, szőlő
11-135	25.1.1.	2004, szőlő
11-136	25.1.46.	2004, szőlő
11-137	25.4.55.	2004, szőlő
11-138	26.1.35.	2004, szőlő
11-139	26.1.53.	2004, szőlő
11-140	26.3.37.	2004, szőlő
11-141	27.2.36.	2004, szőlő
11-142	III.ME1	Tokaji Esszencia
11-143	IV.ME4	Tokaji Esszencia
11-144	I.VM4	Tokaji Esszencia
11-145	I.OE16	Tokaji Esszencia
11-146	II.OE17	Tokaji Esszencia
11-147	III.OE26	Tokaji Esszencia
11-148	I.DE1	Tokaji Esszencia
11-149	I.SE1	Tokaji Esszencia
11-150	II.SE12	Tokaji Esszencia
11-151	I.LA3	Tokaji Esszencia
11-152	II.LA6	Tokaji Esszencia
11-153	III.LA45	Tokaji Esszencia
	2.3.24.	2002, szőlő
	11.1.28.	2002, szőlő
	7.3.10.	2003, szőlő
	4a.3.11.	2003, szőlő
	23.3.3.	2004, szőlő
	31.4.32.	2004, szőlő

**3. b. táblázat:** A vizsgálatok során felhasznált egyéb gyűjteményi törzsek

Tanszéki gyűjteményben	Eredeti gyűjteményben	Törzs megnevezése	Származás
10-619	ABT 804	<i>C. stellata</i>	Balzsamecet (L. Solieri), Olaszország ©
10-620	C3	<i>C. stellata</i>	Olaszország (P. Romano)
10-623	C2	<i>C. stellata</i>	Olaszország (P. Romano)
10-624		<i>C. stellata</i>	Szőlőről (F. Rodríguez-Vico), Spanyolo.
11-1	CECT 11969	<i>C. stellata</i>	Szőlőről, Spanyolország
11-3	RIVE 3-16-1	<i>C. stellata</i>	Szőlőről (E. Minarik), Bratis.
11-4	RIVE 3-16-2	<i>C. stellata</i>	Szőlőről (E. Minarik), Bratis.
11-6	CBS 1713	<i>C. stellata</i>	Borból, Olaszország
11-7	CBS 1779	<i>C. stellata</i>	Erjedő teasörből
11-8	CBS 2649	<i>C. stellata</i>	Szőlőmustból, Franciaország
11-9	CBS 2799	<i>C. shehatae</i>	Talajból, Dél-Afrika
11-10	CBS 6100	<i>C. stellata</i>	
11-16	CBS 843	Stasa 222	
11-17	FAW 70	Stasa 198	Szőlőről (P. Hoffmann), Svájc
11-18	FAW 3	Stasa 8	(A. Viv), Svájc
11-19	Rbst 9-00	Stasa 444	Szőlőről (P. Hoffmann), Svájc
11-20	Rst 98/10/7	Stasa 2 14	Szőlőről (P. Hoffmann)
11-27	Y 00687*	<i>C. stellata</i>	
11-28	Y 00714*	<i>C. stellata</i>	
11-29	Y 00688*	<i>C. stellata</i>	
11-30	Y 01025*	<i>C. stellata</i>	Dinnyéről (G. Péter), Magyarország
11-31	KE 402.86.02.19.	<i>C. stellata</i>	
11-32	Y 00713*	<i>C. stellata</i>	
11-60	CBS 4729	<i>C. stellata</i>	Muslicáról, USA
11-61	DBVPG 4171	<i>C. stellata</i>	Szőlőmustból, Olaszország
11-62	DBVPG 3176	<i>C. stellata</i>	Virágról, Olaszország
11-63	DBVPG 6714	<i>C. stellata</i>	CBS 157 <sup>T</sup> , Németo.
11-64	DBVPG 3175	<i>C. stellata</i>	Virágról, Olaszország
11-65	DBVPG 3826	<i>C. stellata</i>	Talajból, Olaszország

**3. b. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

Tanszéki gyűjteményben	Eredeti gyűjteményben	Törzs megnevezése	Származás
11-66	DBVPG 3711	<i>C. stellata</i>	Ruedos Aguilar, Spanyolo.
11-67	DBVPG 4120	<i>C. stellata</i>	Szőlőről, Görögország
11-68	DBVPG 4121	<i>C. stellata</i>	Szőlőmustból, Szlovénia
11-69	DBVPG 4122	<i>C. stellata</i>	Szőlőmustból, Szlovénia
11-70	DBVPG 4124	<i>C. stellata</i>	Szőlőmustból, Szlovénia
11-71	DBVPG 6715	<i>C. stellata</i>	CBS 843 Szőlőről, Németország
11-72	DBVPG 3708	<i>C. stellata</i>	Fumane, Olaszország
11-73	DBVPG 4126	<i>C. stellata</i>	Szőlőmustból, Szlovénia
11-74	DBVPG 3932	<i>C. stellata</i>	Szőlőmustból, Olaszország
11-75	CBS 6101	<i>C. stellata</i>	
11-78	CCY 26-13-1	<i>C. stellata</i>	Szőlőről (E. Minarik), Szlovákia
11-79	CCY 26-13-2	<i>C. stellata</i>	Szőlőről (E. Minarik), Szlovákia
11-80	CCY 26-10-7	<i>C. stellata</i>	Szőlőről (E. Minarik), Szlovákia

**3. c. táblázat:** A vizsgálatok során felhasznált kontrolltörzsek

Törzskönyvi száma	Hivatkozás	Törzs megnevezése	Megjegyzés
10-372 <sup>T</sup>	CBS 9494 <sup>T</sup>	<i>C. zemplinina</i>	Borból (M. Sipiczki) Magyaro.
10-432 <sup>T</sup>	CBS 157 <sup>T</sup>	<i>C. stellata</i>	Szőlőről, Németország
10-514 <sup>NT</sup>	CBS 732 <sup>NT</sup>	<i>Z. rouxii</i>	Sűrített mustból, Olaszország
10-198 <sup>T</sup>	CBS 380 <sup>T</sup>	<i>S. bayanus</i>	Sörből
S288c	YGSC X 4005-11A	<i>S. cerevisiae</i>	
10-541	AE5	<i>Z. bailii</i>	Tokaji Esszenciából (H. Csoma), Tokaj

Jelmagyarázat a **3. táblázathoz:**

YGSC: Yeast Genetic Stock Center, Berkley, USA

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands

\*NCAIM: National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms,  
Budapest

DBVPG: Collezione dei Lieviti Industrial, Dipartimento di Biologia Vegetale,  
Universita di Perugia, Perugia, Italy

Stasa: Collection of University of Applied Sciences Wädenswill, Switzerland

CECT: Coleccion Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Spain

CCY: Culture Collection of Yeasts, Centre of Chemical Research of the Slovak  
Academy of Science, Bratislava

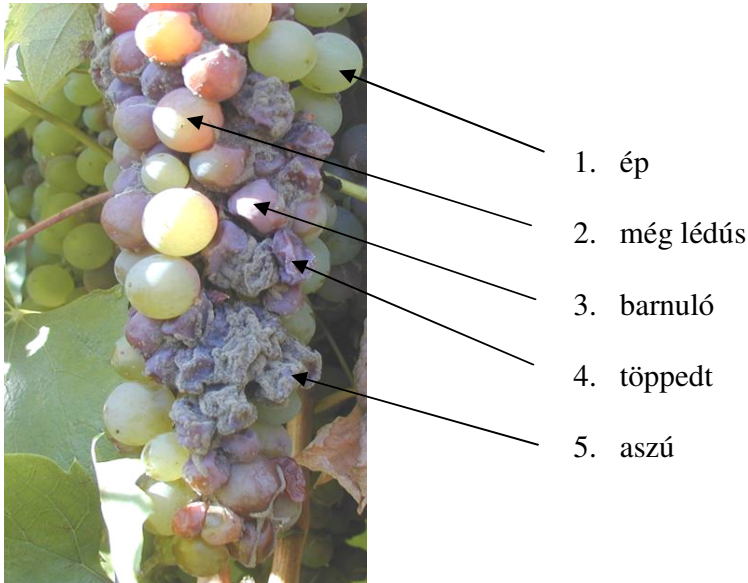
RIVE: Research Institute for Viticulture and Enology, Bratislava

©: Solieri és mtsi., 2006

#### 4.4. Módszerek

##### 4.4.1. Szőlőszemek gyűjtése

A körülményekhez mérten mindhárom színhelyen olyan szőlőfürtöket választottunk ki, amelyek lehetőleg az aszúsodás valamennyi stádiumát mutató szőlőszemeket tartalmazták. Valamennyi fürtöt lefényképeztük, majd mindegyikről kiválasztottunk minden aszúsodási stádiumból egy-egy szemet (**1. ábra**). Ezeket külön-külön kiemeltük steril csipesszel és külön-külön steril lombikba helyeztük. Ezeknek a stádiumoknak megfelelően (1) egészséges, (2) még lédús, de (3) már barnuló, (4) töppedt, valamint (5) töppedt *Botrytis*-növedékkal (micélium konidium-tartókkal) benőtt szőlőszemeket gyűjtöttünk be.



**1. ábra:** 2004-ben, Mádon, a 22. fürtről gyűjtött, az aszúsodás különböző stádiumában lévő szőlőszemek

#### 4.4.2. Szőlőszemek feltárása

A feltárás steril fülke alatt történt. Minden szőlőszemre 5 ml-nyi steril desztillált vizet töltöttünk, majd a szőlőszemeket alaposan szétnyomkodtuk és a kapott masszát vortexeltük. A keletkező szuszpenziókból kis mennyiségeket YEPA agarra szélesztettünk (*A minta*). A maradékból 1 ml-nyit 5 ml folyékony YEPL-be oltottunk, amit 20 órán keresztül szobahőmérsékleten tartottunk, majd abból is mintákat szélesztettünk YEPA agarra (*B minta*). A 20 órás tenyészeteket mikroszkópban is megnéztük. Mind az 'A', mind a 'B' mintákból olyan YEPA agarra is szélesztettünk, amelyhez 2% DMSO-t (dimetil-szulfoxid, Sigma D-8779) adtunk a penészek növekedésének lassítása érdekében. A csészéket ezután 25°C-on inkubáltuk 3-5 napig.

#### **4.4.3. Mintavétel borokból**

A bormintát (5 ml) minden esetben a származás helyén, az adott borászatban, vettük, steril kémcsövet és pipettát használva, hogy elkerüljük az esetleges külső befertőzést. A mintából komplett táptalajra (YEPL) szélesztettünk.

#### **4.4.4. Az élesztőtelepek izolálása**

Mind az élesztő-, mind a penésztelepeket szabad szemmel és szükség esetén kis nagyítású mikroszkóppal is megvizsgáltuk. A telepmorfológia (pl. telepszín, telepfelszín, táptalajba diffundáló színanyagok képzése, konídiumok színe, stb.) alapján típusokba soroltuk a telepeket és meghatároztuk a típusok közötti arányokat. Ezután minden mintából izoláltunk különálló élesztőtelepeket (max. 50 db-ot) komplett táptalajra (YEPA), ügyelve arra, hogy valamennyi típusból kerüljön az izolátumok közé. Ahol 50-nél kevesebb telep nőtt ki, valamennyit izoláltuk. 4 napon át inkubáltuk 25°C-os termosztátban. A későbbiekben ezeket az egy izolátumból álló telepeket használtuk a taxonómiai meghatározáshoz.

#### **4.4.5. Konvencionális fajmeghatározási módszerek**

A vizsgálatok során a szakirodalmakban (Kreger-van Rij, 1984; Barnett és mtsi., 1990; Scorzetti és mtsi., 2000; Kurtzman és Droby, 2001; James és mtsi., 2001; Takashima és mtsi., 2003; Molnár és Prillinger, 2005) és nemzetközi adatbázisokban (<http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>) található faj-meghatározási tesztek és eredményeket hasonlítottuk össze a saját izolátumok eredményeivel.

### Morfológiai vizsgálatok

Az élesztőtelepek, illetve sejtek morfológiáját YEPA táptalajon (**2. táblázat**), 3 napon át 25°C-on növesztett tenyészetek esetében vizsgáltuk. Az élesztő telepeket Olympus Camedia C-2000 Zoom típusú digitális fényképezőgéppel, míg a sejteket Olympus BH-2 mikroszkóppal, valamint ahhoz csatlakoztatott Olympus DP70-es kamerával figyeltük meg, valamint fényképeztük le.

Asszimilációs és növekedési tesztek (Barnett és mtsi., 1990; Kreger-van Rij, 1984)

Az előző pontban izolált valamennyi izolátumot YEPA táptalajra (**2. táblázat**) oltottuk. Három napos 25°C-on történt inkubálás után a növedékeket 13-féle olyan SMA táptalajra replikáztuk, amelyekkel tesztelhetjük a szén- és nitrogénforrás-hasznosítási képességeiket. A táptalajokban ugyanis vagy a *glükózt* cseréltük le valamilyen más szénforrással (*galaktóz, ramnóz, szacharóz, maltóz, mellibióz, cellobióz, raffinóz, mannit, glicerol, citrát*) vagy az  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -t valamilyen más nitrogénforrással (*lizin, nitrit, nitrát*) (Spektrum-3D).

Ezen kívül *vitaminmentes*, és *etanolt* tartalmazó SMA táptalajokat használtunk fel. Replikázás után inkubálás következett 25°C-on. Minden esetben YEPA-ra is replikáztunk, de az inkubálás ebben az esetben 37°C-on történt.

### Spóráztatás

Vizsgálataink során különböző spóráztató táptalajokat használtunk fel, mivel a különböző élesztőtörzsek eltérő körülmények között spórázhatnak megfelelően (Kreger-van Rij, 1984).

Komplett táptalajon (YEPA) lévő négy napos élesztőtelepeket K-acetátos, YM (élesztő-maláta extraktos), valamint 5% glükóz-maláta extraktos (Oxoid) spóráztató táptalajra oltottunk (**2. táblázat**). A csészéket 25°C-os termosztátban inkubáltuk, és 5, 10, 15, 20, 30 nap, valamint két hónap múlva ellenőriztük a

spórázási eredményeket. Kenetet készítettünk, és mikroszkóppal vizsgáltuk a sejteket. A hasonló módon előkészített *Metschnikowia* sp. élesztőtelepeket 1:9 arányban hígított burgonya-dextrózos agarra oltottuk és 10°C, valamint 16°C-on inkubáltuk és hetente ellenőriztük (Péter és mtsi., 2005).

#### Cikloheximid-rezisztencia vizsgálat

5 ml 0,1% cikloheximidet tartalmazó oldatba friss élesztőtenyészetet oltottunk be és 25°C-on 2 hétig inkubáltuk. Folyamatosan vizuálisan nyomon követtük a tenyészetek sejtsűrűségének változását. A kísérlethez kontrolltörzsekként *H. uvarumot* (10-511), ez a törzs rezisztens a 0,1%-os cikloheximid koncentrációra, és *S. cerevisiae* (S288c), valamint *C. stellata* (10-432) törzseket használtunk, mivel ezek a törzsek nem rendelkeznek cikloheximid rezisztenciával (Barnett és mtsi., 1990).

A tenyészetek sejtsűrűségét 0 időpontban, valamint 2 hét elteltével, 600 nm-en spektrofotométerrel szintén megmértük (Beckman DU<sup>®</sup>-50 Spektrophotometer).

#### 1%-os ecetsav-tolerancia vizsgálata

Miután a 10% glükózt, 1% triptont, 1% élesztőkivonatot és 2% agart tartalmazó táptalajt (**1. táblázat**) sterilizáltuk és 45°C-ra lehűlt, 1ml jégecetet adtunk hozzá. Három napos, általunk meghatározni kívánt friss sejtenyészetet oltottunk rá. 25°C-on 6 napig inkubáltuk, majd ellenőriztük, hogy kinőttek-e a telepek.

#### Fermentációs vizsgálatok

A fermentációs teszteket 5-5 ml tápfolyadékban végeztük, Durham csövekkel kiegészítve. A tápfolyadékok alapja YEPL, de a glükózt a vizsgálni kívánt cukorral (*fruktóz, galaktóz, maltóz, szacharóz, melibióz, laktóz, cellobióz, raffinóz, keményítő, xilóz, trehalóz, vagy melizitóz*) helyettesítettük. Fermentáló tenyészetek esetén a Durham csövekbe CO<sub>2</sub> kerül, míg a nem fermentálóknál

nem keletkezik ilyen buborék. A tenyészeteket 25°C, illetve 16°C-on inkubáltuk 2 hétig. A tenyészeteket ellenőriztük 3, majd 14 nap elteltével. A fermentáció mértékét -, valamint +, 2+, 3+, 4+, 5+, 6+ értékekben adtuk meg, attól függően, hogy a Durham csőben mekkora buborék gyűlt össze.

#### **4.4.6. Molekuláris taxonómiai vizsgálatok**

##### Genomiális DNS izolálása élesztőből

A genomiális DNS sejtekből való kivonását Querol és mtsi (1992) leírása alapján végeztük. Egy éjszakás, 25°C-on inkubált 10 ml-nyi sejtenyészet 4000 rpm fordulatszámon, 10 perces centrifugálása (Beckman J2-HS) és mosása után az üledéket 2 mg/ml Zymoliase 20T (ICN)-t tartalmazó 500 µl T1 oldatban oldottuk és 1 órán át 37°C-on tartottuk. 2500 rpm fordulatszámon 10 percig történő centrifugálás (Heraeus Biofuge) után az üledéket 50 µl 10% SDS-t tartalmazó 500 µl T2-ben szuszpendáltuk, és ismét inkubáltuk 30 percig 60°C-on. 200 µl, 5 M K-acetát hozzáadása és azonnali jégre helyezése, valamint 30 perc jégen tartása után 10000 rpm fordulatszámon 15 percig centrifugáltuk 4°C-on (Eppendorf Centrifuge 5804R).

A lecentrifugált folyadék felülúszójához 700 µl 2-propanolt (Spektrum-3D 3.16085) adtunk, majd újra centrifugáltuk 10000 rpm fordulatszámon 15 percig 4°C-on, majd a kapott csapadékot 70%-os etanollal tisztítottuk. Az etanol eltávolítása után a csapadékot 400 µl desztillált vízben oldottuk. 40 µl, 2,5 M Na-acetáttal (Sigma S-7899) és 1000 µl 100% etanollal (Spektrum-3D 3.05032) történő kicsapást követően újra lecentrifugáltuk 10000 rpm fordulatszámon 15 percig 4°C-on. Centrifugálást követő 70%-os etanos mosással fejeztük be a DNS kivonását.

A kapott DNS-t 1xTE-ben oldottuk és RNázal (Sigma R 4875, 10 mg/ml törzsoldatból 1-1 µl) kezeltük (37°C-on fél óráig).

100 ml 1%-os agaróz gélben (hozzáadva 5 µl etidium-bromid 10 mg/ml törzsoldatból; Sigma E8751-5G), 1x TBE pufferben 120 V-on futattuk a 2 µl DNS minta, 10 µl desztillált víz és 2 µl gél-festő puffer elegyét. A futtatás során 1 kb DNS „létrát” (GeneRuler SM 0311) alkalmaztunk.

A gélben felvitt mintákat a BioDoc-It Imaging System UV transzilluminátorával tettük láthatóvá.

### PCR

Primerek:

ITS1-5,8S-ITS2 PCR: ITS1: 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'

ITS4: 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' (White és mtsi, 1990)

26S rRNS D1/D2 PCR: NL1: 5' GCA TAT CAA GCG GAG GAA AAG 3'

NL4: 5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3' (O'Donnell, 1993)

Kísérleteink során a következő reakcióelegyet mértük össze UV-vel sterilizált Eppendorf csőbe:

35,5 µl szűrt (Millipore) desztillált víz

5 µl PCR puffer 10x (Fermentas MBI)

4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas MBI)

2 µl dNTP mix (5 mM dATP, 5 mM dTTP, 5 mM dGTP, 5 mM dCTP)  
(Fermentas MBI)

1-1µl forward és reverse primer (0,5 µM) (IDT, Inc.)

0,3 µl Taq Polymerase enzim (Fermentas MBI) (5 u/ µl)

50 µl ásványi olaj (Sigma M5904)

A reakcióelegyhez 1,5-3 µl (10 pg-1 µg) genomiális DNS-t adtunk.

A reakciót az MJ Research, Inc. PTC-150 MiniCycler típusú készülékével végeztük el, a következő paraméterekkel:

ITS1-5,8S-ITS2 PCR: 94°C 2'; 30x: 95°C 1', 60°C 1', 75°C 5' és 72°C 15'; 4°C  
END

26S rRNS D1/D2 PCR: 94°C 1'; 36x: 95°C 1'; 52°C 1'; 72°C 2' és 72°C 2'; 4°C  
END

2 µl PCR termék és 2 µl gél-festő puffer elegyét 100 ml 1%-os agaróz gélben (hozzáadva 5 µl etidium-bromid 10 mg/ml törzsoldatból; Sigma E8751-5G), 1x TBE pufferben 120 V-on futtatjuk. A futtatás során GeneRuler 1 kb DNS „létrát” (Fermentas MBI, SM 0311), valamint  $\phi$ ×174 DNS/*Hinf*I méret kontrollt (Fermentas MBI, SM0261) alkalmazunk.

A gélben szétváló fragmenseket a BioDoc-It Imaging System UV transzilluminátorával tesszük láthatóvá.

### Szekvencia elemzés

Kinyertük a törzsek genomális DNS-ét, majd NL1, NL4 primereket felhasználva amplifikáltuk a 26S D1/D2 doménjét kódoló régiót. Az amplifikátumok szekvencia meghatározását a GENEART AG, németországi laboratóriumában végezték, az NL1 esetenként az NL4 primerek felhasználásával. A PCR termékek szekvencia eredményeinek kiértékeléséhez a National Center for Biotechnology Information adatbázis BLAST szolgáltatását használtuk fel (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), illetve ennek a páros összehasonlítást végző programját (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). Ellenőrzésként elvégeztük mindezt a CBS adatbázis segítségével is (<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/BioloMICSSequences.aspx>).

## PCR-RFLP

Kísérleteink során a következő reakcióelegyet mértük össze enzimenként (*DraI*, *MboI*, *HinfI*, *HaeIII*, *PstI*, *EcoRI*) egy-egy Eppendorf csőbe:

0,5 µl restrikciós endonukleázt

2 µl puffert

15,5 µl szűrt (Millipore) desztillált víz

2 µl PCR termék

Minden mintából 20 µl-hez 4 µl gél-festő puffert mértünk, és a PCR-nél megadott módon futtattuk.

A gélben felvitt mintákat a BioDoc-It Imaging System UV transzilluminátorával tettük láthatóvá, valamint ezzel készítettünk digitális képeket róla.

## Váltakozó erőterű gélelektroforézis (CHEF)

Munkánk során a BioRad CHEF DR III (BioRad 170-3695) váltakozó erőterű gélelektroforézis rendszert használtuk kromoszómák karíotipizálásához. A minták előkészítése minden esetben ugyanaz volt (Nguyen és Gaillardin leírása alapján, 1997): egy éjszakán át 25°C-os vizes rázó inkubátorban inkubált 3 ml-nyi sejtenyészetet 5 percig 10000 rpm fordulatszámon centrifugáltunk (Heraeus Biofuge), majd az üledéket 50mM EDTA-val mostuk, és ismét lecentrifugáltuk az előzőek alapján. Ezt követően 200 µl-nyi 250 µg/ml Zymoliase 20T (ICN) enzimmel kiegészített CPES pufferben vettük fel a sejteket, és 37°C-on inkubáltuk 15 percig. A szuszpenzióhoz 200 µl 50°C-ra hűlt 2%-os Low Melt Agarózt (BioRad 162-0017) kevertünk, amit 200 µl térfogatú formákba öntöttük. Az így megszilárdult, agarózba ágyazott sejteket CPE pufferbe 8 órára 37°C-ra helyeztük. A protoplasztálódott, agarózba ágyazott mintákon a puffert „lízis puffer”-re cseréltük, ami 0,5 mg/ml Proteinase K (Sigma P 2308) fehérjebontó enzimet is tartalmazott, egész éjszakai inkubálásra 50°C-ra helyeztük a mintákat. Másnap a „lízis puffer”-t háromszor 1xTE-re cseréltük, ezután a minták futtatásra

azonnal felhasználhatók. Ellenkező esetben 0,25 M EDTA-ban 4°C-on fél évig tárolhatók.

I. Futási paraméter: 100-4400 sec. lineáris ramping 96 órán át, futás 1%-os agaróz (BioRad 162-0126) gélben, 1,5V/cm, 120°, 14°C-os 3 liter, 0,5x TBE pufferben.

II. Futási paraméter: 100-4400 sec. lineáris ramping 120 órán át, futás 1%-os agaróz (BioRad 162-0126) gélben, 1,5V/cm, 120°, 14°C-os 3 liter, 0,5x TBE pufferben.

A futást követően a gélt 5 µg/ml-os ethidium-bromid oldatban 20 percig festettük és steril desztilláltvízben mostuk. BioDoc-It Imaging System UV transzilluminátorával fényképeztük.

#### 4.4.7. Élesztőtörzsek fiziológiai vizsgálatai

##### Kénhidrogén termelés vizsgálata

A kénhidrogén termelés vizsgálatához Nickerson agart használtuk fel, mivel a táptalajban található bizmut-szulfid barnás színű bizmut-szulfiddá redukálódik kénhidrogén jelenlétében, ezzel kvalitatívan megadva a keletkezett kénhidrogént

1-1db Nickerson agarra 2 napos szobahőmérsékleten, YEPL oldatban növesztett sejtszuszpenzióból 20µl-t cseppentettünk. Száradás után 25°C-on, valamint 16°C-on inkubáltuk. Ellenőriztük 5, illetve 10 nap után a telepek színét. A kénhidrogén termelés mértékét a színmélység alapján állapítottuk meg: 1-fehér, 2-krémes, 3-világosbarna, 4-barna, 5-sötétbarna, 6-fekete (Sipiczki és mtsi., 2001).

### Savtermelés glükózból

2 napos szobahőmérsékleten, YEPL oldatban növesztett sejtszuszpenzióból 20 µl-t cseppentettünk ki 1-1db 5% glükóz-0,5% CaCO<sub>3</sub> agarra. A csészéket 25°C-on, valamint 16°C-on inkubáltuk 10 napon keresztül, 5 és 10 nap elteltével értékeltük. A savtermelést a telep körül megjelenő tiszta zóna jelenti az opálos táptalajban.

### Alkoholtolerancia vizsgálata

2 napos tenyészeteket oltottunk be 0.1 OD<sub>600</sub> sejtsűrűségben 50 ml 6, 8, 10, 12% alkoholt tartalmazó YEPL tápfolyadékba. 96 órán keresztül inkubáltuk vizes rázógépből 25°C-on. A tenyészetek sejtsűrűségének változását 24 óránként ellenőriztük spektrofotométerrel, 600 nm-en (Beckman DU<sup>®</sup>-50). Amikor a sejtsűrűség meghaladta az 1 OD-t, addig hígítottuk a mérendő mintát (2 ml), míg 0,7 OD alá esett. A hígítás mértékével visszaszorítottuk a kapott OD-t.

### Cukortolerancia vizsgálata

2 napos tenyészeteket oltottunk be 0.1 OD<sub>600</sub> sejtsűrűségben 50 ml 50 és 60 % glükózt tartalmazó YEPL tápfolyadékba. 72 órán keresztül inkubáltuk vizes rázógépből 25°C-on. Az oldatok sejtsűrűségének változását 24 óránként ellenőriztük spektrofotométerrel, 600 nm-en (Beckman DU<sup>®</sup>-50). Amikor a sejtsűrűség meghaladta az 1 OD-t, addig hígítottuk a mérendő mintát (2 ml), míg 0,7 OD alá esett. A hígítás mértékével visszaszorítottuk a kapott OD-t.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Mintagyűjtés

A különböző mintavételezések során begyűjtött szőlőszemek mennyiségét, és jellemzését az **1. számú mellékletben** található táblázatok tartalmazzák. A mintákat a dűlőkben minden évben azonos helyről vettük.

