



***BOTRYTIS CINEREA* POPULÁCIÓK VIZSGÁLATA AZ  
EGRI BORVIDÉKEN**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Váczy Kálmán Zoltán  
okleveles biológus, mikrobiológus

Témavezetők:

Dr. Karaffa Levente

Dr. Sándor Erzsébet

**DEBRECENI EGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI DOKTORI TANÁCS  
JUHÁSZ-NAGY PÁL DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN, 2009.**

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász Nagy Pál Doktori Iskola Biológia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

*Debrecen, 2009. március 2.*

*Váczy Kálmán Zoltán*

*Tanúsítom, hogy Váczy Kálmán Zoltán doktorjelölt 2008- 2009. között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.*

*Debrecen, 2009. március 2.*

*Dr. Karaffa Levente*

*Tanúsítom, hogy Váczy Kálmán Zoltán doktorjelölt 2008- 2009. között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.*

*Debrecen, 2009. március 2.*

*Dr. Sándor Erzsébet*

**BOTRYTIS CINEREA POPULÁCIÓK VIZSGÁLATA AZ EGRIBORVIDÉKEN**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a Biológia tudományágban

Írta: Váczy Kálmán Zoltán okleveles biológus, mikrobiológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász Nagy Pál doktori iskolája  
(Biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Karffa Levente, Dr. Sándor Erzsébet

A doktori szigorlati bizottság:

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

A doktori szigorlat időpontja: 200... . . . . .

Az értekezés bírálói:

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

A bírálóbizottság:

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

Az értekezés védésének időpontja: 200... . . . . .

## **Családomnak és Nagyapáim emlékének**

# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b> .....	1
<b>2. Irodalmi áttekintés</b> .....	4
2.1. <i>Botrytis cinerea</i> .....	4
2.1.1. Taxonómia .....	4
2.1.2. Variabilitás .....	6
2.1.3. Patogenitás .....	8
2.2. Fungicid-kontroll és fungicid-rezisztencia .....	15
2.2.1. Légzést gátló fungicidok .....	16
2.2.2. Mikrotubulus-szintézist gátló fungicidok .....	17
2.2.3. Ozmoregulációra ható fungicidok .....	18
2.2.4. Aminosavakkal antagonizáló fungicidok .....	19
2.2.5. Szterol-bioszintézis gátló fungicidok .....	20
2.3. Genetikai markerek .....	20
2.3.1. Transzpozon elemek .....	22
2.3.2. Szatellit szekvenciák .....	25
2.3.3. Molekuláris markerek .....	27
2.4. Populációgenetikai elemzések .....	30
2.5. Szőlészeti és borászati jelentőség .....	36
2.5.1. A szürkerothadás .....	36
2.5.2. A nemesrothadás, az aszúsodás .....	38
<b>3. Kérdések és célkitűzések</b> .....	42
<b>4. Anyag és módszer</b> .....	43
4.1. Izolálás, törzsgyűjtemény és fenntartás .....	43
4.2. DNS izolálás .....	43
4.3. Transzpozonok felszaporítása és detektálása .....	44

4.4. DNS fragmentumok amplifikációja és detektálása .....	45
4.4.1. Szatellit szekvenciák felszaporítása .....	45
4.4.2. Molekuláris markerek felszaporítása .....	46
4.5. Szekvenálás .....	47
4.6. Szekvencia elemzések .....	47
4.7. Rekombináció analízis és populáció differenciálódás .....	48
4.8. Fungicid-rezisztencia vizsgálatok .....	49
<b>5. Eredmények</b> .....	<b>52</b>
5.1. <i>Botrytis cinerea</i> izolátum törzsgyűjtemény .....	52
5.2. Transzpozon elemek vizsgálata .....	55
5.3. Szekvencia elemzés .....	58
5.3.1. Miniszatellit szekvencia vizsgálata .....	58
5.3.2. <i>tef1</i> szekvencia vizsgálata .....	65
5.3.3. $\beta$ - tubulin szekvencia vizsgálata .....	67
5.3.4. IGS szekvenciák vizsgálata .....	69
5.4. A <i>Botrytis cinerea</i> multilókusz struktúrája .....	71
5.5. Rekombináció a populációkban, mikroszatellit elemzés .....	75
5.6. Genetikai sodródás a populációkban .....	76
5.7. Fungicid-rezisztencia vizsgálatok .....	78
5.8. Eredmények megvitatása .....	81
<b>6. Új tudományos eredmények</b> .....	<b>86</b>
<b>7. Összefoglalás</b> .....	<b>87</b>
<b>8. Summary</b> .....	<b>90</b>
<b>9. Irodalomjegyzék</b> .....	<b>92</b>
Publikációs lista .....	111
Köszönetnyilvánítás .....	116
Függelék .....	118

## 1. Bevezetés

A növénykórokozó gombáknak igen fontos gazdasági és szociális hatása volt az emberekre a mezőgazdasági társadalmak kialakulása óta (Stakman, 1959). Az ókori rómaiak *Robigus* istent félték, aki a gabonaüszög nevű katasztrofális hatású gabonabetegséget testesítette meg, imádkozva hozzá gabonatermésük megmentésére. A XIX. században (1849) az ír burgonyavész, melyet a *Phytophthora infestans* gomba okozott, másfél millió halálos áldozatot és nagy arányú Észak-Amerikába irányuló kivándorlást eredményezett. 1970-ben a kukorica levélhervadása, melyet a *Cochliobolus heterostophus* okozott, az Egyesült Államok kukorica termésének körülbelül 15%-át pusztította el, több mint egy billió dollár veszteséget okozva. A patogén gombáknak köszönhető veszteségek évről évre változnak, de óvatos felmérések szerint az átlagos évi terméshozam 5-10%-kal való csökkenése általános még az iparilag fejlett országokban is (James, 1974).

A *Botrytis* nemzetséget Micheli állította fel 1729-ben, és azóta ez a nemzetség közismerten olyan fonalas gombák csoportját tartalmazza, amelyek fitopatogének és gazdaságilag igen jelentős kórokozók. Ez a megállapítás egyaránt helytálló a genus tagjaira együttesen, valamint a *Botrytis cinerea* esetében önmagában is. A *Botrytis* nemzetség előfordulása nagyobb részt a mérsékelt övre korlátozódik, és ott nagyszámú, eddig bizonyítottan 235 gazdanövény fajt képes megtámadni, és rajtuk a szürkerothadás nevű megbetegedést kiváltani (Jarvis, 1977).

A termesztett növények olyan fontos csoportjai veszélyeztetettek, mint a szántóföldi és üvegházi kultúrák, bogyós gyümölcsök, szőlő, dísnövények és facsemeték. Sok egyéb növény és kultúra is veszélyeztetett, azonban kevésbé számottevő gazdasági jelentőségük miatt nem kerülnek a figyelem középpontjába. A nemzetség tagjait mint tárolási betegséget okozó

mikroorganizmusokat is számon tartjuk, mivel hidegtűrő képességük miatt jelentős problémákat okozhatnak a termékek raktározása és szállítmányozása során. A *Botrytis* nemzetség által okozott megbetegedések megelőzésének és kezelésének több útja és lehetősége is van, de a védelem megvalósítása általában nem egyszerű feladat. A nehézségek gyakran a gomba életciklusából erednek, a spóracsírázás, a fertőzés, a micélium növekedés és a sporuláció gyorsan történik a nemzetség legtöbb tagjánál. A védekezés nehézkes, mivel a gomba különböző populációi eltérő módon tolerálják a különböző fungicideket, más esetben a betegség az érési idő előtt vagy alatt jelenik meg, ami tovább nehezíti vagy lehetetlenné teszi a kémiai védekezést.

Jóllehet a *Botrytis* nemzetség tagjait betegségeket okozó mikroorganizmusokként tartjuk nyilván, a *Botrytis cinerea* szőlőbogyókon nagy jelentőségű és elősegítendő folyamatot is eredményezhet. Ez az állapot – a legjobb dolog, ami a szőlővel történhet<sup>1</sup> – az *aszúsodás*<sup>2</sup>.

A gombák rendelkezhetnek kizárólagosan szexuális vagy kizárólagosan aszexuális szaporodással, illetve szaporodhatnak mind szexuális, mind aszexuális módon; nagy távolságokban szóródhatnak szét esőcseppek, szél, vagy ízeltlábú vektorok segítségével.

A kórokozó gomba kiválóan alkalmas modellszervezetnek a populációbiológia alapvető jelenségeinek tanulmányozásához. Sok növénykórokozó gombát könnyen lehet gyűjteni természetes populációkból, míg másokat nem vagy csak ritkán és nehezen. Adott esetben ezer izolátumot lehet gyűjteni egyetlen nap alatt, egyetlen populációból, lehetővé téve a genetikai változások tanulmányozását ugyanabban a populációban meghatározott idő intervallumokban. Ez teszi a növénykórokozó kutatások középpontjába a növénykórokozó gombák genetikájának és fiziológiájának

---

<sup>1</sup> Szepsy István borász, Tokaji borvidék

<sup>2</sup> angolul *noble rot*, franciául *pourriture noble*, németül *edelfäule*



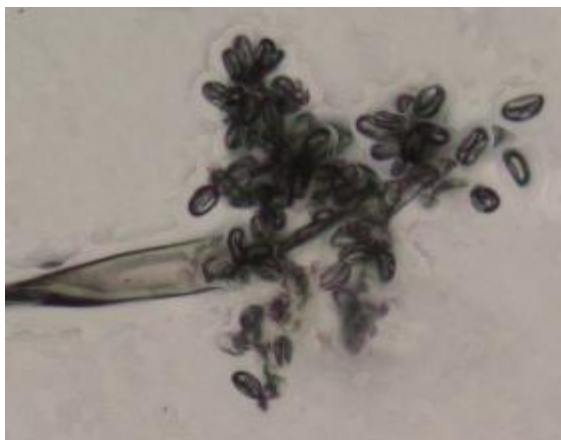
vizsgálatát, egyedülálló lehetőséget kínálva a populációs kapcsolatok és az evolúcióbiológia tanulmányozására.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. *Botrytis cinerea*

#### 2.1.1. Taxonómia

A *Botrytis* P. Mich. ex Pers. („fürtöspenész”) nemzetséget (βοτρυς, bótrys, gör.: szőlőfürt) P.A. Micheli írta le 1729-ben, és C.H. Persoon validálta 1794-ben („1801”, tévesen idézve Coley Smith és mtsai, 1980). A típusfaja a *Botrytis cinerea*, melyet Persoon 1821-ben írt le, és E.M. Fries 1832-ben megerősített (idézve Coley Smith és mtsai, 1980)(1. ábra).



**1. ábra** *Botrytis cinerea* konídiumtartójának szőlőfürtre emlékeztető fénymikroszkópos képe (a szerző felvétele)

Teleomorf alakját A. de Bary 1869-ben először *Peziza fuckeliana* néven közölte, majd *Sclerotinia fuckeliana*-ként de Bary ex de Bary (1884) módosította, melyet később H. H. Whetzel legitimálva (1945) a *Botryotinia* genusba tett át *Botryotinia fuckeliana* néven (idézve Coley Smith és mtsai, 1980) (1. táblázat).

1. táblázat A *Botrytis cinerea* (Pers.: Fr. *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) aszexuális és szexuális rendszerezése

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

A *Botrytis* nemzetség több mint 20 fajt foglal magába, azonban a nemzetségről csak általánosságban beszélhetünk, mivel a fajok gazdanövény specializáltságának leírása meglehetősen hiányos, és besorolásuk körül is vannak problémák (pl. a *Sclerotinia* nemzetségbe tartozó *S. veratri* inkább a *Botryotinia* nemzetségbe sorolható (Khon, 1979)). Három species koncepció hangsúlyos a gombáknál: a megjelenésen alapuló morfológiai, a kereszteződésen alapuló biológiai és a származáson alapuló filogenetikai koncepció. A növény-patogének gazda-specifitása szintén fontos elkülönítési szempont.

A *Botrytis* fajok körülhatárolását morfológiai jellemzőik és gazdanövény specifitásuk alapján kezdték meg (Hennebert, 1979; Jarvis, 1977). A jellegzetességek, mint a szklerócium mérete és formája, a konídium mérete hasznosak lehetnek, de több faj is morfológiailag hasonló, és a tenyésztési körülmények is nagyban befolyásolhatják ezeket a tulajdonságokat. Emiatt ez a módszer nem lehet kizárólagos az azonosításnál. Az *in vitro* keresztezésen alapuló biológiai fajkoncepció használata szintén limitált, ezért az allél variancián alapuló megkülönböztetést kell előnyben részesíteni a fajok definiálásánál. A rendszerezés filogenetikai megközelítése felfedezte a DNS szekvenálásban rejlő lehetőségeket, de ez a lehetőség a *B. cinerea* esetében még kezdeti szakaszában tart. A riboszómális DNS ITS<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Internal Transcribed Spacer

régiója általánosan használt a gomba fajok elkülönítésében, azonban variabilitása a *B. cinerea* esetében alacsony (Nielsen és mtsai, 2001), ami limitálja használhatóságát. A riboszómális IGS<sup>4</sup> vizsgálatának használatára szintén történtek próbálkozások (Giraud és mtsai, 1997), jóllehet hasznossága korlátozott a rekombináció miatt (Staats és mtsai, 2005).

A több gén hasonlóságának vizsgálatán alapuló elkülönítés fontosságát mutatja, hogy különböző gének előzetes vizsgálata során (Leroux és mtsai, 2002) két filogenetikailag különböző csoportot írtak le a *B. cinerea* fajon belül, és igazolták a közeli kapcsolatot a *B. calthae*, *B. convoluta* és a *B. fabae* között, azt sugalmazva, hogy a *B. calthae* és a *B. convoluta* a *B. cinerea* fajról válhatott le. Ezek a fajok korábban a klasszikus morfológiai leírás szerint a *B. cinerea* fajkomplex részei voltak (Hennebert és Groves, 1963).

A filogenetikai és taxonómiai szempontból is érdekes adatnak számít több olyan vizsgálat is (Giraud és mtsai, 1999, 2006; Munoz és mtsai 2002; Fournier és Giraud, 2008), melyek szerint különböző gazdanövényekről származó izolátumok különböző genetikai markerekkel való vizsgálata során, azok gazdanövényenként eltérő genetikai mintázatot mutattak. Karchiani-Balma és munkatársai (2008) tunéziai izolátumokon végzett vizsgálataik során a különböző gazdanövényekről és földrajzilag izolált területekről származó *B. cinerea* izolátumok esetében a populáció differenciálódás szempontjából a gazdanövény hatását tapasztalták erőteljesebb tényezőnek a földrajzi távolságokkal szemben.

### **2.1.2. Variabilitás**

A *Botrytis* nemzetségen belül a legtöbb genetikai szakcikk a *B. cinerea*-val foglalkozó genetikai markereket vizsgáló közlemény. Egyik visszatérő

---

<sup>4</sup> InterGenic Spacer

téma a *B. cinerea* variabilitása, hiszen nagy morfológiai és genetikai változékonysággal rendelkezik. Ezt a változékonyságot hagyományosan a heterokariózis és az aneuploídia jelenségeinek tulajdonították. Újabb vizsgálatok szerint azonban a heterotallikus gomba két párosodási típusa mennyiségileg egyenlően oszlik meg, ez pedig egyértelmű bizonyítéka annak, hogy a *B. fuckeliana* szexuális reprodukcióra is képes a természetben, és ez a heterokariózisnál és az aneuploídiánál sokkal jelentősebb tényezőként járulhat hozzá a faj genetikai változékonyságához (Beewer és Parkes, 1993).

### **A szexuális ciklus variabilitása**

A heterotallikus fajokban a vegetatív fejlődési szakaszba úgy iktatódik be az ivaros rekombinációs szakasz, hogy csak idegen telepről származó hím és női ivarsejtek egyesülése eredményezhet megtermékenyülést. A *B. cinerea* életciklusa ennek megfelelően jeleníti meg a különböző fejlődési fokozatokat. A szomatikus (vegetatív) micéliális állapotban aszexuális konídiumok képződnek (makrokonídiumok), a *Botrytis* anamorf állapotot megjelenítve. A szklerociális, mikrokonídium-képző állapotban a szkleróciumok csírázása rendszerint micéliumot vagy konídiumot eredményez, de megfelelő előfeltételek teljesülése és megtermékenyülés esetén a meiózis eredményeként aszkospórákat tartalmazó apotécium fejlődhet, megjelenítve ezáltal a *Botryotinia* teleomorf állapotot.

A *B. cinerea* apotéciuma rendkívül ritkán fordul elő a természetben (Lorbeer, 1980), ennek ellenére laboratóriumi környezetben könnyedén „előállítható” (Faretra és mtsai, 1988), és ezáltal a szexuális ciklus tanulmányozható. A legtöbb heterotallikus tömlősgomba, így a *B. cinerea* esetében is a párosodási típust egyetlen lókus<sup>5</sup> két idiomorf allélje – *MATI-1*, *MATI-2* – határozza meg. A legtöbb populációban a *MATI-1* allél

---

<sup>5</sup> mating type loci

előfordulása csupán alig valamivel magasabb, mint a *MAT1-2*-é. Mindamellett néhány izolátum esetében homotallikus megjelenést figyeltek meg tesztörzsek keresztezése során, termékeny apotécium képződéssel spermatizáció nélkül. Az instabilitás molekuláris alapjai még nem teljesen érthetőek, de eredményezheti mindkét párosodási allél jelenléte és egyikük deléciója a kapcsolódás során (Raju és Perkins, 2000). A *B. cinerea* esetében is az aszkuszban a négy meiotikus sejtmag közül a kapcsolódás eredményeként egy vagy kettő epigenetikusan módosul a következő mitotikus osztódásnál (Beever és Weeds, 2004).

### **Kompatibilitás**

Az ivaros folyamatok során gaméta jellegű sejtek egyesülése játszódik le, sejtfúzió azonban bekövetkezhet vegetatív (szomatikus) gombasejtek között is. Az ivaros folyamat a genetikailag különböző sejtek egyesülését engedi és véd a beltenyészet kialakulásától, a vegetatív kompatibilitási rendszerek azonban az azonosságot részesítik előnyben és védik a szervezetet a kedvezőtlen genetikai hatásoktól.

Kompatibilis csoportok jellemzése lehetőséget biztosít a gombák fajon belüli változékonyságának vizsgálatára. A vegetatív kompatibilitási csoportok (VCG<sup>6</sup>) vizsgálatát nitrátot fel nem használó auxotróf mutánsok (*Nit*) segítségével végzik, mivel minimál táptalajon a kompatibilitás vagy inkompatibilitás ténye könnyebben eldönthető, illetve a csoportok különböző nitrogénforrásokat tartalmazó minimál táptalajok használatával könnyebben osztályozhatók. A *nit* mutánsok klorát tartalmú táptalaj használata esetén spontán alakulnak ki, és mivel a vad típusú telepekkel szemben nem működnek a nitrát anyagcsere enzimeik, nem alakítják át a klorátot mérgező klorittá (Puhalla, 1985). A *nit* mutánsok három fenotípus osztályba

---

<sup>6</sup> vegetative compatibility group

sorolhatók attól függően, hogy a nitrát hasznosítás mely lépése blokkolódott. Ha a nitrát reduktáz struktúrgénje szenvedett mutációt, akkor *nit1*, ha a nitrogén asszimiláció szabályozásában szereplő gén, akkor *nit3*, ha a nitrát reduktáz működéséhez szükséges molibdén tartalmú kofaktor gének egyike sérült, akkor *nitM* fenotípus osztályról beszélünk. Beaver és Parkers (2003) vizsgálatai során *nit1* és *nitM* mutánsokat felhasználva vizsgáltak különböző izolátumokat, és a *B. cinerea* esetében megerősítették a többszörös VCG-k meglétét és nagy számban való előfordulását – 57 vizsgált izolátum esetében 47 csoportot azonosítottak. A vegetatív inkompatibilitás genetikai alapjai a *B. cinerea* esetében nem ismertek, valószínűleg ugyanúgy működnek, mint más tömlős gombák hasonló rendszerei. Ezeknél a vegetatív inkompatibilitást egy sor inkompatibilitási gén – *vic* vagy *het* – befolyásolja, melyeknek esetenként két vagy több allélje is előfordulhat. A törzsek, melyek azonos, megegyező allélokat hordoznak, minden lókuszon kompatibilisek, azok pedig, amelyek különböznek egy vagy több lókuszban inkompatibilisek. A vegetatív kompatibilitási csoportok meghatározhatóak mint egyedi kombinációi a *vic* génnek, tehát ha pl. hat *vic* lókuszt, lókuszonként két alléllal különül el egy populációban, az elméletileg 64 kompatibilitási csoportot jelentene. Weeds és Beaver (1995) vizsgálataik során 66 különböző VCG-t és legalább hét *vic* gént különítettek el *B. cinerea* esetében. A heterokarióta *B. cinerea* párosodási típusra homotallikus törzseinek létezése mutatja (Faretra és mtsai, 1988), hogy a *MAT-1* nem működik mint *vic* gén a *B. cinerea* esetében úgy mint a *Neurospora crassa*-nál. A VCG-k nagy száma és az ugyanabba a csoportba tartozó izolátumok limitált előfordulása jelzi, hogy a szexuális rekombináció igen fontos szerepet játszik a természetben előforduló *B. cinerea* populációk esetében.

## Heterokariózis

A paraszexuális rekombináció, mint a szexuális rekombináció alternatív mechanizmusa a természetben jelentősen hozzájárul a növénykórokozó gombák genetikai változékonyságához. Egyazon gombatorzs vagy két kompatibilis törzs hifái, esetleg konídiumai között anasztomózis történhet, melynek során genetikailag különböző sejtmagvak kerülnek egy citoplazmába, ezáltal heterokariózist előidézve.

A *B. cinerea* heterokariózisa hosszan tartó vizsgálata ellenére is nehezen bizonyítható, ugyanakkor laboratóriumi heterokarion mutáns létrehozása ugyanattól a szülőtől egyértelműen bizonyított (Weeds és mtsai, 1998; Beever és Parkers, 2003).

A fő kérdés a heterokariózissal kapcsolatban, hogy mennyire játszik szerepet a természetben előforduló törzsek biológiailag szignifikáns variabilitásában. Az ezzel kapcsolatos legközvetlenebb információ a heterokariózistról a párosodási típus gének vizsgálatából származik. Faretra és munkatársai (1988) vizsgálataik során arra az eredményre jutottak, hogy a természetből származó homotallikus izolátum monokonídiumos izolátuma vagy homotallikus maradt (valószínűleg *MATI-1+MATI-2* heterokarióta volt), vagy heterotallikusként viselkedett (valószínűleg vagy *MATI-1* vagy *MATI-2* homokarióta volt). A heterokariózissal kapcsolatos számos további információra a fungicid-rezisztenciával kapcsolatos vizsgálatok során derült fény. Faretra és Pollastro (1993) szabadföldi és laboratóriumi dikarboximid rezisztens izolátumokkal, Pollastro és munkatársai (1996) szabadföldi diklofluanid-rezisztens izolátumokkal dolgozva találtak néhány izolátumot, amelyek nem mindig adták tovább rezisztens karakterüket sem szexuális, sem aszexuális úton létrejött utódaiknak, mutatva ezzel, hogy a szülők heterokarionok voltak rezisztens és szenzitív tulajdonságokat hordozva.



Populációs és kompatibilitási vizsgálatok alapján a szexuális reprodukció fontos szerepet játszik a populációk variabilitásában, a szexuális variabilitásról szóló tanulmányok alapján a legtöbb törzs heterotallikus, és képes a kereszteződésre. Ezek alapján értelmezhetjük, hogyan működhet a heterokariózis a *B. cinerea* esetében. Az aszkospórák utódok alapvetően homokarióták, hordozva egyik vagy másik szaporodási típus gént, és jobbra különböző kompatibilitási csoportokban találhatóak. Mindamellert hogy nagy számban vannak jelen, genetikailag különböző kompatibilitási csoportok fúziója nem jöhet létre. A párosodási típusok ismeretei alapján feltételezhetjük, hogy a csoportok genetikai különbözősége a meiózis utáni kapcsoltságból ered (Beever és Weeds, 2004).