2002. október 3-án, Mádon a Király dűlőből gyűjtöttünk be 6 szőlőfürttről 15 szőlőszemet (**1.sz. melléklet, 1. táblázat**), valamint október 10-én Tarcalon a Szarvas dűlőből 6 fürttről 30 szőlőszemet (**1.sz. melléklet, 2. táblázat**). A szeptemberi és októberi időjárás kedvezett az aszúképződésnek. A hőmérséklet az adott időszaknak megfelelő volt. Az augusztus napos és száraz volt, szeptember közepén és végén hullott csapadék, melynek következtében a relatív páratartalom megemelkedett, de ezt követően a mintavételig száraz volt az idő.

A mintagyűjtéseket 2003-ban és 2004-ben két-két alkalommal végeztük. 2003. szeptember 8-án a Szarvas dűlőből vettük az első mintákat. Ebben az évben az augusztus napos volt, a hónap közepén és végén volt minimális csapadék. Szeptemberben a mintavétel előtt volt egy pár napos csapadékos időszak, melynek hatására a következő napokban a páratartalom megemelkedett. A szeptember 8-i időpontig az időjárási feltételek nem voltak kedvezőek a *Botrytis* számára ahhoz, hogy a nemesrothadást megfelelően véghez vigye. Ezért ebben az időpontban nem tudtunk megfelelő számú aszúszemet begyűjteni, csupán töppedésig jutott stádiumú szőlőszemeket vizsgáltunk, egy kivétellel (**1.sz. melléklet, 3. táblázat**). Ezen a napon a Bakonyi dűlőben 1 fürttről 5 szemet szedtünk (**1.sz. melléklet, 4. táblázat**).

A szeptember eleji eső és magas páratartalom, valamint az azt követő csapadékmentes három nap kivételével napos időszak már kedvezőbbek voltak a nemesrothadás kialakulásához. Így szeptember 29-én a Király és Bakonyi dűlőből minden stádiumból gyűjtöttünk szőlőszemeket (**1.sz. melléklet, 5-6. táblázat**).

2004-ben lehetőségünk volt mindkét dűlőből kétszer mintát venni. A Bakonyi dűlőben már nem mintáztunk. Ebben az évben eltolódott a szüret ideje, így október 7-én és október 27-én vettük a mintáinkat. Szeptember vége és október második fele csapadékos volt, a relatív páratartalom ebből kifolyólag végig magas volt. A napsütéses órák száma szeptember elején még magas volt, de a hónap második felétől lecsökkent, és ingadozóvá vált október folyamán is. Az átlaghőmérséklet az ilyenkor megszokottnak megfelelően 10°C volt. Október 7-re szépen kialakult a nemesrothadás, azonban október 27-re már más penészgombák is megjelentek, a szőlő rothadásnak indult az időjárásnak köszönhetően. Az első alkalommal minden stádiumból izoláltunk szőlőszemeket (**1.sz. melléklet, 7-8. táblázat**), második alkalommal több volt a rothadt, penészes szőlőfürt, így töppedt szőlőszemet nem tudtunk minden esetben gyűjteni (**1.sz. melléklet, 9-10. táblázat**).

A begyűjtött szőlőszemekből 30 db ép, 22 db még lédús, 30 db barnuló, 31 db töppedt és 32 db botrytiszes volt (**1. sz. melléklet**).

## **5.2. Az élesztőgombák izolálása szőlőről**

2002-ben a Szarvas dűlőből összesen 1473, a Király dűlőből 1154 élesztőtelepet izoláltunk. 2003-ban a Szarvas dűlőből 613, a Király dűlőből 557, a Bakonyi dűlőben pedig 249 élesztőtelepet izoláltunk. 2004-ben a Szarvas dűlő mintáiból 550, a király dűlőiekből 666 élesztőtelepet izoláltunk.

Összevetve a három év mintavételeit 5262 darab élesztőtörzset izoláltunk a három vizsgált területről.

### 5.3. Az izolátumok csoportosítása konvencionális taxonómiai módszerekkel

21 olyan fiziológiai tesztet végeztünk el, melyekről úgy gondoltuk, hogy alkalmasak lesznek az izolátumok előcsoportosítására. Ezzel kívántuk lecsökkenteni a molekulárisan analizálandó törzsek számát. Az összesített eredmények alapján a szakirodalmat és a nemzetközi adatbázisokat (Barnett és mtsi., 1990; Kreger-van Rij, 1984; [www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl)) felhasználva olyan törzscsoportokat hoztunk létre, melyekbe a konvencionális meghatározási módszerek alapján azonos eredményeket adó törzsek tartoznak. Ezen csoportok különböző fajokat jelenthetnek. Csoportonként két-három törzset vizsgáltunk a későbbiekben molekuláris biológiai módszerekkel is.

A behatóbb vizsgálatra kiválasztott törzsek konvencionális tesztek alapján kapott eredményeit a **4.-6. táblázatokban** foglaltuk össze.

**4. táblázat:** A 2002-ban izolált, további vizsgálatokra kiválasztott élesztőtörzsek konvencionális tesztjeinek eredményei

Törzskönyvi szám	telepszín	sejtalak	spórázás	1% ecetsav tol.	0,1%ciklohx.	növekedés															
						szacharóz	nítrit	galaktóz	ramnóz	maltóz	cellobióz	melibióz	raffinóz	glicerol	mannit	citrát	KNO <sub>3</sub>	lizin	-vitamin	EtOH	37°C
16.4.20.	f	o	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w/-	+	-	-	-
12.2.39.	kr/s	o/l	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+/-	+	+	+	-
12.2.46.	f	o/c	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-
12.3.84.	kr	O/k	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-/+	+	+	+	+	+	-/+	-
13.5.1.	f	o/c	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
15.2.2.	kr	N/o	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-/+	-	+	-
15.2.23.	kr	N/o	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-/+	-	-/+	-
15.3.65.	kr	N/o	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	w/-	+	+	+	+/-	+	+	+	-
2.3.75.	f	o/c	+	-	+	-	w	-	-	-	+	-	-	-	-	-	w/-	+	-	-	-
12.5.12.	kr	O/l	-	-	-	+	-	+/-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2.3.24.	p	O		-		+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
11.1.28.	p	O		-		+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+

'f' fehér, 'kr' krémes, 'p' piros, diffúzibilis pigment, 's' sárga, 'c' citromalakú, 'k' kerek, 'o' ovális, 'O' nagy ovális, 'N' nagy kerek, 'l' megnyúlt, 'w' gyenge növekedésű

**5. táblázat:** A 2003-ban izolált, további vizsgálatokra kiválasztott élesztőtörzsek konvencionális tesztjeinek eredményei

Törzskönyvi szám	telepszín	sejtalak	spórázás	1% ecetsav tol.	0,1% ciklohx.	növekedés															
						szacharóz	nitrit	galaktóz	ramnóz	maltóz	cellobióz	melibióz	raffinóz	glicerol	mannit	citrát	KNO <sub>3</sub>	lizín	-vitamin	EtOH	37°C
4a.1.31.	f	o/c	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4a.4.1.	f/kr	o/k	-	-/d	-	+	+	-	-	-	w	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
4a.4.42.	f/kr	k	-	-/d	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
5a.4.16.	kr/s	o	-	-	w	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-/w	-	+	+	+	-
6a.4.1.	f	N	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	w	+	+	+	-	-
T1.3.29.	f	o	-	+	-	w	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
10.5.11.	f	o	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	+	-	-	-
6b.4.46.	kr	O/k	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	w	-	+	-	+	+	-	-
6b.1.3.	kr/r	o	-	-	-	+	+	+	+	+	w	-	+	+	+	w	+	-/+	+	-	-
T1.2.30.	r/fk	o/h	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
4a.3.11.	p	O		-		+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
7.3.10.	p	O		-		+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+

'f' fehér, 'kr' krémes, 'n' narancs, 's' sárga, 'r' rózsaszín, 'p' piros, diffúzibilis pigment, 'fk' fekete

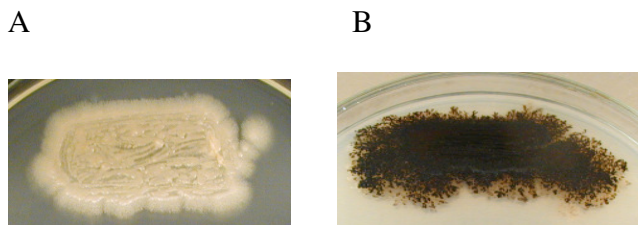
'c' citromalakú, 'k' kerek, 'o' ovális, 'O' nagy ovális, 'N' nagy kerek, 'h' hífák, 'w' gyenge növekedésű, 'd' késleltetett növekedésű

**6. táblázat:** A 2004-ban izolált, további vizsgálatokra kiválasztott élesztőtörzsek konvencionális tesztjeinek eredményei

Törzskönyvi szám	telepszín	sejtalak	spórázás	1% ecetsav tol.	0,1% ciklohx.	növekedés															
						szacharóz	nitrit	galaktóz	ramnóz	maltóz	cellobióz	melibióz	raffinóz	glicerol	mannit	citrát	KNO <sub>3</sub>	lizin	-vitamin	EtOH	37°C
17.1.1.	p/r	o/N	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	w	-	+	+	+	+
17.1.8.	f	o/c	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
17.3.1.	p/r	o/N	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	w	-	+	+	+	+
18.5.1.	kr	O	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+
30.1.1.	kr	O	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	w/-
30.1.34.	kr/s	o	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	w	+	+	+	+	-
31.4.46.	n	k	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	w	+	-	+	+	-
25.1.1.	f	o	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
25.4.55.	f	o/c	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
26.1.35.	f	o	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
26.1.53.	kr	O	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+/-
27.2.36.	r/fk	o/h	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
23.3.3.	kr	N	-	-	-	+	-/+	+	+	+	+	-	-/w	+	+	w	+	+	+	-	-
31.4.32.	kr	O/k	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	w	-	+	-	+	+	-	-

### 5.3.1. Telep-, és sejtmorfológiai vizsgálatok

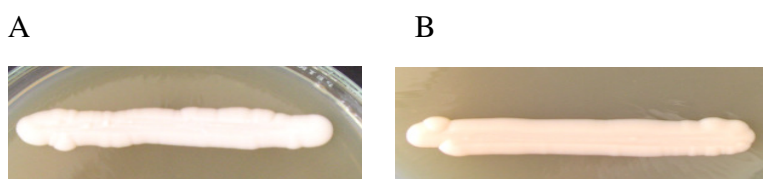
Az élesztőtelepek morfológiájáról készített felvételek néhány jellemző példáját a **2-8. ábrákon** mutatjuk be. A tenyésztésben használt táptalaj egy kivételtől eltekintve YEPA volt. A sejtek morfológiája 2000x-es nagyításban a **9-15. ábrákon** kerül bemutatásra.



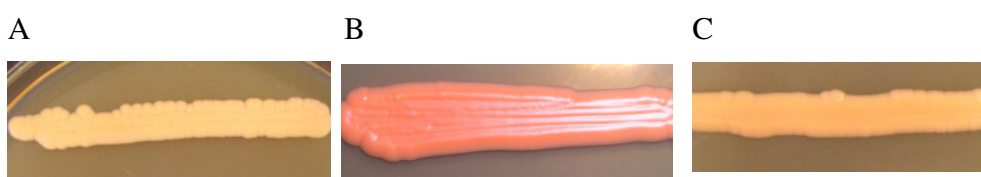
**2. ábra:** T1.2.30 élesztőtelepek 4 napos (A), illetve 15 napos (B) felvétele burgonya-dextrózos táptalajon



**3. ábra:** (A) 15.2.2., (B) 5a.4.16., (C) 6a.4.1. élesztőtelepek



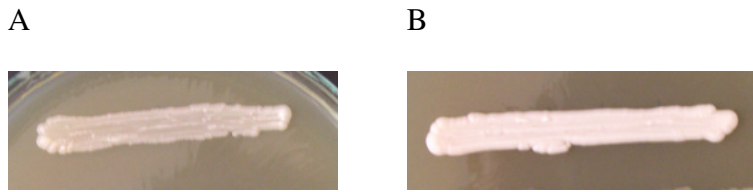
**4. ábra:** (A) 12.3.84., (B) 6b.4.46. élesztőtelepek



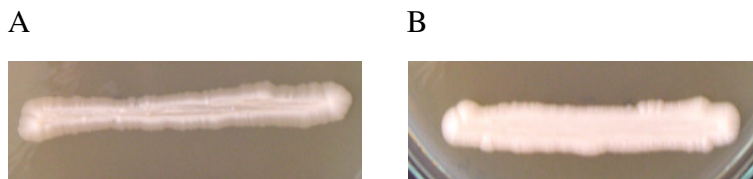
**5. ábra:** (A) 12.2.39., (B) 31.4.46., (C) 6b.1.3. élesztőtelepek



**6. ábra:** (A) 17.1.1., (B) 17.3.1., (C) 15.3.65. élesztőtelepek



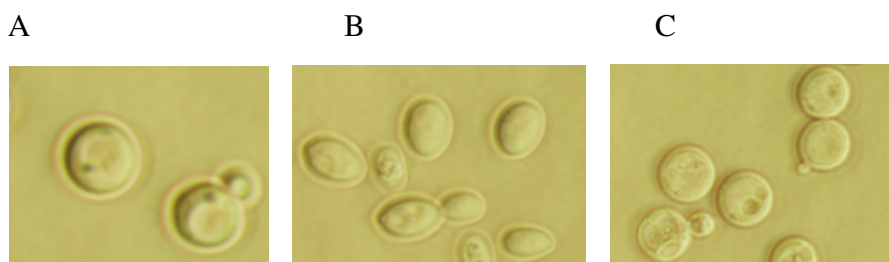
**7. ábra:** (A) 16.4.20., (B) 4a.4.1. élesztőtelepek



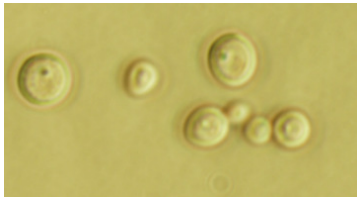
**8. ábra:** (A) 12.2.46., (B) 18.5.1. élesztőtelepek



**9. ábra:** T1.2.30 micéliális (A), valamint egysejtes, élesztőszerű (A) alakban



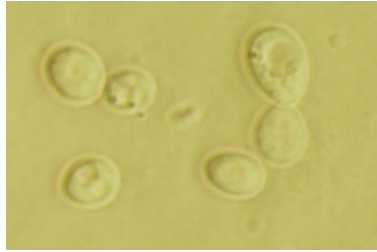
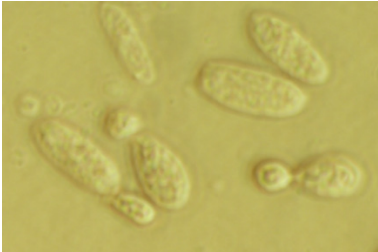
**10. ábra:** (A) 15.2.2., (B) 5a.4.16., (B) 6a.4.1. élesztősejtek



**11. ábra:** 12.3.84. élesztősejtek

A

B

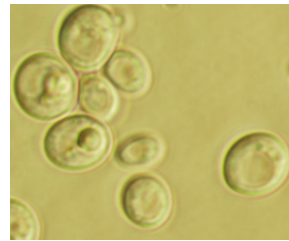
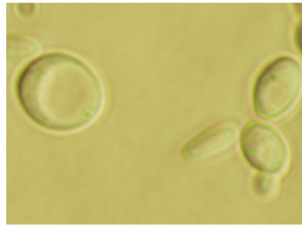
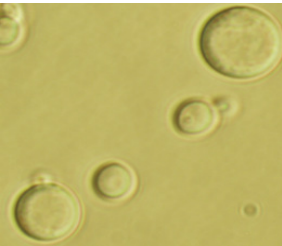


**12. ábra:** (A) 12.2.39., (B) 31.4.46., élesztősejtek

A

B

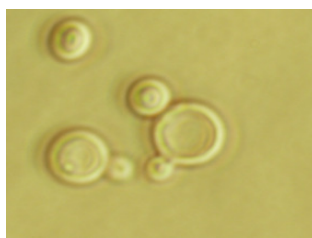
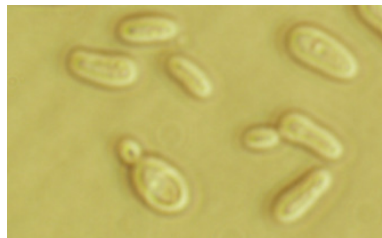
C



**13. ábra:** (A) 17.1.1., (B) 17.3.1., (C) 15.3.65. élesztősejtek

A

B

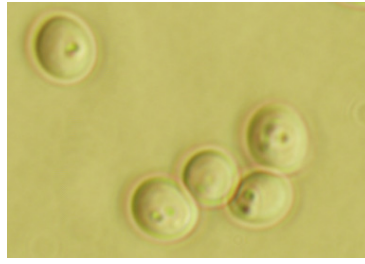


**14. ábra:** (A) 16.4.20., (B) 4a.4.1. élesztősejtek

A



B

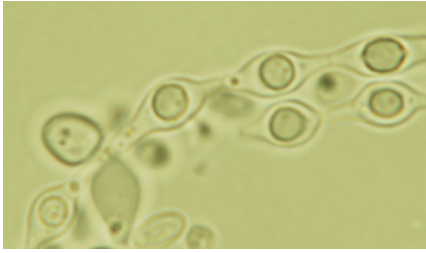


**15. ábra:** (A) 12.2.46., (B) 18.5.1. élesztősejtek

### 5.3.2. Spórázás

A behatóbb vizsgálatokra kiválasztott törzsek spórázási eredményeit a **4-6. táblázatokban** foglaltuk össze. Három izolátum spórázási morfológiáját a **16-18. ábrákon** mutatjuk be.

A fehér, krémszínű telepek közül a 12.2.46-os törzssel egyező asszimilációs, és morfológiai (**15. ábra, A. kép**) eredményeket adó törzsek egy része 1-2 kalap-formájú spórát képzett aszkuszonként (**16. ábra**). A 18.5.1. törzshöz hasonlóaknál (**15. ábra, B. kép**) konjugáló sejteket és 1-2 kerek spórát figyeltünk meg aszkuszonként (**17. ábra**). A 15.3.65., 17.1.1., 17.3.1-es izolátumokkal azonos törzsek 1:9 hígítású burgonya-dextrózos táptalajon képeztek gombostüszzerű aszkuszokat 10, valamint 16°C-on egyaránt. Ezen törzsek esetében konjugáló sejteket, valamint klamidospórákat („pulcherrima sejtek”) is találtunk (**18. ábra**). A kísérletek során nem láttunk példát *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* és *Torulaspóra* fajokra jellemző spórázási módokra. Az izolátumok többsége egyáltalán nem képezett spórákat a vizsgált táptalajokon és idő alatt.



**16. ábra:** 16.3.1. 1-1 aszkusza, 5 nap elteltével YM agaron

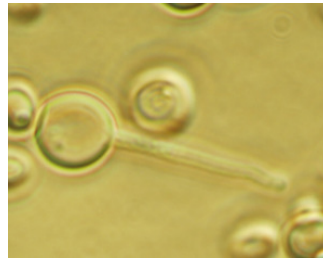


**17. ábra:** 18.5.1. konjugáló sejtjei, valamint 1 és 2 kerek spórás aszkuszai 7 nap elteltével YM agaron

A



B

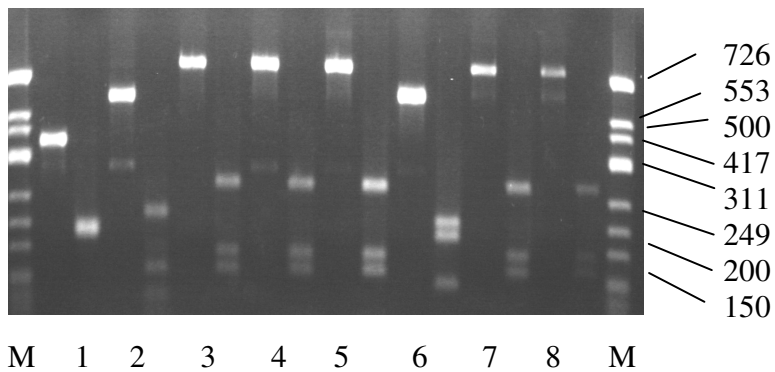


**18. ábra:** 15.3.65. konjugáló sejtjei (A) és gombostűszerű aszkusza, valamint klamidospórája (B) 10°C-on burgonya-dextróz agaron 14 nap elteltével

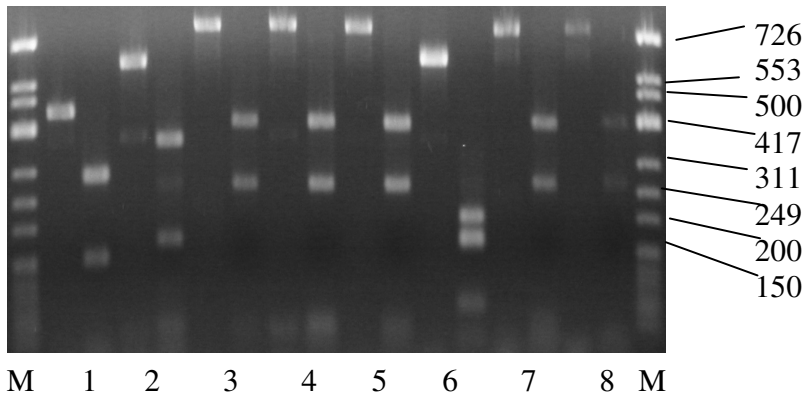
## 5.4. Szőlőről izolált élesztőgombák molekuláris taxonómiai vizsgálatai

### 5.4.1. PCR-RFLP eredmények

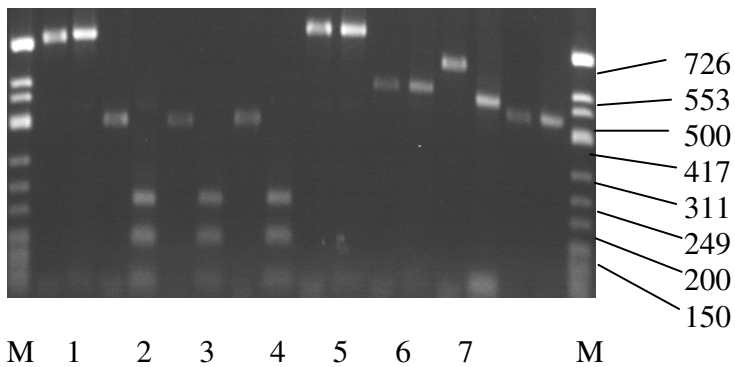
A behatóbb vizsgálatokra kiválasztott szőlős izolátumok PCR-RFLP vizsgálatainak eredményeiből a **19-21. ábrákon** mutatunk be példákat. A **7. táblázatban** összefoglaltuk a PCR-RFLP vizsgálatok eredményeit.



**19. ábra:** ITS1-5.8S-ITS2 régió PCR-RFLP mintázatai. A minták sorrendje:  $\phi$ 174 DNS marker; (1) 16.4.20, (2) 12.2.39, (3) 12.2.46, (4) 12.2.52, (5) 12.2.57, (6) 12.3.84, (7) 13.5.1, (8) 2.1.59. A számokhoz tartozó két-két sávból az első az emésztetlen PCR fragment, a második a *Hinf*I-gyel emésztett fragment.



**20. ábra:** ITS1-5.8S rRNS-ITS2 régió PCR-RFLP mintázatai. A minták sorrendje:  $\phi$ 174 DNS marker; (1) 16.4.20, (2) 12.2.39, (3) 12.2.46, (4) 12.2.52, (5) 12.2.57, (6) 12.3.84, (7) 13.5.1, (8) 2.1.59. A számokhoz tartozó két-két sávból az első az emésztetlen PCR fragment, a második a *MboI*-gyel emésztett fragment.



**21. ábra:** ITS1-5.8S rRNS-ITS2 régió PCR-RFLP mintázatai. A minták sorrendje:  $\phi$ 174 DNS marker; (1) 4a.1.31, (2) 4a.4.1, (3) 4a.4.16, (4) 4a.4.42, (5) 5a.2.35, (6) 5a.4.16, (7) 6a.4.1. A számokhoz tartozó két-két sávból az első az emésztetlen PCR fragment, a második a *HaeIII*-mal emésztett fragment.

A fragmentek mérete csak megközelítőleg határozható meg, ezért adtunk meg kerek számokat a **7. táblázatban**.

**7. táblázat:** A vizsgált élesztőtörzsek PCR-RFLP analízisének eredményei

Mintázattípus	Törzsek	rITS méret	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Eco</i> RI	<i>Mbo</i> I	<i>Dra</i> I
I.	16.4.20., T1.3.29, 10.5.11, 25.1.1, 26.1.35.	480 bp	240 bp 240 bp	480 bp	480 bp	320 bp 150 bp	310 bp 130 bp
II.	4a.4.1., 4a.4.16., 4a.4.42.	420 bp	200bp 200 bp	220 bp 150 bp 60 bp	420 bp	260 bp 150 bp	420 bp
III.	12.2.39.	660 bp	280 bp 160 bp 120 bp	420 bp 120 bp 120 bp	360 bp 300 bp	390 bp 170 bp 80 bp	660 bp
IV.	6b.1.3.	600 bp	210 bp 140 bp 100 bp 140 bp	600 bp	350 bp 260 bp	360 bp 180 bp 60 bp	600 bp
V.	31.4.46.	580 bp	240 bp 200 bp 140 bp	580 bp	330 bp 250 bp	390 bp 190 bp	580 bp
VI.	5a.4.16., 30.1.34.	550 bp	310 bp 200 bp 40 bp	550 bp	320 bp 230 bp	400 bp 150 bp	550 bp
VII.	15.2.2., 15.2.23.	620 bp	360 bp 260 bp	500 bp 80 bp 40 bp	380 bp 250 bp	240 bp 120 bp 100 bp 80 bp 100 bp	620 bp

7. táblázat: Folytatás az előző oldalról

Mintázattípus	Törzsek	rITS méret	<i>HinfI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>MboI</i>	<i>DraI</i>
VIII.	6a.4.1.	600 bp	340 bp 260 bp	540 bp 60 bp	350 bp 250 bp	300 bp 200 bp 100 bp	600 bp
IX.	6b.4.46., 12.5.12.	650 bp	280 bp 220 bp 140 bp	550 bp 100 bp	390 bp 260 bp	220 bp 190 bp 150 bp 100 bp	500 bp 180 bp
X.	12.2.46., 12.2.52., 12.2.57., 13.5.1., 2.1.59., 2.1.51., 2.3.75., 14.1.15., 16.3.1., 4a.1.31., 5a.2.35., T1.3.46., 7.2.31., 10.2.42., 17.1.8., 25.4.55., 26.3.37.	730 bp	330 bp 200 bp 180 bp	730 bp	730 bp	420 bp 250 bp	420 bp 310 bp
XI.	18.5.1., 30.1.1., 26.1.53.	700 bp	350 bp 350 bp	310 bp 200 bp 100 bp 90 bp	700 bp	430 bp 250 bp	320 bp 230 bp 140 bp
XII.	15.3.65.	420 bp	240 bp 200 bp	300 bp 120 bp	420 bp	280 bp 100 bp	240 bp 140 bp
XIII.	17.1.1., 17.3.1.	380 bp	200 bp 90 bp 90 bp	280 bp 100 bp	380 bp	280 bp 100 bp	380 bp

#### 5.4.2. Szekvenciaelemzés eredményei

A behatóbb vizsgálatokra kiválasztott törzsek szekvenciaanalízis során megállapított faji hovatartozását a **8. táblázatban** tüntetjük fel.

**8. táblázat:** A szőlőszemekről izolált törzsek csoportjait képviselő izolátumok faji hovatartozása az rDNS 26S régiójának szekvenciaelemzése alapján

Törzs	Leghasonlóbb típus-törzs	Hasonlóság
16.4.20.	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	99%
12.2.39.	<i>Rh. nothofagi</i> CBS 8166 <sup>T</sup> (AF189950)	98%
12.2.46.	<i>H. uvarum</i> CBS 314 <sup>T</sup> (U84229)	99%
12.3.84.	<i>C. magnus</i> CBS 140 <sup>T</sup> (AF181851)	98%
13.5.1.	<i>H. uvarum</i> CBS 314 <sup>T</sup> (U84229)	100%
15.2.2.	<i>C. adeliensis</i> CBS 8351 <sup>T</sup> (AF137603)	99%
15.2.23.	<i>C. adeliensis</i> CBS 8351 <sup>T</sup> (AF137603)	100%
15.3.65.	<i>M. viticola</i> CBS 9950 <sup>T</sup>	99%
2.3.75.	<i>H. uvarum</i> CBS 314 <sup>T</sup> (U84229)	100%
12.5.12.	<i>C. magnus</i> CBS 140 <sup>T</sup> (AF181851)	99%
2.3.24.	<i>M. pulcherrima</i> CBS 5833 <sup>T</sup> (U45736)	95%
11.1.28	<i>M. fructicola</i> CBS 8853 <sup>T</sup> (AF360542)	96%
27.2.36	<i>A. pullulans</i> DBVPG 4778 (EF643727)	99%
4a.1.31.	<i>H. uvarum</i> CBS 314 <sup>T</sup> (U84229)	99%
4a.4.1.	<i>C. sorbosivorans</i> CBS 8768 <sup>T</sup> (AJ277846)	100%
4a.4.16.	<i>C. sorbosivorans</i> CBS 8768 <sup>T</sup> (AJ277846)	99%
4a.4.42.	<i>C. sorbosivorans</i> CBS 8768 <sup>T</sup> (AJ277846)	99%
5a.2.35.	<i>H. uvarum</i> CBS 314 <sup>T</sup> (U84229)	100%
5a.4.16.	<i>C. flavescens</i> CBS 942 <sup>T</sup> (AB035042)	99%
6a.4.1.	<i>C. albidosimilis</i> CBS 7711 <sup>T</sup> (AF137601)	99%
T1. 3.29.	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100%

**8. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

Törzs	Leghasonlóbb típus törzs	Hasonlóság
T1.3.46.	<i>H. uvarum</i> CBS 314 <sup>T</sup> (U84229)	100%
7.2.31.	<i>H. uvarum</i> CBS 314 <sup>T</sup> (U84229)	100%
10.2.42.	<i>H. uvarum</i> CBS 314 <sup>T</sup> (U84229)	100%
10.5.11.	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100%
6b.4.46.	<i>C. magnus</i> CBS 140 <sup>T</sup> (AF181851)	100%
6b.1.3.	<i>Rh. glutinis</i> CBS 20 <sup>T</sup> (AF070430)	99%
T1.2.30.	<i>A. pullulans</i> DBVPG 4778 (EF643727)	99%
7.3.10.	<i>M. pulcherrima</i> CBS 5833 <sup>T</sup> (U45736)	97%
4a.3.11.	<i>M. fructicola</i> CBS 8853 <sup>T</sup> (AF360542)	97%
17.1.1.	<i>M. fructicola</i> CBS 8853 <sup>T</sup> (AF360542)	97%
17.1.8.	<i>H. uvarum</i> CBS 314 <sup>T</sup> (U84229)	100%
17.3.1.	<i>M. pulcherrima</i> CBS 5833 <sup>T</sup> (U45736)	98%
18.5.1.	<i>L. thermotolerans</i> CBS 6340 <sup>T</sup> (U69581)	100%
30.1.1.	<i>L. thermotolerans</i> CBS 6340 <sup>T</sup> (U69581)	99%
30.1.34.	<i>C. flavescens</i> CBS 942 <sup>T</sup> (AB035042)	99%
31.4.46.	<i>Rh. kratochvilovae</i> CBS 7436 <sup>T</sup> (AF071436)	100%
25.1.1.	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100%
25.1.46.	<i>L. thermotolerans</i> CBS 6340 <sup>T</sup> (U69581)	100%
25.4.55.	<i>H. uvarum</i> CBS 314 <sup>T</sup> (U84229)	100%
26.1.35.	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100%
26.1.53.	<i>L. thermotolerans</i> CBS 6340 <sup>T</sup> (U69581)	100%
26.3.37.	<i>H. uvarum</i> CBS 314 <sup>T</sup> (U84229)	100%

A rRNS 26S szekvenciájának elemzése alapján pontosítva elmondható, hogy a **7. táblázatban** leírt:

**I. csoport:** *C. zemplinina*

**II. csoport:** *C. sorbosivorans*

**III. csoport:** *Rh. nothofagi*

**IV. csoport:** *Rh. glutinis*

**V. csoport:** *Rh. kratochvilovae*

**VI. csoport** a *C. flavescens*

**VII. csoport:** *C. adeliensis*

**VIII. csoport:** *C. albidosimilis*

**IX. csoport:** *C. magnus*

**X. csoportba** a *H. uvarum*

**XI. csoport:** *L. thermotolerans*,

**XII. csoport:** *M. viticola*, végül

a **XIII. csoport** a *M. pulcherrima* és *M. fructicola* fajok törzseit tartalmazza.

Kurtzman és Robnett (1997) megfigyelései alapján tudjuk, hogy a rRNS 26S régiójának D1/D2 doménjét kódoló kromoszómális szakaszban 1%-os nukleotid eltérés már faji különbséget sejtet. Ez alapján különítette el Kurtzman és Droby (2001) a *M. pulcherrima* és *M. fructicola* fajokat is, amelyek között 2,2%-os különbséget találtak.

*Metschnikowia* törzseink esetében nagy eltéréseket kaptunk a típustörzsekhez képest. Az NCBI adatbázisban található szekvenciák közül a 2.3.24-es izolátum 97%-os hasonlóságot mutat Molnár és Prillinger (2005) által benyújtott szekvenciákkal (pl.: AJ745107, AJ86395), a 11.1.28-as izolátum 98%-os hasonlóságot mutat Liu és mtsi. (EU373448), valamint James (AM286804) által benyújtott szekvenciákkal, a 4a.3.11-es törzsünk 98%-ban hasonlít Lei és Rahman (EU195298) törzsére, a 17.1.1-es izolátumunk 99%-os hasonlóságot mutat Liu és mtsi. által meghatározott szekvenciákkal (EU373448, EU373455). Az adott szerzők *M. aff. fructicola*-ként határozták meg izolátumaikat. A 7.3.10-es törzsünk 98%-ban hasonlít Zhao és mtsi. által beadott szekvenciára (EU272042), melyet *M. pulcherrima*-ként identifikáltak. Mindebből az következik, hogy *M. fructicola* izolátumaink között feltételezhetően több is van, amelyik nem azonos teljes mértékben az adott fajjal, csupán *M. aff. fructicola*-ként sorolhatóak be. Az egyszerűség kedvéért azonban a későbbiekben mint *M. fructicola*-t említjük ezeket is.

Korábbi vizsgálatok alapján a *Metschnikowia* fajok D1/D2 régiója jelentősen eltér szekvenciájában (Hong és mtsi., 2003; Molnár és Prillinger, 2005), így sok izolátumunk esetében nem lehet pontosan meghatározni, hogy *M. pulcherrima*, vagy *M. fructicola* fajba tartozik-e. A korábbi vizsgálatok és a mi eredményeink is azt sugallják, hogy nagy az átmenet a két faj között, vagy szükséges lehet egy új faj leírása.

A *H. uvarum*-ként meghatározott törzsek között voltak olyanok, amelyknél nem tapasztaltunk spórázást, így azok feltételezhetően *K. apiculata* törzsek, az előzőek anamorf formái.

#### 5.5. A szőlőről izolált élesztőgombák előfordulása

Az izolált élesztőfajok előfordulását az évjárat és a vizsgált terület függvényében a **9-11. táblázatokban** tüntetjük fel.

#### 9. táblázat: Az élesztőfajok megoszlása 2002-ben

2002	
Szarvas dűlő (1473 db izolátum)	Király dűlő (1154 db izolátum)
<i>H. uvarum/K. apiculata</i>	<i>H. uvarum/K. apiculata</i>
<i>M. fructicola</i>	<i>M. fructicola</i>
<i>A. pullulans</i>	<i>C. zemplinina</i>
<i>C. zemplinina</i>	<i>Cr. flavescens</i>
<i>Rh. nothofagi</i>	<i>M. pulcherrima</i>
<i>Cr. magnus</i>	<i>A. pullulans</i>
<i>Cr. adeliensis</i>	<i>Cr. adeliensis</i>
<i>Cr. flavescens</i>	<i>Cr. magnus</i>
<i>L. thermotolerans</i>	
<i>M. pulcherrima</i>	
<i>M. viticola</i>	

**10. táblázat:** Az élesztőfajok megoszlása 2003-ban

2003		
Szarvas dűlő (613db izolátum)	Király dűlő (557 db izolátum)	Bakonyi dűlő (249 db izolátum)
<i>H. uvarum/K. apiculata</i>	<i>H. uvarum/K. apiculata</i>	<i>Rh. glutinis</i>
<i>C. zemplinina</i>	<i>C. zemplinina</i>	<i>R. kratochvilovae</i>
<i>C. sorbosivorans</i>	<i>Cr. flavescens</i>	<i>H. uvarum/K. apiculata</i>
<i>Cr. flavescens</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>Cr. magnus</i>
<i>M. fructicola</i>	<i>A. pullulans</i>	<i>Cr. albidosimilis</i>
<i>A. pullulans</i>	<i>M. pulcherrima</i>	<i>L. thermotolerans</i>
<i>M. pulcherrima</i>		<i>M. fructicola</i>
		<i>A. pullulans</i>

**11. táblázat:** Az élesztőfajok megoszlása 2004-ben

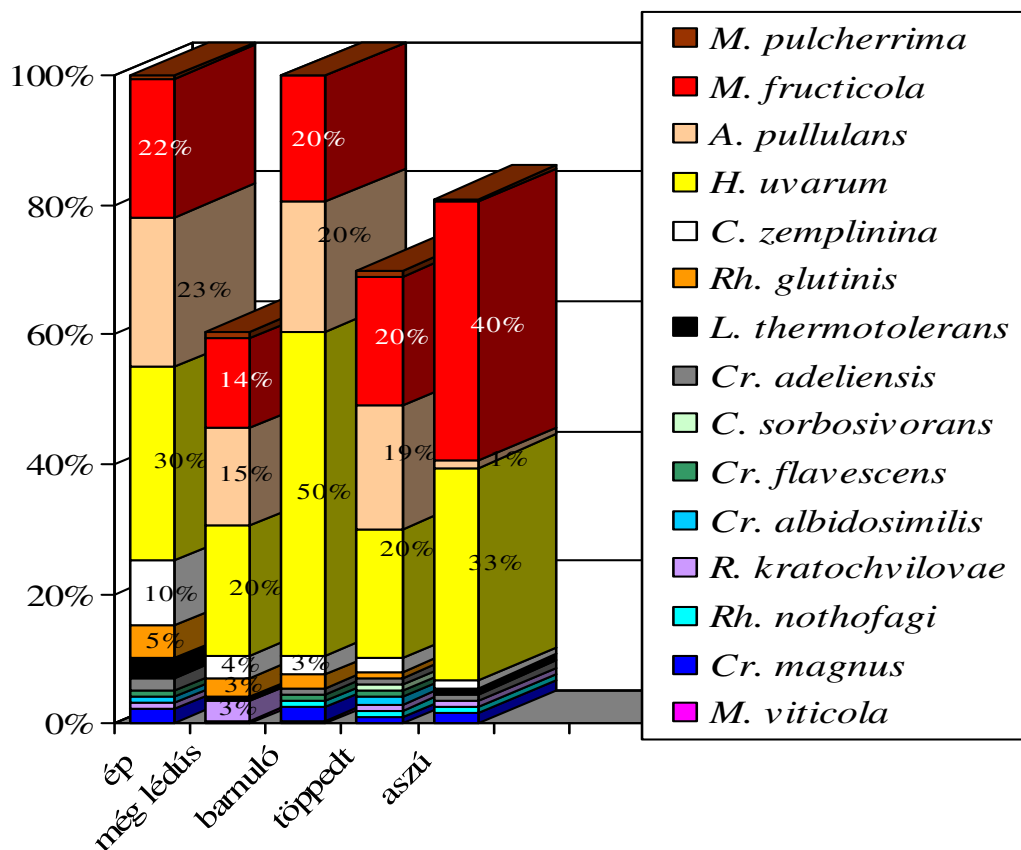
2004	
Szarvas dűlő (550 db izolátum)	Király dűlő (666 db izolátum)
<i>H. uvarum/K. apiculata</i>	<i>H. uvarum/K. apiculata</i>
<i>C. zemplinina</i>	<i>C. zemplinina</i>
<i>Cr. flavescens</i>	<i>Cr. albidosimilis</i>
<i>Cr. magnus</i>	<i>L. thermotolerans</i>
<i>R. kratochvilovae</i>	<i>M. fructicola</i>
<i>L. thermotolerans</i>	<i>A. pullulans</i>
<i>M. fructicola</i>	<i>M. viticola</i>
<i>A. pullulans</i>	<i>M. pulcherrima</i>
<i>M. viticola</i>	

Az aszúsodás különböző stádiumaiból izolált élesztőfajok előfordulását a **12. táblázatban** foglaltuk össze. A leggyakoribb fajokat kiemeltük.

**12. táblázat:** Az élesztőfajok megoszlása az aszúsodás különböző stádiumaiban

ép	még lédús	barnuló	töppedt	aszú
<i>M. fructicola</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>H. uvarum</i>
<i>A. pullulans</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>A. pullulans</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>M. fructicola</i>
<i>H. uvarum</i>	<i>A. pullulans</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>A. pullulans</i>	<i>L. thermotolerans</i>
<i>C. zemplinina</i>	<i>C. zemplinina</i>	<i>C. zemplinina</i>	<i>C. zemplinina</i>	<i>C. zemplinina</i>
<i>Rh. glutinis</i>	<i>Rh. glutinis</i>	<i>Rh. glutinis</i>	<i>Cr. albidosimilis</i>	<i>A. pullulans</i>
<i>L. thermotolerans</i>	<i>R. kratochvilovae</i>	<i>Cr. adeliensis</i>	<i>Cr. magnus</i>	<i>Cr. adeliensis</i>
<i>Cr. adeliensis</i>	<i>L. thermotolerans</i>	<i>Cr. magnus</i>	<i>C. sorbosivorans</i>	<i>Rh. nothofagi</i>
<i>Cr. magnus</i>	<i>M. viticola</i>	<i>Cr. flavescens</i>	<i>R. kratochvilovae</i>	<i>Cr. magnus</i>
<i>Cr. flavescens</i>	<i>M. pulcherrima</i>	<i>Rh. nothofagi</i>	<i>Cr. flavescens</i>	<i>R. kratochvilovae</i>
<i>Cr. albidosimilis</i>		<i>Cr. magnus</i>	<i>Rh. glutinis</i>	<i>M. pulcherrima</i>
<i>R. kratochvilovae</i>		<i>M. viticola</i>	<i>Rh. nothofagi</i>	
<i>M. pulcherrima</i>		<i>M. pulcherrima</i>	<i>Cr. adeliensis</i>	
<i>M. viticola</i>			<i>M. pulcherrima</i>	

A vizsgálataink során az aszúsodás különböző stádiumaiból izolált élesztőfajok százalékos megoszlását a **22. ábrán** mutatjuk be.



**22. ábra:** Az élesztők eloszlása az aszúsodás különböző stádiumaiban

## 5.6. *Candida* élesztőgombák taxonómiai vizsgálata

A vizsgálatokat a **3. táblázatban** található nemzetközi gyűjteményi *Candida* törzsekkel, a tokaji Esszenciából izolált, valamint a Tokaji borvidéken szőlőről izolált és a konvencionális taxonómiai tesztek alapján *C. stellata*-nak tűnő izolátumokkal végeztük el.

### 5.6.1. Molekuláris taxonómiai vizsgálatok

A kiválasztott élesztőtörzsek 26S rDNS-ének szekvencia elemzése révén kapott eredményeket a **13. táblázatban** közöljük. A törzsek szekvenciái a megadott hozzáférési számok alapján megtalálhatóak az NCBI adatbázisában. Az összes, vizsgált élesztőtörzs ITS1-5.8S rRNS-ITS2 régiójának PCR-RFLP analízisét elvégeztük. Az ezekről készült felvételekből a **23-24. ábrákon** mutatunk be példákat. Ezen eredmények alapján, a vizsgált fajok restriktív fragmentjeinek méreteit a **14. táblázatban** foglaltuk össze. A kapott mintázatok összhangban voltak a szekvencia alapján megállapított faji hovatartozással.

#### 13. táblázat: A 26S rRNS D1/D2 doménjének szekvencia analízis eredményei

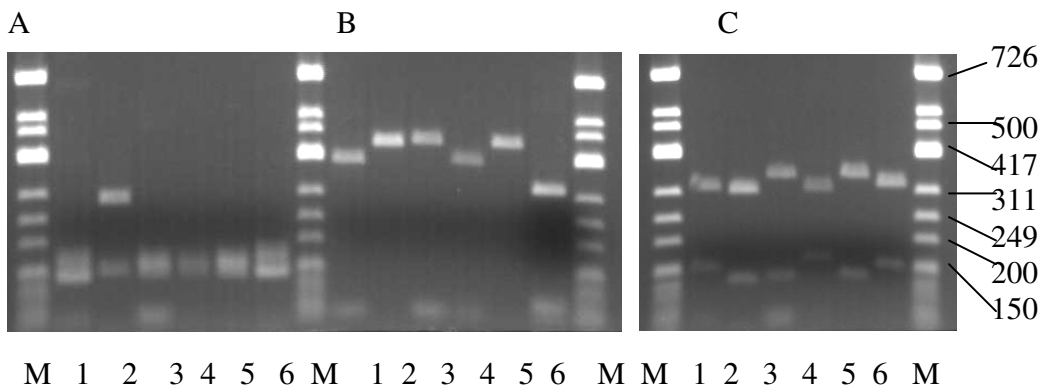
Törzs	Hozzáférési szám	Leghasonlóbb típus-törzs	Hasonlóság (%)
10-619	AJ966340	<i>C. stellata</i> CBS 157 <sup>T</sup> (U45730)	100
10-620		<i>S. cerevisiae</i> részleges szekvencia (EU386746)	99%
10-623	EF452214	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
10-624	EF452216	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-1	EF452215	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	99
11-3	EU020097	<i>T. delbrueckii</i> CBS 1146 <sup>T</sup> (U72156)	99
11-4	EF452218	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-6	EF452193	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-7	EF452219	<i>C. davenportii</i> CBS 9069 (AJ310447)	99
11-8	EF452194	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-9	EF452195	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	99

**13. táblázat:** A 26S rRNS D1/D2 doménjének szekvencia analízis eredményei

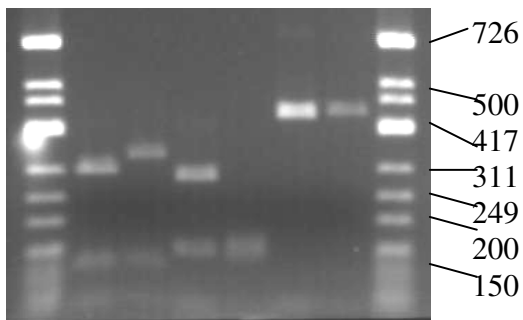
Törzs	Hozzáférsi szám	Leghasonlóbb típus törzs	Hasonlóság (%)
11-10	EF452197	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-17	EF452223	<i>C. bombi</i> CBS 5836 <sup>T</sup> (U45706)	98
11-18	EF452220	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	99
11-19	EF452221	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-20	EF452222	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-27	EF452210	<i>C. lactis-condensi</i> CBS 52 <sup>T</sup> (U45724)	100
11-28	EF452213	<i>C. lactis-condensi</i> CBS 52 <sup>T</sup> (U45724)	100
11-29	EF452211	<i>C. lactis-condensi</i> CBS 52 <sup>T</sup> (U45724)	99
11-30	EU020098	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-31	EF452217	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	99
11-32	EF452212	<i>C. lactis-condensi</i> CBS 52 <sup>T</sup> (U45724)	99
11-60	EF452196	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	99
11-61	EU020102	<i>S. uvarum</i> CBS 395 <sup>T</sup> (AJ279065)	99
11-62	EF452201	<i>St. bombicola</i> CBS 6009 <sup>T</sup> (U45705)	98
11-64	EF452200	<i>St. bombicola</i> CBS 6009 <sup>T</sup> (U45705)	99
11-65	EU020101	<i>P. anomala</i> CBS 5759 <sup>T</sup> (U74592)	99
11-66	EF452203	<i>St. bombicola</i> CBS 6009 <sup>T</sup> (U45705)	99
11-67	EF452205	<i>St. bombicola</i> CBS 6009 <sup>T</sup> (U45705)	98
11-68	EF452206	<i>St. bombicola</i> CBS 6009 <sup>T</sup> (U45705)	98
11-69	EF452207	<i>St. bombicola</i> CBS 6009 <sup>T</sup> (U45705)	99
11-70	EF452208	<i>St. bombicola</i> CBS 6009 <sup>T</sup> (U45705)	98
11-72	EF452202	<i>St. bombicola</i> CBS 6009 <sup>T</sup> (U45705)	98
11-73	EF52209	<i>St. bombicola</i> CBS 6009 <sup>T</sup> (U45705)	99
11-74	EF452204	<i>St. bombicola</i> CBS 6009 <sup>T</sup> (U45705)	99
11-75	EF452198	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	99
11-76	AY775259	<i>St. bombicola</i> CBS 6009 <sup>T</sup> (U45705)	99
11-78	EU020100	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> CBS 767 <sup>T</sup> (U45808)	100
11-79		<i>D. hansenii</i> var. <i>hansenii</i> CBS 767 <sup>T</sup> (U45808)	100
11-80	EU020099	<i>S. exiguus</i> CBS 379 <sup>T</sup> (AY048163)	99
11-88	EF460833	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-101	EF460829	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-107	EF460828	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-124	EF460834	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	99
11-128	EF460827	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-135	EF460830	<i>C. zemplinina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100

**13. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

Törzs	Hozzáférési szám	Leghasonlóbb típus törzs	Hasonlóság (%)
11-138	EF460831	<i>C. zemplanina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-142	EF460825	<i>C. lactis-condensi</i> CBS 52 <sup>T</sup> (U45724)	99
11-143	EF460826	<i>C. lactis-condensi</i> CBS 52 <sup>T</sup> (U45724)	99
11-144	EF460835	<i>C. zemplanina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-145	EF460838	<i>C. zemplanina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	99
11-148	EF460836	<i>C. zemplanina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	99
11-149	EF460841	<i>C. zemplanina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	99
11-150	EF460842	<i>C. zemplanina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	100
11-152	EF460837	<i>C. zemplanina</i> CBS 9494 <sup>T</sup> (AY160761)	99



**23. ábra:** ITS1-5.8S rRNS-ITS2 régió PCR-RFLP mintázatai. A minták sorrendje: (M)  $\phi$ 174 DNS marker; a számokhoz tartozó sávok az (A) *Mbo*I, (B) *Hae*III, valamint (C) *Dra*I fragmenteket jelölik. (1) *C. bombi* (11-17), (2) *C. zemplinina* (11-6), (3) *C. davenportii* (11-7), (4) *C. lactis-condensi* (11-142), (5) *C. stellata* (10-619), (6) *St. bombicola* (11-66)

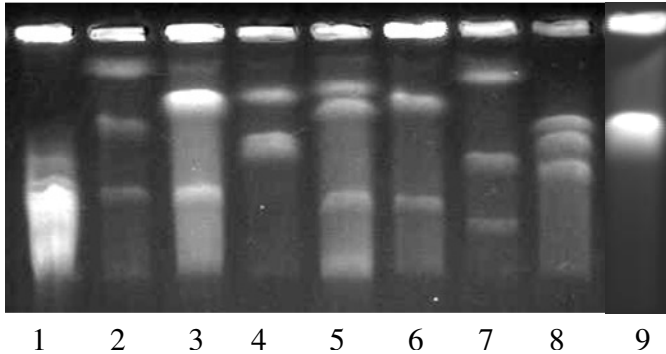


**24. ábra:** ITS1-5.8S rRNS-ITS2 régió PCR-RFLP mintázatai. A minták sorrendje: (M)  $\phi$ 174 DNS marker; a számokhoz tartozó sávok az (A) *Dra*I, (B) *Mbo*I, valamint (C) *Hae*III fragmenteket jelölik. (1) *C. zemplinina* (CBS 9494<sup>T</sup>), (2) *C. stellata* (CBS 157<sup>T</sup>)

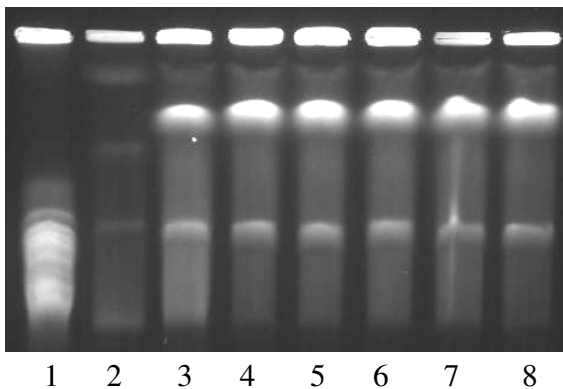
**14. táblázat:** Az általunk vizsgált fajok ITS1-5.8S rRNS-ITS2 régiójának PCR-RFLP mintázatai

Enzimek	<i>C. zemplinina</i>	<i>C. stellata</i>	<i>C. bombi</i>	<i>C. lactis-condensi</i>	<i>C. davenportii</i>	<i>St. bombicola</i>
<i>Hinf</i> I	240 bp 240 bp	245 bp 230 bp	250 bp 150 bp 60-80 bp	240 bp 240 bp	240 bp 240 bp	240 bp 240 bp
<i>Hae</i> III	480 bp	480 bp	420 bp 60 bp	420 bp 60 bp	480 bp	320 bp 100 bp 60 bp
<i>Dra</i> I	310 bp 130 bp	370 bp 120 bp	310 bp 150 bp	310 bp 160 bp	370 bp 120 bp	325 bp 155 bp
<i>Mbo</i> I	320 bp 150 bp	150 bp 150 bp 150 bp	200 bp 140 bp 140 bp	150 bp 150 bp 150 bp	150 bp 150 bp 60 bp 60 bp	200 bp 140 bp 140 bp
<i>Eco</i> RI	480 bp	480 bp	480 bp	480 bp	480 bp	480 bp
<i>Pst</i> I	480 bp	480 bp	480 bp	480 bp	480 bp	480 bp

A kariotipizálási kísérletekhez a taxonómiai vizsgálatok alapján választottuk ki a *Candida* fajok egy-egy törzsét. A **25. ábrán** látható kariótípusokat a I. futási paraméterekkel kaptuk, a **26. ábra** esetében a II. futási paramétereket alkalmaztuk.