### **2.1.3. Patogenitás**

A növénypatogén gombák populációi számára a környezetet a növények felülete vagy egész szervezete jelenti. Az életközösségek evolúciója során alakult ki a gombák növényeken vagy növényekben való élősködése. Ennek lényege, hogy a patogén gomba a növény egyes részein, illetve szervezetében megtelepszik, annak anyagait használja fel életműködési biztosításához. E kapcsolat során a növény fiziológiai állapota megváltozik, a szervezet károsodik vagy elpusztul. A növényi epidermisz sejtjei a behatoló mikroorganizmusokkal szemben fizikai és kémiai gátat képviselnek. A behatolás e felületek sérülésein, természetes nyílásain vagy az ép szöveten keresztül következik be (Jakucs és Vajna, 2003).

A *B. cinerea* élő és elhalt szövetekben is képes fennmaradni. Leggyakrabban a beteg, elhalt növényi részekben képződő szkleróciumokból fejlődő konídiumok a fertőzés elindítói. A gomba esetenként ép bőrszöveten keresztül is behatol, azonban a sebek, sérülések keresztüli fertőzés a leggyakoribb. A szőlő esetében a fertőzés kialakulásához legalább 15 óra 18-

21°C-os hőmérséklet, magas relatív páratartalom és a csapadékos időjárás teremt kedvező feltételeket (Lázár és mtsai, 2004).

A bogyók felszínére került konídiumok, amennyiben megfelelőek számukra a feltételek csírázásnak indulnak, és a környezeti feltételek valamint a szőlőnövény állapota alapján vagy megfertőzik azt, vagy pedig látens állapotban maradnak. A lappangási idő a *B. cinerea* ökológiájának egy rejtélyes eleme, amely számos kutatás középpontjába került az utóbbi időben. Folyamata három fontos szakaszra bontható: a fertőződés fázisára, a lappangás fázisára és az aktív növekedés kialakulására.

A fertőzések féken tartására a szőlőnövénynek több lehetősége is van. Az epidermiszt vékony viaszréteg borítja, ami egyrészt fizikai barrier, másrészt a védekezésben is szerepet játszik antimikrobális és hidrofób tulajdonságai miatt (Padgett és Morisson, 1990). A kutikula vastagsága és kémiai összetétele változik a bogyó érése során, így a bogyó egyre fogékonyabbá válik a *B. cinerea* fertőzés számára (Commenil és mtsai, 1997). A növény sérülése és fertőződése esetén a szomszédos fertőzésmentes és ép sejtek elfásodnak, és teljesen izolálják a fejlődésnek induló micéliumot (Forbes-Smith, 1999). Más patogén inhibíciós mechanizmusok a poligalakturonáz inhibitor proteinek és proantocianinok aktivitása révén az érési folyamat lassításával eredményeznek gátlást (Nair és Hill, 1992; Pezet és mtsai, 2003).

A legjobban feltárt védekezési válasz a szőlő esetében a fitoalexinek felhalmozása és a PR-proteinek<sup>7</sup> szintézise (Renault és mtsai, 1996). A szőlő *B. cinerea*-val szembeni rezisztenciája és a rezveratrol felhalmozása kölcsönösen összefüggenek az érés gátlásával és a fogékonyság fokozódásával. A látens fertőzésekre adott válaszként néhány PR- fehérje képes a konídiumok elpusztítására (Pezet, 1988) a sejtfal kitin vázának

---

<sup>7</sup> pathogenesis related proteins

szétroncsolásával (Giannakis és mtsai, 1998). A bogyó fenol tartalma szintén szerepet játszik a fiatal bogyók *B. cinerea* elleni rezisztenciájában (Goetz és mtsai, 1999), mivel ezek az összetevők inhibitorai a stilbén oxidáznak, mely enzim szerepet játszik a gomba patogenezisében (Sbaghi és mtsai, 1996). A szőlőbogyókkal ellentétben a levelek rezisztensebbek lesznek idősebb korokra a sejtfalhoz rögzült fenoloknak köszönhetően (Weber és mtsai, 1995).

A tavasszal bekövetkező látens fertőzéseknek csak egy kis százaléka eredményez valódi fertőzést az érés bekövetkeztekor (Elmer és Michailides, 2004), összehasonlítva a kései, nyári látens fertőzésekkel. Utóbbiak kb. 30 nappal az érés előtt inkubálódnak és jelentős mértékű gyümölcsrohadást okozhatnak (Cruickshank és Wade, 1992). A kutikula integritása - a már korábban is említettek alapján - alapvető a fertőzés elkerülését illetően, azonban optimális körülmények között sem jelenthet teljes védelmet a *B. cinerea*-val szemben. A bogyók közti érintkezési felületeiken a kutikula nagyon vékony vagy hiányzik, érzékennyé téve ezáltal ezeket a felületeket, ami a sűrű fürtszerkezetű fajták esetében nagyobb fertőzési kockázatot jelent. Újabb vizsgálatok alapján a bogyó felületén található természetes nyílások és sztómák száma is negatívan korrelál a *B. cinerea*-val szembeni rezisztenciával (Mlikota Gabler és mtsai, 2003). Az UV szintén negatívan befolyásolja az ellenállóképességet, mivel vékonyítja a kutikula viaszbevonatát és károsítja a szöveteket, növelve a *B. cinerea*-val szembeni érzékenységet (Steel, 2001).

Minden tényező, ami sérülést okoz a szövetekben, fertőzési kaput nyit a *B. cinerea* fertőzésére. Sérülések kialakulhatnak különböző időjárási tényezők (eső okozta bogyórepedés, jégverés, viharkár) és biotikus tényezők hatására, mint egyéb patogének okozta bogyórepedés, lisztharmatfertőzés, valamint rovarrágás (darázs, szőlómoly) következményeként.

A szőlő rágókártevői közül figyelemre méltó a tarka szőlőmoly (*Lobesia botrana*) és a *B. cinerea* közötti, egyértelműen bizonyított mutualizmus jelensége (Mondy és mtsai, 1998). A szőlőmoly lárvája a bogyó rágásával sérüléseket okoz, és a sebeket „inokulálja” is a kutikulájára tapadt *B. cinerea* konídiumokkal (Fermaud és Le Menn, 1992). A konídiumok táplálkozás közben tapadnak a testére. A *L. botrana* étrendjében szereplő gomba biztosítja a rovar számára a szterol vázat. A gombát (és vele annak szteroljait) fogyasztó szőlőmoly fejlődési ideje rövidebb volt, az egyedek túlélése javult, és megnövekedett a peteprodukció is a csak növényi tápanyagot fogyasztó kontrollokhoz képest (Mondy és Corio-Costet, 2000).

A kórokozó a szőlő esetében annak minden zöld részét fertőzheti, de a fűrtökre jelenti a legnagyobb veszélyt, és súlyos termés kiesést okozhat.



**2. ábra** Szőlővessző szkleróciumokkal (A), nedves kamrába helyezett vessző szkleróciumaiból kinövő *B. cinerea* konídiumtartók konídiumokkal (B), megfertőzött szőlővirág konídiumokkal (C) (a szerző felvételei)



**3. ábra** Szürkerothadásos kórképek (a szerző felvételei)

A vesszők fertőzésekor fakóbarna, majd barnás-fehér foltok jelennek meg konídiumtartó gyeppel, a kifehéredő hánccsszövetbe ágyazódva fekete szkleróciumok képződnek (2. ábra). A leveleken a *B. cinerea* fertőzés hatására egy-egy főértől kiindulva gyorsan növekvő, szabálytalan, nekrotikus foltok figyelhetők meg. A fürtvirágzat, illetve a fürtkocsány megbetegedése (2. ábra) részleges vagy teljes fürtelhalást okoz. A zsendülő, érőfélben lévő fürtök károsítása, „zöldrothadás” a leggyakoribb. A megbetegedett növényrészek felületén szürke konídiumtartó gyp figyelhető meg (3. ábra).

Az érett, magas cukortartalmú fürtök sérüléstől mentes bogyóin aszúsodás, „nemes rothadás” indulhat meg (4. ábra).



4. ábra Aszúsodó szőlőszemek a Tokaji borvidéken (a szerző felvételei)

## 2.2. Fungicid-kontroll és fungicid-rezisztencia

A *B. cinerea* elleni védekezés legfőbb módját napjainkban is a kemikáliák használata jelenti. A szintetikus fungicidok számos családját alkalmazzák a gyakorlatban, amelyek használata a legtöbb botriociddel szembeni rezisztencia kialakulását eredményezi. Ennek megelőzésére több országban a növényvédő szerek használatát és felhasználhatóságát több-kevesebb sikerrel korlátozzák.

A botriocidoknak több családjá is ismeretes, melyek biokémiai hatásmechanizmusuk alapján öt nagyobb csoportba tartoznak: 1) légzést gátló fungicidok, 2) mikrotubulin szintézist gátló fungicidok, 3)

ozmoregulációra ható fungicidek, 4) aminosavakkal antagonizáló fungicidek és 5) szterol bioszintézist gátló fungicidek.

### 2.2.1. Légzést gátló fungicidek

Az élő szervezetek a szerves molekulák lebontásából származó energiát használják fel szervezetük felépítésére és fenntartására. A gombáknál, mint a többi eukariótánál a lebontó folyamatok utolsó lépése, a nagy energiatartalmú ATP molekulák szintézise a mitokondriumban zajlik. Egyes fungicidek megzavarják ezt az energiatermelést, gátolva ezáltal a konídiumok csírázását.

**Több helyen ható vegyületek.** A több helyen ható („multi-site inhibitor”) vegyületeknek három fő kémiai csoportja van: a *dithiokarbamátok* (mint a thiram és a mancozeb vagy maneb), az *N-trihalometil* fungicidek (mint a kaptan, folpet és a diklofluamid), valamint *kloronitrilek* (mint a klorotalonil). Hatásukat a légzési ciklus thiol tartalmú enzimeinek gátlásával fejtik ki (Leroux és mtsai, 1999). Laboratóriumi tesztekben mindegyikük toxikus a spóracsírázásra, míg a micélium növekedést alacsony szinten gátolják. A gyakorlatban legtöbbjük gyenge botriocid, és bár több hatóhelyük van, és a rezisztencia kialakulásának kockázata is alacsony, számos európai országban leírtak már rezisztens törzseket egyik-másik hatóanyaggal szemben (Pollastro és mtsai, 1996).

**Oxidatív foszforilációt gátló vegyületek.** A fluazinam egy *fenilpiridinamin* széles antifungális spektrummal, európai szőlőtermő területeken a kilencvenes évek elejétől használják. Laboratóriumi tesztekben magas toxicitást tapasztaltak a konídiummal és micéliummal szemben is (Kalamakariss és mtsai, 2000), amit a mitokondriális oxidatív foszforiláció

gátlásával ér el a hatóanyag (Leroux, 1996). Keresztrezisztenciát más hatóanyagokkal nem mutatott (Kalamakaris és mtsai, 2000). Champagne-i (Franciaország) szőlőterületeken végzett tesztek már mutattak ki rezisztenciát, azonban annak biokémiai háttere még nem ismert (Leroux és mtsai, 2002).

**A III mitokondriális komplex inhibitorai.** A fungicidek, amelyek a mitokondriumok légzését a citokróm b gátlásával akadályozzák meg (Barlett és mtsai, 2002), a kilencvenes évek második felében kerültek a piacra, és a legtöbbjük szintetikus analógja a természetes strobilurinoknak. Némely esetben (pl. kifejezetten a szőlő esetében) a szürkerothadás gátlása azonban nem kielégítő. A jelenség a terminális alternatív oxidáz (AOX) létevel függ össze, ugyanis a citokróm b gátlása esetén az elektronok egy alternatív úton az AOX-on keresztül jutnak a terminális oxidáció színhelyére (Tamura és mtsai, 1999; Wood és Hollomon, 2003).

**A II mitokondriális komplex inhibitorai.** A karboxinok és a rokonvegyület anilidek vagy karboxamidok szisztémikus széles spektrumú fungicidek, melyek hatásukat a szukcinát dehidrogenáz komplex (II. komplex) gátlásával fejtik ki (Fritz és mtsai, 1993). Egyaránt gátolják a konídium és micélium növekedését. Champagne-i (Franciaország) szőlőterületeken végzett vizsgálatok nem mutattak ki közepes vagy magas fokú rezisztenciát, és keresztrezisztenciát sem más fungicidekkel (Leroux és mtsai, 2003).

### **2.2.2. Mikrotubulus-szintézist gátló fungicidek**

Az egy hatóhellyel rendelkező fungicidek közé tartoznak az 1960-as évek végén kifejlesztett benzimidazolok (karbendazim és prekursora a

benomil, valamint a tiofanát-metil). Ezek voltak az első széles hatásspektrumú, szisztémikus fungicidek (Leroux, 2004). Gátolják a hifák növekedését, és a csíratömlő torzulását okozzák (Leroux, 1999). A benzimidazolok valószínűleg a gomba tubulinjának  $\beta$ -alegységéhez kapcsolódva gátolják a mikrotubulusok összekapcsolódását (Davidse és Ishii, 1995). A benzimidazolokkal szemben már két évvel bevezetésük után kialakultak rezisztens *B. cinerea* törzsek mind üvegházakban (Bollen és Scholten, 1971), mind az európai szőlőültetvényeken (Leroux és Clerjeau, 1985). A rezisztenciát a tubulin gén pontmutációja okozza a  $\beta$ -tubulint kódoló *Mbc1* génben (Faretra és Pollastro, 1991). A benzimidazolokkal szemben kialakuló fungicid rezisztencia veszélye szőlőben igen nagy (Brent és Hollomon, 1998). Mivel a szisztémikus hatású benzimidazol-származékokkal szemben általános és tartós rezisztencia alakult ki Magyarországon is, ezeknek a szereknek az alkalmazását a szürkerothadás ellen régóta nem javasolják (Lázár és mtsai, 2004), sőt a benomil alkalmazását – jórészt a rezisztencia okozta problémák miatt – hazánkban vissza is vonták.

### **2.2.3. Ozmoregulációra ható fungicidek**

Ebbe a vegyületcsoportba a dikarboximidek, a fenilpirrolok és az aromás hidrokarbonátok tartoznak. A dikarboximidek helyettesítették és követték a benzimidazolokat, miután azok hatástalanná váltak; a fenil pirrol egy *Pseudomonas sp.* által termelt antimikrobális vegyület, melynek szintetikus analógjait használják fel a növényvédelemben. Az aromás hidrokarbonátok egy régi és heterogén csoportja a fungicideknek, *B. cinerea* ellen a dicloran nevű vegyületet használják ebből a csoportból. A dikarboximidek mind a spórák csírázását, mind a micéliumok növekedését gátolják, utóbbit sokkal alacsonyabb koncentrációban. A fentiekén túl



megfigyelhető a csíratömlő morfológiai változása is (megduzzadás, elágazás; Leroux, 2004). Biokémiai vizsgálatok alapján ezek a fungicidek a sejtfal szintézisét befolyásolják, továbbá indukálják a micéliális sejtek glicerol akkumulációját (Leroux, 1996). Fő hatóhelyük valószínűleg azok a protein kinázok, amelyek a poliolok szintézisének szabályozásában vesznek részt (Pillonel és Meyer, 1997). A dikarboximidekkel (pl. iprodion, procimidon, vinklozolin) szemben kialakuló rezisztencia is régóta ismert (Faretra és Pollastro, 1991; Leroux és Descotes, 1996). Faretra és Pollastro (1991) tanulmánya alapján a dikarboximid rezisztencia egyetlen génhez, a *Daf1*-hez köthető. Nagyon valószínű azonban, hogy más gének is részt vesznek a rezisztencia kialakításában (Vignutelli és mtsai, 2002).

#### **2.2.4. Aminosavakkal antagonizáló fungicidek**

Az anilinopirimidin fungicidek (a ciprodinil, a mepanipirim és a pirimetanil) egymáshoz nagyon hasonló vegyületek. Széles hatásspektrumú fungicidek, és mint kifejezetten botriocidek lettek bevezetve az európai piacra a kilencvenes évek közepén. Gátolják a csíratömlő növekedését, de a micélium növekedésre is hatással vannak. Néhány aminosav, illetve kifejezetten a metionin antagonizál az anilinopirimidinekkel, biokémiai kutatások kimutatták, hogy hatásukat a cisztation- $\beta$ -liáz gátlásán keresztül fejtik ki (Leroux, 1996). Az anilinopirimidineknek hidrolitikus enzimek termelését gátló hatása is ismert a növényvédelmi hatás mellett. *B. cinerea* esetében gátolják a lakkáz enzim termelését is (Milling és Richardson, 1995), mely enzim jelenléte már kis mennyiségben is rontja a bor minőségét.

A világ különböző részein lévő szőlőtermő területeket vizsgálva találtak e fungicid csoportra rezisztens törzseket, melyek magasfokú rezisztenciát mutattak. Bár ezt intenzív használattal magyarázták (Forster és Staub, 1996), ugyanakkor később több helyen is találtak alacsony

rezisztenciájú törzseket is (Petsikos-Panayotarou és mtsai, 2003). A rezisztencia kialakulásának mechanizmusa még nem tisztázott.

### 2.2.5. Szterol-bioszintézis gátló fungicidek

A hidroxil-anilidek közé tartozó fenhexamid az újabb fejlesztésű botriocid hatóanyagok közé tartozik, és széles körben alkalmazzák a mezőgazdaságban. Hatásmechanizmusát tekintve a szterol bioszintézis gátlók közé tartozik, a C-4 demetiláz enzimet gátolja (Debieu és mtsai, 2001). *B. cinerea* esetében nem akadályozza a konídium csírázását, de alacsony koncentrációban is gátolja a csíratömlő és a micélium növekedését.

*In vitro* fenhexamid rezisztenciát mutató *B. cinerea* természetes populációk már a fungicid használata előtt is kimutathatók voltak Franciaország bortermező vidékein (Leroux és mtsai, 1999). Baroffio és munkatársai (2003) megfigyelései szerint a fenhexamiddal szemben *in vitro* rezisztenciát mutató *B. cinerea* minták aránya a hatóanyag folyamatos alkalmazása mellett a bevezetés után három évvel 100%-ra nőtt. Érdekes, hogy mindezek ellenére a fenhexamid alkalmazásakor nem növekedett a szürkepenészes megbetegedések aránya a vizsgált területen. A *B. cinerea* transzpozon tartalma alapján két populációba sorolható: a transzpozont nem tartalmazó I. csoport rezisztensnek, míg a transzpozont tartalmazó II. csoport szenzitívnek bizonyult (Albertini és mtsai, 2003; Furnier és mtsai, 2003).

## 2.3. Genetikai markerek

A gombatorzsek tipizálása, vagyis a fajszerű azonosítás és a fajon belüli változatok megkülönböztetése a DNS változékonyságának meghatározásával vált lehetővé. Az így kapott információ közvetlenül felhasználható a patogén gombák elleni védekezésben, illetve természetes életmódjuk alaposabb megismerésében.

A növénykórokozó gombák populációgenetikai jellemzéséhez olyan genetikai markereket kell kiválasztani, amelyek (véltetően) függetlenek a szelekciós nyomás alatt álló tulajdonságoktól, és kellőképpen változékonyak a fajon belüli különbségek megjelenítéséhez (McDonald és McDermott, 1993; Parker és mtsai, 1998).

A növénykórokozó gomba-populációk elemzése csak megfelelően kiválasztott genetikai markerekkel valósítható meg. Ezeknek a markereknek egyértelműeknek és kellőképpen informatívoknak, vagyis polimorfoknak kell lenniük. A növénykórban hagyományosan a kórokozók patogenitását, illetve a különböző peszticidekkel szembeni rezisztenciáját vizsgálták a populációk variabilitásának meghatározására (pl. Kolmer, 1991). Mivel azonban ezek a tulajdonságok erős szelekciós nyomás alatt állnak, nem adnak megfelelő támpontot egy kórokozó gomba populáció-genetikai variabilitásáról. Ehhez olyan genetikai markereket kell kiválasztani, amelyek valószínűleg függetlenek az erős szelekciós nyomás alatt álló tulajdonságoktól.

A populáció genetikai vizsgálatokban hosszú ideig az elektroforézis segítségével tanulmányozható alloenzim analízisre korlátozódott a tanulmányozható molekuláris markerek palettája (Parker és mtsai, 1998). A molekuláris technikák fejlődésével azonban lehetővé vált a DNS szekvenciák közvetlen tanulmányozása. A DNS erősen variábilis szakaszai esetenként az egyed azonosítására is alkalmas „ujjlenyomatot” adnak, ezért a DNS markerekkel egészen finom genetikai változások is nyomon követhetőek. A DNS alapú technikák további előnye az enzim fehérjéket vizsgáló alloenzim analízissel szemben, hogy a nem kódoló régiók nem állnak szelekciós nyomás alatt, a DNS pedig egyszerűen kivonható mind élő, mind holt szövetekből és sejtekből. Ezen kívül kis mennyiségű minta is elegendő a vizsgálatokhoz, hiszen a polimeráz láncreakció (PCR) segítségével rövid idő

alatt könnyen felszaporíthatóak a tanulmányozni kívánt szakaszok (Parker és mtsai, 1998).

A genom különböző szakaszai eltérő szelektív nyomás alatt állnak, ezért eltérő arányban fordulnak elő különbségek az egyes DNS szakaszokon belül (Li és mtsai, 1985; Parker és mtsai, 1998). A konzervatív DNS-kötő fehérjét, a hisztont kódoló régióban például valószínűleg az erős szelektív akadályozza meg a mutációk hatására megjelenő variációk felszaporodását, ugyanakkor a nem kódoló régióknál szinte csak a genetikai sodródás befolyásolja a populáción belüli variabilitást (Parker és mtsai, 1998).

A DNS szekvencia változékonyságának direkt vizsgálatával nyerhetők tehát a legegységesebb adatok a növényi kórokozó gombák populációinak elemzéséhez (McDonald és McDermott, 1993). Mint azt korábban említettük, a molekuláris technikák fejlődésével, továbbá a költségek csökkenésével és az adatok elemzését végző számítógépes programok kifejlesztésével lehetővé vált a polimorf régiók szekvenciájának közvetlen összehasonlítása a gomba populációk tanulmányozása során.

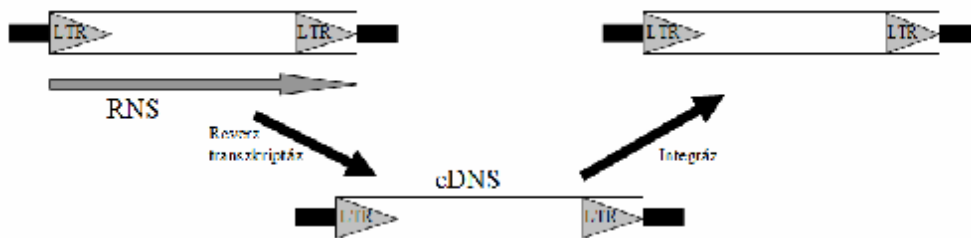
Mindezek miatt nyilvánvalóan szükség van a *B. cinerea* populációk alaposabb molekuláris biológiai vizsgálatára, hiszen csak a megfelelő genetikai információk birtokában tudjuk a céloknak megfelelően jellemezni és kezelni a fellépő növényvédelmi problémákat.

### **2.3.1. Transzpozon elemek**

A transzpozonok a genomba integrált mobilis genetikai elemek (Feschottes és mtsai, 2002). Spontán genetikai változásokat eredményeznek, és szerepük van az érintett élőlény evolúciós változásaiban (Smith és Corces, 1991). A transzpozon elemek (TEs) mind az eukarióta, mind a prokarióta szervezetekben általánosan előforduló szekvenciák. Jelenlétüket először kukoricában írták le (McClintock és mtsai, 1984). Hiányuk vagy jelenlétük

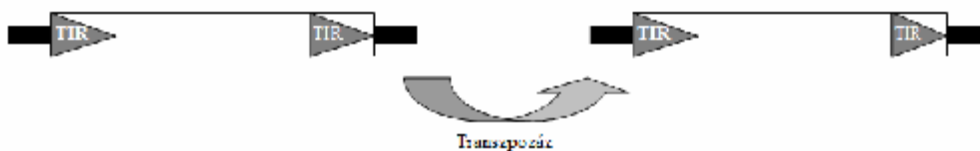
genetikai marker értékű lehet. A gombák körében először *Saccharomyces cerevisiae*-ben találtak transzpozonokat (Boeke és mtsai, 1989).

A transzpozon elemeknek két fő csoportját különítik el (Finnegan, 1988). Az első osztályba a retroelemek tartoznak, amelyek RNS közbeiktatásával, reverz transzkripció útján változtatják a helyüket (kerülnek új helyre a genomban). Egy részük szekvenciájában megtalálhatóak a „hosszú, terminális, ismétlődő szekvenciák”-nak („long terminal repeated sequences - LTRs) nevezett szakaszok (5. ábra).