**25. ábra:** *Candida* törzsek elektroforetikus kariótípusai. A minták sorrendje: (1) *S. cerevisiae* S288c, (2) *C. stellata* CBS 157<sup>T</sup>, (3) *C. zemplinina* CBS 9494<sup>T</sup>, (4) *C. stellata* 10-619, (5) *C. bombi* 11-17, (6) *C. zemplinina* 11-6, (7) *C. davenportii* 11-7, (8) *C. lactis-condensi* 11-142, (9) *St. bombicola* 11-66

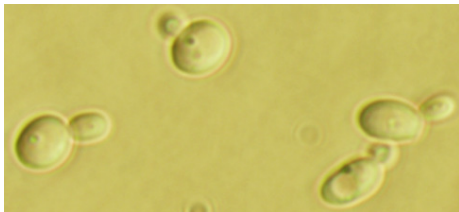


**26. ábra:** *Candida* törzsek elektroforetikus kariótípusai. A minták sorrendje: (1) *S. cerevisiae* S288c, (2) *C. stellata* CBS 157<sup>T</sup>, (3) *C. zemplinina* CBS 9494<sup>T</sup>, (4) *C. zemplinina* 11-1, (5) *C. zemplinina* 10-623, (6) *C. zemplinina* 11-148, (7) *C. zemplinina* 11-107, (8) *C. zemplinina* 11-135

## 5.6.2. Morfológiai vizsgálatok

A kiválasztott élesztőtörzsek sejt morfológiájáról készített képeket a **27-32. ábrákon** mutatjuk be. A sejtek 2000x-es nagyításban láthatóak.

A

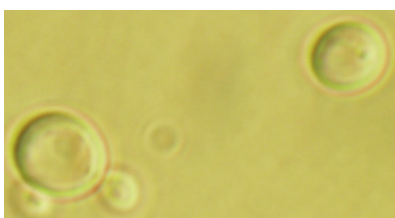


B

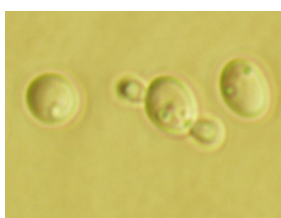


**27. ábra:** (A) *C. zemplinina* (CBS 9494<sup>T</sup>), (B) *C. stellata* (CBS 157<sup>T</sup>) élesztősejtek

A



B



C

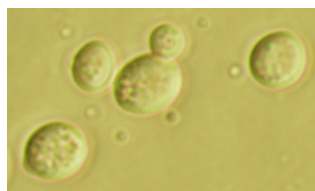


**28. ábra:** (A) 11-66, (B) 11-7, (C) 10-623 élesztősejtek

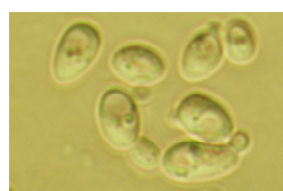
A



B

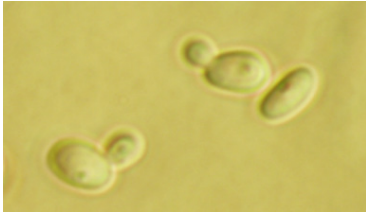


C

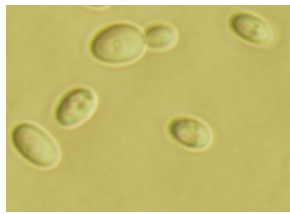


**29. ábra:** (A) 11-17, (B) 10-619, (C) 11-142 élesztősejtek

A

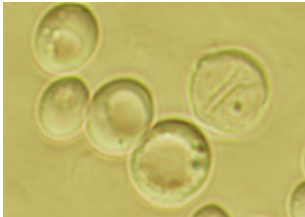


B

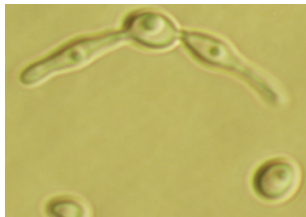


**30. ábra:** (A) 11-107, (B) 11-88 élesztősejtek

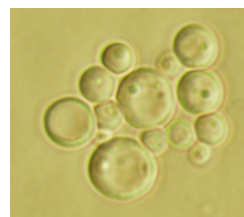
A



B



C



**31. ábra:** (A) 11-80, (B) 11-78, (C) 11-3 élesztősejtek

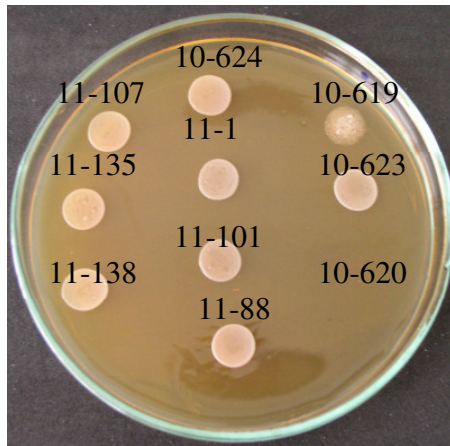


**32. ábra:** 10-620 élesztősejtek

Morfológiájukat tekintve a *C. stellata* törzsek kerek (27.B. ábra, 29.B. ábra), a *C. zemplinina* törzsek, pedig inkább apró ovális sejtekkel rendelkeznek (27.A., 28.C., 30.A., 30.B. ábra). Hozzájuk hasonlóak a *C. lactis-condensi* sejtek (29.C. ábra). A *C. davenportii* (28.B. ábra) és *C. bombi* (29.A. ábra) sejtjei valamivel nagyobb oválisak, a *St. bombycola* nagy kerek sejtekkel rendelkezik (28.A. ábra). A nem-*Candida* izolátumok morfológiailag és fiziológiailag is jól elkülöníthetőek (31-32. ábra).

### 5.6.3. Növekedési és asszimilációs tesztek

A vizsgált törzsekről kapott eredményeket a **2. mellékletben** foglaltuk össze. Ott tüntetjük fel az 1%-os ecetsav-tolerancia eredményeit is. Néhány törzs esetében készült fényképet a **33. ábrán** mutatunk be.

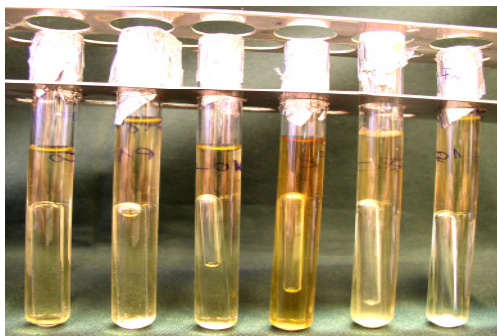


**33. ábra:** 1%-os ecetsav-tolerancia

### 5.6.4. Fermentációs képesség vizsgálata

A fermentációs képesség vizsgálatához csak a *Candida* és *Starmerella* törzseket használtuk fel. Vizsgálataink eredményeit a **15. táblázatban** foglaltuk össze. A táblázatban az első érték jelenti a 25°C-os, a második pedig a 16°C-os eredményt. A **34. ábrán** mutatjuk be a fermentációs képesség értékelésének módját. Galaktóz, maltóz, melibióz, laktóz, cellobióz, keményítő, xilóz, trehalóz és melezitóz esetében negatív eredményeket kaptunk minden vizsgált izolátumnál. A 11-17 törzs fermentálta a trehalózt is.

1 2 3 4 5 6



**34. ábra:** Fermentációs képesség értékelésének módja. Jelölések magyarázata:

(1) -, (2) +, (3) 3+, (4) 4+, (5) 5+, (6) 6+

**15. táblázat:** 25°C-os (első érték), valamint 16°C-os (második érték) fermentáció eredményei

Törzsk. szám	glükóz	fruktóz	szacharóz	raffinóz
S288c	4+/6+	5+/6+	5+/6+	4+/-
10-372 <sup>T</sup>	3+/6+	5+/6+	4+/2+	5+/-
10-432 <sup>T</sup>	2+/5+	3+/6+	2+/6+	2+/-
10-619	6+/6+	5+/6+	6+/6+	3+/+
10-623	6+/5+	5+/6+	4+/6+	2+/+
10-624	4+/6+	3+/6+	4+/6+	4+/+
11-1	3+/6+	5+/6+	5+/5+	3+/+
11-4	5+/4+	6+/4+	5+/2+	2+/-
11-6	5+/6+	6+/6+	6+/6+	4+/-
11-7	5+/4+	6+/5+	6+/6+	3+/-
11-8	5+/6+	5+/5+	6+6+	4+/-
11-9	6+/+	5+/6+	6+/3+	2+/-
11-10	6+/6+	6+/6+	6+/6+	2+/-
11-16	4+/6+	4+/6+	2+/6+	-/-

15. táblázat: Folytatás az előző oldalról

Törzsk. szám	glükóz	fruktóz	szacharóz	raffinóz
11-17	6+/4+	6+/6+	6+/6+	3+/-
11-18	+/2+	2+/5+	+6/+	+/+
11-19	3+/6+	6+/3+	4+/6+	-/-
11-20	+/5+	3+/4+	2+/6+	-/-
11-27	4+/5+	5+/6+	3+/2+	-/-
11-28	2+/+	+/6+	2+/6+	-/-
11-29	5+/6+	6+/6+	3+/6+	2+/+
11-30	2+/+	+/+	2+/+	+/+
11-31	+/+	+/2+	+/+	+/-
11-32	+/+	4+/2+	4+/5+	-/2+
11-60	2+/2+	5+/3+	4+/6+	-/-
11-62	6+/6+	6+/2+	5+/3+	-/-
11-64	6+/6+	6+/+	6+/2+	4+/-
11-66	2+/3+	+/3+	+/6+	-/-
11-67	3+/3+	4+/+	4+/2+	2+/-
11-68	2+/4+	3+/2+	3+/2+	+/-
11-69	+/+	2+/4+	+/6+	-/-
11-70	2+/5+	3+/4+	2+/3+	-/-
11-72	6+/+	6+/6+	6+/2+	-/-
11-73	6+/6+	6+/6+	6+/3+	3+/-
11-74	5+/+	5+/+	3+/2+	+/-
11-75	4+/6+	5+/6+	+/6+	2+/-
11-76	6+/2+	5+/6+	6+/+	-/-
11-88	3+/5+	+/5+	2+/5+	3+/-
11-101	+/3+	+/6+	2+/6+	+/-
11-107	+/6+	+/5+	+/6+	+/+
11-112	3+/+	3+/+	2+/6+	+/-
11-113	2+/5+	2+/6+	3+/5+	+/-
11-114	2+/+	3+/5+	2+/4+	+/-
11-115	+/5+	+/6+	2+/5+	+/-
11-116	+/+	+/6+	4+/6+	+/-
11-118	3+/6+	+/5+	3+/6+	-/-
11-119	2+/5+	2+/6+	+/6+	+/+

15. táblázat: Folytatás az előző oldalról

Törzsk. szám	glükóz	fruktóz	szacharóz	raffinóz
11-120	2+/5+	2+/6+	3+/6+	+/+
11-121	+/5+	3+/5+	2+/6+	2+/-
11-122	+/5+	+/5+	+/6+	+/-
11-123	2+/5+	5+/6+	4+/6+	3+/+
11-124	2+/5+	5+/5+	4+/3+	2+/+
11-125	3+/4+	2+/6+	2+/4+	-/-
11-127	3+/6+	2+/6+	3+/6+	2+/+
11-128	2+/6+	3+/5+	3+/6+	2+/2+
11-135	3+/5+	2+/6+	3+/6+	+/-
11-138	3+/6+	+/4+	+/5+	+/+
11-142	+/2+	5+/+	3+/6+	+/-
11-144	5+/6+	5+/6+	4+/6+	4+/-
11-145	2+/5+	+/6+	+/6+	3+/-
11-146	2+/+	5+/5+	3+/6+	+/-
11-147	3+/4+	5+/6+	+/6+	2+/-
11-148	4+/+	3+/6+	4+/6+	2+/-
11-149	4+/6+	4+/+	4+/5+	2+/-
11-150	2+/+	5+/6+	5+/5+	3+/-
11-151	3+/5+	4+/5+	5+/+	3+/-
11-152	2+/6+	3+/3+	4+/6+	2+/-
11-153	3+/3+	4+/6+	5+/2+	2+/-

Az általunk a tokaji borvidéken, szőlőről és borból izolált *C. zemplinina* törzsekről elmondható, hogy 16°C-on nem, vagy csak nagyon kis mértékben fermentálták a raffinózt, míg 25°C-on két törzset leszámítva kis mértékben mindegyik. A törzsek döntő többsége a glükózt, fruktózt és szacharózt 16°C-on aktívabban fermentálta, mint 25°C-on.

A más területekről származó *C. zemplinina* törzsek esetében törzsenként változó a glükóz, fruktóz, szacharóz fermentáció mértéke, közel egyforma a két hőmérsékleten, vagy törzsenként változó. Raffinóz esetében ezek sem fermentálnak 16°C-on, vagy csak minimális mértékben.

Általunk vizsgált két *C. stellata* törzs (10-432<sup>T</sup>, 11-16), szintén 16°C-on fermentálta jobban a glükózt, fruktózt és szacharózt. Míg a típus törzs pozitív eredményt adott 25°C-on raffinózra, 16°C-on pedig negatív, addig a 11-16-os törzs egyik hőmérsékleten sem mutatott aktivitást raffinózra. A 10-619-es *C. stellata* törzs közel egyformán fermentálta a négy cukrot, a két hőmérsékleten.

A vizsgált 11 *St. bombicola*, 5 *C. lactis-condensi*, egy *C. davenportii* (11-7), valamint *C. bombi* (11-17) törzsnél hasonló megállapításra jutottunk. Törzsenként és hőmérsékletenként változik a glükóz, fruktóz, szacharóz és raffinóz fermentációja. A *C. bombi* (11-17) az összes többi törzsszel ellentétben fermentálta még a trehalózt is, mindkét hőmérsékleten.

## 5.7. Fiziológiai vizsgálatok eredményei

### 5.7.1. Kénhidrogén-termelés, valamint savtermelés vizsgálata

A két vizsgálat eredményeit a **16. táblázatban** foglaljuk össze. A táblázatban 'I.' a savtermelés eredményeit jelöli, a 'II' pedig a kénhidrogén-termelését. Az eredményekről készült felvételeket a **3.**, valamint **4. számú mellékletekben** mutatjuk be. A kénhidrogén-termelés tekintetében 1-től 6-ig (fehér-fekete) terjedő skálán jelöltük a színintenzitást, a savtermelés esetében milliméterben adtuk meg a telep körüli zóna szélességét.

**16. táblázat:** A sav- (I.) és kénhidrogén-termelési (II.) vizsgálatok eredményei

Törzsek	25°C, 10 nap		16°C, 10 nap	
	I. (mm)	II. (szín)	I. (mm)	II. (szín)
S288c	1	5	0,5	4
10-198 <sup>T</sup>	1	6	0,5	5
10-372 <sup>T</sup>	5	6	3	6
10-432 <sup>T</sup>	2	6	2	5
10-619	5	5	2	4
10-623	2	6	1	6
10-624	2	6	1	6
11-1	2	6	1	6
11-4	4	6	1	6
11-101	2	6	1	6
11-88	3	6	1	6
11-107	2	6	0,5	6
11-135	3	6	1	6

**16. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

Törzsek	25°C, 10 nap		16°C, 10 nap	
	I. (mm)	II. (szín)	I. (mm)	II. (szín)
11-138	2	6	1	6
11-112	2	6	0,5	6
11-113	3	6	1	6
11-114	2	6	1	6
11-115	1	6	0,5	6
11-116	1	6	0,5	6
11-118	1	6	0,5	6
11-119	2	6	1	6
11-122	1	6	0,5	6
11-123	2	6	0,5	6
11-124	2	6	1	6
11-125	1	6	1	6
11-120	2	6	1	6
11-121	1	6	0	6
11-127	1	6	0,5	6
11-128	3	6	1	6
11-144	3	6	1	6
11-145	2	6	0,5	6
11-146	2	6	0	6
11-147	6	6	4	6
11-148	1	6	0	6
11-149	3	6	2	6
11-150	1	6	0,5	6
11-151	4	6	2	6

**16. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

Törzsek	25°C, 10 nap		16°C, 10 nap	
	I. (mm)	II. (szín)	I. (mm)	II. (szín)
11-152	3	6	1	6
11-153	2	6	1	6
11-142	3	5	0,5	4
11-27	2	5	0	4
11-29	1	5	0	4
11-32	3	5	0	4
11-28	2	5	0,5	4
11-31	2	6	0,5	4
11-76	5	6	5	6
11-30	2	6	0,5	6
11-6	1	6	0	6
11-8	1	6	0	6
11-7	4	6	3	5
11-10	4	6	2	6
11-9	2	6	1	6
11-18	4	6	1	6
11-17	9	6	7	6
11-20	6	6	3	6
11-19	3	6	1	6
11-60	2	6	0	5
11-62	5	6	4	6
11-64	4	6	3	6
11-66	2	6	4	6
11-67	5	6	3	6

**16. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

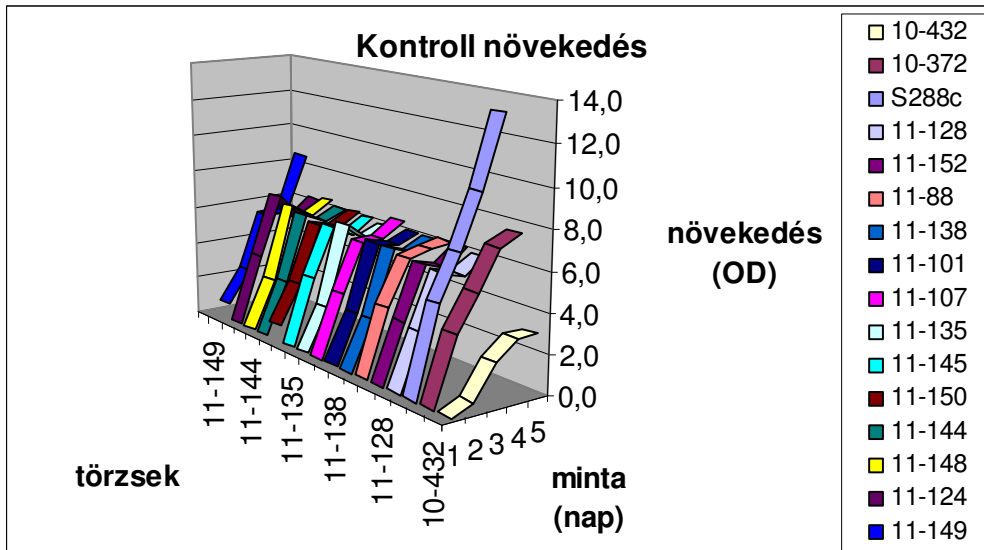
Törzsek	25°C, 10 nap		16°C, 10 nap	
	I. (mm)	II. (szín)	I. (mm)	II. (szín)
11-68	5	6	4	6
11-69	5	6	4	6
11-70	5	6	5	6
11-71	5	6	5	6
11-72	5	6	4	6
11-73	5	6	4	6
11-74	8	6	7	6
11-75	2	6	0,5	6

Vizsgálataink során törzsenként változó eredményeket kaptunk a két vizsgált hőmérsékleten. A *C. zemplinina* törzsek 1-6 mm nagyságú kioltási zónát hoztak létre maguk körül 25°C-on, és 0-4 mm-eset 16°C-on. A *C. stellata* típustörzshöz (10-432<sup>T</sup>) képest a 10-619 és 11-71-s *C. stellata* törzsek nagyobb mennyiségű savat termeltek 25°C-on, 16°C-on, pedig a 11-71-s adott nagyobb zónát. A *St. bombicola* törzsekre nagyobb mennyiségű savtermelés jellemző (25°C-on 2-8mm, 16°C-on 3-7 mm) mint a *C. zemplinina*, és *C. lactis-condensi* (25°C-on 1-3mm, 16°C-on 0-0,5 mm) törzsekre.

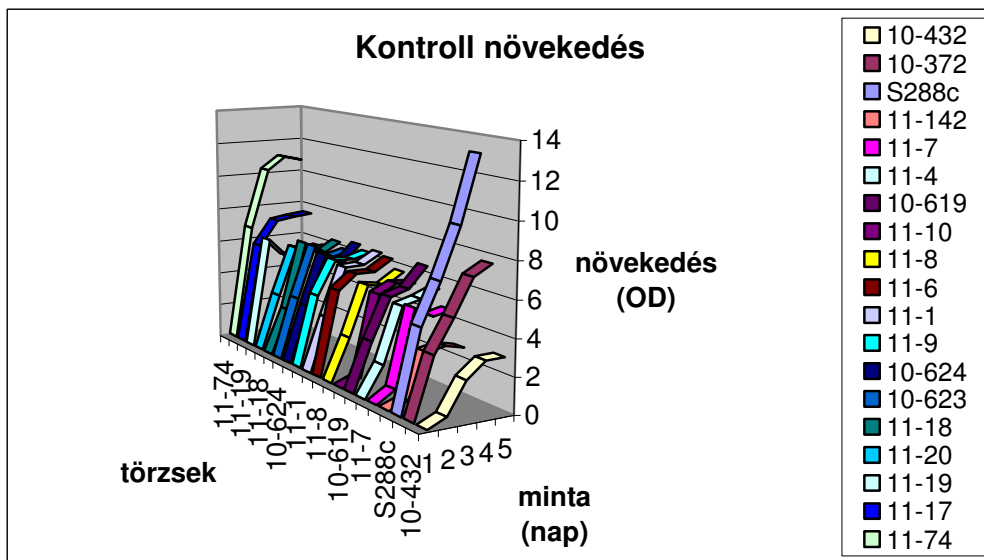
**5.7.2. Alkoholtolerancia vizsgálata**

A kísérleteket néhány saját *C. zemplinina* izolátummal, valamint az egyéb *Candida* fajok közül egy-egy törzsszel végeztük el. Három kontrolltörzs (S288c, 10-372<sup>T</sup>, 10-432<sup>T</sup>) esetében is meghatároztuk a növekedést. Eredményeinket a **35-40. ábrákon** mutatjuk be.

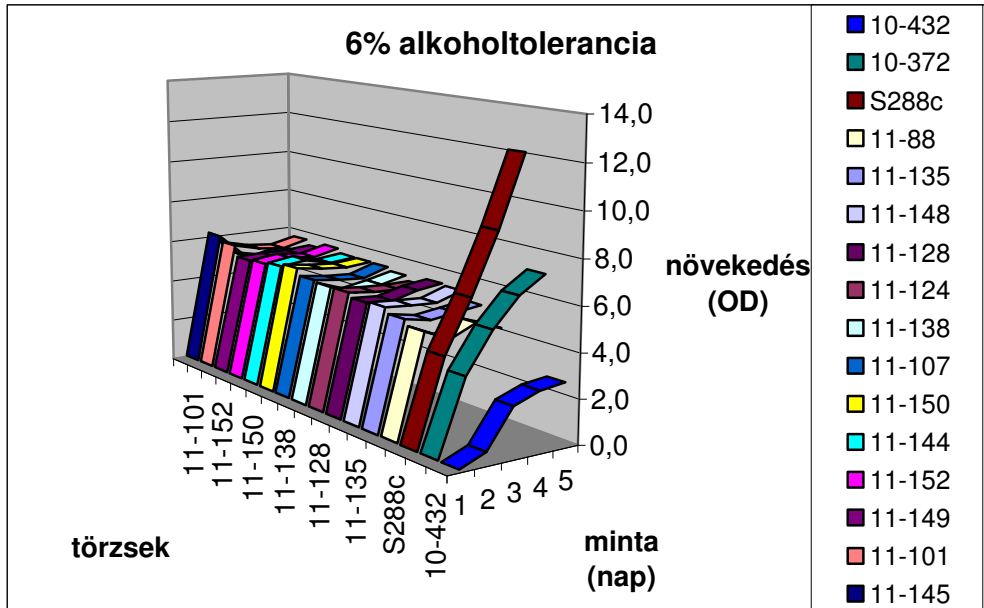
A vizsgált élesztőtörzsek YEPL oldatban való növekedését a **35-36. ábrán** szemléltetjük.



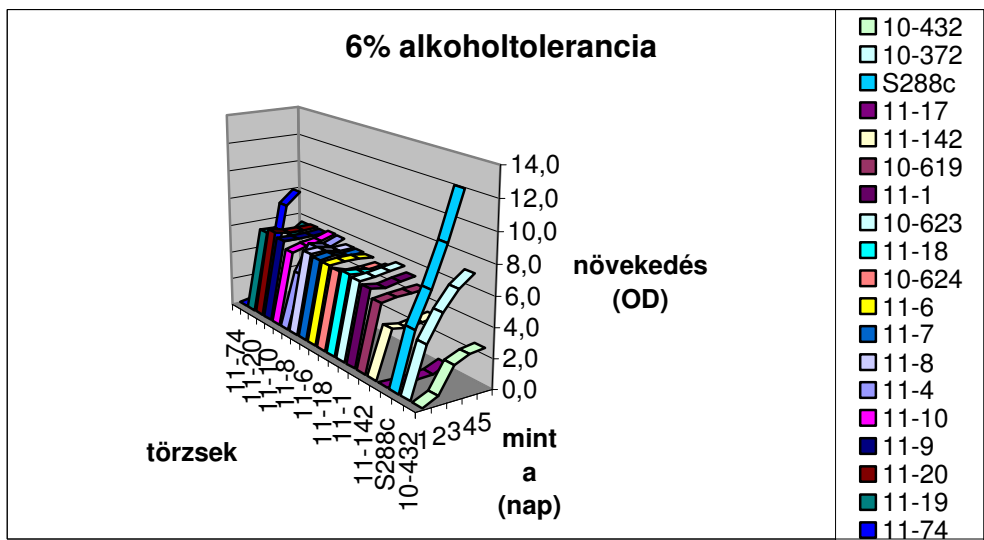
35. ábra: A típus törzsek és saját *C. zemplinina* izolátumaink növekedése YEPL táptalajban, 25°C-on



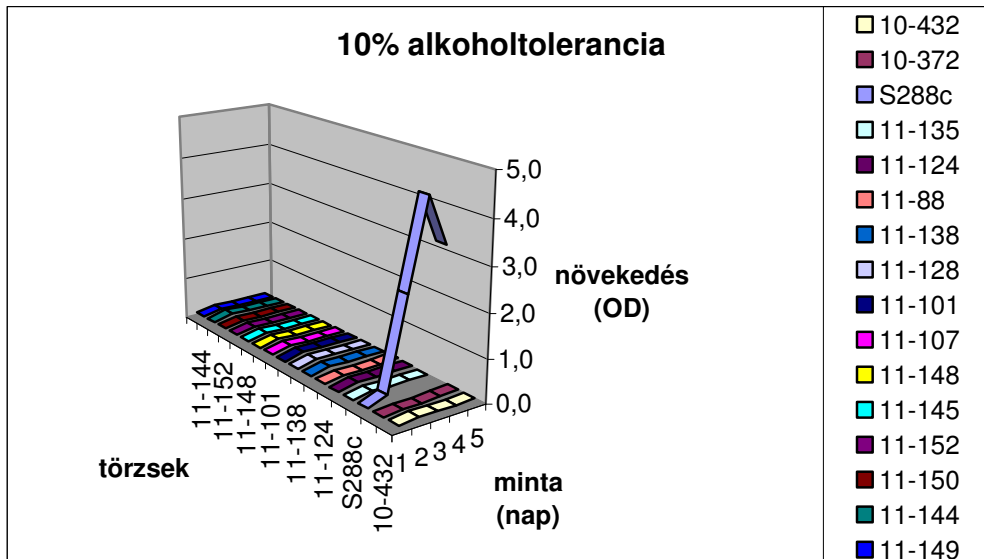
36. ábra: A típus törzsek és egyéb *Candida* törzsek növekedése YEPL táptalajban, 25°C-on



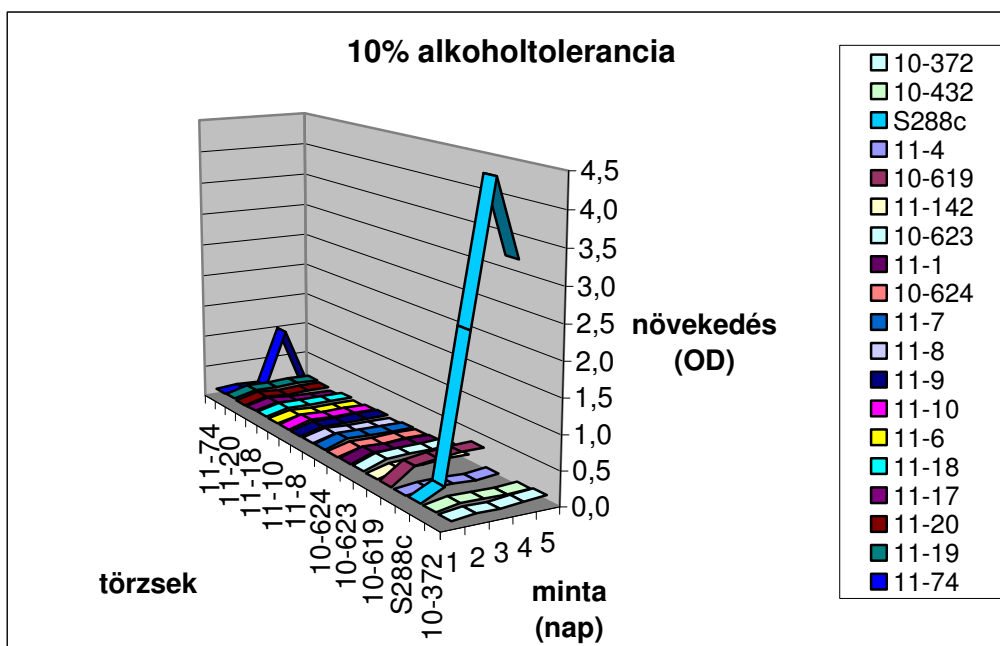
37. ábra: A típusörzsek és saját *C. zemplinina* izolátumaink 6%-os alkoholtoleranciája 25°C-on



38. ábra: A típusörzsek és egyéb *Candida* törzsek 6%-os alkoholtoleranciája 25°C-on



**39. ábra:** A típus törzsek és saját *C. zemplinina* izolátumaink 10%-os alkoholtoleranciája 25°C-on



**40. ábra:** A típus törzsek és egyéb *Candida* törzsek 10%-os alkoholtoleranciája 25°C-on

YEPL oldatban történő, kontroll növekedés során a *C. zemplinina* törzsek növekedése kisebb mértékű volt, mint a típus törzsé (10-372<sup>T</sup>) (**35-36. ábra**). A 11-149-es izolátumunk, valamint a vizsgált *C. bombi* törzsek viselkedtek azzal megegyezően. A 11-74-es *St. bombicola* növekedési üteme jóval meghaladta a *C. zemplinina* törzsekét, közelített a *S. cerevisiae* kontrolltörzséhez (S288c). A 11-142-es *C. lactis-condensi* izolátumunk mutatott a *C. stellata* típus törzsszel (10-432<sup>T</sup>) egyező lassú, gyenge növekedést (**36. ábra**).