**5. ábra** Transzpozon elemek transzpozíciója RNS intermedieren keresztül - LTR: long terminal repeated sequence (Finnegan, 1988 ábrája alapján)

A második osztályba tartozó transzpozonok olyan DNS elemek, amelyek a genomban direkt módon (csak DNS-ként előfordulva) változtatják helyüket (6. ábra).



**6. ábra** Transzpozon elemek direkt transzpozíciója - TIR: inverted terminal repetition (Finnegan, 1988 ábrája alapján)

Az első osztályba tartozó retroelemeket számos gombafajban megtalálták már: *Alternaria alternata* (Kaneko és mtsai, 2000), *Ascobolus*

*immersus* (Goyon és mtsai, 1996), *Aspergillus fumigatus* (Neuvéglise és mtsai, 1996), *Aspergillus nidulans* (Nielsen és mtsai, 2001), *Neurospora crassa* (Kinsey és Helber, 1989). A második osztályba tartozó transzpozonok szintén megtalálhatóak a gombákban, például *Agaricus bisporus* (Sonnenberg és mtsai, 1999), *Ascobolus immersus* (Colot és Rossignol, 1995), *Aspergillus niger* (Glazyer és mtsai, 1995), *Magnaporthe grisea* (Kachroo és mtsai, 1994), *Nectria haematococca* (Enkerli és mtsai, 1997), *Neurospora crassa* (Yeadon és Catcheside, 1995), and *Podospora anserina* (Hamann és mtsai, 2000).

*B. cinerea* esetében eddig két transzpozon elemet írtak le. A *Boty* az egyes osztályba, azon belül a gypsy/Ty3 szerű (Metaviridae) csoportba tartozó, LTR régiókat tartalmazó retrotranszpozon (Diolez és mtsai, 1995; Daboussi és Cappy, 2003). A később leírt *Flipper* a második osztályba, azon belül a Tc1/mariner csoport „pogo” családjába tartozik (Levis és mtsai, 1997; Daboussi és Cappy, 2003). A *Flipper* bizonyítottan aktív transzpozon, mely a nitrát reduktáz génbe épülve okoz mutációt (Levis és mtsai, 1997).

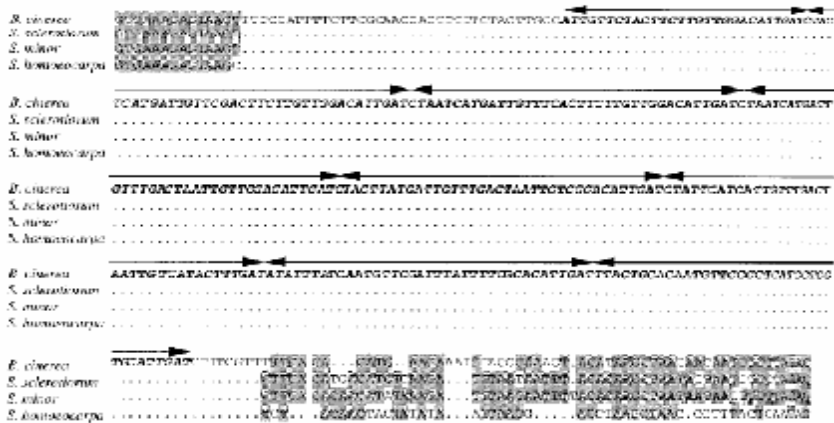
Chilei és francia szőlőről izolált *B. cinerea* populációk vizsgálatakor három csoportot különítettek el az egyes transzpozon elemek előfordulása szerint (Giraud és mtsai, 1997; Martinez és mtsai, 2003; Munoz és mtsai, 2002): mindkét transzpozon elemet tartalmazó, „transposa”-nak nevezett izolátumokat, a csak *Boty* elemet tartalmazó „boty” izolátumokat, illetve egyik elemet sem tartalmazó „vacuma” izolátumokat. A közelmúltban Milicevic és munkatársai (2006) szamócáról származó horvát *B. cinerea* izolátumok tanulmányozásakor a fent említett csoportokon kívül nagy számban találtak csak *Flipper* transzpozont tartalmazó „flipper” izolátumokat is.

### **2.3.2. Szatellit szekvenciák**

Az eukarióta szervezetek genomjának nem kódoló részein olyan egymás után következő (tandem) ismétlődő szekvenciák is találhatóak, amelyeknek még nem ismerjük a pontos funkcióját. Ezeket a néhány száz bázisból felépülő részeket szatellit-DNS-eknek nevezzük. A szatellit szekvencia elnevezése arra utal, hogy a cézium-kloridban (CsCl) történő gradiens centrifugálás során ezek a DNS szakaszok egy jól elkülönülő csúcsként (szatellitként) jelennek meg (Parker és mtsai, 1998). A szatellit DNS-ek leggyakrabban a kromoszóma végein (a kromoszómát védő telomer régióknál), vagy éppen a kromoszóma központjában (a centromer régióhoz közel) helyezkednek el. Léteznek nagyobb ismétlődő egységekből felépülő ún. miniszatellitok és kisebb egységekből felépülő mikroszatellitok is.

#### **Miniszatellit szekvenciák**

A miniszatellit szekvenciák változó számban, tandem módon ismétlődő („variable number tandem repeats” – VNTRs), rövid, 6-120 bázispárnyi (bp) DNS szakaszok közé tartoznak. Legtöbbször szétszórtan helyezkednek el a genomban (Jeffreys és mtsai, 1985). Teljes hosszuk 0,5-120 kilobázis (kb). Erősen variábilis régiók, melyekben egyrészt a felépítő egységek szekvenciája, másrészt az ismétlődő egységek (miniszatellit variant repeats – MVRs) száma változik (Jeffreys és mtsai, 1985). Az első hipervariábilis miniszatellit szekvenciát a 14-es emberi kromoszómában találták (Wyman és White, 1980). Gombákban 1997-ben írták le az első miniszatellitot (Andersen és Torsten, 1997).



7. ábra *B. cinerea* és rokon fajok ATP szintáz gén intron szekvenciája – dőlt betűkkel a miniszatellit régió látható (Giraud és mtsai, 1998)

Giraud és mtsai (1998) találták meg a *B. cinerea* miniszatellit szekvenciáját (MSB1) az ATP szintetáz gén intronjában (7. ábra). Az általuk leírt miniszatellit 37 bázispárnyi ismétlődő szakaszokból áll, AT gazdag, és csak egy lókuszon található a genomban. Az ilyen, egyetlen lókuszon megtalálható, igen variábilis miniszatellitek nagyon jól használhatók a populációs paraméterek meghatározásához (Parker és mtsai, 1998). Az MSB1 karakterisztikája különbözik egyéb miniszatellitekétől, eredete nem ismert, csak egyetlen génuszban található meg és valószínűleg csúszással bekövetkező mutációk során jött létre.

### Mikroszatellitek

A mikroszatellitek ismétlődő, 2–5 bázispárból felépülő genetikai szekvenciák, melyek a genomban szétszórtnan helyezkednek el, kódoló és nem kódoló régiókban egyaránt megtalálhatók. Az eddig vizsgált mikroorganizmusokban nagy számban fordultak elő, az eddig vizsgált összes prokarióta és eukarióta genomból ki tudták őket mutatni (Zane és mtsai, 2002). A különböző allélok a megismételt egységek eltérő számából jönnek létre. Polimorfizmusának egyik oka a repetitív mintázat okozta mutációk



sorozata, illetve magas mutációs rátája (Edwards és mtsai, 1992). Az ezt előidéző mechanizmus még nem ismert, de azt már tudjuk, hogy a hosszvarianciákat eredményező mechanizmus a DNS replikációja során fellépő hiba eredménye. Az ismétlődő motívumsor szempontjából perfekt, imperfekt és összetett szekvenciákat különböztetünk meg (Weber, 1990). A perfekt mikroszatellitek szabályosan ismétlődő egységekből épülnek fel, az imperfekt mikroszatellitek esetén egy vagy több nukleotid ékelődik a perfekt sorba. Az összetett szekvenciájú mikroszatelliteknél különböző típusú ismétlődő szekvenciákból épül fel a mikrosatellit régió.

Bőséges jelenlétüknek és széleskörű elterjedésüknek köszönhetően közkedvelt és hatékony molekuláris markerré váltak. A mikrosatellitek egyaránt alkalmasak fajok közötti rokonsági vizsgálatokra és fajon belüli genetikai sokszínűség meghatározására, ennek következtében felhasználásuk rendkívül széleskörű. Fournier és munkatársai (2002) kilenc polimorf (2–11 allél) mikrosatellit lokuszt találtak a *B. cinerea* genomjában.

### **2.3.3. Molekuláris markerek**

Ahhoz, hogy egy populáció alapvető jellegeit, tehát a reprodukció módját és a genetikai izoláció meglétét vizsgálhassuk, szükségünk van néhány egyszerű, jól ismert, független és stabil lokuszra. Ehhez olyan genetikai markereket kell kiválasztani, amelyek valószínűleg függetlenek az erős szelekciós nyomás alatt álló tulajdonságoktól. Különböző gének variábilis intron régióját régóta sikeresen használják az egyes gomba csoportok elkülönítésére (2. táblázat). Az rRNS-eket kódoló régió kívül más gének, például a transzlációs elongációs faktor 2, az aktin, a  $\beta$ -tubulin, a kitin szintáz gének variábilis intron régióját is sikeresen használták már különböző gombacsoportok elkülönítésére.

**2. Táblázat** Gombák egyes csoportjainak elkülönítésére leggyakrabban használt génszakaszok

Gén	Mikróba	Irodalom
<b>Riboszómális RNS gén csoport</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	Kulling-Gradinger és mtsai, 2002, Mycol Res
<b>Transzlációs elongációs faktor 2 (<i>tefl</i>)</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	Kulling-Gradinger és mtsai, 2002, Mycol Res
<b>Aktin gének</b>	<i>Pneumocystis carinii</i>	Fletcher és mtsai, 1994, Genetics
<b><math>\beta</math>-tubulin gének</b>	<i>Pneumocystis carinii</i>	Li and Eddlin, 1994, J Eukaryotic Microbiol
<b>Kitin szintáz gének</b>	<i>Trichoderma sp.</i>	Kulling-Gradinger és mtsai, 2002, Mycol Res

**Riboszómális RNS géncsoport**

Az egyik leggyakrabban tanulmányozott szakasz a riboszómális RNS szekvenciákat kódoló rDNS régió. Az eukariótáknál a sejtmagi rRNS gének tandem módon ismétlődő egységekbe („cluster”) rendeződnek. Minden egység tartalmazza a riboszómális RNS kis alegység (18S, SSU), az 5.8S alegység és a nagy alegység (25-28S, LSU) génjét (8. ábra).

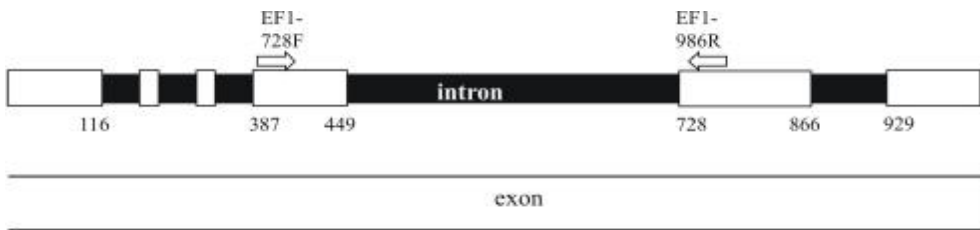


**8. ábra** A gombák riboszómális génjeinek és az azokat elválasztó nem-kódoló szekvenciáknak a vázlatos ábrája. ITS: internal transcribed spacer, IGS intergenic spacer.

Ezek a gének kis mértékű szekvencia változást mutatnak a közel rokon fajoknál, így filogenetikai elemzésekben az egymással távolabbi rokonságban álló fajok összehasonlítására használhatóak fel (Bruns és mtsai, 1991). Az rDNS alegységeket kódoló szakaszok között két „internal transcribed spacer” (ITS) található, két rDNS egységet pedig az IGS-nek („intergenic spacer”) vagy NTS-nek („non transcribed spacer”) nevezett szakasz választja el egymástól. A nem kódoló régiók (ITS, IGS) evolúciósan sokkal gyorsabban változnak, mint az alegységeket kódoló gének, ezért ezek egymással közeli rokonságban álló élőlények (genuson belül fajok, fajon belül populációk) összehasonlítására használhatóak fel (White és mtsai, 1990).

## Transzlációs elongációs faktor

A transzlációs elongációs faktor 1 alfa alegysége (EF-1 $\alpha$ ) egy sejten belüli, a citoszólban található fehérje, mely a fehérjeszintézisben vesz részt. Elsődleges funkciója, hogy katalizálja a GTP függő aminoacil-tRNS komplex felbomlását (Moldave, 1985). Ez az Eukariótáknál és az Archea baktériumoknál megtalálható fehérje egy kópiában van jelen a genomban (Baldauf és Doolittle, 1997). Az EF-1 $\alpha$  fehérjét kódoló *tefl* mintegy 2 kb hosszúságú, intront és exont egyaránt tartalmazó gén (9. ábra). Korábbi eredmények alapján a *tefl* negyedik és ötödik exonja közötti fragmentum (nagy intron) szekvenciája sikeresen használható gombáknál mind a fajok közötti, mind a fajon belüli kapcsolatok vizsgálatára (Roger és mtsai, 1999; Druzhinina és Kubicek, 2005).



9. ábra *Hypocrea jecorina tefl* génjének sematikus ábrája. Fehér színnel a kódoló, fekete színnel pedig a nem kódoló régiók vannak feltüntetve (Druzhinina és Kubicek, 2005 ábrája alapján)

## $\beta$ -tubulin gének

A növénypatogén gombák elleni benzimidazol rezisztencia a  $\beta$ -tubulin gén pontmutációjával van kapcsolatban. A benzimidazolok valószínűleg a gomba tubulinjának  $\beta$ -alegységéhez kapcsolódva, annak szerkezetét megváltoztatva gátolják a mikrotubulusok összekapcsolódását (Davidse és Ishii, 1995). A rezisztenciát a tubulin gén pontmutációja okozza a  $\beta$ -tubulint kódoló *Mbc1* génben (Faretta és Pollastro, 1991), ami megváltoztatja az aminosav sorrendet a benzimidazolok kapcsolódási pontján.

## 2.4. Populációgenetikai elemzések

A növénykórokozó gombák populációinak ismerete a modern növénykórtan immár elengedhetetlen kiegészítője az ellenük történő védekezés kialakításakor. Populációgenetikai elemzésük során hagyományosan a patogenitást és a peszticidekkel szembeni rezisztenciát vizsgálták. A genetikai variabilitás ad lehetőséget arra, hogy a populációk adaptálódni tudjanak a változó környezethez. Ha a populációban többféle allél van jelen, akkor a szelekció révén mindig az az allél terjedhet el, amelyik az adott körülmények között előnyös. Mivel azonban ezek a tulajdonságok erős szelekciós nyomás alatt állnak, csak torzított információt adnak a genetikai variabilitásról. Ezért olyan genetikai markereket kell kiválasztani, amelyek (véltetően) függetlenek a szelekciós nyomás alatt álló tulajdonságoktól. Haploid mikroorganizmusok esetében egy-egy egylókuszos marker nem nyújt elég információt a populációs vizsgálatokhoz, míg egynél több marker több lókuszos vizsgálata alapvető és jóval bővebb információkat biztosíthat a populációk jellemzéséhez.

Különböző, nem összefüggő lókuszokat tartalmazó genotípusok vizsgálata esetén a lókuszok közötti asszociáció mérhető egy - először árpa esetében alkalmazott - technika segítségével (Brown és mtsai, 1980). Az **asszociációs index ( $I_A$ )** teszt a genetikai távolság meghatározására szolgál. Mikrobák esetében Maynard Smith és munkatársai alkalmazták először 1993-ban. Az asszociációs index ( $I_A$ ) a következő módon számolható:

$$I_A = V_O / V_E - 1 ,$$

ahol  $V_O$  a megfigyelt,  $V_E$  pedig a várható varianciája a lókuszok számának, amiben két egyed különbözik. Abban az esetben, ha kapcsoltsági egyensúly áll fenn a gyakori rekombinációs események miatt, az  $I_A$  várható értéke zéró, klonális populációk esetében azonban ez az érték lényegesen eltér zérótól. Az

asszociációs index ( $I_A$ ) teszt segítségével megtudhatjuk, hogy az elemzett genomban a különböző lókuszon lévő allélok egy populációban random vagy nem random módon kapcsolódtak-e (Kasuga és mtsai, 2003). Kiszámítása a kapcsoltsági egyensúlytalanság analízis segítségével történik.

**Kapcsoltsági egyensúlytalanságnak**<sup>8</sup> nevezzük azon értéket, amely megmutatja két különböző lókuszon két adott allél együttes előfordulásának gyakoriságát. Különböző lókuszon alléljainak olyan csoportját, melyek általában egy csoportban öröklődnek tovább, haplotípusnak nevezzük. A különböző lókuszon adott alléljainak együttes öröklődése arra utalhat, hogy a lókuszon pozitív szelektív nyomás hat (Sabeti és mtsai, 2006).

A **Chi-square teszt**<sup>9</sup> próbacsaldót sok statisztikai elemzést alkalmazó tudományterület (pl. informatika, biostatistika) használja. Véges számú véletlen esemény, pl. egy kísérlet lehetséges kimeneteleinek valószínűségeivel kapcsolatban fogalmaz meg és vizsgál hipotéziseket. A próba során a megfigyelt kimenetek gyakoriságai és ezek nullhipotézis melletti elméleti értékei közötti eltérések alapján döntünk, mégpedig a Chi-square-statisztikával, amely az említett eltérések négyzeteiből számított súlyozott összeg. A statisztika nulleloszlása közelítőleg Chi-square-eloszlású, melynek szabadságfoka a tesztelt kimenetek száma mínusz egy, csökkentve még az esetleges ismeretlen, és ezért magukból a megfigyelésekből becsült paraméterek számával. A próba elvégezhető folytonos változó feltételezett eloszlására vonatkozóan is oly módon, hogy a változó értékeit véges sok egymást követő intervallumba beosztva az intervallumokat tekintjük kimeneteknek (kontingenciatáblázat). Ha a feltételezett eloszlás típusa normális, akkor a próba neve normalitásvizsgálat.

---

<sup>8</sup> linkage disequilibrium

<sup>9</sup> khi-négyzet próba vagy  $\chi^2$  teszt

Ha a gyakoriságokat ismert valószínűségekkel hasonlítjuk össze, akkor tiszta illeszkedésvizsgálatot (goodness of fit test) végzünk. Ha csak a valószínűségek típusát tételezzük fel, amely ismeretlen paramétert tartalmaz, akkor az eljárás neve becsléses illeszkedésvizsgálat. Ha azt a hipotézist vizsgáljuk, hogy több független minta azonos eloszlásból származik-e, akkor a próba neve homogenitásvizsgálat (homogeneity test). A döntéshez használt Chi-square-statisztika ilyenkor a mintákból származó gyakoriságokat az egyesített mintából számolttal hasonlítja össze. A Chi-square-teszt véletlen események, pl. kísérleti kimenetek függetlenségének vizsgálatára (independence test) is alkalmas (kontingenciatáblázat). A próba ilyenkor két-két kimenetel együttes gyakoriságát veti össze a függetlenség feltételezése mellett kiszámítható értékkel. A Chi-square-teszt statisztikája csak a mintaelemek számának növelésekor közelíti a Chi-square-eloszlást. A nemparaméteres eljárások közé szokták sorolni, mert a nulleloszlásra ill. valószínűségekre semmiféle kikötés, korlátozó feltevés nem vonatkozik. (<http://www.biostat.hu/biostat/indit1.asp?p=szotar2&k=8>)

A **maximum Chi-square teszt** a potenciális rekombinációs események azonosítására szolgáló módszer két szekvencia vagy két szekvencia és egy valódinak vélt, származtatott szekvencia között. A teszt a polimorf helyek várhatóan véletlen előfordulásának megoszlását hasonlítja össze a vizsgált szekvenciák mentén (Maynard-Smith, 1992). A teszt során az azt futtató program megvizsgál minden helyet az igazított szekvenciák mentén, és létrehoz egy 2x2-es mátrixot, ami tartalmazza a különbségek számát a bal - és az aktuális pozíciót a jobboldalon. Csupán két szekvencia összehasonlítása esetén a mátrix egyik sora a különbségek, a másik az azonosság arányát tartalmazza. Mikor két szülői és egy származtatott szekvencia kerül összehasonlításra, a mátrix sorai tartalmazzák a különbségeket minden szülői szekvencia és a származtatott szekvencia

között. A chi-square teszt értékét ez a mátrix határozza meg, és a pozíció, ahol a teszt ezt a maximum értékét eléri, határozza meg a feltételezett rekombinációs pontot. A szignifikancia szintje a próba párok arányaként határozható meg, nagyobb maximum chi-square értékkel, mint az addig megfigyelt eredményeké.

Az **F-statisztika**<sup>10</sup> a populációgenetikában a heterozigotizmus szintjét, illetve a csökkenés mértékét pontosabban írja le egy populációban, mint ahogy azt a Hardy-Weinberg törvény alapján várhatnánk. Szintén felfogható, mint a gének közötti korreláció fokmérője, felvázolva a felosztott populációk különböző hierarchikus szintjeit. Ez az összefüggés számos evolúciós folyamat által befolyásolt (mint a mutáció, migráció, beltenyészet, természetes szelekció), de újszerű felépítése okán megfelelően használható a genetikai sodródás következtében fellépő allél fixáció mértékének meghatározásában is. Az F-statisztikának egy speciális esete, illetve gyakran használt módszere a populáció genetikai területén a **fixációs index (F<sub>ST</sub>)**, amely a genetikai polimorfizmus (SNP-k és mikroszatellitek vizsgálati eredményei) alapján zajló populáció-differenciáció mérőfoka, amely a genetikai variabilitást a populációkon belül és populációk között hasonlítja össze. Definícióját Hudson és munkatársai adták meg 1992-ben a következőképpen:

$$F_{ST} = \frac{\Pi_{Between} - \Pi_{Within}}{\Pi_{Between}} ,$$

ahol  $\Pi_{Between}$  és  $\Pi_{Within}$  fejezi ki két egyed, páronkénti különbségeinek átlag számát, amelyek különböző ( $\Pi_{Between}$ ) vagy ugyanazon ( $\Pi_{Within}$ ) populációból lettek mintázva. Az átlag páronkénti differencia egy populáción belül

---

<sup>10</sup> eloszlás statisztikai próba

kiszámítható a páronkénti differencia összegének a párok számával való elosztásával. Amikor az  $F_{ST}$  ezen definícióját alkalmazzuk, a  $\Pi_{within}$  értékét minden populáció esetében ki kell számolni, majd átlagolni, különben a párok populáción belüli random mintavétele során a legnagyobb mintaszámmal rendelkező populáció szerepel a legnagyobb súllyal.

A **Phi tesztet** Bruen és munkatársai (2006) dolgozták ki egy egyszerű, gyors statisztikai tesztként a rekombináció jelenlétének vizsgálatára. Több populációt feltételezve a cél a szekvenciák közötti a rekombinációs szignál jelenlétének a meghatározása. A teszt előnye a többi általános teszttel szemben az, hogy nem következtet tévesen rekombináció jelenlétére a mutációs ráta korrelációja esetén, ami esetenként mitokondriális DNS esetében tapasztalható. A teszt használható önmagában, vagy a rekombináció jelenlétének filogenetikai kapcsolatok oldaláról történő megerősítéseként, illetve a rekombináció jelenlétének önálló ellenőrzésére, amennyiben pozitív értékű rekombinációs ráta értéket kapunk. Ez a megközelítés kiváltképpen hasznos a rendszeres mutációk rekombinációtól való megkülönböztetésére. A teszt könnyen használható sok szekvencia és lókuszt jelenléte esetén, számítási hatékonysága hasonló körülmények között jobbnak bizonyul más megoldásokénál.

A **p-érték**<sup>11</sup> az első fajta hiba (Type I error, alpha error, a nullhipotézis hibás elvetése) valószínűségét adja meg. A szokásos hibahatárnak megfelelően ha a p-érték 5%-nál kisebb vagy azzal egyenlő ( $p \leq 0.05$ ), akkor a  $H_0$ -t (null hipotézis) elvetjük, ha pedig nagyobb ( $p > 0.05$ ), akkor megtartjuk.

Akkor mondjuk, hogy egy megfigyelt hatás, különbség stb. statisztikailag **szignifikáns**, ha a hatásra (különbségre, hányadosra stb.) vonatkozó nullhipotézist a megfigyelés alapján el kell utasítanunk. Ez

---

<sup>11</sup> p-value, observed significance level



szemléletesen azt jelenti, hogy a mintában megfigyelt jelenség bizonyíthatóan (természetesen egy bizonyos, hagyományosan  $\leq 5\%$  tévedési valószínűség, pontosabban első fajta hiba fenntartásával) nem a véletlen műve, hanem a populáció szintjén is fennáll. Ezzel szemben a 'statisztikailag nem szignifikáns' azt jelenti, hogy a mintában tapasztalt tulajdonság számottevő valószínűséggel (hagyományosan  $> 5\%$ ) lehet a véletlen műve is.

A **Bayes módszer**<sup>12</sup> klasszikus statisztikai módszer az adatokból számolt gyakoriságokra. A gyakoriságokból becsült valószínűségekre építi azokat a modelleket, amelyekből következtetéseit (statistical inference, hipotézisvizsgálat) levonja. Ezeket a statisztikai módszereket a külföldi szakirodalom éppen ezért frekventista eljárásoknak nevezi (gyakoriság = frequency). A hazai szakirodalom csak elvétve él ezzel a megkülönböztetéssel.

A statisztikának egy ettől gyökeresen eltérő, újabban egyre inkább előtérbe kerülő felépítése a valószínűségszámítás egy régóta ismert tételére, a Bayes-tételre alapozza a következtetéseket. Ennek lényege, hogy valamilyen megfontolások alapján előzetes (a priori) valószínűségeket állapít meg, majd a minta - és Bayes tétele - segítségével jut újabb (a posteriori) valószínűségekhez, amelyek hozzásegítik a statisztikai következtetéshez. A módszernek számos előnye van, de a gyakorlatban ritkán fordul elő, hogy az a priori valószínűségeket egyértelmű, mások számára is elfogadható módon lehet meghatározni.

A **bootstrap analízis** mintából való mintavételen alapuló eljárás, amely azon az egyszerű elven alapul, hogy ha adott mintából elég sok új mintát alkotunk valamilyen módon, az ezekből számolt statisztikák (átlag, szórás stb.) eloszlása jól megközelíti a teljes populációból vett minták statisztikáinak eloszlását. Leginkább olyankor hasznos vizsgálati módszer,

---

<sup>12</sup> bayesian method

mikor nem ismeretesek egyszerű képletek a becslés pontosságának (standard hibájának, esetleg megbízhatósági intervallumának) kiszámítására (pl. variációs együttható megbízhatósági intervallumának meghatározása esetén). Hátránya viszont, hogy az eloszlások széleinél pontatlanul működik (nem alkalmas például a 95%-os percentilis<sup>13</sup> megbízhatósági intervallumának meghatározására). A bootstrap vizsgálat során az eredeti mintából visszatevéssel húzunk kb. 1000-2000 új mintát.

## 2.5. Szőlészeti és borászati jelentőség

A *B. cinerea* – a szőlő peronoszpóra (*Plasmopara viticola*) és a szőlő lisztharmat (*Erysiphe necator* /syn.: *Uncinula necator*/) mellett – a szőlő termésbiztonságát leginkább veszélyeztető három, járványos betegséget kiváltó kórokozó közé tartozik Magyarországon (Lázár és mtsai, 2004). Kiválthatja egyrészt a szőlő *szürkerothadását*, másrészt a szőlőbogyók *nemesrothadását*.

### 2.5.1. A szürkerothadás

A szőlőbogyót fertőző *B. cinerea* által okozott kár az egyik legjelentősebb, de jórészt megoldatlan növényvédelmi probléma a szőlőtermesztésben, amelynek előzményei és következményei rendkívül összetettek. A szőlőn megjelenő szürkepenész jelentős termés kiesést okozhat, emellett ronthatja a bor minőségét. A különböző gyümölcstermesztési ágazatok közül a szőlőtermesztés a maga 8 millió hektárjával gazdaságilag az egyik legjelentősebb terület, és ebben az ágazatban a *B. cinerea* becslések szerint 2 billió US\$ veszteséget okoz évente (Vivier és Pretorius, 2002).

---

<sup>13</sup> folytonos változókra vonatkozó jellemző, pl. a szóródás jellemzésére

A szőlőtermelők különböző fungicidek alkalmazásával próbálnak védekezni a szürkerothadás ellen, de egyre gyakrabban jelennek meg a különböző fungicidekkel szemben rezisztens törzsek (Alfonso és mtsai, 2000; Lattore és mtsai, 2002). A sikeres védekezést megnehezíti, hogy noha genetikailag nagyon változékony gombáról van szó, a populációk szerkezetéről nincsenek megfelelő ismereteink.

A fertőzés kialakulását a korábbiakban már részleteztük (2.1.3. Patogenitás fejezet), a továbbiakban a szőlőbogyóban és az összetételében bekövetkező változásokra fogunk kitérni. A fertőzés következtében végbemenő változások nagyon sokrétűek, ezek közül az első és legszembetűnőbb a cukortartalom nagymértékű csökkenése, mely elsősorban a gomba biomassza képződésére hasznosul. Ezen kívül jelentősen csökken a must nitrogén és vitamin tartalma – a tiamin mennyisége 70-80%-al, a piridoxin mennyisége 50%-al (Dittrich és Sponholz, 1975). A szerves savak közül a borkősav oxidációja progresszíven növekszik a fertőzés előrehaladtával. A fellazult héjon keresztül a bogyó sok vizet veszít, de ez mégsem vezet a bogyóhús anyagainak bekonzentrálásához, mert a vízveszteség jelentős része pótlódik a tőkéből.

A gomba pektin bontó aktivitása jelentős, ezért a must pektin tartalma akár teljesen le is bomolhat, ugyanakkor növekszik a galakturonsav, illetve ennek oxidációjával keletkező galaktársav – nyálkasav – mennyisége, mely az egészséges mustban nem fordul elő. A pektin-metilészteráz enzim aktivitása következtében a metil-alkohol tartalom növekedése is számottevő. A *B. cinerea* a bor kezelését és az erjedést károsan befolyásoló poliszacharidok szintézisére is képes. A glükánok ( $\beta$ -D térállású glikozidos kötással kapcsolódó, elágazó láncú, nagy molekula tömegű glükóz polimerek) lényegesen rontják a borok szűrhetőségét (Dubourdieu és mtsai, 1978), a galaktózban és mannózban gazdag heteropoliszacharidok pedig az

alkoholos erjedést gátolják és az ecetsav termelődést fokozzák az erjedés során (Ribéreau-Gayon és mtsai, 1979). A gomba által okozott tápanyaghiányos állapot a mustok vontatott erjedéséhez vezet.

A szürkerothadás legsúlyosabb borászati következményének a gomba lakkáz aktivitása tekinthető, amellyel a bogyó fenolos vegyületeit kinonokká oxidálja. Fehérboroknál ez barnulást, barna törést, keserű ízanyagok megjelenését, vörösborokban a színanyagok lebomlását eredményezi és csökkenti a rezveratrol tartalmat is.

A szürkerothadás folyamata során a *B. cinerea* által feltárt szőlőbogyóban számos szaprobionta penészgomba (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Aurebasidium*, *Trichotecium* fajok), élesztőgombák és ecetsav baktériumok (főleg *Gluconobacter*, *Acetobacter* fajok) is fejlődésnek indulhatnak, hozzájárulva a bogyó értékes anyagainak lebontásához, a kellemetlen íz és illat anyagok kialakulásához. Amennyiben ez a társult mikroflóra jelentősebb arányban vesz részt a fertőzés kialakulásában, *vegyesrothadásról* beszélünk. Ennek eredményeként a fertőzött szőlőből készült mustok jó minőségű borkészítésre általában már nem használhatóak (Magyar, 1998).

### **2.5.2. A nemesrothadás, az aszúsodás**

A természetes borok és borkülönlegességek világszerte a szőlő- és borgazdaságok meghatározó termékei. Magyarország zászlós bora, világhírű borkülönlegességünk a Tokaji Aszú. Világhírét a XVI.-XVII. században szerezte, amikor Európában dicshimnuszokat zengettek a Tokajiról. Mária Terézia alkímistái aranyat kerestek benne, a lengyel királyi és nemesi udvarokat nem lehetett belőle kellő mennyiséggel ellátni. A szállóigévé vált „Vinum regum, rex vinorum”<sup>14</sup> címet XIV. Lajos francia király udvarában

---

<sup>14</sup> „Királyok bora, borok királya”

nyerte, de az orosz cári udvar is „borvásárló bizottságot” tartott fenn az aszú rendszeres beszerzésére.

Ez a világon párját ritkító egyedi minőség a kivételes adottságokkal bíró termőhely – a Tokaji borvidék<sup>15</sup>-, jól aszúsodó hungarikum szőlőfajták - Furmint, Hárslevelű stb.- mellett a *B. cinerea* áldásos közreműködésének eredménye (Kállay, 1998).

A nemesrothadás, azaz az aszúsodás kialakulásához több alapvető feltételnek kell teljesülnie: a nedves időjárás a szőlőt már teljes érésben érje, a bogyók épek legyenek, a nedves időszakot száraz, meleg idő kövesse, illetve a szőlőfajta aszúsodás szempontjából megfelelő tulajdonságokkal bírjon.

Mindezidáig azt az alapvető kérdést nem sikerült megválaszolni, hogy a nemes rothadást eredményező *B. cinerea* törzsek geno és/vagy fenotípusosan eltérnek-e a szürke rothadást okozó törzsektől. Jelenlegi ismereteink alapján a különbségek a folyamat mértékében és körülményeiben vannak, a nemesrothadást a gomba metabolizmusának biokémiai folyamatai és a szőlő töppedésének fizikai változásai együttesen eredményezik. A biokémiai folyamatok alapvetően azonosak a szürkerothadáskor lejátszódó folyamatokkal, a legnagyobb különbséget mégis az okozza, hogy a túlrett szőlő esetén a fürtkocsány elfásodik, így nincs lehetőség a töppedő bogyóból elpárolgó víz pótlására, ami az oldott anyagok bekonzentrálódását eredményezi.

A bekonzentrálódás során egyre növekvő ozmotikus nyomás korlátozza a gomba növekedését és metabolizmusát, és megváltoztatja az extracelluláris enzimek aktivitását. A gombahifák az epidermisz alatti sejtrétegekben növekednek, a felületi légmicélium képzés minimális vagy

---

<sup>15</sup> Az aszúsodás, megfelelő körülmények között más borvidékeken és szőlőtermő területeken is kialakulhat.

hiányzik. A termés össztömege felére-ötödére, a kinyerhető must mennyisége töredékére csökken, mindez azonban rendkívül nagy minőségjavulással jár együtt.

Mindamellett, hogy a gomba szénhidrát felhasználása következtében a cukortartalom abszolút értékben csökken, a bekoncentráció következtében igen jelentős cukorkoncentráció növekedés tapasztalható, amely 600 g/l fölé is emelkedhet. A cukortartalmat alacsony glükóz-fruktóz arány jellemzi, a magas fruktóz tartalom az édesség érzetet fokozza. Poliszacharidok és pektinanyagok lebontásával az egyéb hexózok (ramnóz, galaktóz, mannóz), pentózok (arabinóz, xilóz), valamint a galakturonsav mennyisége is növekszik (Kerényi, 1977).

A gomba cukoroxidációja során, az oxigénellátottság korlátozott volta miatt (légmicéliumok hiánya) jelentősebb mennyiségű glicerín és glükonsav keletkezik. Mivel a glükonsav felhasználási képessége a gomba növekedésének stacioner fázisában megszűnik, így az feldúsul a bogyóban (Donéche, 1989), és 10-30 g/l glicerintartalom mellett, 1-3 g/l mennyiségben található meg az aszú mustokban. Ezek a vegyületek egészséges szőlők mustjában csak nyomokban találhatóak meg, ezért más tényezők együttes figyelembevételével kiváló indikátorai a botritiszes tevékenységnek. A megnövekedett cukortartalom mellett a jellegzetes illat- és zamatanyagok képezik az aszúsodott szőlő legfőbb értékeit. Ezek kémiai összetétele még nem teljesen feltárt, de jelentős szerepet játszik közöttük a furfurool, a benzaldehid, a fenilacetaldehid és a benzilcianid. A mézre emlékeztető illatban kulcsszerepe van a szotolon nevű (3-hidroxi-4,5-dimetil-2-furanon) laktonnak (Mashuda és mtsai, 1984).

Szőlészeti, borászati és gazdasági szempontból fontos, hogy átfogó ismeretek megszerzése révén kevesebb növényvédőszer kerüljön

felhasználásra, ugyanakkor nagyobb termésbiztonságot érjünk el mind a száraz fehér és vörös, mind a kései szüretelésű és a különleges minőségű botritiszes borok esetében is. A *B. cinerea* populációk megismerése révén alapvető információkhoz juthatunk a populációk szerkezetéről, tulajdonságairól, eredményesebbé válhat az ültetvények kezelése az esetlegesen különböző genetikai tulajdonsággal és eltérő növényvédőszer érzékenységgel rendelkező törzsekkel szemben.

### 3. Kérdések és célkitűzések

A szürkerothadás kórokozója a *Botrytis cinerea* (teleomorfi: *Botryotinia fuckeliana*) gombafaj, számos növénykultúra rendszeres és jelentős károsítója. A *B. cinerea* nagyon változatos megjelenésű, fenotípusában és genotípusában is nagy változékonyságot mutat. A modern növénykörtan kiemelt figyelmet fordít a patogén gombapopulációk genetikai szerkezetének feltárására, hogy ezen információk megismerése révén alakíthassák ki, illetve egészíthessék ki a védekezés stratégiáját.

A dolgozatban bemutatott – korántsem befejezett – kutatásunk célja, hogy választ keressünk azokra a kérdésekre, melyek mind a tudományos közélet, mind a mindennapi szőlőművelésbeni, növényvédelmi és borászati gyakorlatban felmerülhetnek. A gyakorlatban felmerülő kérdések megválaszolásához azonban először az elméleti alapokat, jelen esetben az Egri borvidéken előforduló *B. cinerea* populációk genetikai diverzitását kell megvizsgálunk és ezen keresztül a következő kérdésekre választ kapunk:

1. Genetikailag milyen módon épül fel az Egri Borvidék a *B. cinerea* állománya, ha többféle populáció létezik, akkor milyen fenotípusos és genotípusos különbségek vannak közöttük?
2. Vannak vagy lehetnek-e speciális az Egri Borvidékre jellemző markerek vagy szekvenciák?
3. Milyen genetikai markerek alkalmasak a *B. cinerea* populációk vizsgálatára?
4. Milyen módon (szexuális illetve klonális) szaporodnak az egyes populációk?
5. Van vagy lehet-e földrajzi alapú különbözőség a borvidék populációi között?
6. Van-e összefüggés a fungicid rezisztencia és a vizsgált genetikai paraméterek között?



## 4. Anyag és módszer

### 4.1. Izolálás, törzsgyűjtemény és fenntartás

Az Egri és a Tokaji borvidék különböző szőlőtermő területeiről 2003 és 2006 között gyűjtöttünk *B. cinerea*-val fertőzött fűrt-részleteket és szőlőbogyókat, júliustól novemberig terjedő időszakban. A minták egymás közötti fertőződésének elkerülése végett a gyűjtés közben használt fém ollókat rendszeresen lángoltuk, illetve a begyűjtött izolátumokat steril mintavevő zacskókba gyűjtöttük. Az izolálás első lépéseként a bogyókról konídiumokat vittünk át spóraszórással bengál-rózsa szelektív táptalajra (Scharlau Chemie S.A. Spain). Azon mintákat, amelyek esetében a bogyók felszínén spórák (még) nem voltak észlelhetőek, nedves kamrába tettük és 28 °C-on inkubáltuk csírázásukig. A bengál-rózsa táptalajon csírázásnak indult spórákat sztereo mikroszkóp alatt válogattuk, majd áthelyeztük a növesztéshez szükséges burgonya-dextróz agar<sup>16</sup> táptalajra (Scharlau Chemie S.A. Spain), ily módon létrehozva a vizsgálatainkhoz szükséges egyspórás izolátumokat. A táptalajokat a gyártó utasításának megfelelően készítettük el. Az izolálási eljárás után az izolátumokat évjárat, származási hely szerint rendezve burgonya dextróz agaron tartjuk fenn, illetve -80 °C-on 50%-os gliceriben tároljuk (lásd Függetlenség 1-2.).

### 4.2. DNS izolálás

A genom vizsgálatához Petri-csészén növesztett tenyészet micéliumából nyertük ki a DNS-t. A sejtek feltárása apró kerámiagolyókat alkalmazó, nagy teljesítményű, mechanikus sejtfeltáró készülék segítségével (MagNaLyser, Roche) történt. Az extrakcióhoz kereskedelmi forgalomban

---

<sup>16</sup> PDA, Potato Dextrose Agar

kapható DNS izoláló kit-et (DNEasy Plant Mini Kit, Qiagen) használtunk, a gyártó leírása szerint (lásd Függelék 3.).

### 4.3. Transzpozonok felszaporítása és detektálása

#### **Detektálás gél elektroforézissel**

A transzpozonokat Munoz és munkatársai (2002) által leírt duplex PCR alkalmazásával mutattuk ki. A *Boty* transzpozon elem detektálásához a következő primereket használtuk (Diolez és mtsai, 1995):

LTR98: 5'-AGCCTGTAGAATCACCAACG-3',

LTR728: (5'-CGGTATTTCTGGTTGGCA-3'.

A *Flipper* transzpozon elem felszaporításához a Levis és munkatársai (1997) által leírt

F300: 5'-GCACAAAACCTACAGAAGA-3',

F1500: 5'-ATTCGTTTCTTGGACTGTA-3'

primerpárt használtuk. Mivel a két reakciótermék eltérő nagyságú (*Boty*: 648 bp, *Flipper*: 1250 bp), a két transzpozon elemet ugyanazon reakcióban szaporítottuk fel. A PCR reakciót 25 µl térfogatban végeztük Taq Master 2x (Fermentas) PCR mastermix reakció elegy használatával. A reakció körülményei a következők voltak: denaturáció 95 °C, 3 perc; majd 95 °C 1 perc, 60 °C 1 perc, 72 °C 1 perc öt ciklusban, majd 90 °C 1 perc, 60 °C 1 perc, 72 °C 1 perc harminc ciklusban; végül: 72 °C 15 perc. Amennyiben a kettős reakcióban nem történt amplifikáció, külön-külön reakcióban is elvégeztük a *Boty* és a *Flipper* transzpozon elemek felszaporítását.

#### **Detektálás dot blot analízissel**

A vizsgálatok során a minták elemzéséhez pozitív töltésű Nylon membránra (Roche) 200 ng DNS-t vittünk fel, 0,5 M NaOH és 1,5 M NaCl oldatban 20 percig denaturáltuk, majd 0,5 M Tris-HCl (pH: 7,5) és 1,5 M

NaCl oldatban további 20 percig neutralizáltuk. A membrán kiegyensúlyozása 2X SSC oldatban történt 5 percig, majd 120 °C-on tartottuk 30 percig és DIG Easy Hyb (Roche) oldatban prehibridizáltuk 30 percig. Az overnight hibridizáció ugyanabban az oldatban 42 °C-on történt a *Boty* (648 bp), illetve a *Flipper* (1250 bp) próbák hozzáadásával. A próbák DIG jelöltek voltak, a jelöléshez PCR DIG Synthesis Kitet (Roche) használtunk a gyártó utasításai szerint. Primereként az előzőekben ismertetett LTR98 és LTR728, valamint F300 és F1500 primerpárokat használtuk.

#### 4.4. DNS fragmentumok amplifikációja és detektálása

A PCR reakciókban használt primereket az Integrated DNA Technologies Inc. (Coralville, USA) szintetizálta. A reakciókat MWG Primus Thermal Cycler-ben végeztük. A reakciókban felszaporodott termékeket 1,5 %-os, etidium-bromidot tartalmazó agaróz gélben, TAE pufferben (40 mM TRIS, 1mM EDTA, pH=8,0 jégecettel beállítva) futtattuk. A futtatást a szokásos körülmények között végeztük (Sambrook és mtsai, 1989).

##### 4.4.1. Szatellit szekvenciák felszaporítása

###### A miniszatellit szekvenciák felszaporítása

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

MSB1F: 5'-AAGTTGCTGGTTCCTTGA-3',

MSB1R: 5'-GTTGCAACCGGCGTAGAT-3'.

Az amplifikációt 25 µl térfogatban végeztük, Pwo Mastermix 2x (Roche) reakcióelegy felhasználásával. A PCR reakció körülményei a következők voltak: denaturáció 95 °C, 3 perc; majd 95 °C 1 perc, 60 °C 1 perc, 72 °C 1 perc harminc ciklusban; végül 72 °C 15 perc.

## A mikroszatellit szekvenciák felszaporítása

Öt mikroszatellit szekvencia (Bc2, Bc3, Bc6, Bc7 és Bc10) vizsgálatát végeztük. A Furnier és munkatársai (2002) által leírt amplifikációs protokollokat és primereket használtuk. A fragment analízis automatizált szekvenáló berendezés (ABI PRISM® 310 Genetic Analyser) segítségével történt. A forward primerek 5' vége fluoreszcensen jelölt volt - Bc2: FAM , Bc3: NED, Bc6: NED, Bc7: FAM és Bc10: VIC – a berendezés gyártója leírásának megfelelően.

### 4.4.2. Molekuláris markerek felszaporítása

A *tefl* felszaporítása a Kulling-Gradinger és munkatársai (2002) által használt primerekkel történt:

EF1-728F: (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3',

EF1-986R: (GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3'.

Az amplifikációt 25 µl térfogatban végeztük, Pwo Mastermix 2x (Roche) reakcióelegy felhasználásával. A PCR reakció körülményei a következők voltak: denaturáció 95 °C 3 perc; majd 95 °C 1 perc, 59 °C 1 perc, 72 °C 1 perc harminc ciklusban; végül 72 °C 15 perc.

A *tubl* amplifikációjához a Furnier és munkatársai (2005) által leírt és használt primerpárt használtuk:

155: 5'- CAACCTTCAAATGCGTGAG - 3',

1174: 5'- AGATGGGTTGCTGAGCTTCA - 3'.

Az amplifikációt 25 µl térfogatban végeztük, Pwo Mastermix 2x (Roche) reakcióelegy felhasználásával. A PCR reakció körülményei a következők voltak: denaturáció 95 °C 3 perc; majd 94 °C 1 perc, 55 °C 1 perc, 72 °C 1 perc öt ciklusban, majd 94 °C 1 perc, 55 °C 1 perc, 72 °C 1 perc harminc ciklusban; végül 72 °C 15 perc.

Az **IGS** szekvenciák egy általunk kiválasztott részletének felszaporításához a következő primereket használtuk:

BcIGS F: 5'-GAAAATCAACGTCTCGAAATCC-3',

BcIGS R: 5'-CGCGAAGGGTAAAATCAAATC-3'.

Az amplifikációt 25 µl térfogatban végeztük, Pwo Mastermix 2x (Roche) reakcióelegy felhasználásával. A PCR reakció körülményei a következők voltak: denaturáció 95 °C 3 perc; majd 95 °C 1 perc, 58 °C 1 perc, 72 °C 1 perc harminc ciklusban; végül 72 °C 15 perc.

#### 4.5. Szekvenálás

Szekvenálás előtt a mintákat Microcon YM-100 oszlopon (Millipore) és Roche High Pure PCR Product Purification Kit felhasználásával tisztítottuk a gyártó utasításai szerint (lásd Függelék 4-5.), majd a megfelelő mennyiséget beszárítva juttattuk el szekvenáltatni. A szolgáltatást az MWG Biotech AG (Erdberg, Németország) megbízás alapján végezte. Amennyiben a mintákat agaróz gélből kellett kivágni a szekvenáltatást megelőző tisztításhoz, a Roche High Pure DNA purification Kit-et használtuk, a gyártó utasítása szerint.

A szekvenciákat ellenőrzést követően az NCBI GenBank oldalain (Accession numbers: EU194917-EU194951) helyeztük el (lásd Függelék 6.).