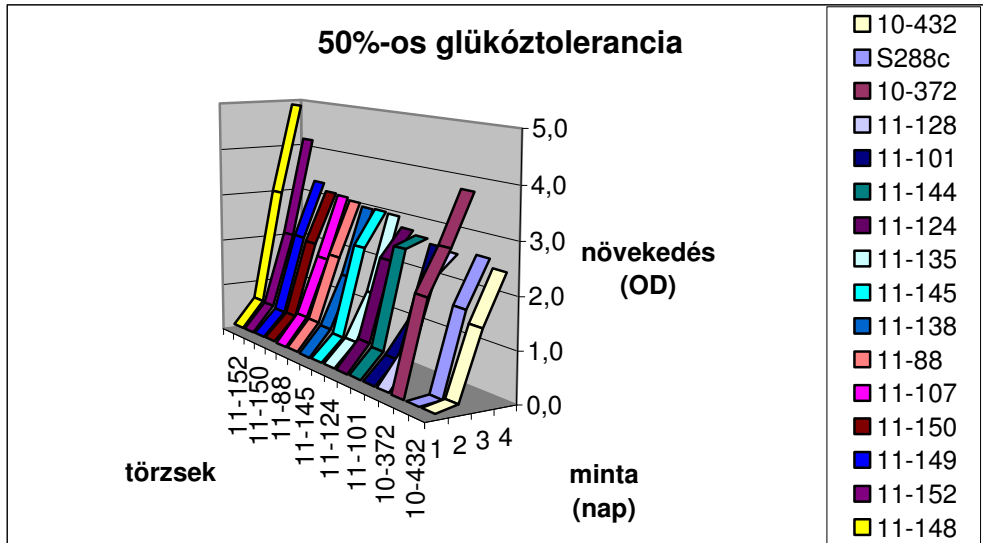
6% alkoholt tartalmazó YEPL táptalajban a *C. bombi* törzs (11-17) már nem növekedett, valamint a *C. stellata* típus törzs (10-432<sup>T</sup>) és a 11-142 *C. lactis-condensi* törzs növekedési üteme csökkent le (**38. ábra**).

8% alkohol tartalom leállította a *C. stellata* típus törzs (10-432), a *C. lactis-condensi* (11-142), *St. bombicola* (11-74) és a *C. bombi* (11-17) növekedését. A *C. zemplinina* törzsek a *S. cerevisiae* (S288c) kontrolltörzshöz hasonlóan mind növekedtek.

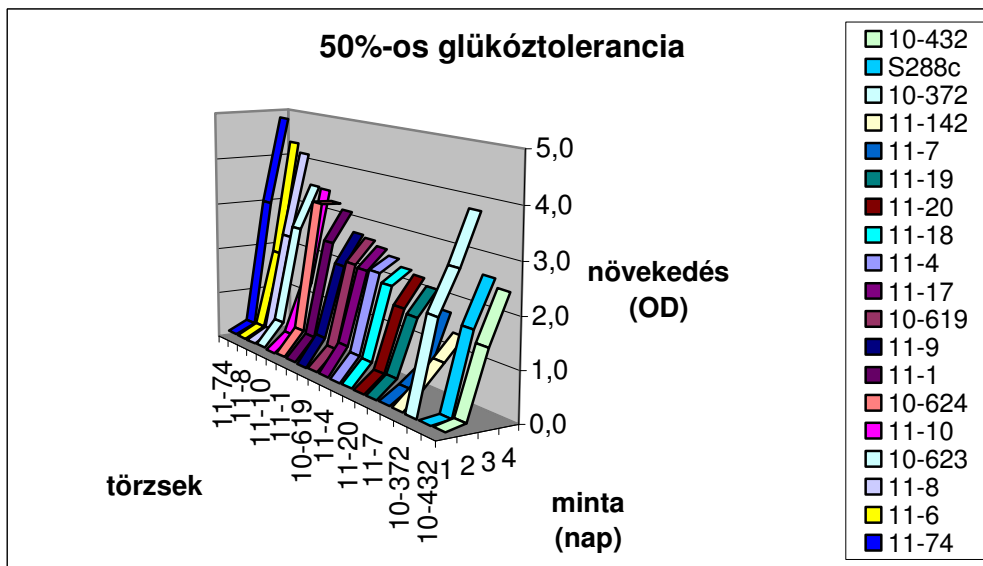
Teljes növekedés gátlás 10% alkohol tartalom esetében állt be a *C. zemplinina* törzsek esetében is (**39-40. ábra**).

### 5.7.3. Cukortolerancia

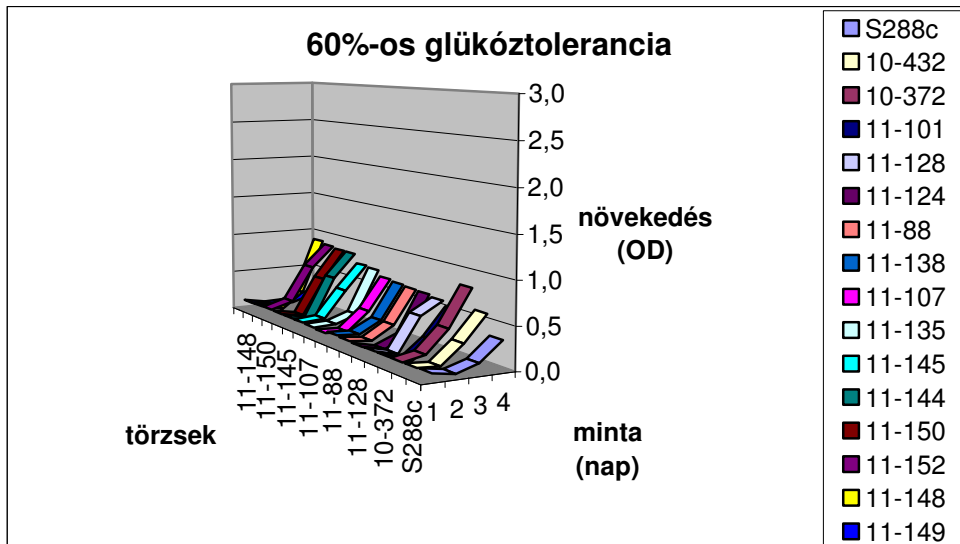
A kísérleteket néhány saját *C. zemplinina* izolátummal, valamint az egyéb *Candida* fajok közül egy-egy esetben végeztük el. Három kontrolltörzs (S288c, 10-372<sup>T</sup>, 10-432<sup>T</sup>) esetében is meghatároztuk a növekedést. Eredményeinket a **41-44. ábrákon** mutatjuk be.



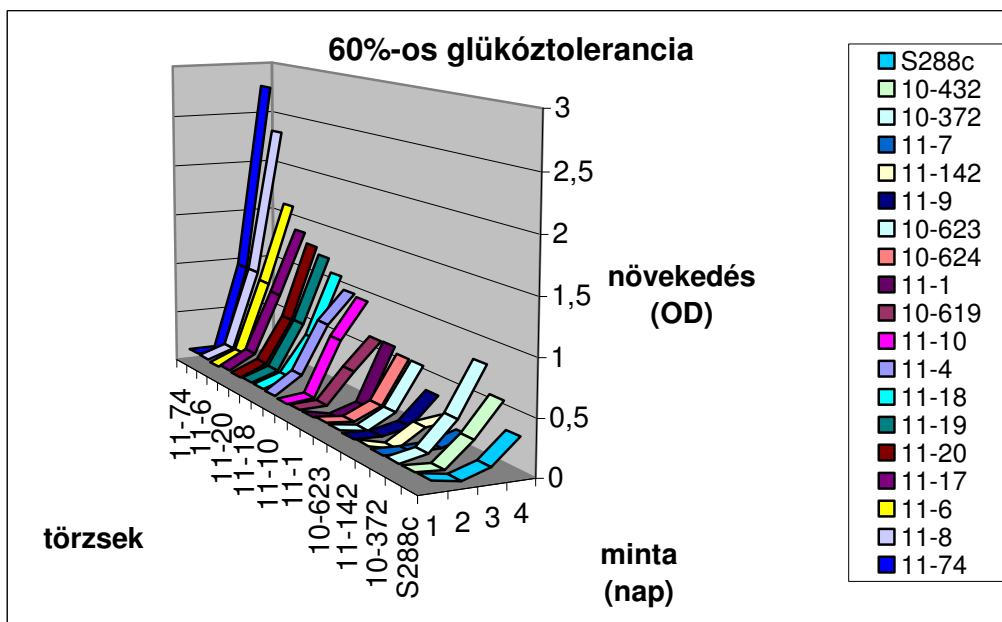
41. ábra: A típus törzsek és saját *C. zemplinina* izolátumaink 50%-os glükóztoleranciája 25°C-on



42. ábra: A típus törzsek és egyéb *Candida* törzsek 50%-os glükóztoleranciája 25°C-on



43. ábra: A típustörzsek és saját *C. zemplinina* izolátumaink 60%-os glükóztoleranciája 25°C-on



44. ábra: A típustörzsek és egyéb *Candida* törzsek 60%-os glükóztoleranciája 25°C-on

50-60%-os glükóz koncentráció mellett a *C. zemplinina* törzsek jobban nőnek, mint a *C. stellata* típus törzs (10-432<sup>T</sup>) (**43-44. ábra**). A 11-6, 11-8, 11-152, 11-148-as *C. zemplinina* törzsek jobban tolerálják az 50%-os glükózt a 10-372<sup>T</sup>-s típus törzsnél, mint ahogy a 11-74-es *St. bombicola* is (**41-42. ábra**). 60% glükóz mellett még tapasztaltunk növekedést a *C. zemplinina* törzseknél, kifejezetten a 11-6 és 11-8-as törzseknél, de a vizsgált fajok közül a *St. bombicola* (11-74) törzs bizonyult a legzmotoleránsabbnak (**44. ábra**). A *S. cerevisiae* (S288c), *C. lactis-condensi* (11-142) és a *C. davenportii* (11-7) törzsek tolerálták legkevésbé a magas cukortartalmat (**41-44. ábra**).

A tolerancia vizsgálatok során a 10-619-es *C. stellata* törzs a *C. zemplinina* törzsekkel mutatott hasonlóságot.

## 6. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Munkánk során a hangsúlyt az aszúsodás folyamatát végigkísérő élesztőbióta feltérképezésére fektettük. A vizsgálatainkkal szerettünk volna a Tokaji borvidéken hasonló témából származó néhány adatot kiegészíteni és tovább bővíteni.

A minták gyűjtésének helyéül a Tokaj Kereskedőház Rt. két, legjobb borait adó szőlőterületét választottuk ki. Mind a Király, mind a Szarvas dűlőről említést tesz a Tokaj-Hegyaljai Album 1867-es kiadásában Szabó és Török, mint főúri birtokokról. A Bakonyi dűlő a kutatóintézet területén található kísérleti ültetvény.

A minták különböző feldolgozási módjai eltérő eredményeket adtak. Lényegesen több élesztőtörzset tudunk izolálni a 20 órás tápfolyadékból ('B' minta), mint az azonnali ('A' minta) feldolgozás után. Ezt nyilván az okozza, hogy a tápanyagdús környezetben elszaporodtak az élesztők. Az izolálást nagyban nehezítette a különböző penészgombák nagy aránya a DMSO adagolása ellenére, mely a növekedésüket gátolná.

A meghatározásokat konvencionális taxonómiai tesztekkel kezdtük. Az izolátumokat replikázási módszerrel SMA, valamint YEPA táptalajokra oltottuk, és vizsgáltuk, hogy képesek-e hasznosítani az adott tápanyagforrást, illetve képesek-e 37°C-on növekedni. A klasszikus növekedési tesztek során a törzsek variabilitása és a korlátolt számú teszt miatt pontos meghatározást nem tudtunk végezni. Támponként szolgált viszont, hogy a *Saccharomyces* törzsek nem képesek a lizint hasznosítani, a *C. stellata* törzsek csak a szacharózt, glükózt, raffinózt és a lizint képesek asszimilálni, a *H. uvarum* törzsek, pedig cellobiózt és lizint hasznosítanak anyagcsere folyamataik során (Kreger-van Rij, 1984; Barnett és mtsi., 1990). Izolátumaink jelentős része ez utóbbi kettővel egyezett meg. Az izolátumok egy része nem növekedett lizint tartalmazó SMA táptalajon, de narancssárga színük alapján kizárható volt, hogy

esetleg valamely *Saccharomyces* fajba tartoznának. A többi izolátum tekintetében többek között a morfológiai jellemzők adtak támpontot. Voltak piros, narancssárga pigmentű törzsek, rózsaszín, hívaképző telepek, valamint fehér, krémes izolátumok, melyek közé számtalan élesztőfaj tartozhat.

A konvencionális tesztek alapján összeállított csoportokból kiválasztott reprezentáns törzseknél megfigyeltük a spórázási képességeket K-acetátos, YM, malátaextraktos és burgonya-dextróz táptalajokon.

Az eredmények alapján minden csoportból véletlenszerűen kiválasztottunk néhány törzset a faji hovatartozás egyértelmű meghatározására alkalmas molekuláris vizsgálatokhoz. Elvégeztük ezen törzsek PCR-RFLP analízisét. Az eredmények kiértékeléséhez Guillamon és munkatársai (1997), Granchi és munkatársai (1999), Clemente-Jimenez és munkatársai (2004), valamint Sipiczki (2004) által megadott adatokat használtuk fel. Öt restriktív endonukleáz - *Hinf*I, *Hae*III, *Dra*I, *Eco*RI és *Mbo*I - alkalmaztunk a kísérletekhez a minél pontosabb eredmények érdekében.

Az elvégzett taxonómiai vizsgálatokat egybe vetve a konvencionális módszerek eredményei sok megválaszolendő és pontosítandó kérdést vetettek fel. A szakirodalmi eredményekhez (Kreger-van Rij, 1984; Barnett és mtsi., 1990; Kurtzman és Droby, 2001; Sipiczki, 2003; Péter és mtsi., 2005; Molnár és Prillinger, 2005; <http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>) képest bizonyos esetekben eltérést tapasztaltunk az asszimilációs képességek tekintetében, például a *M. fructicola*, *Cr. magnus*, *Cr. adeliensis*, *Cr. albidosimilis* és *Rh. nothofagi* izolátumok és típus törzseik között. A korlátozott számú teszt miatt az általunk izolált fajok, illetve a hozzájuk filogenetikailag közel álló fajok fiziológiai tulajdonságai nem tértek el kellő mértékben. Emiatt a konvencionális vizsgálatok alapján nem lehetett pontosan megadni a faji hovatartozásukat.

Gyors és viszonylag pontos eredményt a rRNS-t kódoló kromoszómális régió ITS1-5.8S rRNS-ITS2 szakaszának PCR-RFLP vizsgálatával lehet elérni. Viszont ennek a módszernek a feltétele, hogy irodalmi adatok álljanak

rendelkezésre, amik a bazidiomicéták esetében sajnos még hiányosak. A szakirodalomban, csupán Esteve-Zaroso és mtsi. (1999) által leírtakra támaszkodhatunk. További hátránya a módszernek, hogy a gélelektroforézis során nyert PCR-RFLP mintázatok pontos, méretbeni megadása nagyon nehézkes és pontatlan a megfigyeléseink alapján. Ezen nehézségek miatt az élesztőtörzsek pontos faji hovatartozásának és a fajok filogenetikai kapcsolatainak megállapításához, a 26S rRNS D1/D2 doménjét kódoló kromoszómális szakasz szekvencia elemzését is elvégeztük. A hasonlóságkeresés során számos szekvenciát azonosítottunk, melyek nagymértékben hasonlóak voltak. Ezek alapján kikerestük az adatbázisokban az adott faj típusörzsének 26S rRNS szekvenciáját és elvégeztük a típusörzs és a mi törzsünk szekvenciájának összehasonlítását. 15 faj törzseit különítettük el.

Ezek a *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *M. fructicola*, *M. viticola*, *C. zemplinina*, *C. sorbosivorans*, *Cr. magnus*, *Cr. adeliensis*, *Cr. albidosimilis*, *Cr. flavescens*, *Rh. glutinis*, *Rh. nothofagi*, *R. kratochvilovae*, valamint az *A. pullulans*.

A *H. uvarum* (anamorf: *K. apiculata*) élesztőfaj az *Ascomycota* (Tömlősgombák) tagozatba, a *Saccharomycetes* (*Hemiascomycetes*) osztályba, a *Saccharomycetales* rendbe és a *Saccharomycodaceae* családba tartozik ([www.yeast-taxonomy.jp](http://www.yeast-taxonomy.jp)). Az általunk izolált és meghatározott *Hanseniaspora/Kloeckera* törzsek morfológiai és asszimilációs eredményei megfelelnek a szakirodalomban megadott tulajdonságoknak (Kreger-van Rij, 1984; Barnett és mtsi., 1990; <http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>). A telepek fehérek, vegetatív szaporodásuk sarjadzással történik, citrom alakú sejtek és 1-2 kalapformájú spóra jellemző rájuk. Szénforrásként cellobiózt, nitrogénforrásként lizint asszimilálnak az általunk vizsgált anyagok közül.

A *L. thermotolerans* (korábban: *Kl. thermotolerans*) a *Saccharomycetales* rendbe és a *Saccharomycetaceae* családba tartozik. Kurtzman (2003) vizsgálatai alapján a *Kt. thermotolerans* fajt a *Lachancea* genusba sorolta.

Tulajdonságaikat tekintve, krémes, vajszerű telepek, vegetatív szaporodása sarjadzással történik, 1-2 kerek spórát tartalmazó aszkusz, valamint sejt-sejt konjugáció jellemző izolátumainkra. A 18.5.1. izolátum nem hasznosítja a galaktózt és a glicerint, a többi vizsgált esetben megegyeznek az irodalmi adatokkal (Kreger-van Rij, 1984; Barnett és mtsi., 1990; <http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>).

A *M. pulcherrima* (anamorf: *C. pulcherrima*) faj a *Saccharomycetales* rendbe és a *Metschnikowiaceae* családba tartozik (<http://www.yeast-taxonomy.jp>). Piros, diffúzibilis pigmentet termelő telepek, klamidospórák („pulcherrima” sejtek), 1-2 gombostüszzerű aszkusz jellemző törzseinkre.

A *M. fructicola* filogenetikailag nagyon közel áll a *M. pulcherrima*-hoz (Kurtzman és Droby, 2001). Morfológiai és fiziológiai tulajdonságaikat tekintve elkülönítésük nagyon nehéz és időigényes. Az irodalmi adatok alapján (Kurtzman és Droby, 2001; Molnár és Prillinger, 2005) a 37°C-on való növekedés (*M. fructicola* nő, a *M. pulcherrima* nem) szolgálhat az elkülönítésükre. Mindkét faj potenciális biokontroll ágens a gombás rothadási folyamatok során, így a *B. cinerea*-ra is hatást gyakorolnak (De Curtis és mtsi., 1996; Piano és mtsi., 1997; Kurtzman és Droby, 2001; Sipiczki, 2006).

*M. viticola* (anamorf: *C. cofuensis*) szintén a *Metschnikowia* genusba tartozik ([www.yeast-taxonomy.jp](http://www.yeast-taxonomy.jp)). Morfológiailag jól elkülöníthető az előző két fajtól. Izolátumaink krémes színűek, nem termelnek pulcherrimin pigmentet, 1:9 hígítású burgonya-dextrózos táptalajon konjugáló sejteket és gombostüszzerű spórákat hoztak létre. A PCR-RFLP eredményeink segítségével is elkülöníthető az előző két fajtól. Fiziológiai vizsgálataink eredményei megegyeznek a szakirodalomban megadott adatokkal (Péter és mtsi., 2005).

A *C. zemplinina* szintén a *Saccharomycetales* rendbe tartozik, anamorf (imperpekt) élesztőgomba, melynek szaporodása folyamán ivaros folyamatok nem figyelhetők meg (<http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>). Morfológiájukat tekintve krémes telepek és ovális sejtek jellemzik törzseinket, vegetatív

szaporodásuk sarjadzással történik. Szénforrásként a szacharózt, glükózt, raffinózt, nitrogénforrásként a lizint hasznosítják törzseink. A *C. stellata*-val ellentétben a *C. zemplinina* törzsek rendelkeznek 1%-os ecetsav toleranciával (Csoma és Sipiczki, 2008). A 2002, 2003-s izolátumok esetében nem vizsgáltuk az 1%-os ecetsav toleranciát. Azonban a random módon kiválogatott *Candida* izolátumok, valamint a 2004-ben izolált törzsek mindegyike pozitív eredmény adott, illetve a rRNS 26S szekvencia elemzése alapján is *C. zemplinina*-nak bizonyult (lásd később).

A *C. sorbosivorans* a *Saccharomycetales* rendbe tartozik és nem ismert a teleomorf alakja (James és mtsi., 2001). Törzseinknek krémszínű telepei, kerek sejtjei vannak, vegetatív szaporodásuk sarjadzással történik. Az elvégzett fiziológiai vizsgálatok eredményei megegyeznek a típustörzsével (CBS 8768<sup>T</sup>) (James és mtsi., 2001).

A következő *Cryptococcus*, *Rhodotorula* és *Rhodospiridium* fajok a *Basidiomycota* tagozatba tartoznak.

A *Cr. magnus* a *Hymenomyces* osztályba és Fell és mtsi (2000) vizsgálatai alapján a *Filobasidiales* rendbe tartozik. A telepek krémesek, a sejtek oválisak, vagy kerek, vegetatív szaporodásuk sarjadzással megy végbe, megfigyeléseink alapján. Az általunk vizsgált törzsek, és a szakirodalomban található eredmények (Kreger-van Rij, 1984; Barnett és mtsi., 1990) között különbség van a mannit, ramnóz, glicerin, nitrát és vitaminmentes tápközegben való növekedés tekintetében.

A *Cr. adeliensis* szintén a *Filobasidiales* rendbe tartozik (Fell és mtsi 2000). Krémes telepek, kerek sejtek, sarjadzással történő vegetatív szaporodás jellemzi törzseinket. Élettani tulajdonságaikat tekintve eltérést találtunk a szacharóz, maltóz, mannit, melibióz, valamint a lizin hasznosításban a típustörzshöz képest (Scorzetti és mtsi., 2000; <http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>).

*Cr. albidosimilis* is a *Filobasidiales* rendbe tartozik (Fell és mtsi., 2000). Törzseinkre krémes színű telepek, kerek sejtek és sarjadzó vegetatív sejtek

jellemzőek. A mi izolátumaink növekedtek glicerinen és vitaminmentes táptalajon, míg a típusörzs (CBS 7711<sup>T</sup>) ezen esetekben negatív eredményt adott (<http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>).

*Cr. flavescens* (*Torula flavescens*) a *Hymenomyces* osztályba és a *Tremellales* rendbe tartozik (Fell és mtsi., 2000; Takashima és mtsi., 2003; [www.yeast-taxonomy.jp](http://www.yeast-taxonomy.jp)). Korábban a *Cr. laurentii* szinonimájaként tartották számon, de valójában egy különálló faj (Takashima és mtsi., 2003). A telepe krémes, sejtjei oválisak, vegetatív szaporodása sarjadzással történik (<http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>). Az általunk vizsgált törzsek esetében tapasztaltunk gyenge növekedést 0,1%-os cikloheximid adagolása mellett, a többi vizsgált paraméter esetében egyezést találtunk az irodalmi adatokkal (Takashima és mtsi., 2003; <http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>).

A *Rh. glutinis* az *Urediniomyces* osztályba és a *Sporidiobolus* rendbe tartozik (Fell és mtsi., 2000). A *Rh. glutinis* fajnak két változata van, a *Rh. glutinis* var. *glutinis* (CBS20<sup>T</sup>), ami a típusörzs, és a *Rh. glutinis* var. *dairenensis*. Az izolátumok krémes, rózsaszín színűek, a sejtek oválisak, a vegetatív reprodukció sarjadzással megy végbe, nem találtunk ivaros szaporodásra utaló jelet. Asszimilációs képességeiket tekintve, megegyeznek az irodalmi adatokkal (<http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>; Kreger-van Rij, 1984).

A *R. kratochvilovae* szintén a *Sporidiobolus* rendbe tartozik (Fell és mtsi., 2000). Izolátumaink színe narancssárga, a sejtjeik kerek, vegetatív úton sarjadzanak. Az elvégzett konvencionális tesztek eredményei megegyeznek az irodalmi adatokkal (<http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>).

A *Rh. nothofagi* az *Urediniomyces* osztályba és a *Microbotryum* rendbe tartozik (Fell és mtsi., 2000). A törzseink telepi krémes színűek, sejtjeik oválisak, megnyúltak, vegetatív úton sarjadzanak, nem találtunk ivaros formát. Az asszimilációs tesztekénél eltérést találtunk az irodalmi adatok (<http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>; Kreger-van Rij, 1984) és a mi eredményeink

között a galaktóz, cellobióz, raffinóz, glicerin, mannit, citrát tartalmú táptalajokon való növekedés esetében.

Végül az *A. pullulans*, mely a gombák *Ascomycota* tagozatába, a *Dothideomycetes* osztályba, a *Dothideales* rendbe, valamint a *Dothioraceae* családba tartozik ([www.yeast-taxonomy.jp](http://www.yeast-taxonomy.jp)). Fekete, élesztőszerű gombának is szokták hívni (Barnett és mtsi., 1990; Raspor és mtsi., 2006). A rózsaszín telepek idővel feketék lesznek, illetve az élesztőkhöz hasonló sejtjei nagyok, megnyúltak és oválisak. Törzseink valódi hífákat hoznak létre. A legelterjedtebb szaprofita a levegőben és antagonist hatást gyakorol a szürkepenészre (Schena és mtsi., 2003). A fajmeghatározásban a morfológiai és szekvenciaelemzés eredményeit vettük alapul.

A taxonómiai vizsgálataink egyik érdekes tanulsága, hogy számos fajnál lényeges eltérést találtunk a szakirodalomban megadott határozókulcsok és saját tapasztalataink között. Például a *Cr. magnus*, *Cr. adeliensis* és a *Rh. nothofagi* esetében az izolátumaink a szekvenciaegyezés ellenére jelentős mértékben eltértek a típustörzstől a fiziológiai tulajdonságaikban. A különbségek kétségeket vetnek fel a kulcsok megbízhatóságával kapcsolatban, de legalábbis nagyfokú fajon belüli variabilitásra utalnak.

Célkitűzésünkben utaltunk arra, hogy munkánk kezdetéig a Tokaji borvidéken botrytizált szőlőből készült borok élesztőbiótáját többen is vizsgálták, azonban a botrytizált (nemesenrothadt) szőlők élesztőbiótájáról csak Bene és Magyar (2002) közölt eredményeket. Ezeket 2006-ban egészítették ki (Magyar és Bene, 2006).

Eredményeinket tekintve elmondható, hogy a botrytizált szőlőszemek felületén *M. fructicola* (*M. aff. fructicola*) és *H. uvarum* élesztőtörzsek dominanciája volt szembetűnő, melyeket *L. thermotolerans*, *C. zemplinina*, *A. pullulans* és bazidiomicétesz fajok követtek. Magyar és Bene nem mutattak ki *M. fructicola* törzseket, ezzel szemben a *M. pulcherrima* törzseket dominánsnak találták. Számos *Candida* fajt is találtak, melyek közül mi csak *C. zemplinina*

törzseket izoláltunk. Továbbá nem izoláltak *A. pullulans* törzseket, amiket mi számos esetben kimutattunk. *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* és *Torulaspota* törzseket viszont egyikünk sem mutatott ki botrytizált szőlőszemeken.

A fajmeghatározás Bene és Magyar (2002, 2004), valamint Magyar és Bene (2006) publikációiban konvencionális tesztek elvégzésére épült, Kurtzman és Fell (1998) alapján. Nem történtek molekuláris biológiai vizsgálatok. Számos kutató és mi is utaltunk arra, hogy ezek a tesztek esetenként félrevezethetők is lehetnek. A megfigyeléseinkben található különbségek a módszertani megközelítésünk eltéréseiből adódhatnak.

Az aszúsodás mikrobiológiájának teljes folyamatát, mely az egészséges szőlőtől, a sérültön és a töppedten át a nemesenrothadtig terjed, senki nem vizsgálta rajtunk kívül ezidáig több szőlőültetvényben egyidejűleg. Görögországban végeztek hasonló megfigyelést Nisiotou és Nychas (2007), ők azonban csak egy évben gyűjtöttek egészséges, szürkerothadt és nemesenrothadt szőlőszemeket két vörös szőlőfajtáról. Következtetéseiket molekuláris biológiai módszerekre alapozták. Vizsgálataik során ők is a *H. uvarum* törzseket találták dominánsnak a nemesenrothadt szemeken, melyeket *M. pulcherrima*, egyéb *Hanseniaspora* fajok, *C. zemplinina* és *I. terricola* törzsek követték.

Az egészséges szőlőszemek élesztőbiótáját vizsgáló, legújabb, molekuláris technikákat alkalmazó kutatások (pl. Prakitchaiwattana és mtsi., 2004; Raspor és mtsi., 2006; Nisiotou és Nychas, 2007) szerint, a domináns fajok az *A. pullulans* és a *H. uvarum*, melyeket *Candida*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* és *Rhodospordium* fajok követhetnek. A mi vizsgálataink ezzel összhangban vannak, azzal a kiegészítéssel, hogy mi a *M. fructicola* (*M. aff. fructicola*) törzseket is a domináns élesztők közé soroltuk, míg mások nem tesznek említést az előfordulásukról.

A sérült szőlőszemekben *H. uvarum*, *M. pulcherrima* és *A. pullulans* fajok dominálnak, megfigyelhetők még kisebb számban *C. zemplinina*, *Cryptococcus*, *Rhodospodium*, *Issatchenkia* fajok a molekuláris vizsgálatok eredményei alapján (Prakitchaiwattana és mtsi., 2004; Nishiotou és Nychas, 2007). A mi eredményeink alapján szintén a *H. uvarum*, és *A. pullulans* fajok domináltak, valamint mások megfigyeléseivel ellentétben a *M. fructicola*, épp úgy, mint az ép szőlőszemek esetében. A „még lédús”, „barnuló” és „töppedt” szőlőszemekről izoláltunk még *C. zemplinina*, *Rhodotorula*, *Lachancea*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Rhodospodium* fajokat. Ezekről a szőlőszemekről izoláltunk még *M. viticola* élesztőtörzseket, melyekről csak Péter és mtsi., (2005) tesznek említést, de közleményükből nem derül ki, hogy milyen szőlőszemről izolálták.

Ezen kívül az általunk, különböző szőlőszemekről, izolált fajok közül négyről, a *Cr. adeliensis*, *Cr. flavescens*, *Cr. albidosimilis*, és *R. kratochvilovae*, nem találtunk utalást a szakirodalomban, hogy szőlőről izolálták volna korábban.

Továbbá vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a *C. zemplinina* törzsek aránya az aszúsodás előrehaladtával csökkent, valamint az aszúszemekben minimális mennyiségű *A. pullulans* törzs volt, és *M. fructicola* törzsek domináltak. A *C. zemplinina* és *A. pullulans* törzsek csekély száma esetleg a szőlőbogyókon előforduló egyéb élesztők, penészgombák és baktériumok előfordulásával magyarázhatók, melyek gátolhatják egymás növekedését antifungicid és antibaktericid hatóanyagaiknak köszönhetően. Például *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, és *Sporobolomyces* fajoknál megfigyeltek antifungicid hatást (pl. Calvente és mtsi., 1999; Piano és mtsi., 1997; Scherm és mtsi., 2003; Karabulut és mtsi., 2003; Qin és mtsi., 2004; Sipiczki, 2006). Schena és munkatársai (2003) vizsgálatai alapján az *A. pullulans* antagonista hatást gyakorol a szürkepenészre. A nemesrothadás során megnövekszik a baktériumok száma (Joyeux és mtsi., 1984; Barbe és mtsi.,

2001), melyek olyan anyagokat termelhetnek, amik gyengítik az élesztők növekedési ütemét a fermentáció során (Drysdale és Fleet, 1989). Sipiczki (2006) *M. pulcherrima* törzsek növekedésre gyakorolt gátlását figyelte meg *C. zemplinina*, *A. pullulans*, *B. cinerea*, valamint egyéb fonalagomba és baktérium törzseknél. Azonban a *H. uvarum*, *C. stellata*, *S. cerevisiae* és *S. uvarum* törzseket nem találta érzékenynek. Izolátumaink között feltételezhetően több a *M. fructicola* (*M. aff. fructicola*), mint a *M. pulcherrima*, azonban a két faj nagyon közel áll egymáshoz filogenetikailag, így elképzelhető, hogy a *M. fructicola* is rendelkezik antagonistá hatással a *C. zemplinina* és *A. pullulans* törzsekre.

Számos kutató megfigyelte a földrajzi fekvés és a mikroklíma hatását a szőlőbogyó felszínén található élesztőpopuláció összetételére és sűrűségére vonatkozóan (pl. Barnett és mtsi., 1972; De La Torre és mtsi., 1999; Bene és Magyar, 2004; Raspor és mtsi., 2006). Hideg, esős évjáratokban, nagyobb arányban figyeltek meg bazidiomicétesz élesztőfajokat, mint aszkomicéteszeket (Fleet és mtsi., 2002). Raspor és mtsi (2006) összefüggést láttak a szőlőfajták és az előforduló élesztőfajok között is.

Az általunk vizsgált évjáratok közül 2002-ben és 2004-ben a mintavételezések előtti időszakban már hűvös volt az idő, néhány napos eső is volt, a relatív páratartalom magas volt. A Király és Szarvas dűlőkben több élesztőfajt tudtunk kimutatni ebben a két évben, mint a száraz, napos 2003-as évjárat esetében. Ugyanakkor nem volt több bazidiomicétesz faj izolálható, mint aszkomicétesz. A 2003-as évben a *Cr. flavescens*-en kívül nem volt más bazidiomicétesz fajunk ebben a két dűlőben.

A Bakonyi dűlőben csak két alkalommal mintáztunk (2003.09.09., 29.). Ezekben az időpontokban az időjárásnak köszönhetően a szőlő már érett, helyenként túlrett, az aszúsodás pedig előrehaladott volt. A három év alatt izolálható *Rh. glutinis*, *R. kratochvilovae* és *Cr. albidosimilis* törzsek döntő többségét itt találtuk. Ezen felül találtunk *H. uvarum*, *Cr. magnus*, *L.*

*thermotolerans* és *M. fructicola* törzseket. A bazidiomicéteszek dominanciája ebben a dűlőben némiképp ellentmond a korábban leírtaknak, hiszen az időjárás meleg és száraz volt. Valószínűleg a szőlőfajta és annak érettsége játszik közre ebben, itt ugyanis Zéta szőlőfajtáról vettük a mintákat, mely korábban érik, mint a Furmint, és nagyobb cukortartalmat érhet el.

A mintázások során nem volt kimutatható *Saccharomyces* élesztőfajok jelenléte, nem izoláltunk ilyen törzseket. Ez is megerősíti a korábbi feltételezéseket, miszerint az ültetvényeken nem, vagy csak igen kis számban fordulnak elő, és inkább a szőlő tarolása és feldolgozása során kerülnek bele a mustba, később a borba.

*C. stellata* és *C. zemplinina* élesztőként azonosított törzseket leggyakrabban a túlértett, botrytizált szőlőkkel és a belőlük készített borkülönlegességekkel hozzák összefüggésbe (pl. Rosini és mtsi., 1982; Fleet és mtsi., 1984; Mills és mtsi., 2002; Antunovics és mtsi., 2003). Azon nem-*Saccharomyces* fajok közé tartoznak, melyek törzsei képesek az erjedés befejeztéig túlélni (pl. Constanti és mtsi., 1997; Clemente-Jimenez és mtsi., 2004; Povhe és Raspor, 2005) és az érlelés során szelektíven felszaporodni nagy cukortartalmú, alacsony alkoholtartalmú borokban, mint a tokaji borvidékről származó Aszú, Aszúesszencia és Esszencia (Csoma és Sipiczki, 2003, 2007).

Korábbi évek vizsgálatai során nagy számban izoláltunk *C. stellata* élesztőtörzseket tokaj-hegyaljai borkülönlegességekből, valamint szőlőbogyókról, amikor a botrytiszos tevékenység és a szőlőbogyó élesztőbiótájának kapcsolatát kutattuk. Sipiczki (2003) eredményei rávilágítottak, hogy ezen izolátumok egyaránt lehetnek volna *C. stellata* és *C. zemplinina* törzsek. Az addig elvégzett asszimilációs és növekedési tesztek alapján nem lehetett a két faj törzseit elkülöníteni.

Ezekkel párhuzamosan folyó tanszéki kísérletek és eredményeik alapján a DBVPG 3827 *C. stellata* törzset a *St. bombicola* fajba soroltuk át (Sipiczki és

mtsi., 2005). Ennek a törzsnek korábban számos esetben vizsgálták a borra gyakorolt hatását úgy, mintha *C. stellata* lett volna (Ciani és Ferraro, 1996, 1998; Ferraro és mtsi., 2000; Ciani és mtsi., 2000). Mikor kiderítettük, hogy nem az, felmerült bennünk, hogy a mi izolátumainkkal együtt újvizsgáljuk más, hazai és nemzetközi törzsgyűjteményben található *C. stellata* törzs rendszertani hovatartozását.

A kísérleteknél a tokaji borvidéken szőlőről izolált 21, Aszúesszenciából, Esszenciából izolált 12, valamint törzsgyűjteményektől kapott 43 „*C. stellata*” élesztőtörzset vizsgáltunk meg. Ezen utóbbiak között 21 származott szőlőről, mustból, vagy borból.

A 26S rRNS D1/D2 doménjét kódoló kromoszómális szakasz szekvencia elemzése alapján *C. zemplinina* és *C. lactis-condensi* törzsek vannak a mi izolátumaink között, illetve *C. stellata*, *C. zemplinina*, *C. davenportii*, *C. bombi*, *C. lactis-condensi*, *St. bombicola*, *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. exiguus*, *T. delbrueckii*, *D. hansenii* és *P. anomala* törzsek a gyűjteményektől kértek között.

Eredményeink többek között azt is bizonyítják, hogy a Coton és mtsi. (2006) által, almaborból izolált, valamint a Hierro és mtsi. (2006) által spanyol borból kimutatott, illetve kaliforniai édes, botrytizált borból származó *Candida* sp. törzs (Mills és mtsi., 2002) mindegyike a *C. zemplinina* típusörzssel egyezik meg. Úgyszintén *C. zemplinina* és nem *C. stellata* törzseket találtak a portugál vörösbor szőlőfajta, a Castelao, mustjának erjedése során (Baleiras Cuoto és mtsi., 2005). Az adatbázisokban talált szekvenciák alapján *C. zemplinina*-ként azonosítottunk egyéb portugál borélesztőt (AY394855), illetve görögországi szőlőről származó élesztőt (DQ872872) is. Mindezekből az következik, hogy a borászatban a *C. stellata* alig fordul elő, a *C. zemplinina* viszont annál gyakoribb. Másfelől, gyakorisága ellenére nem mondhatjuk azt, hogy specifikusan borban, vagy szőlőn fordul elő, mivel izolálták ghánai erjesztett kakaóból (Nielsen és mtsi., 2005, 2007) is, valamint két általunk

meghatározott törzs egyike (CBS 2799) talajból, a másik (CBS 4729) pedig *Drosophila*-ról lett izolálva (Phaff és mtsi., 1956).

A rRNS ITS1-5.8S rRNS-ITS2 szakaszának PCR-RFLP eredményei alapján, az *EcoRI* és *PstI* esetében nem történt hasítás, ezek az enzimek nem alkalmasak minden vizsgált faj elkülönítésére. A *HinfI*-nél a *C. bombi* törzseket lehet elkülöníteni a többitől. A *HaeIII* nem hasítja a *C. zemplanina*, *C. stellata* és *C. davenportii* szekvenciákat, a *C. bombi* és a *C. lactis-condensi* törzseknél két, a *St. bombicola* törzseknél pedig három fragmentet ad. A *DraI* a *C. stellata* és *C. davenportii* törzseknél két egyforma fragmentet, a többi faj esetében két némileg eltérő fragmentet hoz létre. Az *MboI* alkalmas arra, hogy a *C. zemplanina* törzseket elkülönítsük a többi fajtól. A *C. zemplanina* esetében 320+150 bp, a *C. stellata*-nál és *C. lactis-condensi*-nél 150+150+150 bp, a *C. bombi*-nál és *St. bombicola*-nál 200+140+140 bp, míg a *C. davenportii* esetében 150+150+60+60 bp nagyságú fragmenteket ad nagy valószínűség szerint.

Sok gomba és élesztőfaj esetében változó a kromoszómák száma, de esetenként lehet fajspecifikus is. Hogy pontosabb képet kapjunk a vizsgált fajok kariotípusáról és annak esetleges taxonómiai felhasználhatóságáról, a váltakozó erőterű gélelektroforézis módszerét alkalmaztuk a BioRad CHEF-DRIII-as rendszerét felhasználva. Sipiczki (2004) a *C. stellata* törzseknél (CBS 157<sup>T</sup>) kimutatott egy >6 Mb, egy kb. 3 Mb és egy kb. 1.5-2 Mb nagyságú kromoszómát. *C. zemplanina* törzseknél (CBS 9494<sup>T</sup>) egy kb. 4 Mb és egy 1.8 Mb nagyságú kromoszómát figyelt meg, de a 4 Mb nagyságú sáv esetében feltételezte, hogy esetleg két egyforma, vagy nagyon hasonló méretű kromoszómát jelent. Egy másik *C. zemplanina* törzsnél az előbbi 4 Mb kromoszóma helyett egy kb. 4.5 Mb és egy 3.5 Mb nagyságú kromoszómát talált. Ezek alapján arra a megállapításra jutott, hogy a *C. zemplanina* genom (kb. 9.8 Mb) valamivel kisebb, mint a *C. stellata* genomja (kb. 10.5-11 Mb). Az általunk meghatározott egyetlen *C. stellata* (10-619/ ABT 804) törzs kariotípusa három kromoszómából áll, ezek azonban méretükben különböznek a korábban

vizsgált CBS 157<sup>T</sup> és CBS 843 *C. stellata* kromoszómáktól, melyek egymástól is eltértek (Sipiczki, 2004). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a *C. stellata* törzsek hajlamosak lehetnek kromoszóma átrendeződésre. Ezzel ellentétben a vizsgált *C. zemplinina* törzsek mindegyike két, a típusörzsével megegyező méretű kromoszómasávval rendelkezik. A vizsgált *C. davenportii*, *C. lactis-condensi* és *C. bombi* törzseknek szintén három kromoszómájuk van, bár méreteik eltérnek. Teljes genom méretük körülbelül megegyezik a *C. stellata* és *C. zemplinina* genomok méretével. Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a karotipizálás alkalmas lehet más módszerekkel leírt taxonómiai eredmények megerősítésére, de önmagában nem elegendő a faji hovatartozás eldöntéséhez.

A konvencionális meghatározási módszerek során megvizsgáltuk több szénforrás, nitrogénforrás, szerves sav, alkohol asszimilációját, vitaminmentes tápközegen, valamint 37°C-on való növekedés képességét. Meglehetősen heterogén képet kaptunk, a *C. stellata* (10-432<sup>T</sup>), *C. zemplinina* (10-372<sup>T</sup>) típusörzsek tulajdonságaitól sok esetben eltérő eredményeket.

Az általunk elvégzett asszimilációs tesztek eredményeit összevetve a szakirodalmi adatokkal (Kreger-van Rij, 1984; Sipiczki, 2003; <http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/>), úgy találtuk, hogy a *C. stellata* és *C. zemplinina* törzsek nagyon hasonló fiziológiai tulajdonságokkal rendelkeznek: asszimilálják a glükózt, szacharózt, raffinózt és lizint, sok más szénforrást viszont nem tudnak hasznosítani. Viszont találtunk köztük egy könnyen vizsgálható különbséget: a *C. zemplinina* törzsek rendelkeznek 1%-os ecetsav-toleranciával, míg a *C. stellata* törzsek nem. Egy esetben találtunk eltérést, a 10-619-es (ABT 804) *C. stellata* törzsnél, amit balzsamecetből izoláltak (Solieri és mtsi., 2006). Ez a törzs valószínűleg adaptálódott a savas környezethez.

Morfológiailag és fiziológiailag is jól elkülöníthetőek voltak a *C. stellata* törzsek kerek sejtjei a *C. zemplinina* apró ovális sejtjeitől és a nem-*Candida* izolátumoktól.

A *Candida* törzsek fiziológiai tulajdonságai közül, a savtermelést glükózból, a kénhidrogén-termelést, a cukortoleranciát és az alkoholtoleranciát vizsgáltuk.

A fermentációs képesség vizsgálatakor azt szerettük volna tudni, hogy adott szénforrást alacsonyabb, vagy magasabb hőmérsékleten hasznosítanak jobban. Ezért vizsgáltuk 16°C-on, mivel manapság egyre inkább az alacsonyabb erjesztési hőmérsékleteket preferálják a borászatokban és 25°C-on azért, mert ez egy általánosan elfogadott optimális növekedési hőmérséklet a borászati élesztőgombák esetében. Az alacsony hőmérséklet és a lassú, egyenletes erjedés kétségkívül előnyös a borok aroma-összetétele és az elsődleges aromaanyagok megőrzése szempontjából, ezért az utóbbi évtizedekben a fehérborok erjesztési hőmérséklete fokozatosan lefelé tolódott, és ma többnyire 15-20°C között van, sőt több országban alkalmazzák a 10°C körüli, ún. hidegerjesztést is.

A *C. zemplinina* törzsekről elmondható, hogy 16°C-on nem, vagy csak nagyon kis mértékben fermentálták a raffinózt, míg 25°C-on a törzsek nagyobb része kis mértékben pozitív eredményt adott. A törzsek döntő többsége a glükózt, fruktózt és szacharózt 16°C-on aktívabban fermentálta, mint 25°C-on. Ez magyarázható azzal, hogy a *C. zemplinina*-t hidegtűrő fajként írták le (Sipiczki, 2003, 2004). A vizsgált *C. stellata* törzsek kis száma miatt nem mondhatjuk általánosságban, hogy 16°C-on fermentálják jobban a glükózt, fruktózt és szacharózt, bár ez is megfigyelhető volt, néhány esetben. A *St. bombicola*, *C. lactis-condensi*, *C. davenportii* és *C. bombi* törzseknél, törzsenként és hőmérsékletenként változott a glükóz, fruktóz, szacharóz és raffinóz fermentációja. A *C. bombi* az összes többi törzssel ellentétben fermentálta még a trehalózt is, mindkét hőmérsékleten.

Az alkoholos erjedés során számos másodlagos anyagcseretermék keletkezik, mely kihatással van a bor minőségére és aroma komplexitására. A kénhidrogén kis mennyiségben az alkoholos erjedés normális mellékterméke, amely nagy illékonyága miatt általában már az első fejtéssel eltávolítható

(Ribéreau-Gayon és mtsi., 2000). A nitrogénhiányos mustokban az élesztők H<sub>2</sub>S-termelése jelentősen megnő, ami esetenként már intenzív levegőztetéssel sem távolítható el és záptojásszagot okozhat.

Az általunk vizsgált *C. zemplinina*, *St. bombicola*, *C. davenportii* törzsek mindegyike nagyobb mennyiségű H<sub>2</sub>S-t termelt, mint a *S. cerevisiae* kontrolltörzs (S288c), mindkét vizsgált hőmérsékleten. A 10-619 *C. stellata*, valamint a *C. lactis-condensi* törzsek esetében kaptunk a *S. cerevisiae*-vel megegyező, halványabb színt, 16-25°C-on, mint a 10-372<sup>T</sup> és 10-432<sup>T</sup> *Candida* típustörzseknél.

Munkánk során vizsgáltuk a törzsek ecetsavtermelésének a mértékét is. Egészséges borokban az illósav-tartalom több mint 95%-a ecetsav. Az alkoholos erjedés folyamán mindig keletkezik ecetsav, a cukrokból képződött acetaldehid diszmutációja révén. Az élesztők tevékenysége folytán képződött ecetsav mennyisége függ az erjedés körülményeitől, de normális erjedéseknél nem haladja meg a 0,6-0,8 g/l-t. Megfigyelések szerint a képződött ecetsav mennyisége összefüggésben van a must cukortartalmával: nagyobb cukortartalmú mustokból több ecetsav keletkezik (Lafon-Lafourcade és mtsi., 1984). Vizsgálataink során törzsenként változó eredményeket kaptunk a két vizsgált hőmérsékleten. A *St. bombicola* törzsekre nagyobb mennyiségű savtermelés jellemző, mint a *C. zemplinina*, *C. stellata* és *C. lactis-condensi* törzsekre.

A *C. zemplinina*-t hidegtűrő és ozmotoleráns fajként írták le, mely alkohol toleranciája viszonylag jónak mondható (Sipiczki, 2003). 8% alkoholtartalom esetén még tapasztaltak növekedést nála szemben a többi, borászati szempontból lényeges, nem-*Saccharomyces* élesztővel (Sipiczki, 2004; Pina és mtsi., 2004). A *C. stellata* cukor- és alkoholtűrése visszafogottabb (Sipiczki, 2004). Megfigyeléseink eredményei megerősítették ezen korábbi megállapításokat. A *C. zemplinina* törzsek esetében 10% alkoholtartalom mellett állt be teljes növekedés gátlás vizsgálataink során. Az

egyéb vizsgált fajok törzsei közül a *St. bombicola* törzs növekedési üteme haladta meg a *C. zemplinina* törzsekét, közelített a *S. cerevisiae* kontrolltörzséhez (S288c). A *C. lactis-condensi* izolátumunk mutatott a *C. stellata* típustörzsszel (10-432<sup>T</sup>) egyező lassú, gyenge növekedést, teljes gátlást 8% alkoholtartalom okozott. A legérzékenyebb a *C. bombi* törzs (11-17) volt, mely növekedése 6%-os alkoholtartalomnál állt le.

A vizsgált fajok közül a *St. bombicola* törzs bizonyult a legozmotoleránsabbnak. A *S. cerevisiae* (S288c), *C. lactis-condensi* (11-142) és a *C. davenportii* (11-7) törzsek tolerálták legkevésbé a magas cukortartalmat.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A Tokaji borvidék kiemelt helyet foglal el a magyarországi borvidékek között. Nemcsak történelme, hagyományai, de különleges borai is az elsők közé emelik. A *B. cinerea* hatására nemesenrothadt szőlőszemekből készített tokaji borkülönlegességek méltán váltak Európa- és világszerte híressé.

A dolgozat célja, hogy kibővítsük és pontosítsuk a Tokaji borvidék élesztőbiótájával foglalkozó szakirodalmat. Az aszúsodás folyamatának végigkísérésével igyekeztünk képet kapni az élesztőbióta összetételéről és változásáról, miközben folyamatos átalakuláson megy keresztül a szőlőfürt. A vizsgálatok alapján szerettük volna megerősíteni, esetleg cáfolni bizonyos, az erjedő borban előforduló élesztőfajok eredetére vonatkozó adatokat. A borászati szempontból egyik legjelentősebb élesztőfaj a *S. cerevisiae* kapcsán több eltérő szakirodalmi adat van. Vannak, amelyek szerint a szőlőről származik, mások viszont a borászati üzemek felületeiről eredeztetik. A másik kérdéses faj a *C. zemplinina*, mely kapcsán felmerült, hogy tokaji borkülönlegességekben cukortűrésének köszönhetően domináns lehet, és előfordulási gyakorisága meghaladhatja a *C. stellata*-ét.

A vizsgálatokat szőlőszemek gyűjtésével kezdtük, melyek ép, még lédús, barnuló, töppedt, és botrytiszes növedékkal benőtt töppedt (aszúszem) stádiumban voltak. A mintagyűjtés helyéül három szőlőterületet választottunk: a Szarvas dűlőt (Tarcal), a Bakonyi dűlőt (Tarcal) és a Király dűlőt (Mád). Összevetve a három év mintavételeit 5262 darab élesztőtörzset izoláltunk a három vizsgált területről.