#### 4.6. Szekvencia elemzések

A DNS szekvenciák illesztését a Clustal X. 1.81 (Thompson és mtsai, 1997) programmal, majd azt követően a Genedoc 2.6 (Nicholas és mtsai, 2007) programmal végeztük. Az elemzésekhez és számításokhoz PAUP 4.0 B10 (Swofford, 1998) filogenetikai programcsomagot használtunk. A törzsfá

készítéséhez heurisztikus keresést alkalmaztunk. Az így kapott törzsfák egyes elágazásainak valószínűségét bootstrap analízissel teszteltük.

#### 4.7. Rekombináció analízis és populáció differenciálódás

A *Botrytis cinerea* izolátumok variabilitását különböző, a rekombináció analízis, illetve a differenciálódás mértékét megmutató programok és tesztek segítségével mértük fel.

A molekuláris filogenezis elemzésére a MEGA 3.1 (Kumar és mtsai, 2004), a PhyML (Guindon és Gascuel, 2003, elérhető: <http://atgc.lirmm.fr/phyml/> internetes címen) és a Mr. Bayes v3.0B4 (Huelsenbeck és Ronquist, 2001) programokat használtuk. A későbbiekben a MODELTEST v.3.06 (<http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html>) internetes oldalt használtuk a legvalószínűbb nukleotid szubsztitúciós modell kiválasztására, AIC (Akaike information criterion) kimeneti stratégiát alkalmazva (Posada és Crandall, 1998).

A haplotípus kapcsolatok felderítésére a szekvenciákat a DNASp programmal (Rozas és mtsai, 2003) elemeztük. Minden haplotípus egy-egy szekvenciáját illesztettük, és NEXUS formátumba konvertálva vizsgáltuk parsimony analízis segítségével a fennálló kapcsolatokat. A TCSv. 2.11 (Clement és mtsai, 2000; <http://darwin.uvigo.es/software/tcs.html>) program segítségével vettük igénybe az adatok elemzésére.

Az asszociációs index segítségével megtudhatjuk, hogy vajon a különböző lókuszkokról származó allélok egy populációban random vagy nem random kapcsolódnak a vizsgált genomban (Kasuga és mtsai, 2003). A vizsgálatokat a kapcsoltsági egyensúlytalanság analízis segítségével végeztük, amely az MLST ([http://linux.mlst.net/link\\_dis/index.htm](http://linux.mlst.net/link_dis/index.htm)) internetes oldalon elérhető vizsgálati módszer. A szignifikanciát 1,000-tól becsültük az adatok random permutációja alapján.

A Maximum Chisquare tesztet (Maynard Smith, 1992) azzal a módosítással végeztük, miszerint minden várható érték nagyobb mint 2 (Piganeau és mtsai, 2004).

A Phi teszt végrehajtását a SplitsTree v. 3.8 (Huson és Bryant, 2006) program segítségével végeztük. A teszt által biztosított megközelítés kiváltképpen hasznos az ismétlődő mutációk rekombinációtól való megkülönböztetésében, miközben a populációt jellemző egyes paraméterek - úgy mint egyedüli, véletlenszerűen szaporodó vagy konstans méretű populációról van e szó - nem ismertek.

## 4.8. Fungicid-rezisztencia vizsgálatok

### **A fungicid-rezisztencia vizsgálatokhoz használt táptalajok és oldatok**

Az izolátumok fungicid-rezisztencia mértékeinek meghatározásához a Leroux és munkatársai (1999) által leírt minimál táptalajt használtuk. A táptalaj összetétele a következő: 10 g/l glükóz, 1,5 g/l  $K_2HPO_4$ , 2 g/l  $KH_2PO_4$ , 1 g/l  $(NH_4)_2SO_4$ , 5 g/l  $MgSO_4$ , 2 g/l élesztőkivonat, 12,5 g/l agar desztillált vízben oldva, pH=6,0.

A konídiumképzés elősegítéséhez, illetve nem spórázó izolátumok esetében a konídiumképzés fokozásához a *B. cinerea* izolátumokat zöldborsó agaron (Baroffio és mtsai, 2003) növesztettük. A táptalaj összetétele a következő: 160 g/l fagyasztott, pürésített zöldborsó, 5 g/l glükóz, 15 g/l agar desztillált vízben oldva, pH=6,0.

A táptalajról történő spóra-lemosáshoz a következő oldatot használtuk: 10 g/l glükóz, 1,5 g/l  $K_2HPO_4$ , 2 g/l  $KH_2PO_4$ , 1 g/l  $(NH_4)_2SO_4$ , 5 g/l  $MgSO_4$ , 2 g/l élesztőkivonat, 0,5 ml/l Tween, desztillált víz és glicerin 1:1:1 oldatában oldva.

## A fungicid-rezisztencia meghatározása

A minták fungicid-rezisztenciáját három szisztemikus fungiciddel, a benomillal (Fundazol 50WP, Chinoín Rt), az iprodionnal (Rovral 50WP, BASF) és a fenhexamiddal (Teldor 500SC, Bayer) szemben vizsgáltuk a Baroffio és munkatársai (2003) által alkalmazott micéliális teszt módosításával. A vizsgálatokhoz (a reprodukálhatóság érdekében) minimál táptalajt használtunk. Az inokulum készítéséhez borsó agaron spóráztatott tenyészetekről spóramosó oldattal lemostuk a spórákat, majd üveggyapoton átszűrve gombafonalakat nem tartalmazó konídium-szuszpenziót készítettünk. Ebből az oldatból  $2,5 \times 10^6$  db spórárt 4 ml 50 °C-os fedő-agarba pipettáztunk, majd ezt 90 mm átmérőjű Petri csészébe, 10 ml minimál agart tartalmazó táptalaj felületére öntöttük. Ebből 8 mm átmérőjű korongokat vágunk ki, melyek mindegyike  $2 \times 10^4$  db *B. cinerea* konídiumot tartalmazott. A korongokat 90 mm átmérőjű, fungicidet meghatározott koncentrációban tartalmazó agarlemezek közepére helyeztük. A fungicideket a steril, 60 °C-ra lehűtött táptalajba mértük be.

A Petri-csészéket 20 °C-on, sötétben inkubáltuk. Négy nap elteltével lemértük a telepek átmérőjét, melyekből levontuk a leoltáshoz használt 8 mm-es agar korong átmérőjét. Egy tenyészet telepátmérőjének megállapításához mindig két érték (a legkisebb és a legnagyobb) átlagát vettük. Minden kísérletnél három párhuzamos tenyészetet vizsgáltunk, és ezek eredményeit átlagoltuk. Az alkalmazott fungicideket és koncentrációikat a 3. táblázat tartalmazza.

**3. táblázat** A rezisztencia vizsgálatához alkalmazott fungicid koncentrációja

Benomil (µg/ml)	Iprodion (µg/ml)	Fenhexamid (µg/ml)
500	500	100
50	50	10
5	5	1
0,5	2,5	0,5
0,05	0,5	0,1
	0,05	0,01



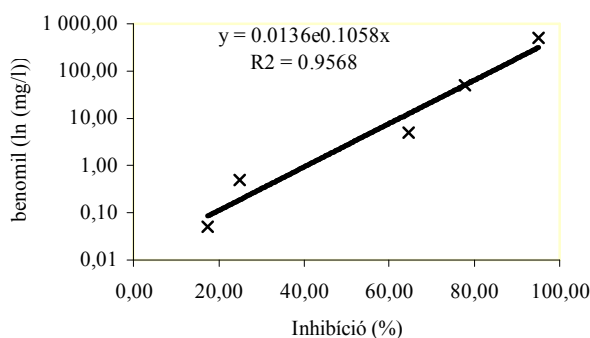
A fungicid-rezisztencia meghatározásához kiszámítottuk az 50 százalékos növekedés gátláshoz tartozó fungicid koncentrációkat (EC<sub>50</sub>). Ehhez a négy nap után lemert átlagos telepértékekből előbb meghatároztuk az adott fungicid-koncentrációhoz tartozó inhibíció mértékét minden izolátumnál (1. egyenlet).

$$\text{inhibíció (\%)} = 100 - \left( \frac{D_f (\text{mm})}{D_k (\text{mm})} \times 100 \right)$$

**1. egyenlet** Inhibíció mértékének számítása. D<sub>f</sub>: adott fungicidet tartalmazó táptalajon mért átlagos telepátmérő, D<sub>k</sub>: a fungicidet nem tartalmazó (kontrol) táptalajon mért telepátmérő.

Az EC<sub>50</sub> értékek kiszámításához az inhibíció mértékét a fungicid koncentráció tízes alapú logaritmusával (lg) szemben ábrázoltuk (10. ábra).

*B. cinerea* 56



**10. ábra** Az EC<sub>50</sub> értékek kiszámításához készített grafikon.

A pontokra illesztett egyenes egyenletéből számoltuk ki az 50 %-os növekedés gátláshoz tartozó fungicid koncentrációkat (Leroux és mtsai, 1999; Vignutelli és mtsai, 2002). A számításokat a Microsoft Excel (2003) program segítségével végeztük.

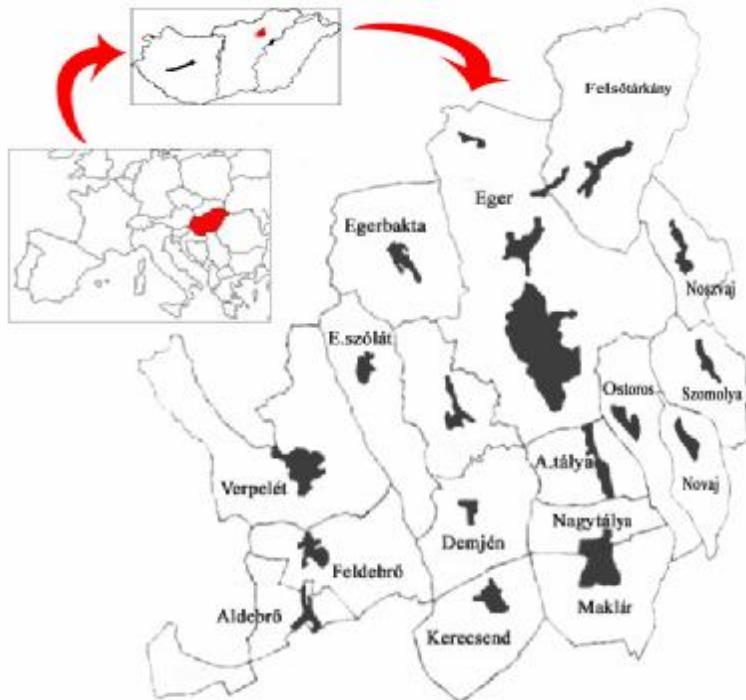
## 5. Eredmények

### 5.1. *Botrytis cinerea* izolátum törzsgyűjtemény létrehozása

2003-ban és 2004-ben az Egri borvidék különböző területeiről gyűjtött minták feldolgozása során összesen 149 tiszta, egyspórás *B. cinerea* izolátumot hoztunk létre. A minták azonosításához a begyűjtés sorrendjében számoztuk az egyspórás izolátumokat (4. táblázat).

4. táblázat Az Egri borvidékről, szőlőbogyókról gyűjtött *B. cinerea* minták

Mintavétel helye		Mintavétel éve	Minta száma
Andornaktálya	Felsőláp	2003	22
Aldebrő	Szent Donát	2004	478
	Barlankhegy	2003	9, 13, 29, 30, 33, 34
Dömjén	Szőlőhegy	2003	3
	Kisgalagonyás Csepősdűlő	2004	427, 428, 431, 425
Eger	Kiseged alja	2003	60, 61
	Kölymlesterő	2003	63
		2004	43
		2004	401, 402, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411
	Külsősíkhegy	2003	64, 65, 67
	Nagygalagonyás	2004	432, 433, 434, 487, 488, 489, 490, 491
Egerbakta	Pajdos	2004	4107
	Paphegy	2003	45, 46, 47
	Szarkás tető	2003	56, 57, 58, 59
	Baktai tető	2003	49, 51, 53, 54, 55
Egerszalók	Hosszúmagyaros	2004	435, 437, 438, 439, 440, 441
	Tóbére	2003	86
		2004	442, 443, 445, 448, 449, 450, 451
Egerszólát	Franc János	2003	36
	Szőlári tető	2003	17, 38, 39
Feldébrő	Szőlőhát	2003	75, 76
		2004	467, 468, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477
Felsőtárkány	Cserepart	2004	412, 413, 414, 415
	Nagyparlag		419, 420
	Nagyparlagalia		423, 424
	Tiba		417, 421, 422
Novaj	Öreghegy	2004	4163, 465, 466, 467, 468
Szemolyva	Csújszőlő	2004	4147
	Istvánbenke Mácsalma		4149, 4250, 4151, 432, 454, 4157, 458, 459, 461 4171, 4173, 4179, 4183, 4184, 4185, 4186, 4187, 4188, 4189
Ostoros	Pajdos dűlő	2003	68, 70
Verpelét	Fődűlő	2003	18, 41
		2004	465, 466
	Kishárs		454, 455, 456, 457, 458, 460, 461, 463, 464



11. ábra Az Egri borvidék térképe a hegyközségekkel

5. táblázat A Tokaji borvidékről gyűjtött *B. cinerea* minták

Mintavétel helye		Mintavétel éve	Minta száma
Dodrogkeresztúr	Kapi	2004	401
	Lapis dűlő	2006	74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81
Dodrogkisfőhut	Cipány dűlő	2006	69, 70, 71, 72, 73
	Várhegy	2006	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
Dodrogszegi	Burtalos	2004	401, 402
Mád	Becsck tető	2006	48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55
	Dancka alsó	2006	29, 30, 31, 32
	Dancka tető	2006	27, 28
	Királyok	2004, 2006	10, 11, 12, 101
	Király dűlő, tető	2006	39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47
	Szent Tamás	2006	13, 14, 15
	Szent Tamás közép	2006	35, 36, 37, 38
	Szent Tamás tető	2006	33, 34
Sárazsodány	Úrágva felső	2006	16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26
	Szárhegy alsó	2006	56, 57, 58, 59
	Szárhegy felső	2006	60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68
Tarcsl	Dakonyi alsó	2004	801, 802, 901, 902, 903
	Szarvas alsó	2004	601, 602, 603, 604
	Mózesmáj	2004	501, 502, 503, 504

A Tokaji borvidékről szintén két különböző évben, gyűjtöttünk izolátumokat. A minták feldolgozása során 96 egyspórás *B. cinerea* izolátumot sikerült szelektálnunk és laboratóriumban tovább tenyésztenünk.



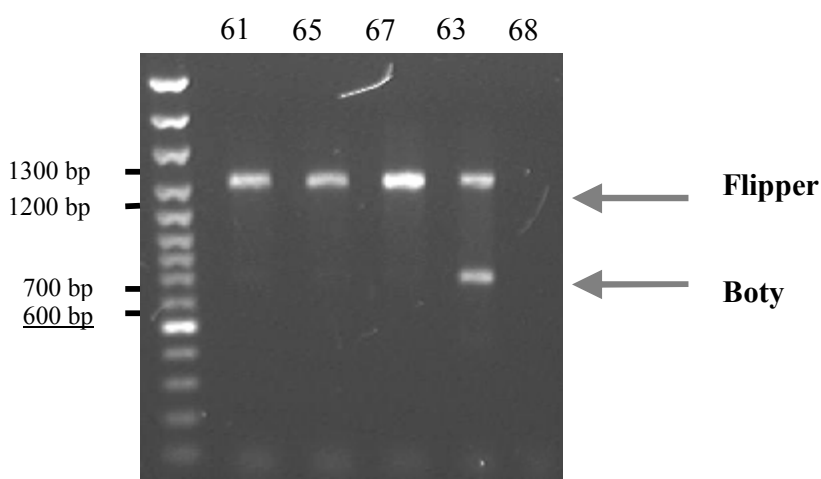
**12. ábra** A Tokaji borvidék térképe a hegyközségekkel és a mintagyűjtési helyekkel (csillaggal jelölve)

A tokaji izolátumok vizsgálata jelen dolgozatnak nem témája, azonban egyéb vizsgálataink során kapott eredményink egy részét (az MSB1 miniszatellit esetében), azoknak jobb értelmezhetősége miatt mutatjuk be.

## 5.2. Transzpozon elemek vizsgálata

Transzpozon tartalmuk alapján különböző csoportokba soroltuk az izolátumokat. Chilei (Munoz és mtsai, 2002) és francia (Giraud és mtsai, 1997) *B. cinerea* populációk vizsgálatakor két, illetve három csoportot különítettek el. Vizsgálataink alapján az egyes transzpozon elemek előfordulása szerint négy csoportot különítettünk el: (1) mindkét transzpozon elemet tartalmazó „transposa” izolátumokat, (2) a csak *Boty* elemet tartalmazó „boty”-nak nevezett izolátumokat, (3) a csak *Flipper* elemet tartalmazó „flipper”-nek nevezett izolátumokat, illetve (4) az egyik elemet sem tartalmazó „vacuma” izolátumokat.

A csak *Flipper* transzpozont tartalmazó flipper intrapopulációt először egy Nagy-Britanniából és egy Franciaországból származó izolátum képviselte (Albertini és mtsai, 2003). A közelmúltban Horvátországban, fertőzött szamócából származó mintákban nagy arányban (26 %) találtak csak *Flipper* transzpozonnal rendelkező *B. cinerea*-kat (Milicevic és mtsai, 2006).



**13. ábra** *B. cinerea* törzsekből felszaporított transzpozonok futtatásának képe etidium bromidot tartalmazó agaróz gélben. A 61, 65, 67 minták flipper, a 63 minta transposa, a 68 izolátum vacuma típusú izolátum.

Az Egri borvidékről származó *B. cinerea* izolátumok transzpozon tartalmának vizsgálatához korábban Munoz és munkatársai (2002) PCR alapú módszerét használtuk, azonban a vizsgálatokat annak nem pontos volta, illetve reprodukálhatósági problémák miatt dot blot analízis módszert használva megismételtük. A két módszer mérései közötti különbséget a 6. táblázat mutatja.

**6. táblázat** A duplex PCR és a Dot blot vizsgálatok eredményeinek összehasonlítása

<i>Transzpozon elemek</i>	<b>Duplex PCR</b>	<b>Dot blot</b>
<i>Boty és Flipper (transposa)</i>	29	74
<i>Csak Flipper (flipper)</i>	65	13
<i>Csak Boty (boty)</i>	3	12
<i>Sem Boty sem Flipper (vacuma)</i>	12	10

A PCR vizsgálatok során 94, míg a dot blot módszert használva 87 *Flipper* transzpozon elemet tartalmazó izolátumot azonosítottunk, ami már jelentős eltérésnek bizonyult. A *Boty* transzpozon elem esetében PCR módszerrel 33, míg dot blot módszerrel 86 izolátumot azonosítottunk. A PCR vizsgálatokkal míg a *Flipper* transzpozonok jelenlétének ellenőrzése viszonylagosan reprodukálható volt, addig a *Boty* transzpozonok ismétlésekben való detektálása meglehetősen esetleges volt, bizonyítva ezáltal a módszer alkalmazhatatlanságát ilyen típusú vizsgálatokban. A dot blot vizsgálati módszerrel a flipper típusú izolátumok nagy része transposa típusúnak bizonyult, a vacuma izolátumok egy részéről pedig kiderült, hogy *Boty* transzpozon elemet hordoznak.

A vizsgált mintákban a transposa típusú, mindkét transzpozont tartalmazó izolátumok fordultak elő legnagyobb arányban, az izolátumok 68 %-a tartozik ide. A csak *Flipper* transzpozont tartalmazó izolátumok 12%-ban, a boty típusú izolátumok 11%-ban, a vacuma csoport tagjai pedig 9 %-ban fordultak elő. A minta megoszlást a 6. táblázatban, a százalékos előfordulást a 7. táblázatban mutatjuk be.

**7. táblázat** Az egyes transzpozon elemek eloszlása az egri, tokaji, chilei, francia és horvát *B. cinerea* izolátumokban <sup>a</sup>: Munoz és mtsai, 2002, <sup>b</sup>: Giraud és mtsai, 1997, <sup>c</sup>: Martinez és mtsai, 2002, <sup>d</sup>: Milicevic és mtsai, 2006

<i>Transzpozon elemek</i>	<i>Izolátumok eloszlása (%)</i>				
	<i>Eger</i>	<i>Chile<sup>a</sup></i>	<i>Francia<sup>b</sup></i>	<i>Francia<sup>c</sup></i>	<i>Horvát<sup>d</sup></i>
<i>Boty + Flipper</i>					
<i>Boty és Flipper (transposa)</i>	67,88	79,71	75,00	61,34	41
<i>Csak Flipper (flipper)</i>	11,92	0,00	0,00	0,00	26
<i>Csak Boty (boty)</i>	11,00	11,59	0,00	0,00	9
<i>Sem Boty sem Flipper (vacuma)</i>	9,17	8,70	25,00	38,66	23

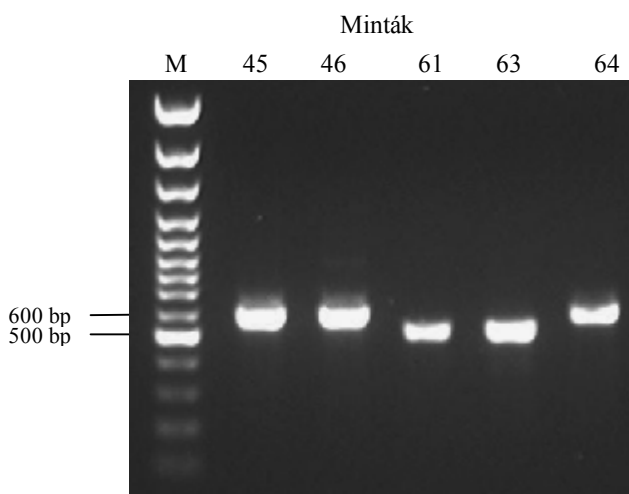
Az Egri borvidék *B. cinerea* izolátumaiban transzpozonok kb. 90%-ban vannak jelen, és ezekben az izolátumokban a *Flipper* és *Boty* transzpozonok jelenléte arányaikban is közel hasonló. Hasonló előfordulási arány a francia izolátumok esetében tapasztalható, de ott sem *Flipper*, sem *Boty* elem önmagában nem fordul elő, illetve igen magas a transzpozon nélküli vacuma izolátumok aránya. A chilei izolátumok esetében a *Boty* transzpozon elem, a horvát izolátumok esetében a *Flipper* transzpozon elem fordul elő nagyobb arányban. A transzpozon tartalmuk alapján elkülönülő *B. cinerea* izolátumok szétszórtan helyezkedtek el a borvidéken.

Jóllehet mind a *Boty*, mind a *Flipper* kizárólag a saját reprodukciójukhoz szükséges fehérjék génjeit tartalmazzák, francia kutatók vizsgálata alapján (Martinez és mtsai, 2003) a vacuma intrapopuláció növekedése sokkal gyorsabbnak bizonyult, mint a transposa intrapopuláció izolátumainak növekedése. Bár arra jelenleg nincs bizonyíték, hogy a transzpozonok jelenléte befolyásolná az élőlények anyagcseréjét, egyes fonalas gombákban (*Magnaporthe grisea* - Ikeda és mtsai, 2001; *Fusarium oxysporum* - Mes és mtsai, 2000) különböző stressz körülmények között (tápanyag hiány, szárazság,  $\gamma$ -sugárzás) egyértelműen megnőtt a transzpozon elemek mobilitása. Ezen információk alapján a gombákat érő fungicid kezelések szintén stresszhatást jelenthetnek.

## 5.3. Szekvenca elemzés

### 5.3.1. Miniszatellit szekvenca vizsgálata

Vizsgálataink során minden vizsgált *B. cinerea* izolátumból amplifikálni tudtuk az MSB1 miniszatellit szekvenciát. A PCR reakció során eltérő nagyságú szakaszok szaporodtak fel (14. ábra), ami a miniszatellit variánsok eltérő számú ismétlődésére utal.



**14. ábra** *B. cinerea* törzsekből felszaporított MSB1 miniszatellit szekvenciák futtatásának képe etídium bromidot tartalmazó agaróz gélben (M: molekulatömeg marker – Fermentas 100 bp ladder plus)

Összesen 21 féle miniszatellit variáns (minisatellite variant repeat – MVR, 15. ábra) ismétlődött az Egri borvidékről származó 109 vizsgált izolátum, és 14 féle miniszatellit variáns a Tokaji borvidékről származó 92 vizsgált izolátum MSB1 szekvenciáiban.