Az izolált élesztőtörzsek identifikálását konvencionális és molekuláris biológiai módszerekkel végeztük el. A konvencionális tesztek eredményei alapján csoportosítottuk az izolátumokat, majd mintatörzseket választottunk ki, melyek segítségével pontosan meghatároztuk a csoport faji hovatartozását. Ennek érdekében elvégeztük a törzsek rRNS 5.8S-ITS régiójának PCR-RFLP

analízisét, és a riboszóma nagyobb alegységében szereplő 26S rRNS D1/D2 doménjét kódoló kromoszómális szakasz szekvencia elemzését. Mindezen kísérletek alapján 15 fajt határoztunk meg, melyek a *H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *M. fructicola*, *M. viticola*, *C. zemplinina*, *C. sorbosivorans*, *L. thermotolerans*, *Cr. flavescens*, *Cr. magnus*, *Cr. albidosimilis*, *Cr. adeliensis*, *Rh. glutinis*, *Rh. nothofagi*, *R. kratochvilovae*, valamint az *A. pullulans* voltak. A domináns élesztőfajok a *H. uvarum*, *M. fructicola*, valamint a *C. zemplinina* voltak, illetve az *A. pullulans* dimorf penészgomba, mind az ötféle bogyón.

A több mint 5200 izolátum között nem találtunk *S. cerevisiae* törzseket.

Az izolált fajok közül négyről, a *Cr. adeliensis*-ről, *Cr. flavescens*-ről, *Cr. albidosimilis*-ről, és *R. kratochvilovae*-ről, nem találtunk utalást a szakirodalomban, hogy szőlőről izolálták volna korábban.

Továbbá vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a *C. zemplinina* törzsek aránya az aszúsodás előrehaladtával csökkent, valamint az aszúszemekeken viszonylag kevés *A. pullulans* törzs volt. Ez feltételezhetően összefüggésben lehet azzal, hogy a *Metschnikowia* törzsek elszaporodtak, melyek gátolhatták növekedésüket.

A hűvösebb, párásabb évjáratokban (2002, 2004) több élesztőfajt tudtunk izolálni, mint a száraz és meleg 2003-as évben.

Összefüggést találtunk a szőlőfajta és az előforduló élesztőfajok között is. A 2003-as évjáratban, sajátságai ellenére, több bazidiomicétesz élesztőfajt izoláltunk a Zéta szőlőfajtán, mint a Furminton.

Korábbi évek vizsgálatai során nagy számban izoláltunk *C. stellata* élesztőtörzseket botrytizált borokból, valamint szőlőbogyókról. Korábbi vizsgálatok eredményei rávilágítottak, hogy ezen izolátumok egyaránt lehetnek volna *C. stellata* és *C. zemplinina* törzsek. Az addig elvégzett asszimilációs és növekedési tesztek alapján nem lehetett a két faj törzseit elkülöníteni. Kiegészítendő saját eredményeinket, 43 más gyűjteményben lerakott „*C. stellata*” törzset is megvizsgáltunk saját izolátumainkon (33) kívül, hogy

összehasonlíthassuk a két faj törzseit. Pontos identifikálásukhoz molekuláris technikákat használtunk, mint az ITS1-5.8S rRNS gén-ITS2 régiójának PCR-RFLP analízise és a 26S rRNS D1/D2 doménjét kódoló kromoszómális szakasz szekvencia elemzése.

Eredményeink azt igazolták, hogy a *C. stellata* névvel ellátott élesztők jórésze nem azonos a *C. stellata* típus törzsszel. A legtöbb *C. stellata*-ként azonosított és dolgozatunkban vizsgált törzs olyan fajokhoz tartozik, melyeket az izolálásukkor még nem ismertek, mint például a *C. zemplinina*, *C. lactis-condensi*, *C. davenportii*, vagy a *St. bombicola*. Néhány esetben azonosítottunk *Saccharomyces* (11-80/CCY 26-10-7, 11-61/DBVPG 4171), *Debaryomyces* (11-78/CCY 26-13-1), *Pichia* (11-65/DBVPG 3826) és *Torulaspóra* (11-3/RIVE 3-16-1) törzseket a gyűjteményektől kért törzsek között. A *C. stellata* borászati vonatkozásairól szóló korábbi megfigyelések jelentős része a DBVPG törzsek megfigyelésén alapult. Ezen törzseket vizsgálataink során *St. bombicola*-ként azonosítottuk.

A vizsgált szőlőről és borból származó CBS, RIVE, CECT, FAW, Rbst, Rst törzseket, valamint saját, szőlőről és botrytizált borból származó törzseinket a *C. zemplinina* fajba sikerült sorolnunk. Egyetlen *C. stellata*-t sem találtunk köztük, ami megerősíti azt a feltételezésünket, hogy a *C. stellata* kevésbé gyakori a szőlőn és a borok erjedése során, mint azt korábban gondolták. A botrytizált borok esetében a *C. zemplinina* nagyobb előfordulási gyakorisága összefüggésben lehet a jobb ecetsavtoleranciájával. Vizsgálataink alapján a *C. zemplinina* növekszik 1%-os ecetsav koncentráció esetében is, mely gátolja a *C. stellata* növekedését. Az 1%-os ecetsav-tolerancia alkalmazható lehet a konvencionális taxonómiai tesztek során is a *C. stellata* és *C. zemplinina* törzsek elkülönítésére.

Az ITS PCR-RFLP során alkalmazott restriktív endonukleázok közül az *MboI* és *DraI* adott megfelelő elkülönítési alapot a *C. stellata* és *C. zemplinina* között, valamint az *MboI* alkalmas arra, hogy a *C. zemplinina* törzseket

elkülönítsük a *C. lactis-condensi*, *C. davenportii*, *C. bombi* és *St. bombicola* fajoktól.

A *C. zemplinina* kariótipizálása során úgy találtuk, hogy genomja méretben közel azonos a közelrokon, dolgozatban vizsgált *Candida* fajokéval. Azonban stabilabbnak bizonyult, mint a *C. stellata* genom.

Fiziológiai tulajdonságaikat tekintve elmondható a *C. zemplinina* törzsekről, hogy termelnek savat, alacsonyabb hőmérsékleten kevesebbet, kénhidrogént, hőmérséklettől függetlenül nagyobb mennyiséget, ozmotoleránsak és 10%-ig elviselik az alkoholt. Ezzel szemben a *C. stellata* törzsek gyengébb növekedésűek, kevésbé ozmotoleránsak, és 8% alkohol már blokkolja a növekedésüket. A *C. lactis-condensi* törzsek savtermelők, kevesebb kénhidrogént termelnek, 6% alkohol már gátolja a növekedésüket és kevésbé ozmotoleránsak mint a többi vizsgált *Candida* faj. A *St. bombicola* törzsek növekedési erélye, ozmotoleranciája és alkoholtűrése jobb, több savat és közel azonos mennyiségű kénhidrogént termelnek, mint a *C. zemplinina* törzsek. Eredményeink alapján elmondható, hogy feltehetően savtoleranciája, ozmotoleranciája és alkoholtoleranciája teszi a *C. zemplinina* törzseket versenyképesebbé a Tokaji borvidéken más *Candida* fajokkal szemben.

## 8. SUMMARY

Tokaj is one of the major European wine regions, where botrytized wines can be produced. The most characteristic products of the region are sweet and dessert wines made from botrytized grapes by fermentation at low temperatures.

The aim of this work was to confirm and refine previous examinations of the yeast biota of this wineregion. We studied wine yeasts isolated from grapes of the region, in order to obtain more information about the indigenous biota that colonises grapes being in various stages. We wanted to confirm or refute certain observation on the origin of certain yeasts occurring in fermenting wine. There is much debate and controversy in the literature about occurrence of *S. cerevisiae*, the most important wine yeast. While some authors believe that the grape berry is the natural origin of it, others do not agree with this view and believe the winery equipment to be the main source. The other problematic species is *C. zemplinina* which is almost indistinguishable from *C. stellata*, may be more abundant than *C. stellata* in the Tokaj wines due to its tolerance to high sugar concentrations.

The taxonomic identification of the isolates was done by conventional yeast identification methods based on morphology, sporulation, utilisation of certain carbon sources, and nitrogen sources, tolerance to ethanol, 1 % acetic acid, growth at various temperatures, etc. The isolates were then grouped according to results of the tests. Representatives of each group were then subjected to molecular analysis. The PCR-RFLP of the ITS1-5.8S-ITS2 region and the sequencing of the 26S region of the rDNA revealed that most isolates belonged to *H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *M. fructicola*, *M. viticola*, *C. zemplinina*, *C. sorbosivorans*, *L. thermotolerans*, *Cr. flavescens*, *Cr. magnus*, *Cr. albidosimilis*, *Cr. adeliensis*, *Rh. glutinis*, *Rh. nothofagi*, *R. kratochvilovae* and *A. pullulans*.

The dominant species were *H. uvarum*, *M. fructicola*, *C. zemplinina* and *A. pulcherrima*.

We could not identify *Saccharomyces* species among the 5200 isolates. In the literature we found no reference on the occurrence of *Cr. adeliensis*, *Cr. flavescens*, *Cr. albidosimilis* and *R. kratochvilovae* on grape berries.

We observed that the amount of *C. zemplinina* strains decreased with the progress of *Botrytis* infection and *A. pullulans* strains were present in insignificant amount on botrytized grapes. Probably, the predominating *Metschnikovia* yeasts growing on these grapes can antagonize the growth of the *C. zemplinina* and *A. pullulans* strains.

We could isolate more yeast species in colder, more rains vintages of 2002 and 2004 than in the warm, more sunny vintage of 2003. In spite of the temperature in 2003, we isolated more basidiomycetes species in Bakony vineyard, where the Zéta grape variety was sampled. Probably, the basidiomycetes species have some preferences for the Zéta grape variety.

In earlier years, we isolated high amount of *C. stellata* strains from botrytized wines and grapes. The two species could not be distinguished by conventional assimilation and growth tests. To obtain more data about the taxonomic position of these yeasts, we involved additional 33 isolates from our collection and 43 strains deposited in other collections as strains of “*C. stellata*”. For their reclassification we used molecular methods such as the PCR-RFLP of the ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 and the sequence analysis of the chromosomal region coding for the D1/D2 domain of the 26S rRNA.

Our results demonstrate that the species name *C. stellata* has been used for yeasts, many of which, in view of recent developments of yeast taxonomy, are not conspecific with the type strain of *C. stellata*. Most strains originally identified as *C. stellata* and examined in this study turned out to belong to species that were not known yet at the time of their isolation, such as *C. zemplinina*, *C. lactis-condensi*, *C. davenportii* or *St. bombicola*. In some cases

we identified *Saccharomyces* (11-80/CCY 26-10-7, 11-61/DBVPG 4171), *Debaryomyces* (11-78/CCY 26-13-1), *Pichia* (11-65/DBVPG 3826) and *Torulaspota* (11-3/RIVE 3-16-1) among strains deposited in the culture collections. Considerable amount of information published about *C. stellata* in wine-making came from the investigation of DBVPG strains, which were found to be strains of *St. bombicola*.

The CBS, RIVE, CECT, FAW, Rbst, Rst strains originated from grape and wine and our isolates turned out to be *C. zemplinina*. *C. stellata* was not found among yeasts newly isolated from noble rotted grapes and botrytized wines either. The findings indicate that *C. stellata* is far less widespread in grapes and natural wine fermentation than hitherto thought. In the case of botrytized wines, the higher occurrence of *C. zemplinina* might be due to its ability to withstand higher acetic acid concentrations. This study found that *C. zemplinina* grows in the presens of 1% acetic acid, which is inhibitory to *C. stellata*. The response to 1% acetic acid is a physiological trait that can be exploited in routine taxonomic differentiation of the strains of these species.

In the ITS PCR-RFLP the restriction endonucleases *Mbo*I, *Dra*I proved to be suitable for the differentiation of *C. stellata* from *C. zemplinina*. *Mbo*I can also be used to separate *C. zemplinina* strains from species *C. lactis-condensi*, *C. davenportii*, *C. bombi* and *St. bombicola*.

The genome of *C. zemplinina* is similar in size to the genome of *C. stellata* (and the genomes of the related *C. bombi*, *C. lactis-condensi* and *St. bombicola*) but appears to differ from it in stability. The *C. zemplinina* chromosomes are less variable than those of *C. stellata*. This stability indicates that chromosome rearrangements may not be as important in this species for the adaptation to the changing conditions during wine fermentations.

In view of physiological traits of *C. zemplinina* strains, it can be said that they produce lower amount of acids at low temperature, higher amount of sulphur dioxid, independently of temperature and they are more osmotolerant

than *C. stellata* and *C. lactis-condensi* strains. *C. zemplinina* tolerates ethanol up to 10%, *C. stellata* tolerates ethanol up to 8% and *C. lactis-condensi* up to 6%. *St. bombicola* strains grow much better, are more osmotolerant and ethanol tolerant, produce more acid than *C. zemplinina* strains and produce about the same amount of sulphur dioxide as *C. zemplinina*. Our results suggest that the acid-, osmo-, and alcohol tolerance make *C. zemplinina* more competitive in the Tokaj wine region contrary to other *Candida* species.

## **9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönöm Dr. Sipiczki Mátyás témavezetőmnek, hogy lehetőséget biztosított doktori munkám elvégzéséhez. Köszönet illeti a Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék munkatársait, az együttműködő borászokat, hogy lehetővé tették számunkra mintáink begyűjtését.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, hogy mindvégig támogattak, és tanáromnak, Szaniszló Gábornénak, hogy megszeretette velem a biológiát.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

- Adams, A.M. 1964. Airborne yeasts from horticultural sites. *Can. J. Microbiol.* 10: 641-646.
- Antunovics, Zs., Csoma, H., Sipiczki, M. 2003. Molecular and genetic analysis of the yeast flora of botrytized tokaj wines. *Bulletin de l' O.I.V.* 76: 382-397.
- Antunovics, Z., Irinyi, L., Sipiczki, M. 2005. Combined amplification of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. *J. Appl. Microbiol.* 98: 971-979.
- Baleiras Cuoto, M.M., Vogels, J.T., Hofstra, H., Huis, J.H. és Vossen, J.M. 1995. Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-borne yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 525-535.
- Baleiras Cuoto, M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., in't Veld, J.H., van der Vossen, J.M. 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 41-46.
- Baleiras Cuoto, M.M., Reizinho, R.G., Duarte, F.L. 2005. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 102: 49-56.
- Barbe, J.C., de Revel, G., Joyeux, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A. 2001. Role of botrytized grape microorganisms in SO<sub>2</sub> binding phenomena. *J. Appl. Microbiol.* 90: 34-42.
- Barnett, J.A., Delaney, M.A., Jones, E., Magson, A.B. Winch, B. 1972. The numbers of yeasts associated with wine grapes of Bordeaux. *Arch. Microbiol.* 83: 52-55.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. 1990. *Yeasts: Characteristics and Identification.* Cambridge University Press, Cambridge.

- Benda, I. 1964. The yeast flors of the district of Fraconia. Weinberg Keller 11: 67–74.
- Benda, I. 1982. Wine and brandy. In: Prescott & Dunn's Industrial Microbiology. Edited by G. Reed. The AVI Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut. 293–402.
- Bene, Zs., Magyar, I. 2002. Study on the yeast and mould biota of the botrytized grapes in Tokaj region in two years. Int. J. Hort. Scienc. 8: 61-65.
- Bene, Zs., Magyar, I. 2004. Characterization of yeast and mould biota of botrytized grapes in Tokaj wine region in the years 2000 and 2001. Acta Alimentaria. 33: 259-267.
- Cadez, N., Raspor, P., de Cock, A.W.A.M., Boekhout, T., Smith, M.Th. 2002. Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. FEMS Yeast Res. 1: 279-289.
- Calvente, V., Benuzzi, D., de Tosetti, M.I.S. 1999. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. Int. Biodeterior. Biodegrad. 43: 167-172.
- Caruso, M., Capece, A., Salzano, G., Romano, P. 2002. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. L. Appl. Microbiol. 34: 323-328.
- Ceccato-Antonini, S.R., Cremonini, L.C.M., Regenfuss, C. 1999. 'Killer' character of yeasts isolated from ethanolic fermentations. Scientia Agricola 56: 631-635.
- Ciani, M., Ferraro, L. 1996. Enhanced glycerol content in wines made with immobilised *Candida stellata* cells. Appl. Environ. Microbiol. 62: 128-132.
- Ciani, M., Ferraro, L. 1998. Combined use of immobilised *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. J. Appl. Microbiol. 85: 247-254.

- Ciani, M., Ferraro, L., Faticenti, F. 2000. Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 27: 698-703.
- Ciami, M., Maccarelli, F. 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microb. Biot.* 14: 199-203.
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Heras-Vazquez, F.J.L., 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.
- Clemons, K.V., Feroze, F., Holmberg, K., Steven, D.A. 1997. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locals by three genomic methods. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1332-1336.
- Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Letters.* 189: 81-87.
- Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofré, V., Ganga, A, Martinez, C., Catanis, C. 2005. Yeast associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1055-1061.
- Constanti, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A., Guillamon, J. M. 1997. Analysis of yeast population during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Viticult.* 48: 339-344.
- Constanti, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A., Guillamon, J.M. 1998. Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 169-175.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier., D. 2006. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108: 130-135.

- Csoma, H., Sipiczki, M. 2003. Investigation of the yeast microflora of „Tokaj essence”. 1st FEMS Congress of European Microbiologists, Ljubljana, Book of Abstracts. 213.
- Csoma, H., Sipiczki, M., 2007. Taxonomic investigation of the yeast biota of botrytised grapes and „Essence” in the Tokaj wine region. 8th International Enology Symposium, Bordeaux, France, Book of Abstracts. 174.
- Csoma H., Sipiczki M. 2008. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. FEMS Yeast Res. 8: 328-336.
- Davenport, R.R. 1974. Microecology of yeasts and yeast-. like organisms associated with and English vineyard. Vitis 13: 123–130.
- Deák, T. 1993. Simplified techniques for identifying foodborne yeasts. Int. J. Food Microbiol. 19: 15-26.
- De Curtis, F., Torriani, S., Rossi, F., De Cicco, V. 1996. Selection and use of *Metchnikowia pulcherrima* as a biological control agent for postharvest rots of peaches and table grapes. Ann. Microbiol. Enzymol. 46: 45-55.
- De La Torre, M.J., Millan, M.C., Perez-Juan, P., Morales, J., Ortega, J.M. 1999. Indigenous yeasts associated with two *Vitis vinifera* grape varieties cultured in southern Spain. Microbios 100: 27-40.
- Domerque, S. 1957. Étude et classification des levures de vin de la Gironde. Ann. Technol. Agric. 6: 139-183.
- Donéche, B.J. 1993. Botrytized wines. In: Wine Microbiology and Biotechnology. Edited by G.H. Fleet. Chur. Harwood. 372-351.
- Drysdale, G.S., Fleet, G.H. 1989. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeast during the fermentation of grape juice. J. Appl. Bacteriol. 67: 471-481.
- Eperjesi, I., Kállay, M., Magyar. I. 1998. Borászat. Második, javított kiadás. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337.
- Fell, J.W. 2001. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospordium*: *Rhodospordium kratochvilovae* and related anamorphic species. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 51: 687-697.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetes yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1351-1371.
- Fernandez-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E. 2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rDNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78: 87-97.
- Ferraro, L., Fatichenti, F., Ciani, M. 2000. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Biochem.* 35: 1125-1129.
- Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P. 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1034-1038.
- Fleet, G.H., Prakitchaiwattana C., Beh, A.L., Heard, G. 2002. The yeast ecology of wine grapes. In: *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*. Edited by M. Ciani. Research Signpost, Kerala, India. 1-17.
- Fregoni, M., Iacono, F., and Zamboni, M. 1986. Influence du *Botrytis cinerea* sur les caractéristiques physicochimiques du raisin. *Bulletin de l'O. I. V.* 667-668, 995-1013.

- Gandini, A. 1973. Influenza dell'infezione botritica delle uve sulla blastoforadei mosti e sulla composizione dei vini dolci da questi otteniti I. Vini d' Italia. 15: 7-36.
- González, S.S., Barrio, E., Gafner, J., Querol, A. 2006. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. FEMS Yeast Res. 6: 1221-1234.
- Granchi L., Bosco M., Messini A., Vincenzini M. 1999. Rapid detection and qualification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. J. Appl. Microbiol. 8: 949-956.
- Gregory, P.H. 1973. Microbiology of the atmosphere. Leonard Hill Books, Aylesbury, Bucks.
- Groth, G., Hansen, J., Piskur, J. 1999. A natural chimeric yeast containing genetic material from three species. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1933-1938.
- Guidici, P., Pulvirenti, A. 2002. Molecular methods for identification of wine yeasts. In: Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts. Edited by M. Ciani. Research Signpost, Kerala, India. 35-52.
- Guillamon, J.M., Barrio, M.E., Huerta, T., Querol, A. 1994. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 708-714.
- Guillamon, J.M., Barrio, M.E., Querol, A. 1996. Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers. Relationship between genetic distance and geographic origin. Syst. Appl. Microbiol. 19: 122-132.
- Guillamon, J.M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Arch. Microbiol. 169: 387-392.

- Hierro, N., Gonzalez, A., Mas, A., Guillamon, J.M. 2006. Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Res.* 6: 102-111.
- Hong, S.G., Bae, K.S., Herzberg, M., Titze, A., Lachance, M.-A. 2003. *Candida kunwiensis* sp. nov. a yeast associated with flowers and bumblebees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 367-372.
- Ingram, M., Lüthi, H. 1961. Microbiology of fruit juices. In: *Fruit and Vegetable Juices Processing Technology*. Edited by D.K. Tressler and M.A. Jolyn. The AVI Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut.
- James, S.A., Bond, C.J., Roberts, I.N. 2001. *Candida sorbosivorans* sp. nov., a new member of the genus *Candida* Berkhout. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1215-1219.
- Johnson, C.G. Aust, S.D. 1994. Detection of *Phanerochaete chrysosporium* in soil by PCR and restriction enzyme analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2350-1254
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribereau-Gayon, P. 1984. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 153-156.
- Kalmár, Z.P., Miklósy, É., Pölös, V., Kerényi, Z. 1999. Les effets de la qualité des grans d'aszú et les gifferénts modes de vinification sur la constitution des vins d'aszú de Tokaj-Hegyalja. *Oenologie* 99. 6e Symposium International d'Oenologie. Proceedings. 191-195.
- Karabulut, O., Smilanick, J., Gabler, F., Mansour, M., Droby, S. 2003. Near-harvest application of *Metschnikowia fructicola*, ethanol and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in central California. *Plant Pathol.* 87: 1384-1389.

- Kerényi, Z. 1977. Tokaji borkülönlegességek aromaanyagainak gázkromatográfiás vizsgálata. III. Nem illó és nehezen illó aromakomponensek GLC-analízise. *Borgazdaság*. 25: 26-29.
- Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Kurtzman, C.P., 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the genera *Lachancea*, *Nekaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhizomyces*. *FEMS Yeast Res.* 4: 233-245.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 1998. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman, C.P., Droby S., 2001. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *System. Appl. Microbiol.* 24: 395-399.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 1216-1223.
- Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C., Ribéreau-Gayon, P. 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1246-1249
- Le Jeune, C., Lollier, M., Demuyter, C., Erny, C., Legras, J., Aigle, M., Masneuf-Pomarède, I. 2007. Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEMS Yeast Res.* 7: 540-549.
- Le Roux, G., Eschnbruch, R., De Bruin, S. I. 1973. The microbiology of South African winemaking VIII. Microflora of healthy and *Botrytis cinerea* infected grapes. *Phytophylactica* 5: 51-54.

- Lodder, J., Kreger-van Rij, N.J.W. 1952. The Yeasts: A Taxonomic Study. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Magyar, I. 1996. Study on the yeast flora of Tokaj Wine district. 11th Internationall Oenological Symposium. Sopron, Hungary. Proceedings, 30-40.
- Magyar, I., Bene, Zs. 2006. Morphological and taxonomic study on mycobiota of noble rotted grapes in the Tokaj wine district. *Acta Alimentaria* 35: 237-246.
- Martini, A. 1993. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Wine Res.* 3: 165-176.
- Martini, A., Ciani, M., Scorzetti, G. 1996. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surface. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 435-440.
- Masneuf, I., Aigle, M., Dubourdiou, D., 1996. Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. *FEMS Microbiol. Let.* 138: 239-244.
- McCullogh, M.J., Clemons, K.V., McCusker, H.J., Stevens, D.A. 1998. Intergenic transcribed spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1035-1038.
- Mikata, K., Ueda-Nishimura K., Goto, S., Kurtzman, C.P., Suzuki, M., Yarrow, D., Nakase, T. 1999. Reidentification of yeast strains deposited as *Candida agrestis*, with a description of *Candida kofuensis* sp. nov. *Microbiol. Cult. Coll.* 15: 49-57.
- Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, L. 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4884-4893.
- Minárik, E. 1963. Beitrag zur Mikroflora von Ausleseweinen. *Mitteil. Rebe Wine.* 13: 186-188.

- Minarik, E., Jungova, E., Emeriaud, M. 1978. Fruktophile Hefen und deren Einfluss auf süsse Naturweine. *Wein-Wissenschaft*. 33: 42-47.
- Molnár, O., Prillinger, H. 2005. Analysis of yeast isolates related to *Metschnikowia pulcherrima* using the partial sequences of the large subunit rDNA and the actin gene; discription of *Metschnikowia andauensis* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* 28: 717-726.
- Montrocher, R., Verner, M-C., Briolay, J., Gautier, C, Marmeisse, R. 1998. Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *Int. J. System. Bacteriol.* 48:295-303.
- Mortimer, R.K., Polsinelli, M. 1999. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150: 199-204.
- Naumov, G. I., Naumova, E. S., Sniegowski, P. D. 1997. Differentiation of European and far east Asian populations of *Saccharomyces paradoxus* by alloenzyme analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 341-344.
- Nguyen, H.V., Gaillardin, C. 1997. Two subgroups within the *Saccharomyces bayanus* species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the Non-Transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit. *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 268-294.
- Nguyen, H.V., Lepingle, A., Gaillardin, C. 2000. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae* including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 71-85.
- Nielsen, D.S., Honholt, S., Tano-Debrah, K., Jespersen, L., 2005. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast.* 22: 271-284.
- Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S., Holzapfel, W.H. 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa

- fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 114: 168-186.
- Nisiotou, A.A., Nychas, G.E. 2007. Yeast populations residing on healthy or botrytis-infected grapes from a vinyard in Attica, Greece. *Appl. Env. Microbiol.* 73: 2765-2768.
- Oda, Y., Yabuki, M., Tonomura, K., Fukunaga, M. 1997. A phylogenetic analysis of *Saccharomyces* species by the sequence of 18S-28S rDNA spacer regions. *Yeast* 13: 1243-1250.
- O'Donnell, K., Gray, L.E. 1995. Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 709-716.
- Péter, G., Tornai-Lehoczki J., Suzuki, M., Dlauchy, D. 2005. *Metschnikowia viticola* sp. nov., a new yeast species from grape. *Antonie van Leeuwenhoek.* 87: 155-160.
- Pezet, R., Pont, V. 1988. Infection florale et latence de *Botrytis cinerea* dans les grappes de *Vitis vinifera* (var. Gamay). *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture.* 18: 317-322.
- Phaff, H.J., Miller, M.W., Shifrine, M. 1956. The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. *Antonie van Leeuwenhoek.* 22: 145-161.
- Phaff, H.J., Starmer, W.T. 1987. *The Yeasts. Volume 1*, 2th edition. Edited by A.H. Rose and J.S. Harrison. Academic Press, London.
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, M., Gullino, M.L. 1997. Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest. Biol. Technol.* 11: 131-140
- Pina, C., António, J., Hogg, T. 2004. Inferring ethanol tolerance of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts by progressive inactivation. *Biotechnol. Let.* 26: 1521-1527.

- Pineau, J. 1978. Modification de la composition du raisin par attaque du *Botrytis cinerea*. *Revue Francaise d' Oenologie*. 108: 17-20.
- Povhe, J.K., Raspor, P. 2005. Initial *Saccharomyces cerevisiae* concentration in single or composite cultures dictates bioprocess kinetics. *Food Microbiol.* 22: 293-300.
- Praikitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., Heard, G.M. 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res.* 4: 865-877.
- Puchen-Planté, B., Mercier, M. 1983. Etude ultrastructurale de l' interrelation hôteparasite entre le raisin et le champignon *Botrytis cinerea*: exemple de la pourriture noble en Sauternais. *Can. J. Bot.* 61: 1785-1797.
- Qin, G., Tian, S., Xu, Y. 2004. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biol. Technol.* 31: 51-58.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramon, D. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2948-2953.
- Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Mozina, S.S., Cadez, N. 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 97-102.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B., Lonvaud, A. 2000. *Handbook of Enology. Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinification.* John Wiley and Sons, Ltd. Baffins Lane.
- Romano, P., Suzzi, G., Domizio, P., Fatichenti, F. 1997. Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. *Antonie van Leeuwenhoek.* 71: 239-242.
- Rosa, C.A., Lachance, M. 1998. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola*

- (Spencer, Gorin and Tullock) Meyer and Yarrow. *Int. J. System. Bacteriol.* 48: 1413-1417.
- Rosini, G., Federici, F., Martini, A. 1982. Yeast flora of grape berries during ripening. *Microb. Ecol.* 8: 83-89.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. 2th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sampaio, J.P., Gadanho, M., Santos, S., Duarte, F.L., Pais, C., Fonseca, Á., Fell, J.W. 2001. Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 51: 687-697.
- Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Ligorio, A., Ippolito, A. 2003. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biol. Technol.* 30: 209-220.
- Scherm, B., Ortu, G., Muzzu, A., Budroni, M., Arras, G., Migheli, Q. 2003. Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *J. Plant Pathol.* 85: 205-213.
- Scorzetti, G., Petrescu, I., Yarrow, D., Fell, J.W. 2000. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. *Atonie van Leewenhoek.* 77: 153-157
- Shimizu, Y. Watanabe, M. 1981. Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must during fermentation. *J. Ferment. Technol.* 59: 27-32.
- Shimizu, J.I., Uehara, M., Watanabe, M. 1982. Transformation of terpenoids in grape must by *Botrytis cinerea*. *Agr. Biol. Chem.* 46: 1339-1344.
- Spiczki, M. 2001. Characterisation of *Candida stellata* strains isolated from botrytized grapes and wines in Tokaj. 21st International Specialized Symposium on Yeasts. Lviv. Book of Abstracts. 61.

- Sipiczki, M. 2003. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *Int. J. Syst. E. Microb.* 53: 2079-2083.
- Sipiczki, M. 2004. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. *J. Basic Microbiol.* 44: 471-479.
- Sipiczki, M. 2006. *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl. Environ. Microbiol.* 6716-6724.
- Sipiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklós, I., Antunovics, Z. 2001. Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie van Leeuwenhoek.* 79: 97-105.
- Sipiczki, M., Ciani M., Csoma, H. 2005. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* DBVPG 3827. *Folia Microbiol.* 50: 494-498.
- Soden, A., Francis, I.L., Oakey, H., Henschke, P.A. 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6: 21-30.
- Solieri, L., Landi, S., De Vero, L., Giudici, P. 2006. Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar. *J. Appl. Microbiol.* 101: 63-71
- Sponholz, W.R., Dittrich, H.H. 1985. Über die Herkunft von Gluconsure, 2- und 5-Oxogluconsure sowie Glucuron- und Galacturonsure in Mosten und Weinen. *Vitis* 24: 51-60.
- Sprague, G.F., Thorner, J.W. 1992. Pheromon response and signal transduction during the mating process of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Edited by E.W. Jones and J.R. Broach. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 583-657.

- Stratford, M., Bond, C.J., James, S.A., Roberts, I.N., Steels, H. 2002. *Candida davenportii* sp. nov., a potential soft-drinks spoilage yeast isolated from wasp. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 42: 1369-1375.
- Sullivan, P.A., Bernardis, F.D., Chiani, P., Ciccozzi, M., Pellegrini, G., Ceddia, T., D'Offizzi, G., Cassone, A. 1996. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolated from oral cavities of subjects infected with Human Immunodeficiency Virus. *Inf. Immun.* 64: 466-471
- Szabó, J., Török, I. 1867. Tokaj-Hegyaljai Album. Emich Gustáv Magyar Akadémiai Nyomdász, Pest.
- Takashima, M., Sugita, T., Shinoda, T., Nakase, T. 2003. Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aereus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus peneaus*. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 53: 1187-1194.
- Török, T., Rockhold, D., King, A.D. 1993. Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization on yeast identification. *Int. J. Food. Microbiol.* 19: 161-164.
- Török, T., Mortimer, R.K., Romano, P., Suzzi, G., Polsinelli, M. 1996. Quest for wine yeasts - An old story revisited. *J. Ind. Microbiol.* 17: 303-313.
- Valente, P., Gouveia, F.C., de Lemos, G.A., Pimentel, D., van Elsas, J.D., Mendonca-Hagel, A.N. 1996. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* 137: 253-246.
- Vaughan Martini, A., Martini, A. 1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 508-511.
- Vaughan Martini, A., Martini, A. 1987. Taxonomic revision of the yeast genus *Kluyveromyces* by nuclear deoxyribonucleic acid reassociation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 380-385.

- Walczak, E., Czaplinska, A., Barszczewski, W., Wilgosz, M., Wojtatowicz, M., Robak, M. 2007. RAPD with microsatellite as a tool for differentiation of *Candida* genus yeasts isolated in brewing. *Food Microbiol.* 24: 305-312.
- White, T.J. Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications.* Edited by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White. Academic Press, San Diego. 315-322.
- Williams, D.W., Wilson, M.A., Potts, A.J. 1995. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2476-2479.

## 11. A doktori munka során megjelent publikációk

### Közlemények

- Antunovics, Z., **Csoma, H.**, Sipiczki, M. 2003. Molecular and genetic analysis of the yeast flora of botrytized Tokaj wines. *Bulletin de l'O.I.V.* 76: 380-397.
- Sipiczki, M., Ciani, M, **Csoma, H.** 2005. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* DBVPG 3827. *Folia Microbiol.* 50: 494-498.
- Sipiczki, M., **Csoma, H.**, Antunovics, Z. 2006. Biodiversity of yeast microbiota of botrytized Tokaj grapes and wines. In "ECCO XXV. The role of Culture Collections at the Beginning of the XXIst Century". Proceedings Budapest. 55-65.
- Csoma H.**, Sipiczki M. 2008. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. *FEMS Yeast Res.* 8: 328-336

### Előadások

- Sipiczki, M., **Csoma, H.** 2002. An investigation into the yeast flora of botrytized grapes in Tokaj. 22nd International Specialised Symposium on Yeasts "Yeast Fermentations and other Yeast Bioprocesses". Pilanesberg National Park, South Africa. Programme and Abstracts. 106.
- Antunovics, Z, **Csoma, H.**, Sipiczki, M. 2002. Molecular and genetic analysis of the yeast flora of botrytized Tokaj wines. XXVIIth World Congress of Vine and Wine. Bratislava, Slovakia. Book of Abstracts. 71.
- Sipiczki, M., **Csoma, H.** 2004. Yeast and fungi in botrytized grapes: co-colonisation and interactions. Eleventh International Congress on Yeasts, Rio de Janeiro, Book of Abstracts. 79.

**Csoma, H.**, Sipiczki, M. 2005. Tokaji borászati élesztőtörzsek molekuláris genetikai és mikrobiológiai vizsgálata. MTA, Magyar Tudomány Napja, Debrecen.

Sipiczki, M., **Csoma, H.** 2005. Antagonistic microbial populations in botrytized grapes and their potential in wine-making and post-harvest bioprotection. International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld-2005). Badajoz (Spain). Book of Abstracts. 733.

**Csoma, H.**, Sipiczki, M. 2005. Taxonomic identification of yeasts colonising grapes during noble rotting in Tokaj. 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary. Book of Abstracts. 24.

### **Konferencia poszter**

**Csoma, H.**, Sipiczki, M. 2003. Investigation of the yeast microflora of "Tokaj essence" 1st FEMS Congress of European Microbiologists, Ljubljana. Book of Abstracts. 213.

**Csoma, H.**, Sipiczki, M. 2004: Examination of yeast diversity in "Tokaj essence". XXVIIIth World Congress of Vine and Wine, Vienna. Book of Abstracts. 106-107.

**Csoma, H.**, Sipiczki, M. 2004. Taxonomic identification of yeasts that colonise botrytized grape berries in Tokaj. XXVIIIth World Congress of Vine and Wine, Vienna. Book of Abstracts. 107.

**Csoma, H.**, Sipiczki, M. 2007. Taxonomic investigation of the yeast biota of botrytized grapes and „Essence” in the Tokaj wine region. 8th International Symposium of Oenology, Bordeaux. Book of Abstracts. 174.

# **Borászati élesztőtörzsek identifikálása és molekuláris biológiai elemzése**

Értekezést a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a BIOLÓGIA tudományágban

Írta: Csoma Hajnalka  
okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája  
(Bioreguláció Molekuláris és Fiziológiai Szerveződése és Biotechnológiai  
vonatkozásai programja) keretében

Témavezető: Dr. Sipiczki Mátyás

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.....  
tagok: Dr.....  
Dr.....

A doktori szigorlat időpontja: 2008. ....

Az értekezés bírálói:

Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. ....  
tagok: Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 200... ..

## 12. MELLÉKLETEK

### 1. számú melléklet: A begyűjtött szőlőminták felsorolása

**1. táblázat:** A mintaként szolgáló szőlőfürtök és szőlőszemek jellemzése, Királydűlő, Mád, 2002.10.03.

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
1	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
2	1	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
	2	töppedt
	3	barnuló
3	1	ép
	2	barnuló
	3	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
4	1	ép
	2	barnuló
	3	töppedt
	4	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
5	1	barnuló
	2	töppedt
6	1	ép
	2	töppedt
	3	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)

**2. táblázat:** A mintaként szolgáló szőlőfürtök és szőlőszemek jellemzése, Szarvas dűlő, Tarcal, 2002.10.10.

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
11	1	ép
	2	barnuló
	3	szőlőszem minimális <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
	4	szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
	5	töppedt
12	1	ép
	2	barnuló
	3	szőlőszem minimális <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
	4	szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
	5	töppedt

**2. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
13	1	ép
	2	barnuló
	3	szőlőszem minimális <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
	4	szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
	5	töppedt
14	1	ép
	2	barnuló
	3	szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
	4	töppedt
	5	enyhén töppedt
15	1	ép
	2	barnuló
	3	barnuló
	4	szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
	5	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
16	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt

**3. táblázat:** A mintaként szolgáló szőlőfürtök és szőlőszemek jellemzése, Szarvas dűlő, Tarcál, 2003.09.08.

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
T1	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt
T2	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt
	5	penészes, száraz
	6	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)

**3. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
4a	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt
5a	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt

**4. táblázat:** A mintaként szolgáló szőlőfürtök és szőlőszemek jellemzése, Bakonyi dűlő, Tarcál, 2003.09.08.

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
6a	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt
	5	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)

**5. táblázat:** A mintaként szolgáló szőlőfürtök és szőlőszemek jellemzése, Királydűlő, Mád, 2003.09.29.

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
7	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt
	5	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
8	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
9	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló

**5. táblázat:** Folytatás az előző oldalról

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
9	4	töppedt
	5	szőlőszem minimális <i>Botrytis</i> - növedékkal
10	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
	5	töppedt

**6. táblázat:** A mintaként szolgáló szőlőfürtök és szőlőszemek jellemzése, Bakonyi dűlő, Tarcal, 2003.09.29.

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
6b	1	ép
	2	barnuló
	3	töppedt
	4	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)

**7. táblázat:** A mintaként szolgáló szőlőfürtök és szőlőszemek jellemzése, Szarvas dűlő, Tarcal, 2004.10.07.

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
17	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt
	5	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
18	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló ( <i>Botrytis</i> - növedékkal)
	4	töppedt
	5	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
19	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló (penész)
	4	töppedt
	5	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)

**8. táblázat:** A mintaként szolgáló szőlőfürtök és szőlőszemek jellemzése, Királydűlő, Mád, 2004.10.07.

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
22	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló ( <i>Botrytis</i> - növedékkal)
	4	töppedt
	5	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
23	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló ( <i>Botrytis</i> - növedékkal)
	4	töppedt
	5	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
24	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló ( <i>Botrytis</i> - növedékkal)
	4	töppedt
	5	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)

**9. táblázat:** A mintaként szolgáló szőlőfürtök és szőlőszemek jellemzése, Szarvas dűlő, Tarcsl, 2004.10.27.

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
30	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló ( <i>Botrytis</i> - növedékkal)
	4	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
31	1	ép
	2	még lédús (penész)
	3	barnuló ( <i>Botrytis</i> - növedékkal)
	4	töppedt
	5	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
32	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt
	5	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)

**10. táblázat:** A mintaként szolgáló szőlőfürtök és szőlőszemek jellemzése, Királydűlő, Mád, 2004.10.27.

Fürt	Szem	A szőlőszem megjelenési formája
25	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
26	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)
27	1	ép
	2	még lédús
	3	barnuló
	4	töppedt szőlőszem <i>Botrytis</i> - növedékkal (aszúszem)

**2. számú melléklet: *Candida* törzsek konvencionális taxonómiai tesztjeinek eredményei**

**1. táblázat:** A vizsgált *Candida* törzsek konvencionális taxonómiai tesztjeinek eredményei

Törzskönyv szám	telepszín	sejtalak	1% ecetsav tolerancia	növekedés																				
				keményítő	trehalóz	melizitóz	xilóz	szacharóz	mannit	galaktóz	ramnóz	maltóz	cellobióz	melibióz	raffinóz	glicerol	citrát	nitrit	KNO <sub>3</sub>	lizin	-vitamin	EtOH	37°C	
11-142	f/kr	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
11-143	f/kr	o	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
11-144	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-145	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-146	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-147	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-148	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-149	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-150	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-151	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-152	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-153	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-4	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
10-619	kr	k	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
10-623	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
10-624	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-1	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+

1. táblázat: Folytatás az előző oldalról

Törzskönyvi szám	telepszín	sejtalak	1% ecetsav tolerancia	növekedés																			
				keményítő	trehalóz	melizitóz	xilóz	szacharóz	mannit	galaktóz	ramnóz	maltóz	cellobióz	melibióz	raffinóz	glicerol	citrát	nitrit	KNO <sub>3</sub>	lizin	-vitamin	EtOH	37°C
11-16	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
11-17	kr	o	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	w	+	-	-	-	+	+	-	-
11-8	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
11-19	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-20	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-101	f/kr	o	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
11-112	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-113	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-114	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	+	-	-	+
11-115	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-116	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-118	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-119	f /kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-120	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-121	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-122	f/kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-123	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-124	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-125	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-126	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-127	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+

1. táblázat: Folytatás az előző oldalról

Törzskönyvi szám	telepszín	sejtalak	1% ecetsav tolerancia	növekedés																			
				keményítő	trehalóz	melizitóz	xilóz	szacharóz	mannit	galaktóz	ramnóz	maltóz	cellobióz	melibióz	raffinóz	glicerol	citrát	nitrit	KNO <sub>3</sub>	lizin	-vitamin	EtOH	37°C
11-128	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	+
11-88	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	-
11-107	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	+	-	-	-
11-135	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
11-138	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-8	kr	o	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	w
11-6	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	w
11-10	kr	o	+d	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-7	kr	k/o	w/d	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-9	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11-76	kr	k	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	+	+	-
11-27	kr	o	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
11-29	kr	o	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
11-32	kr	o	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
11-28	kr	o	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
11-30	kr	k	+					+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
11-31	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
11-62	kr	k	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	+	+	-
11-72	kr	k	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	+	+	-
11-66	kr	k	+	-	-	-	-	+	w	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	+	+	-
11-65	kr	o	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

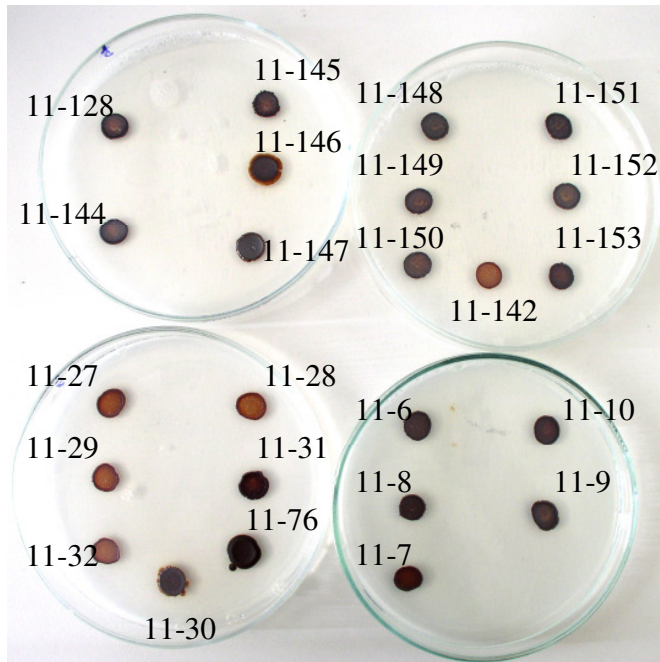
1. táblázat: Folytatás az előző oldalról

Törzskönyvi szám	telepszín	sejtalak	1% ecetsav tolerancia	növekedés																			
				keményítő	trehalóz	melizitóz	xilóz	szacharóz	mannit	galaktóz	ramnóz	maltóz	cellobióz	melibióz	raffinóz	glicerol	citrát	nitrit	KNO <sub>3</sub>	lizin	-vitamin	EtOH	37°C
11-74	kr	k	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	+	+	-
11-67	kr	k	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	+	+	-
11-68	kr	k	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	+	+	-
11-69	kr	k	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	+	+	-
11-70	kr	k	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	+	+	-
11-73	kr	k	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	+	+	-
11-61	kr	k/o	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	w	+	+	-	+	-	w	-	+	+	-
11-64	kr	k	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	+	+	-
11-63	kr	k	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
11-71	kr	k	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	-
11-75	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	-
11-60	kr	o	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	+	-	-	-
11-3	kr	k	-	-	+	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	w	w	+	+	+	-
11-78	kr	o/pm	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
11-79	kr	o	-					+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	w	+	+	+	-
11-80	kr	k	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	-	+	+	-
10-620	kr	o/pm	-	-/+	+	-/+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	w	-	+	+	+
10-432 <sup>1</sup>	kr	k	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
10-372 <sup>1</sup>	kr	o	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-

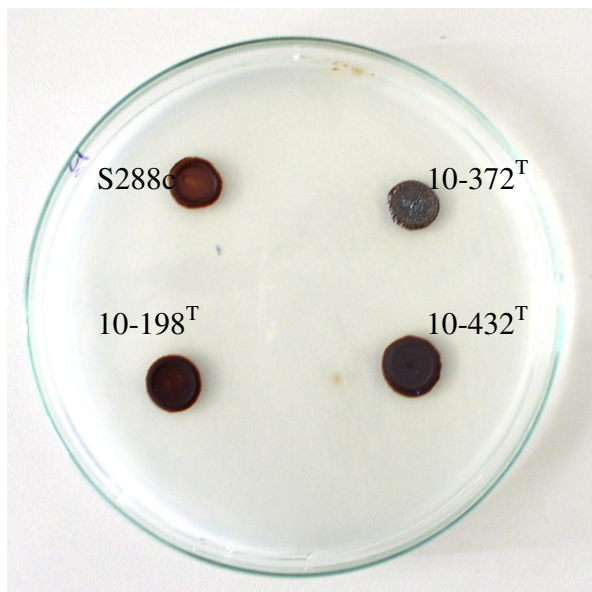
'f' fehér, 'kr' krémes, 'k' kerek, 'o' ovális, 'pm' pseudomicélium

'w' gyenge növekedésű, 'd' késleltetett növekedésű

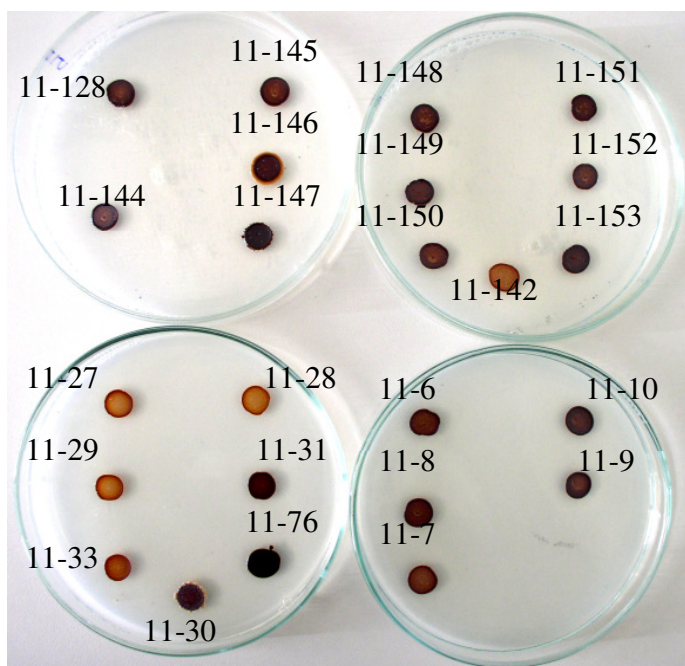
### 3. számú melléklet: kénhidrogén-termelés vizsgálata



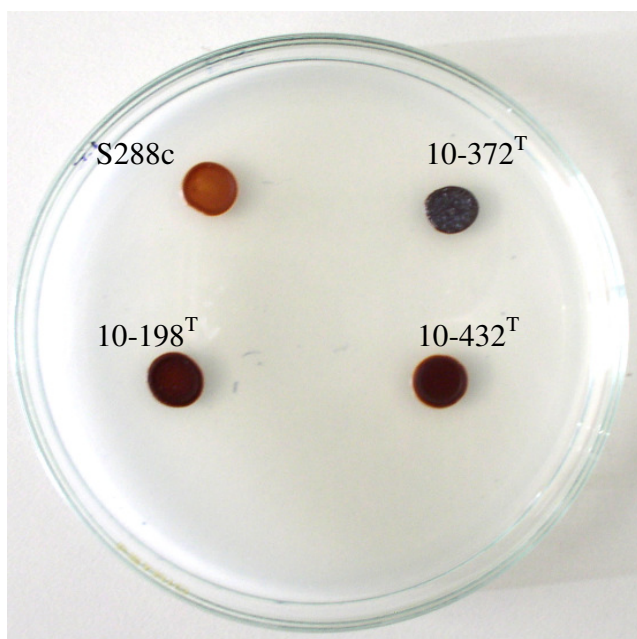
1. ábra: Kénhidrogén-termelés vizsgálata 25 °C-on, 10 nap elteltével



2. ábra: Kénhidrogén-termelés vizsgálata 25 °C-on, 10 nap elteltével a kontrolltörzsek esetében

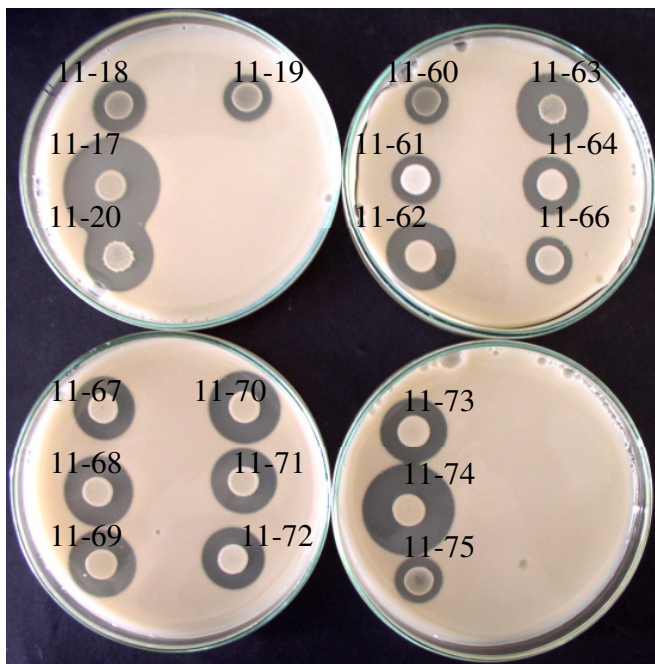


**3. ábra:** Kénhidrogén-termelés vizsgálata 16 °C-on, 10 nap elteltével

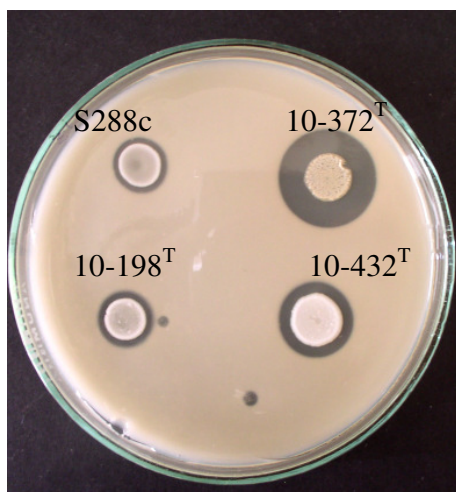


**4. ábra:** Kénhidrogén-termelés vizsgálata 16 °C-on, 10 nap elteltével a kontrolltörzsek esetében

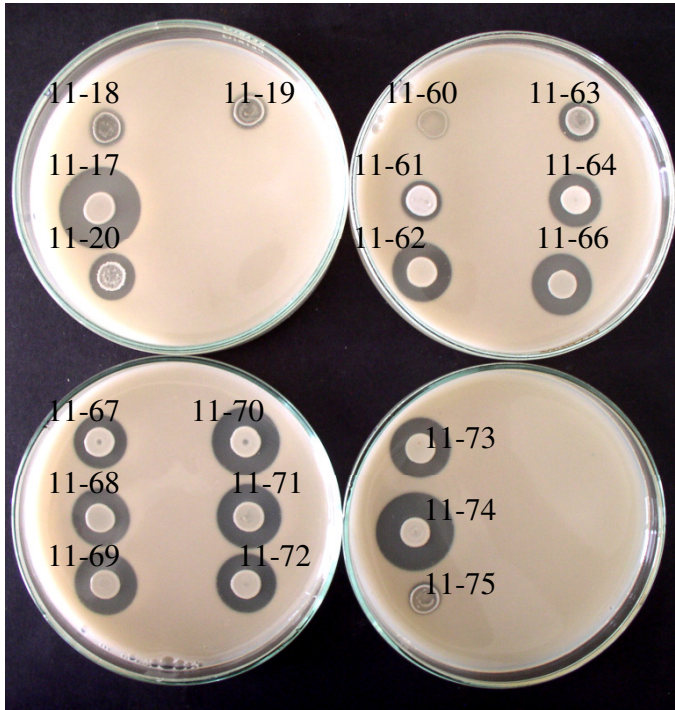
#### 4. számú melléklet: Savtermelés vizsgálata



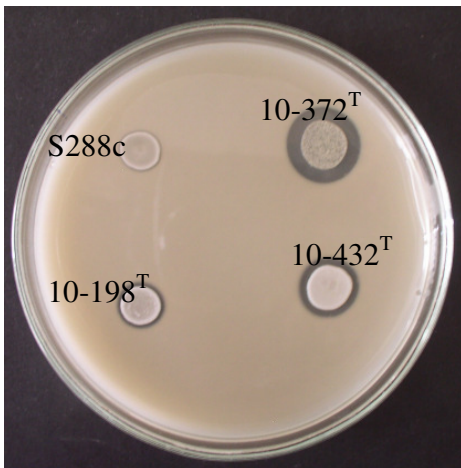
1. ábra: Savtermelés vizsgálata 25 °C-on, 10 nap elteltével



2. ábra: Savtermelés vizsgálata 25 °C-on, 10 nap elteltével a kontrolltörzsek esetében



**3. ábra:** Savtermelés vizsgálata 16 °C-on, 10 nap elteltével



**4. ábra:** Savtermelés vizsgálata 16 °C-on, 10 nap elteltével a kontrolltörzsek esetében