A miniszatellit variánsok közül nyolc teljes (a10H, a14H, a15H, a16H, b110H, c1211H, c3233H és c3234H), továbbá egy töredék (D2H) MVR szakasz csak a magyarországi *B. cinerea* mintákból volt kimutatható. Ebből nyolc csak az Egri, egy pedig csak a Tokaji borvidékről származó egyedi MVR szekvenca (15-16. ábra). Az MSB1 szekvenciákban előforduló



többi variánst korábban francia izolátumokból (Giraud és mtsai, 1998). is leírták (15-16. ábra).

	CTACTCATGATTGTTTCGACTTCTTGTTGGACATTGAT	
a10H	-----ATTGTTCTACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 28
a11	-----ATTGTTCTACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 28
a14H	-----ATTGTTCTACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 28
a15H	-----ATTGTTCTACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 28
a16H	-----ATTGTTCTACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 28
b110H	CTACTCATGATTGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
b111	CTACTCATGATTGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
b112	CTAATCATGATTGTTCTACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
b114	CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
b115	CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
b12	CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
b13	CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
b1712	CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
b174	CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
b2	CTACTTATGATTGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
c121	ATAATATCAATGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
c321	TFACTGCACAATGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
c3231	TFACTGCACAATGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 37
c3233H	TFACTGCACAATGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 38
c3234H	TFACTGCACAATGTTTCGACTTCTTGTT-GGACATTGAT	: 38
D2H	CTA-----T	: 4

**15. ábra** Az MSB1 miniszatellit szekvenciák ismétlődő miniszatellit variánsai (MVR) az Egri borvidéken. A sárgával jelölt nukleotidok a konszenzus szekvenciával megegyező, a kék és világoskék az azoktól eltérő nukleotidokat, a gondolatjelek a deléciókat („gap”) jelölik. Az első sorban található „cons” a konszenzus MVR szekvenciát (Giraud és mtsai, 1998) mutatja. Piros keretben az eddig csak Egerben előforduló variánsokat jelöltük.

Az új szekvenciák megfelelő elnevezéséhez a francia és a magyar minták MVR szakaszainak szekvenciája alapján „parsimony” típusú törzsfát készítettünk (17. ábra). A D2H szakasz (CTAT) a franciaországi D típusú (Giraud és mtsai, 1998) MVR töredék szekvenciájától (CTACT) csak egyetlen bázissal volt rövidebb. A csak magyarországi mintákban előforduló MVR-ek összesen a minták 28%-ában képviselték magukat. Az ismétlődések száma az Egri borvidék izolátumaiban 6 és 9 között (8. táblázat) a Tokaji izolátumokban pedig 7 és 8 között (9. táblázat) változott.

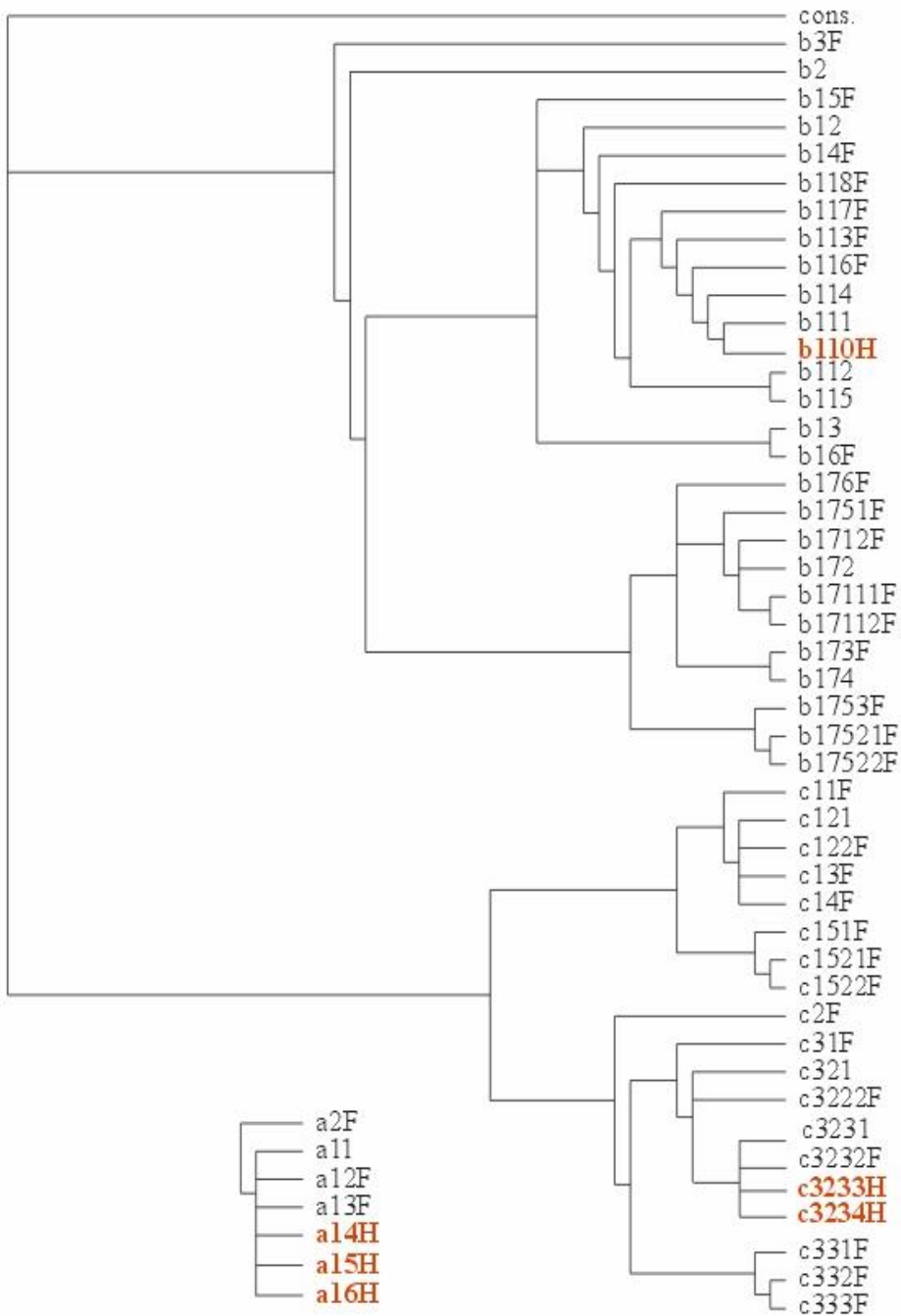
```

          CTAATCATGATTGTTTCGACTTATTGTCTCGGGACATTGAT
a11      : -----ATTGTTCTACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 28
b111     : CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
b112     : CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
b114     : CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
b115     : CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
b12      : CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
b13      : CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
b1712    : CTATTCATCATTGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
b174     : CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
b2       : CTAATCATGATTGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
c121     : ATATTTATCAATGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
c1211H   : ATATTTATCAATGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
c321     : TTAATGCACAATGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
c3231    : TTAATGCACAATGTTTCGACTTCTTTGTT-GGACATTGAT : 37
D2H      : CTA-----T : 4

```

**16. ábra** Az MSB1 miniszatellit szekvenciák ismétlődő miniszatellit variánsai (MVR) a Tokaji borvidéken. . A sárgával jelölt nukleotidok a konszenzus szekvenciával megegyező, a kék és világoskék az azoktól eltérő nukleotidokat, a gondolatjelek a deléciókat („gap”) jelölik. Az első sorban található „cons” a konszenzus MVR szekvenciát (Giraud és mtsai, 1988) mutatja. Piros keretben az eddig csak Tokajban előforduló variánst jelöltük.

Az MVR-ek közül három, (a11, b111 és c121) minden izolátumban megtalálható volt. Az Egri borvidékről származó izolátumokban az MSB1 miniszatellit variánsok alapján 15 különböző allél fordult elő. A 7-es allél 60 %-os gyakorisággal, az 2-es allél 16 %-os gyakorisággal fordult elő, a többi allél viszont csak néhány izolátumban volt jelen. A Tokaji borvidékről származó izolátumokat vizsgálva az ottani 1-es és 2-es allél a két leggyakoribb egri miniszatellit alléllal (2-es és 7-es) egyezett meg (8-9. táblázat). A Tokaji izolátumok között még leírt további két allél csak egy-egy izolátummal reprezentálta magát. Ez azt mutatja, hogy a két, egymáshoz közel eső borvidék szürkepenészes szőlőbogyóiról gyűjtött *B. cinerea* izolátumok genetikailag nem különülnek el egymástól. Ugyanakkor egyik MSB1 allél sem volt megtalálható a Champagne vidékéről gyűjtött francia mintákban (Giraud és mtsai, 1998).



**17. ábra** A *B. cinerea* törzsekből felszaporított MSB1 miniszatellit szekvenciák miniszatellit variánsai (MVR) szekvenciái alapján PAUP programmal rajzolt „parsimony” típusú törzsfá. Az „F” a csak francia, a „H” (pirossal kiemelt) a csak magyar izolátumokban előforduló MVR-eket jelöli.

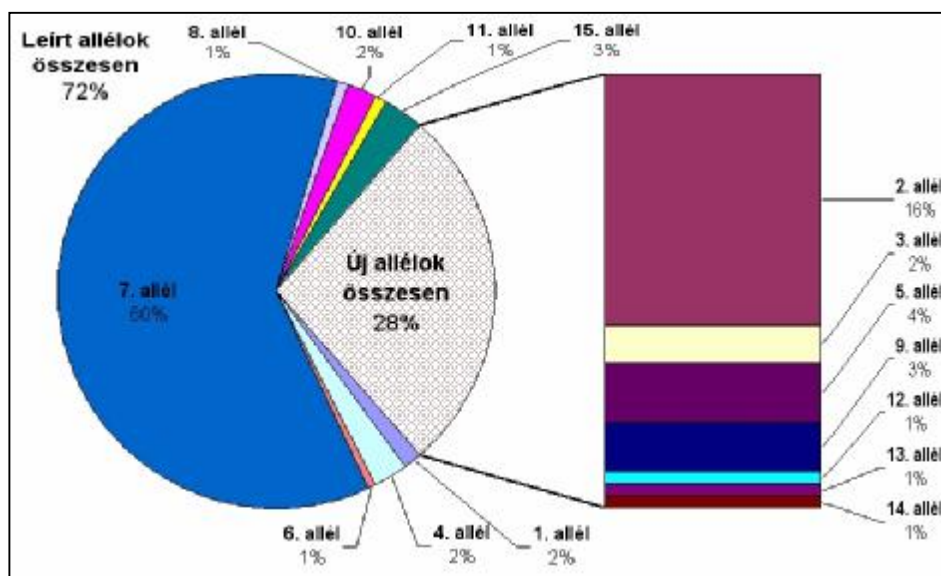
A szekvenciák tehát valószínűleg jól alkalmazhatók a különböző országokból származó minták elkülönítésére. Az egymást követő években nem változott az MSB1 allélok eloszlása az Egri borvidéken. A francia szerzők által leírt variánsokat tartalmazó MSB1 allélok több mint 70%-ban, a magyarországi variánsokat tartalmazó MSB1 allélok közel 30%-ban fordultak elő a vizsgált minták között. Az összes többi allél 1-4 %-ban fordult elő az izolátumok között (18 ábra).

**8. táblázat** Az Egri borvidék MSB1 miniszatellit szekvencia alléljai a miniszatellit variánsok (MVR) (15.ábra) alapján. Az új, magyar variánsokat zöld színnel emeltük ki.

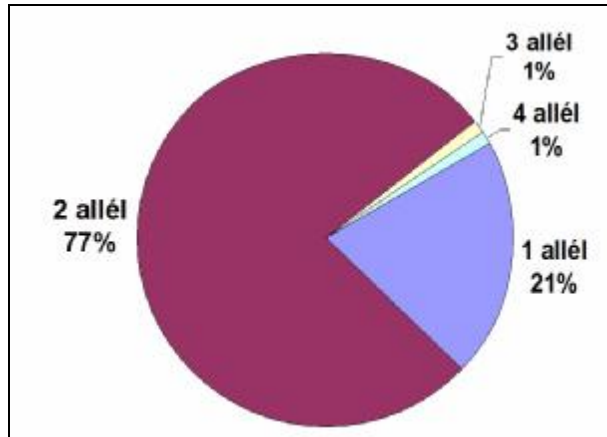
Allél sorszám	Ismétlődő szekvenciák	Izolátumok		MVR térkép								
		2003	2004									
1	6	412, 413,		a11	b115				b13	b1712	c121	c321
2	7	29, 31, 34, 36, 43, 53, 58, 60, 63, 86, 409, 410, 411, 419, 420, 434, 445, 477, 478, 490, 4107,		a11	b111			b115	Δ2	b174	c121	c3231
3		61, 70, 76		a11	b111			b115	Δ2	b174	c121	c3233
4		471, 487, 488,		a11	b111	b112		b12		b1712	c121	c321
5	8	436, 447, 492, 497, 4100,		a10	b111	b112		b12	b2	b1712	c121	c321
6		4171		a11	b110	b112		b12	b2	b1712	c121	c321
7		13, 17, 22, 30, 32, 33, 38, 39, 41, 46, 49, 54, 55, 56, 64, 65, 67, 68, 401, 402, 404, 406, 407, 414, 415, 417, 418, 421, 422, 423, 424, 427, 428, 431, 432, 433, 434, 435, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 448, 449, 450, 451, 454, 455, 456, 457, 458, 460, 461, 465, 466, 472, 475, 476, 491, 4109, 4149, 4150, 4152, 4154, 4157, 4158, 4159, 4161, 4163, 4165, 4166, 4167, 4168, 4179, 4184, 4185, 4187, 4188, 4189,		a11	b111	b112		b12	b2	b1712	c121	c321
8		9		a11	b111	b112		b115	b2	b1712	c121	c321
9		45, 47, 51, 75,		a11	b111	b112		b12	b2	b1712	c121	c3234
10		18, 57, 59,		a11	b111	b114		b115	b13	b1712	c121	c321
11		4147		a11	b111	b115		b12	b2	b1712	c121	c321
12		4186		a14	b111	b112		b12	b2	b1712	c121	c321
13		4172		a15	b111	b112		b12	b2	b1712	c121	c321
14		4183		a16	b111	b112		b12	b2	b1712	c121	c321
15	9	3, 405, 425, 426,		a11	b111	b112	b112	b12	b2	b1712	c121	c321

9. táblázat A Tokaji borvidék MSB1 miniszatellit szekvencia alléljai a miniszatellit variánsok MVR (16.ábra) alapján. Az új, magyar variánsokat zöld színnel emeltük ki.

Allél sorszám	Ismétlődő szelekciók	Izolátumok 2004 2006	MVR térkép							
1	7	T101, T301, T402, T504, T601, T603, T604, T801, T802, T06/29, T06/48, T06/49, T06/50, T06/51, T06/56, T06/57, T06/58, T06/59, T06/72	all	b111	b115	Δ2H	b174	-	c121	c3231
2	8	T901, T902, T903, T401, T501, T502, T503, T602, T06/2, T06/3, T06/4, T06/5, T06/6, T06/7, T06/8, T06/9, T06/10, T06/11, T06/12, T06/14, T06/15, T06/16, T06/17, T06/18, T06/19, T06/20, T06/21, T06/22, T06/23, T06/24, T06/25, T06/26, T06/27, T06/28, T06/30, T06/31, T06/32, T06/33, T06/34, T06/35, T06/36, T06/38, T06/39, T06/40, T06/41, T06/42, T06/43, T06/44, T06/45, T06/46, T06/52, T06/53, T06/54, T06/55, T06/60, T06/61, T06/62, T06/63, T06/64, T06/69, T06/70, T06/71, T06/73, T06/74, T06/75, T06/76, T06/77, T06/78, T06/79, T06/80, T06/81.	all	b111	b112	b12	b2	b1712	c121	c321
3	8	T06/13	all	b114	b112	b12	b2	b1712	c1211H	c321
4	8	T06/47	all	b111	b114	b115	b13	b1712	c121	c321



18. ábra Az egri *B. cinerea* törzsekből felszaporított MSB1 allélok megoszlása



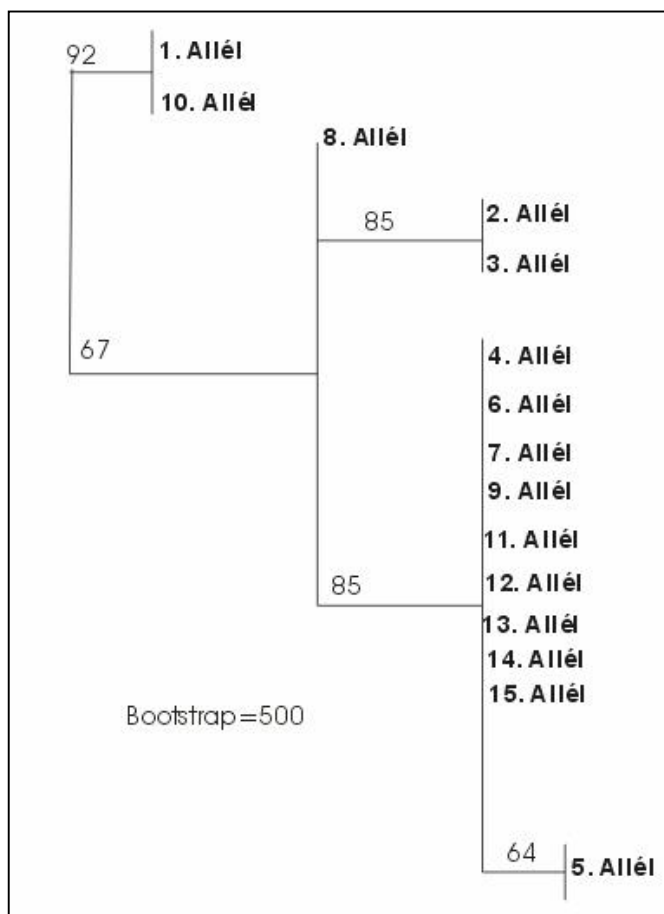
19. ábra A tokaji *B. cinerea* törzsekből felszaporított MSB1 allélok megoszlása

Az egymást követő években az MSB1 allélok eloszlása a Tokaji borvidéken sem változott. A francia szerzők által leírt variánsokat tartalmazó allél (2. allél) 77%-ban, a magyarországi variánsokat tartalmazó allélok 22%-ban (21+1) fordultak elő a vizsgált minták között (19. ábra).

Az Egri borvidék MSB1 szekvenciáinak filogenetikai vizsgálata során többszörös szekvencia-összerendezéssel (8. táblázat) a DNS szakaszokon belüli összefüggések, illetve az adott szakaszon belüli, konzerválódott mintázatok feltárását végeztük. A szekvenciák összerendezése után „parsimony” típusú törzsfát rajzoltunk. A PAUP program által rajzolt törzsfá a 20. ábrán látható.

A Tokaji borvidék izolátumainak törzsfába rendezését a gyakorlatilag teljes allél egyezés okán nem tartottuk szükségesnek. A 19. ábrán jelzett allélok közül a tokaji 1. allél az egri 2. allélnak, a 2. allél az egri 7. allélnak, a 4. allél az egri 8. allélnak felel meg. Ez alapján az izolátumok, illetve allélok helye jól értelmezhető a 20. ábrán látható törzsfá esetében is.

A törzsfá alapján megállapítható, hogy az Egri borvidék területén több (legalább négy) *B. cinerea* populáció különíthető el (20. ábra), melyek szétszórtan helyezkednek el a borvidéken.

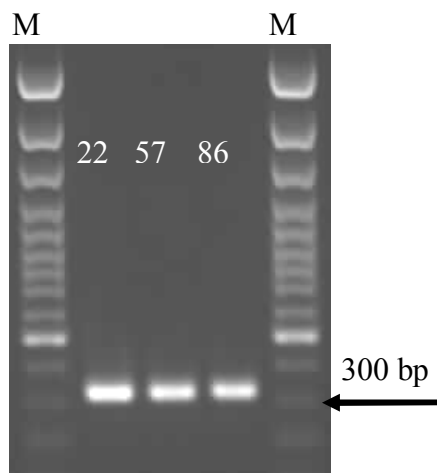


**20. ábra** A *B. cinerea* izolátumok MSB1 alléljainak szekvenciái alapján rajzolt "parsimony" típusú törzsfá. A vonalak feletti számok a bootstrap analízis eredményét jelzik.

### 5.3.2. *tef1* szekvencia vizsgálata

Az MSB1 miniszatellit szakaszhoz hasonlóan a *tef1* szakaszt is sikerült minden vizsgált mintából felszaporítani. A felszaporított szakaszok körülbelül 300 bp méretűek voltak (21. ábra). A szekvencia analízis alapján rajzolt törzsfá szerint szintén több *B. cinerea* csoport különíthető el a területen (22. ábra). Ezek a csoportok kevés egyezést mutatnak az MSB1 szekvenciák alapján kialakított csoportokkal (10. táblázat), a szekvenciák

közötti különbségek pedig jóval kisebbek voltak (6 bp), mint az MSB1 miniszatelliteknél.



**21. ábra** *B. cinerea* törzsekből felszaporított *tefl* szekvenciák futtatásának képe etidium bromidot tartalmazó agaróz gélben (M: molekula tömeg marker – Fermentas 100 bp ladder plus)

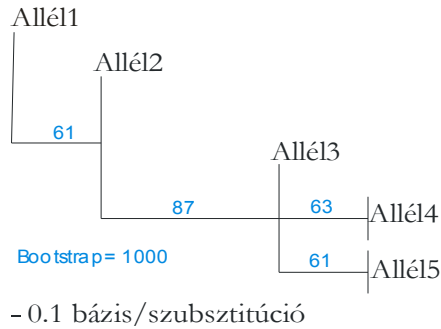
**10. táblázat** Az egyes *B. cinerea* izolátumok csoportosítása a bennük található *tefl* allélok szerint, és az allélok előfordulási aránya

Allel száma	Izolátumok	Allelok előfordulásának aránya (%)
1	3, 9, 13, 17, 31, 33, 34, 36, 38, 41, 45, 46, 53, 54, 58, 60, 61, 65, 67, 68, 76, 86, 401, 402, 405, 409, 410, 411, 419, 423, 424, 425, 427, 445, 460, 461, 464, 465, 466, 468, 473, 474, 475, 478, 491, 4107, 4147, 4149, 4150, 4151, 4152, 4163, 4165, 4167, 4168	50
2	18, 57, 59, 421, 431, 432, 433, 437, 438, 439, 442, 443, 448, 449, 450, 451, 454, 455, 456, 457, 458, 471, 476, 488, 4188	23
3	29, 43, 47, 55, 70, 414, 415, 417, 435, 489, 490	10
4	22, 75, 412, 413, 440, 441	6
5	30, 32, 49, 56, 63, 64, 407, 408, 4171, 4183, 4185, 4186	11

A szekvenciák összerendezése után 5 különböző allélt tudtunk elkülöníteni a *tefl* szekvenciák különbözősége alapján, melyek megfelelnek a törzsfá egyes ágainak (22. ábra). Az egyes allélok különböző arányban voltak jelen a populációban (10. táblázat).



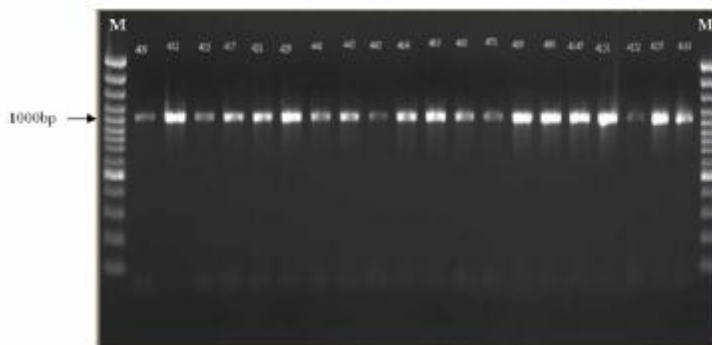
## Tef1



**22. ábra** A *B. cinerea* izolátumok *tef1* szekvenciái alapján rajzolt "parsimony" gyökér nélküli fák. A vonalak feletti számok a bootstrap analízis eredményét jelzik.

### 5.3.3. $\beta$ - tubulin szekvencia vizsgálata

Az MSB1 miniszatellit szakaszhoz hasonlóan a *tub1* szakaszt is sikerült minden vizsgált Egri borvidékről származó mintából felszaporítani. A felszaporított szakaszok körülbelül 1120 bp méretűek voltak (23. ábra). A szekvencia analízise alapján több *B. cinerea* csoport különíthető el a területen. Ezek a csoportok kevés egyezést mutatnak az MSB1 és *tef1* szekvenciák alapján kialakított csoportokkal (11. táblázat), a szekvenciák közötti különbségek pedig jóval kisebbek voltak, mint az MSB1 miniszatelliteknél, ezért nem tudtunk jól megalapozott törzsfát rajzolni.



**23. ábra** *B. cinerea* törzsekből felszaporított *tub1* szekvenciák futtatásának képe etídium bromidot tartalmazó agaróz gélben (M: molekulatömeg marker – Fermentas 100 bp ladder plus)

A szekvenciák összerendezése után 20 különböző allélt tudunk elkülöníteni a *tubl* szekvenciák különbözősége alapján. Az egyes allélok különböző arányban voltak jelen a populációban (11. táblázat).

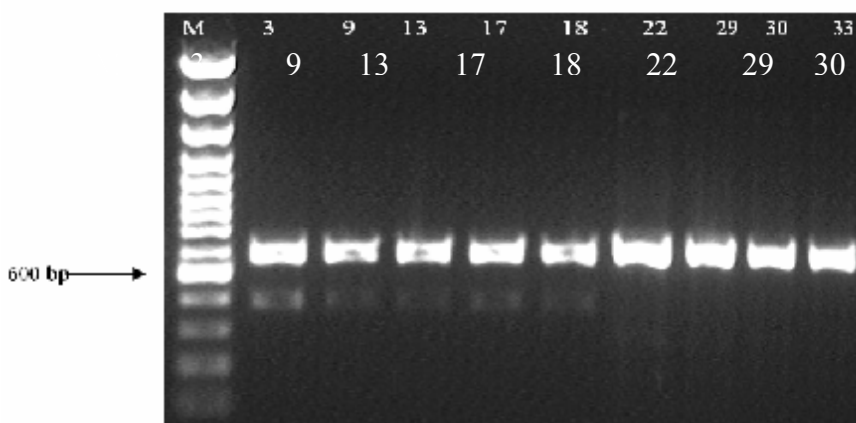
**11. táblázat** Az egyes *B. cinerea* izolátumok csoportosítása a bennük található *tubl* allélok szerint, és az allélok előfordulási aránya

Allél száma	Izolátumok	Allélok előfordulásának aránya (%)
1	38	0,9
2	49	0,9
3	488	0,9
4	476	0,9
5	3, 41, 56, 63, 405, 425, 431, 438, 442, 449, 450, 451, 454, 460, 461, 4149	14,7
6	45	0,9
7	9, 13, 29, 30, 32, 43, 47, 53, 54, 55, 58, 59, 60, 64, 65, 67, 70, 75, 76, 86, 402, 408, 409, 410, 411, 414, 415, 417, 419, 421, 423, 424, 427, 433, 435, 437, 439, 440, 441, 443, 445, 455, 456, 464, 465, 466, 468, 471, 473, 474, 475, 478, 489, 490, 491, 4107, 4117, 4150, 4151, 4152, 4163, 4165, 4167, 4168, 4171, 4183, 4185, 4186, 4188	63,4
8	407	0,9
9	401	0,9
10	17, 22, 34	2,8
11	46	0,9
12	31	0,9
13	448	0,9
14	61	0,9
15	432	0,9
16	458	0,9
17	18, 57, 412, 413	3,7
18	33, 68	1,9
19	457	0,9
20	36	0,9

A *tubl* szekvenciák TBLASTN analízise során a Fournier és munkatársai (2005) által az NCBI adatbázisban elhelyezett szekvenciákkal összevetve, minden vizsgált izolátum az általuk felállított kritériumok szerinti II. filogenetikai csoportba tartozott.

### 5.3.4. IGS szekvenciák vizsgálata

Az IGS szekvenciák kiválasztott részlete az általunk használt körülmények között minden esetben felszaporodott, néhány minta esetében azonban nem-specifikus sávok is megjelentek (24. ábra, 3-18 minták), melyek az annealáció hőmérsékletének optimalizálása után sem tűntek el. Ezeknél a mintáknál a gélből kivágtuk a kb. 600 bp nagyságú szakaszt tartalmazó agaróz darabot. Az ebből visszanyert DNS-t tisztítás után küldtük el szekvenáltatni. A vizsgált mintának mintegy 10 %-ánál a szekvenálási kép többszöri ismétlés és tisztítás után is kevert volt, vagyis többféle bázissorrendet mutatott. Az egyértelmű szekvencia meghatározás annak ellenére sem sikerült, hogy a gélképen egyetlen sáv volt csak látható. Ez valószínűleg arra vezethető vissza, hogy az IGS eredetileg több kópiában fordul elő a genomban, és ezek közül egy (vagy néhány) kópia megváltozik. Az IGS szekvenciák tehát a *B. cinerea* esetében nem tekinthetők megbízható populációgenetikai markernek, minek következtében a minták csupán egy részében vizsgáltuk.



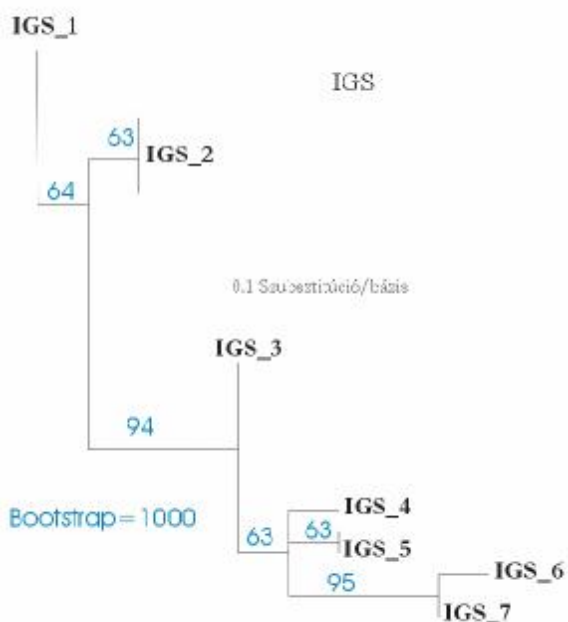
**24. ábra** *B. cinerea* törzsekből felszaporított IGS szekvenciák futtatásának képe etidium bromidot tartalmazó agaróz gélben.

(M: molekula tömeg marker – Fermentas 100 bp ladder plus)

A szekvenciák összerendezése után 7 különböző bázissorrendű variánst tudtunk elkülöníteni az IGS szekvenciák különbsége alapján (12. táblázat), melyek megfelelnek a törzsfá egyes ágainak (25. ábra).

**12. táblázat** Az egyes *B. cinerea* izolátumok csoportosítása a bennük található IGS variánsok szerint, és a variánsok előfordulási aránya

Allel száma	Izolátumok	Variánsok előfordulásának aránya (%)
1	3, 45, 56, 58, 63	11
2	9, 13, 17, 33, 39, 64, 65	21
3	22, 29, 30, 32, 36, 38, 41, 46, 47, 49, 53, 54, 58, 60, 401, 425, 490	50
4	55	3
5	18, 59	6
6	57	3
7	412, 413	6



**25. ábra** A *B. cinerea* izolátumok részleges IGS szekvenciái alapján rajzolt "parsimony" gyökér nélküli fák. A vonalak feletti szám a bootstrap analízis eredményét jelzi

Az IGS szekvenciák elemzése után elkülöníthető csoportokat a 25. ábra mutatja. Ezek a csoportok kevés egyezést mutatnak az MSB1, illetve a *tefl* szekvenciák alapján kialakított csoportokkal (8., 9., 10. és 11. táblázat). A szekvenciák közötti különbség, hasonlóan a *tefl* szekvenciánál tapasztaltakhoz, csak néhány (maximum 16) bázispárnyi volt. Az egyes csoportokba tartozó izolátumok begyűjtési helye ebben az esetben is diszperz volt, vagyis az egyes csoportokba tartozó izolátumok nem korlátozódtak egy-egy területre. Alacsony genetikai variabilitásuk miatt a későbbiekben nem használtuk fel őket a genetikai elemzésekhez.

#### 5.4. A *Botrytis cinerea* multilókusz struktúrája

Az Egri borvidéken található *B. cinerea* populációk struktúrájának megismeréséhez és felderítéséhez az előbbiekben már ismertetett gének közül a *tefl*, MSB1 és *tub1* szekvenciáit vizsgáltuk további szempontok szerint.

A *B. cinerea* genom adatbázisban (az adatbázis elérhető a [http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/botrytis\\_cinerea/Home.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/botrytis_cinerea/Home.html) internet címen) elvégzett blast keresés megerősítette, hogy ezek a gének nem kapcsoltak és így alkalmasak a további vizsgálatok elvégzésére. A Tajima D-teszt és a Fu F-statisztikai vizsgálatok eredményei is megerősítik a neutrális evolúció hipotézisét, így ennek alapján a rendelkezésre álló genetikai információ megfelelően használható filogenetikai elemzések elvégzésére.

A három vizsgált lókusz összesen 1007 nukleotid helyet (site-ot) tartalmazott, melyek közül 26 polimorf, azonban ezek közül csupán néhány volt parsimony elemzés szempontjából informatív (13. táblázat).

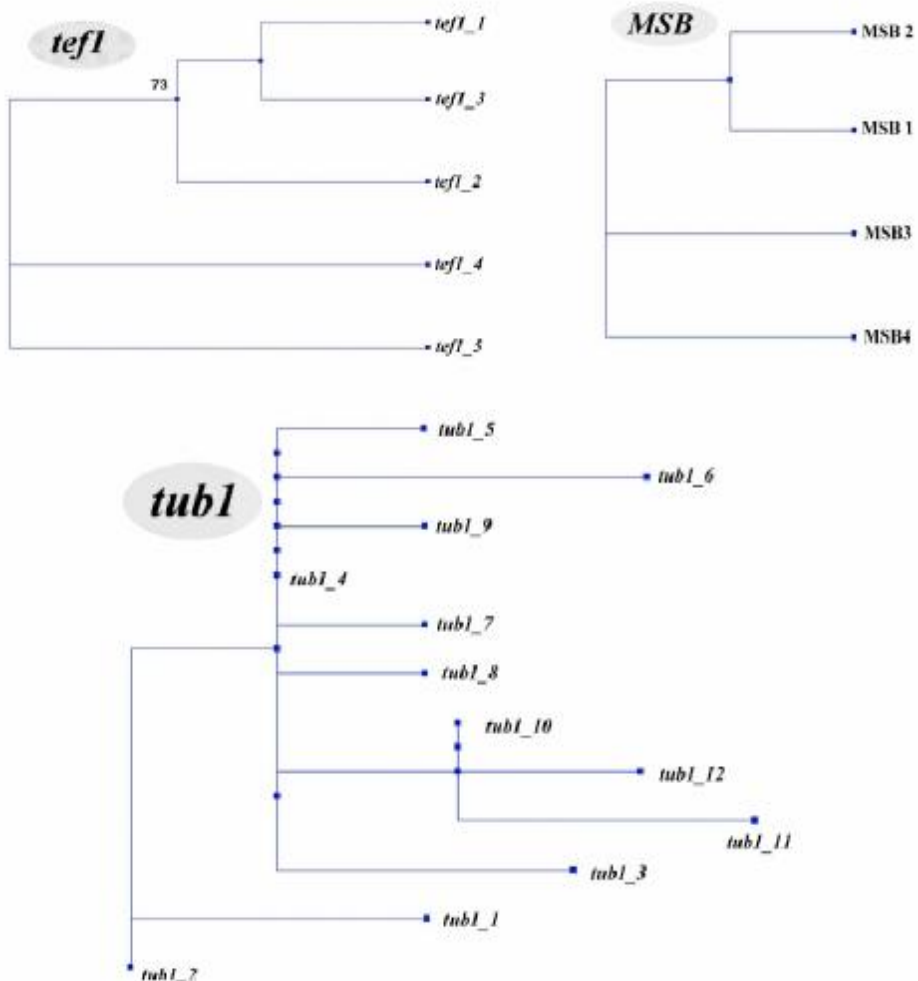
13. táblázat A *B. cinerea* *tef1*, MSB1 és *tub1* lókuszainak jellemzői

	<i>tef1</i>	MSB1	<i>tub1</i>	Összesen
Nukleotid helyek száma összesen (siteok)	249	254	504	1007
Polimorf helyek száma	6	6	14	26
Parsimony elemzésben informatív helyek	7	6	5	18
$\pi$ (Pi)	0.00384	0.00875	0.00120	
$\tau$ (Theta)	0.00530	0.00445	0.00513	
Haplotípusok száma	5	4	12	
Haplotípusok diverzitása	0.364 [ $\pm 0.055$ ]	0.697 [ $\pm 0.013$ ]	0.448 [ $\pm 0.052$ ]	
Fu és Li D értéke	1.182	1.108	-3.783	
Tajima D értéke	-0.630	2.129	-2.035	

A különböző lókuszokra a maximális valószínűség vizsgálat<sup>17</sup> segítségével készítettünk törzsfákat, amelyek alapján az analízis során az MSB1 esetében 4, a *tef1* esetében 5, a *tub1* esetében pedig 12 kládot kaptunk (26. ábra).

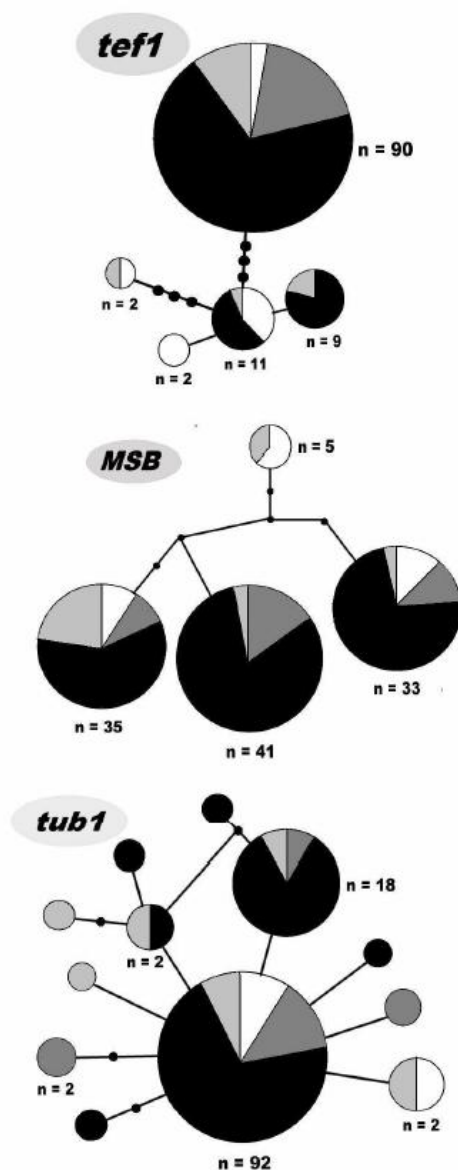
A valószínűségek (loglk) számításánál a *tef1* -836.45626, *tub1* -578.61042, illetve a MSB1 -578.61042 értékeket mutatott. A törzsfákon található legtöbb elágazás esetében viszonylag alacsony elágazási valószínűségeket (> 50%) kaptunk, ami az egyes törzsfák csekély megalapozottságát mutatja.

<sup>17</sup> maximum likelihood analysis



**26. ábra** A *tef1*, a *tub1* és az MSB1 maximális valószínűségvizsgálat alapján készített törzsfái. Az analízis során minden haplotípus esetében egy szekvenciát használtunk, illetve a HKI modellt használtuk minden gén esetében.

Jól értelmezhető eredményeket csak akkor kaptunk, amikor az egyes génszekvenciákat haplotípusokba összevonva elemeztük parsimony analízissel. A haplotípusok között fennálló kapcsolatok csekély mértékű hierarchiát mutattak (Clement és mtsai, 2000) (27. ábra).



**27. ábra** A *tef1*, a *tub1* és az MSB1 parsimony analízissel létrehozott haplotípusok kapcsolatai (TCS Java computer program). Az "n" az izolátumok számát mutatja az egyes haplotípus csoportokban; ahol nincs feltüntetve, ott csupán egy izolátum található. A haplotípus csoportokat összekötő vonalak és pontok a mutációkat mutatják (egy vonallal elválasztva pont nélkül, 1 mutációt; két vonal ponttal elválasztva 2 mutációt jelent stb). A körök felosztásánál a világos szürke részek a *Boty*, a sötét szürke részek a *Flipper* transzpozon jelenlétét mutatják az izolátumokban, a fekete mindkettő jelenlétét, a fehér pedig a hiányukat.



A *Boty* és *Flipper* transzpozon előfordulását (jelenlétüket vagy hiányukat) a haplotípusok kapcsolati rendszerében a 27. ábrán tüntettük fel. Az adatok jól szemléltetik, hogy a kisebb haplotípus csoportok nem ugyanolyan arányban jelenítik meg az egyedi transzpozon genotípusokat, mint ahogy az egyes populációk tartalmazzák a jelentősebb gének haplotípusát. Amiatt azonban, hogy két összehasonlított csoport különböző mintaszámmal volt jelen, ez a módszer statisztikailag nem alátámasztott.

## 5.5. Rekombináció a populációkban, mikroszatellit elemzés

A korábban említett három különböző gén törzsfáját nem lehet összehasonlítani, és ez már sejteti a rekombináció jelenlétét az egri *B. cinerea* populációban. Miután a három használt gén nem tartalmazott elegendő genetikai variabilitást, mikroszatelliteket alkalmaztunk a rekombináció tesztelésére. A *B. cinerea* öt különböző mikroszatellitjét (Bc2, Bc3, Bc6, Bc7 és Bc10) használtuk erre a célra, amelyek 6, 6, 6, 11 és 13 különböző hosszúságú fragmentumokkal voltak kimutathatóak, vagyis az egyes mikroszatellitek ennyi különböző allélja fordul elő. Az izolátumokban való előfordulásaik alapján 55 különböző genotípusuk volt azonosítható (lásd Függelék 7.). Mikor ezeket a genotípusokat a korábban vizsgált gének haplotípusaival hasonlítottuk össze, nem találtunk kapcsolatot közöttük. Nem volt összefüggés a mikroszatellit genotípusok, az izolátumok földrajzi eredete és az izolálás éve között sem.

A rekombináció tesztelésére az Asszociációs Index ( $I_A$ ) tesztet használtuk az adatok korrigált (clone corrected) részhalmazán, ahol mindegyik multilokuszos genotípus egy egyedként volt megjelenítve (Pringle és mtsai, 2005). A tesztek eredménye ( $I_A = 0.166$ ;  $P < 0.01$ ) alapján elmondható, hogy a pánmixia önmagában nem következtethető az adatokból, és valamennyi klonalitásnak jelen kell lennie a populációban. Ugyanilyen

értékeket kaptunk akkor is, amikor csak a 2003. vagy 2004. évi izolátumokat vizsgáltuk az Asszociációs Index teszttel ( $I_A = 0.145$  és  $0.187$ ;  $P < 0.01$ ).

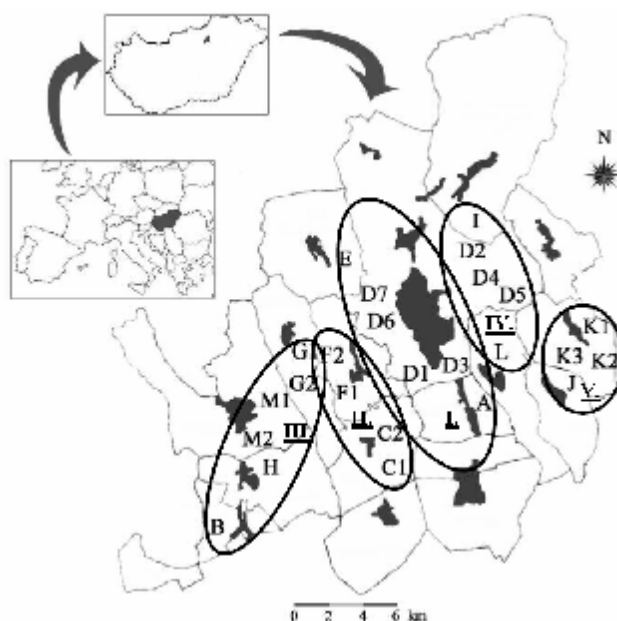
Vizsgálataink során a továbbiakban újabb két tesztet alkalmaztunk összefűzött gén szekvenciákon: a maximum Chi-square és a Phi-tesztet. A rekombinációról alkotott hipotézisünk megerősítést kapott használatukkal, ugyanis a maximum Chi-square teszt  $20.43$  ( $p = 0.009$ ) értéket, míg a Phi-teszt  $p = 9.564 \times 10^{-4}$  értéket eredményezett. Ennek következtében a három különböző kritérium és a két különböző genetikai marker alkalmazása egyértelműen alátámasztja, hogy az egri *B. cinerea* izolátumok populációi képesek a szexuális reprodukcióra.

## 5.6. Genetikai sodródás a populációkban

A teljes pánmixia hiánya miatt a mikroszatellit eredmények alapján kiszámoltuk az  $F_{st}$  értéket minden transzpozon populációra és az egyes földrajzilag elkülönült populációkra is. Elkülönülő területekként értelmeztük az általában észak-dél lefutású, tufa dombsorok alkotta patak völgyeket. Amennyiben az  $F_{st}$  értékek  $0,05 - 0,15$  tartományban találhatóak, mérsékelt fixációról beszélünk (a jellegek fixációja),  $0,15$  és  $0,25$  közötti tartományban a fixáció mértékét nagyinak, míg  $0,25$  érték felett nagyon nagyinak tekintjük (Wright, 1978).

**14. táblázat** A mikroszatellit markerek  $F_{st}$  értékei a különböző földrajzilag izolált populációk között az Egri borvidéken. A római számok a különböző földrajzi területeket jelölik (lásd következő, 28. ábra).

Területek	II	III	IV	V
I	0.018	0.029	0.025	0.039
II		0.038	0.058	0.043
III			0.038	0.024
IV				0.077



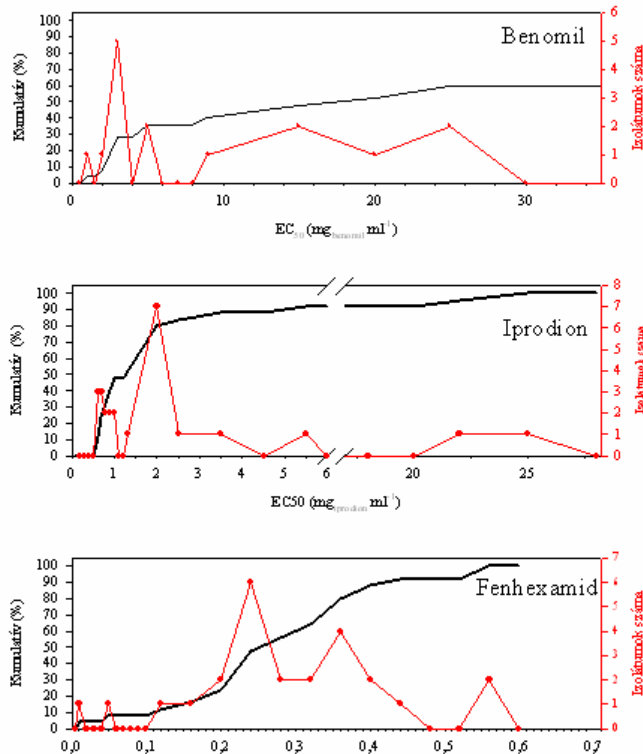
**28. ábra** Az Egri borvidék térképe a mintavételi helyekkel. Betűkkel a mintavételi helyeket, római aláhúzott számokkal a különböző földrajzilag elkülönülő területeket jelöltük, melyek között az  $F_{st}$  értékek kiszámolásra kerültek

Mint ahogy az a 14. táblázatban is jól látható, a földrajzilag izolált populációk (28. ábra) közötti  $F_{st}$  értékek 0,018 és 0,077 közötti tartományban mozognak, jelezve, hogy nincs vagy nagyon alacsony szintű a fixáció a populációk között.

A különböző transzpozon tartalmú (boty, flipper, vacuma, transposa) populációk között elvégzett  $F_{st}$  analízis szintén alacsony fixációt jelzett az egyes csoportok között. Csupán a flipper és vacuma populációk között tapasztalható egy mérsékelt fixációs szint ( $F_{st}=0,11$ ), a transposa és vacuma csoportokat összehasonlítva nagy mértékű differenciációról beszélhetünk ( $F_{st}=0,09$ ).

## 5.7. Fungicid-rezisztencia vizsgálatok

A minták fungicid-érzékenységének vizsgálatánál az egyes érzékenységi kategóriák megállapításához (az érzékeny izolátumok definiálásához) először ábrázoltuk az egyes  $EC_{50}$  értékekhez tartozó izolátumok számát (29. ábra).



**29. ábra** Az érzékeny izolátumok száma az  $EC_{50}$  értékek függvényében. A benomil esetében - a jobb áttekinthetőség érdekében - nem a teljes skálát ábrázoltuk.

A vizsgált izolátumok több mint fele magas fokú rezisztenciát mutatott a benomillal szemben, annak ellenére, hogy ezt a fungicidet már évek óta nem használják az Egri borvidéken (Kaptás Tibor, személyes közlés). Szintén megfigyelhető a közepes szintű rezisztencia jelenléte a

másik két fungicid esetében, ami jelentős kockázatot jelenthet, hiszen ezek a kemikáliák napjainkban is használatos fungicidok.

Az első csoportba tartozó (legalacsonyabb  $EC_{50}$  értékekkel rendelkező) izolátumok mindhárom esetben jól elkülönültek a rezisztenciát mutató többi *B. cinerea*-tól. A benomil esetén az irodalmi adatokat figyelembe véve csak egyetlen izolátumot tekintettünk érzékenynek. A szenzitív izolátumok  $EC_{50}$  értékei jó egyezést mutattak az eltérő táptalajokon és eltérő körülmények között meghatározott irodalmi  $EC_{50}$  értékekkel (15. táblázat).

**15. táblázat** Az egyes általunk definiált fungicid-rezisztencia kategóriák, és a hozzájuk tartozó értékek, valamint összevetésük az irodalmi adatokkal (\*: csak az irodalmi hivatkozásban szereplő kategória)

Fungicid	Rezisztencia szint	Rezisztencia érték (RL)	$EC_{50}$ (mg/l)	Irodalmi érték (mg/l)	Hivatkozás
<b>Benomil</b>	Érzékeny (S)	-1	-1	-1 0.3	Faretra és Pollastro, 1991 Leroux és mtsai, 1984
	Alacsony rezisztencia (LR)	2 - 10	2 - 10	>30	Faretra és Pollastro, 1991
	Közepes rezisztencia (MR)	10 - 100	10 - 100		
	Magas rezisztencia (HR)	>100	>100	>100	Leroux és mtsai, 1984
	Rezisztens (R)*			>100	Faretra és Pollastro, 1991
<b>Iprodion</b>	Érzékeny (S)	-1	-0.7	0.3-1	Leroux és mtsai, 1989
	Alacsony rezisztencia (LR)	2 - 10	1.4 - 7	1-5 (RL: 4-20)	Leroux és mtsai, 1999
	Közepes rezisztencia (MR)	10 - 100	7 - 70		
	Magas rezisztencia (HR)	>100	70<	>6	Leroux és mtsai, 1999
	Rezisztens (R)*			>6	Leroux és mtsai, 1999
<b>Fenhexamid</b>	Érzékeny (S)	-1	-0.01	0.008-0.02	Leroux és mtsai, 1999
	Alacsony rezisztencia (LR)	2 - 10	0,02-0,1		
	Közepes rezisztencia (MR)	10 - 100	0,1-1		
	Magas rezisztencia (HR)	>100	1<		
	Rezisztens (R)*			>0,0001	Baronillo és mtsai, 2003
	Rezisztens (IIIy(RL))*			>3	Leroux és mtsai, 1999

A laboratóriumi fungicid vizsgálatok alapján minden izolátum rezisztens volt a vizsgált fungicidek valamelyikére, illetve az RL értékek alapján majdnem minden izolátum mutatott közepes vagy magas fokú rezisztenciát valamelyik vizsgált fungicidre (Leroux és mtsai, 1999). Az 16.

táblázatban összegeztük a benomil, iprodion és fenhexamid hatóanyagú fungicidekkel végzett kísérletek eredményeit.

**16. táblázat** *A. B. cinerea* rezisztencia szintek (S – szenzitív, LR – alacsony rezisztencia, MR – közepes rezisztencia, HR – magas rezisztencia)

Minta	Benomil EC <sub>50</sub>	Benomil RL	Benomil rezisztencia	Iprodion EC <sub>50</sub>	Iprodion RL	Iprodione rezisztencia	Fenhexamid EC <sub>50</sub>	Fenhexamid RL	Fenhexamid rezisztencia
3	12,590	23,2	MR	0,747	1,3	LR	0,344	34,4	MR
9	82,506	151,9	HR	3,232	5,9	LR	0,363	36,3	MR
13	15,540	28,6	MR	1,705	3,1	LR	0,233	23,3	MR
17	2,017	3,7	LR	0,954	1,7	S	0,437	43,7	MR
31	20350,5	37477,9	HR	1.856	2.7	LR	0.339	33,9	MR
33	86,118	158,6	HR	0.864	1.2	S	0.296	29,6	MR
34	724,248	1333,8	HR	0.746	1.1	S	0.263	26,3	MR
36	854673947	1573985170	HR	0.637	0.9	S	0.281	28,1	MR
39	679,577	1251,5	HR	0.861	1.2	S	0.392	39,2	MR
41	5779859	10644307,6	HR	0.548	0.8	S	0.272	27,2	MR
43	2,507	4,6	LR	20.607	29.7	MR	0.207	20,7	MR
45	5,613	10,3	LR	0.678	1.0	S	0.223	22,3	MR
46	463,73	854,0	HR	0.593	0.9	S	0.148	14,8	MR
51	54,856	101,0	HR	1,715	3,1	LR	0,553	55,3	MR
53	71065	130874,8	HR	0,535	0,9	S	0,355	35,5	MR
54	1,810	3,3	LR	5,481	10,1	MR	0,184	18,4	MR
56	2,697	5,0	LR	15.83	22.8	MR	0.522	52,2	MR
58	2,672	4,9	LR	0.625	0.9	S	0.220	22	MR
59	3,472	6,4	LR	2.242	3.2	LR	0.332	33,2	MR
61	30690	56519,3	HR	1.542	2.2	LR	0.108	10,8	LR
63	0,543	1,0	S	1.669	2.4	LR	0.196	19,6	MR
65	4,817	8,9	LR	1,940	3,5	LR	0,225	22,5	MR
67	20,293	37,4	MR	1,000	1,8	S	0,228	22,8	MR
68	2,605	4,8	LR	1,257	2,3	LR	0,010	1	S
401	8,913	16,4	MR	1.435	2.1	LR	0.0473	4,73	LR

Francia kutatók vizsgálatai alapján a transzpozont nem tartalmazó, vacuma csoportba sorolt törzsek minden esetben rendelkeztek fenhexamiddal szembeni rezisztenciával. Kutatásaik során egyetlen vacuma csoportba tartozó izolátumot vizsgáltunk, amely szintén rendelkezett *in vitro* fungicid-rezisztenciával a fenhexamiddal szemben. A fungicid-rezisztencia és a többi vizsgált genetikai paraméter között szoros összefüggést nem találtunk.

## 5.8. Eredmények megvitatása

A *Botrytis cinerea*val kapcsolatos vizsgálataink alkalmazott módszerei és eredményei több esetben is eltérnek a nemzetközi irodalmtól és eredményeiktől vagy csak ezeknek ismeretében érthetők, összevetésük és értelmezésük ezen szempontok miatt fontos.

Korábban úgy vélték, hogy a *B. cinerea* két szimpatrikus fajból áll, melyek közül az egyik, a transposa tartalmazza a két ismert transzpozon elemet (*Boty* és *Flipper*), a másik, a vacuma pedig nem. A vacuma és transposa változatok további fenotípusos jegyekben is különböztek, mint a konídiumok mérete, a növekedési ráta, valamint a fungicid-rezisztencia. Később Fournier és munkatársai (2005) GCPSR<sup>18</sup> vizsgálati módszert alkalmazva nyújtották az első bizonyítékát annak, hogy a *B. cinerea* valószínűleg két testvér fajt foglal magába. Ezeket I és II csoportnak nevezeték el. A vacuma – transposa koncepcióval összevetve a *B. cinerea* I. csoportban szintén csak vacuma izolátumok fordultak elő, míg a *B. cinerea* II. csoportban jelen voltak mind vacuma, mind transposa típusú izolátumok. Az Egri borvidéken található *B. cinerea* populációk az eddigi vizsgálatoktól eltérő értékeket mutatnak mind a csoport besorolást, mind a transzpozon összetételt tekintve. A *tub1* szekvenciák analízise során minden vizsgált izolátum a Fournier és munkatársai (2005) által felállított kritériumok szerinti

---

<sup>18</sup> genealogical concordance phylogenetic species recognition

II. filogenetikai csoportba tartozott és ezt a vacuma típusú izolátumok *hch* restrikciós enzimmel történő vizsgálata (Albertini és mtsai, 2002) is megerősítette. Transzpozon öszetételüket tekintve az izolátumok többsége a transposa csoportba sorolható, a vacuma izolátumok ugyanolyan arányban vannak jelen, mint azok az izolátumok amelyek csak *Boty* vagy csak *Flipper* transzpozon elemet tartalmaznak. A csak *Flipper* transzpozon elemet tartalmazó izolátumok nem fordultak elő sem Kaliforniában (Ma és Michailides, 2007), sem Chilében (Munoz és mtsai, 2002) és erősen alulreprezentáltak az előfordulásuk Angliában (Albertini és mtsai, 2002), Franciaországban (Albertini és mtsai, 2002) és Tunéziában is (Ben Ahmed és Hamada, 2005). Ezzel szemben, újabb vizsgálati eredményként horvátországi izolátumok 26 %-a tartalmazott csak *Flipper* transzpozon elemet, mindamelllett, hogy az izolátumok további 41 %-a transposa típusú volt, azaz mindkét transzpozont tartalmazta (Milicevic és mtsai, 2006).

A csak *Flipper* transzpozon elemet tartalmazó izolátumok nagy arányú előfordulása felveti azt a kérdést, hogy hogyan alakultak ki ezek a törzsek: transposa izolátumokból a *Boty* elem elvesztése révén, vagy vacuma izolátumokból a *Flipper* elem megszerzésével? Munoz és munkatársai (2002) szerint a chilei populációkban a boty izolátumok megjelenése a vacuma és transposa izolátumok kereszteződése révén jöhetett létre, vagy a vacuma csoport egy inváziós populációja révén. Az általunk vizsgált markerek magas kapcsoltsági egyensúlya miatt nem lehet különbséget tenni a két lehetőség között. Elméletben a boty, flipper és vacuma izolátumok hozzávetőlegesen azonos arányú előfordulása összeegyeztethető a transposa és egy inváziós vacuma populáció rekombinációjának elméletével, azonban eredményeink alapján a vacuma populáció mutatja a legmagasabb szintű klonalitást, ami ezt az elképzelést eléggé valószínűtlenné teszi. Mindenesetre az a tény, hogy a *B. cinerea* II. csoportban előfordulnak olyan izolátumok,



amelyek csak *Flipper* vagy csak *Boty* transzpozont tartalmaznak, rávilágít arra, hogy a transzpozonok jelenléte vagy hiánya eredményesen nem felhasználható jellegzetesség a *B. cinerea* rendszerezésében.

A *B. cinerea* elsőként leírt és mindezidáig egyetlen miniszatellitje, az MSB1 miniszatellit (Giraud és mtsai, 1998) látványos variabilitást és változatosságot mutatott vizsgálata során. A francia szerzők a miniszatellit 51 különböző variánsát (MVR) írták le, melyek eltérő mennyiségben és kombinációban követik egymást az általuk felépített allélokban. Az egi izolátumok hasonlóan nagy variabilitást mutatnak, az előforduló variánsoknak azonban csak alig több mint fele egyezik meg a francia szerzők által leírtakkal. A fennmaradó variánsok másik fele újonnan azonosított, melyek általában csak egy-egy pontmutációban térnek el egymástól, illetve csak néhány izolátumban vannak jelen feltételezve ezáltal, hogy helyben kialakult mutáció révén jöttek létre.

A *B. cinerea* morfológiailag és genetikailag rendkívül változékony, amit korábban a heterokariózis és az aneuploidia jelenségeinek tulajdonítottak. A gomba két párosodási típusa azonban mennyiségileg kb. egyenlően oszlik meg, vagyis a *B. cinerea* a természetben is képes szexuális szaporodásra. Ez a heterokariózisnál és az aneuploidianál sokkal jelentősebb mértékben járulhat hozzá a faj genetikai változékonyságához. Hogy bekövetkezik-e a rekombináció a *B. cinerea* esetében vagy sem, éveken keresztül foglalkoztatta a kutatókat, mivel a különböző gazdanövényeken csak ivartalan szaporodását (konídium képzését) tapasztalták. Franciaországban végzett vizsgálatok során az eredmények egyértelműen mutatták, hogy a *B. cinerea* populációk képesek szexuális rekombinációra (Fournier és mtsai, 2005) Más esetben, kaliforniai populációk vizsgálata során a klonalitás nagymértékű jelenléte jellemző (Ma és Michailides, 2007). A következtetésekben megnyílvánuló eltéréseket eredményezhették a

földrajzi távolságok, illetve a különböző genetikai markerek és módszerek használata is (RFLP illetve RAPD az utóbbinál).

Kísérleteink során az egyes genetikai markerek önmagukban nem nyújtottak elegendő genetikai információt, azonban együtt vizsgálva őket eredményesen voltak használhatóak az izolátumok jellemzésére. Vizsgálataink során igen magas fokú kapcsoltsági egyensúlytalanságot tapasztalhattunk, mely adatok a szekvencia és mikroszatellit vizsgálatokkal együtt elegendő információt nyújtanak ahhoz, hogy a rekombináció lehetőségéről alkotott következtetéseink helytállóak legyenek. Fournier és Giraud (2008) egy újabb munkájukban szintén szolgáltatott bizonyítékot a rekombináció jelenlétére a franciaországi populációkban, ami alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a *B. cinerea* európai populációi képesek a rekombinációra és szexuális reprodukcióra. Az asszociációs index teszt eredményei azonban ennek ellenére is sejtetik a klonalitás jelenlétét. A fixációs index hasonló vizsgálata kimutatta, hogy a *vacuina* populációk csakugyan mutatnak némi differenciálódást mind a flipper, mind a transposa populációktól, amit megmagyarázhatnak ezek az eredmények. Ugyancsak észleltünk - bár igen mérsékelt - differenciációt a földrajzilag különböző helyekről származó populációk között.

A fungicid-rezisztencia vizsgálatok során az irodalmi adatoknak megfelelően mindhárom vizsgált vegyszer esetében tapasztalhattuk a rezisztencia jelenlétét az izolátumok között. A már régóta nem használt benomyl esetében még mindig viszonylag nagy arányban fordultak elő a magas és közepes rezisztenciával rendelkező izolátumok, míg a még nem régen használt fenhexamid esetében a közepes szintű fungicid-rezisztenciájú izolátumok nagy arányú jelenléte volt kimutatható. A magas fokú rezisztencia stabil jelenlétére Bardas és munkatársai (2007) vizsgálatai adhatnak választ, akik többszöri – akár 16 alkalommal elvégzett – átoltás után

sem tapasztalták a fungicid-rezisztencia, illetve az izolátumok fitnessének csökkenését vizsgálataik során. A fenhexamid rezisztencia gyors kialakulása nem meglepő, erre vonatkozó adatok nagy számban találhatóak az irodalomban (Leroux és mtsai, 1999; Baroffio és mtsai, 2003).

Az Egri borvidékről származó izolátumok vizsgálata alapján eredményeink bizonyítják a rekombináció szignifikáns jelenlétét és kihangsúlyozzák a szignifikáns genetikai variabilitást a *B. cinerea* populációk között. A nagy genetikai variabilitás, valamint a szexuális reprodukció egyértelmű magyarázat arra, hogy miért alakul ki olyan gyorsan és könnyen rezisztencia a különböző, *B. cinerea*-val szemben alkalmazott fungicidek ellen. Az egyoldalú és okszerűtlen szerhasználat következtében mindenképpen számítani kell rezisztens törzsek megjelenésére és elterjedésére. Vizsgálataink ezt megerősítették, illetve ugyanilyen tendencia kialakulását mutatták a *B. cinerea* ellen jelenleg használt fungicidek esetében is. A megfelelő növényvédelmi technológia kifejlesztéséhez – a populáció struktúrájának alapos megismerése mellett – továbbra is nélkülözhetetlen információt gyűjteni az aktuális fungicid-rezisztencia állapotokról az egyes szőlőtermő területeken.

## 6. Új tudományos eredmények

Vizsgálataink és munkánk során a következő új tudományos eredmények jöttek létre:

1. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy az Egri borvidéken csak II. filogenetikai csoportba tartozó izolátumok fordulnak elő, melyeknek transzpozon tartalma az irodalmi adatoktól eltérő. A flipper és a boty genotípus is viszonylag gyakran előfordult, PCR alapú megbízható detektálásukat ugyanakkor vizsgálataink nem igazolták.
2. Az MSB1 miniszatellit allélok vizsgálata során nagy mennyiségű, eddig csak az Egri Borvidéken előforduló új szekvencia sorrendel rendelkező miniszatellit variánst (MVR) azonosítottunk (a variánsok közel fele). Ezek azonban kevés izolátumban fordultak elő, valószínűsítve, hogy helyben kialakult mutáció révén jöttek létre, ugyanakkor ezáltal alkalmasak a származási hely becslésére, melynek lehetőségét elsőként vetettük fel ezen genetikai marker esetében.
3. Vizsgálatainkkal elsőként mutattuk ki, hogy a *B. cinerea* genetikai jellemzésére alkalmazható genetikai markerek alacsony genetikai variabilitásuk miatt önmagukban nem elegendőek a populációk egyértelmű jellemzésére, ill. megkülönböztetésére. Több lokusz is a haplotípusok között fennálló kapcsolatok csekély mértékű hierarchiáját mutatta, melyet statisztikai vizsgálatok is megerősítettek.
4. Kísérleteink során elsőként bizonyítottuk, hogy a mikroszatellitok és a multilokuszos genotípusok asszociációs indexel történő vizsgálata alapján az egri *B. cinerea* izolátumok populációi képesek a szexuális reprodukcióra.
5. Vizsgálataink alapján bizonyítottnak tekinthető, hogy az Egri borvidék különböző földrajzi helyeiről származó populációk között nincs, vagy nagyon alacsony mértékű a fixáció, földrajzi alapú elkülönülés nem tapasztalható.
6. A fungicid-rezisztencia és a vizsgált genetikai paraméterek között szoros összefüggést nem találtunk.

## 7. Összefoglalás

A szürkerothadás kórokozója, a *Botrytis cinerea* (teleomorfi: *Botryotinia fuckeliana*) gombafaj számos növénykultúra rendszeres és jelentős károsítója. A *B. cinerea* nagyon változatos megjelenésű, fenotípusában és genotípusában is nagy változékonyságot mutat. A modern növénykörtan kiemelt figyelmet fordít a patogén gombapopulációk genetikai szerkezetének megismerésére, épp ezért ezen információk megismerése fontos a védekezés stratégiájának kialakításában illetve egészítésében. A dolgozatban bemutatott – korántsem befejezett – kutatásunk célja, hogy választ keressünk azokra a kérdésekre, melyek mind a tudományos közélet, mind a mindennapi szőlőművelésbeni, növényvédelmi és borászati gyakorlatban felmerülhetnek.

Vizsgálataink során egyértelműen bizonyítható volt, hogy minden egyes izolátum a II. filogenetikai csoportba tartozik, transzpozon összetétele pedig eltér az irodalomban leírtaktól. Az izolátumok többsége a transposa csoportba sorolható (67.8%), a vacuma izolátumok ugyanolyan arányban voltak jelen (9.1%), mint azon izolátumok, amelyek csak *Boty* (11%) vagy csak *Flipper* (11.9%) transzpozon elemet tartalmaztak. Az a tény, hogy a *B. cinerea* II. csoportban előfordulnak olyan izolátumok, amelyek csak *Flipper* vagy csak *Boty* transzpozont tartalmaznak, rávilágít arra, hogy a transzpozonok jelenléte vagy hiánya olyan jellegzetesség, amely nem használható fel a *B. cinerea* egyértelmű rendszerezésében.

Az egri izolátumok MSB1 miniszatellit tartalmukat tekintve szintén nagy variabilitást mutatnak. A miniszatellit felépítő variánsok közel fele újonnan azonosított variáns, melyek általában csak egy-egy pontmutációban térnek el egymástól, illetve csak néhány izolátumban vannak jelen, feltételezve ezáltal, hogy helyben kialakult mutáció révén jöttek létre.

Kísérleteink során különböző genetikai markereket (MSB1, *tef1*, *tub1*) használtunk a populációk jellemzésére. Ezek önmagukban azonban nem nyújtottak elegendő genetikai információt, mikroszatellit markerekkel (Bc2, Bc3, Bc6, Bc7, Bc10) együttesen elemezve viszont eredményesen használhatóak voltak az izolátumok jellemzésére. Vizsgálatuk során igen magas fokú kapcsoltsági egyensúlytalanságot tapasztalhattunk mely adatok a szekvencia és mikroszatellit vizsgálatokkal együtt elegendő információt nyújtanak ahhoz, hogy a rekombináció lehetőségéről alkotott következtetéseink helytállóak legyenek. Az asszociációs index teszt eredményei azonban ennek ellenére is sejtetik a klonalitás jelenlétét. A fixációs index hasonló vizsgálata kimutatta, hogy a vacuma populációk csakugyan mutatnak némi differenciálódást mind a flipper, mind a transposa populációktól, amit magyarázhatnak ezek az eredmények. Ugyancsak észleltünk – bár igen mérsékelt differenciációt – a földrajzilag különböző helyekről származó populációk között.

A fungicid-rezisztencia vizsgálatok során az irodalmi adatoknak megfelelően mindhárom vizsgált vegyszer esetében tapasztalhattuk a rezisztencia jelenlétét az izolátumok között. Azonban különösen elgondolkodtató, illetve további vizsgálatokat szorgalmaz az az eredmény, miszerint a már régóta nem használt benzimidazol esetében (Benomyl, Du Pont) esetében még mindig viszonylag nagy volt a magas és közepes rezisztenciával rendelkező izolátumok aránya, míg a még nem régóta használt fenhexamid (Teldor, Bayer) esetében, pedig a közepes szintű fungicid-rezisztencia jelenléte volt nagy arányú.

Az Egri borvidékről származó izolátumok vizsgálata alapján eredményeink bizonyítják a rekombináció szignifikáns jelenlétét és kihangsúlyozzák a szignifikáns genetikai variabilitást a *B. cinerea* populációk között. A nagy genetikai variabilitás, valamint a szexuális

reprodukció egyértelmű magyarázat arra, hogy miért alakul ki olyan gyorsan és könnyen rezisztencia a különböző, *B. cinerea*-val szemben alkalmazott fungicidek ellen.

## 8. Summary

*Botrytis cinerea* (teleomorph: *Botrytinea fuckeliana*) is a haploid filamentous, heterothallic fungus that causes grey mould on grapevine and other many important crops in the temperate zone worldwide. The appearance of the fungus is very diverse and it shows a high genetic variability also. The modern plant pathology has a great respect for cognition of genetic structure of plant pathogen fungus for shaping and developing the strategies of protection. The aims of our work were to find answers for scientific and for field-work questions, which occurs in grape production, plant protection and in oenology.

In the course of our examinations were proved unequivocally that *B. cinerea* isolates consist entirely of phylogenetic group II. Looking of transposon pattern, the majority of isolates (67.8%) contained both Flipper and Boty and was thus transposa. However, some of isolates also contained only Flipper (11.9%) or only Boty (11%), in same proportion respectively. Ten isolates (9.1%) were vacuma, i.e., they contained neither transposon. The results show that the *B. cinerea* populations in the Eger wine grape growing exhibit an unusual transposon composition; while the majority of isolates indeed were transposa, vacuma isolates were present in about the same percentage as isolates containing only Boty or only Flipper. In any case, the evidence from our data, i.e., that *B. cinerea* group II also contains isolates which only contain Flipper or Boty, further underlines that the presence or absence of either transposon is not a valid character for speciation in *B. cinerea*. The isolates show high diversity in MSB1 minisatellite contents also. Almost moiety of minisatellite variant repeats were newly referred variants, which were occurred ordinarily just in few sample, supposed that was evolved by local mutation.



In the course of our experiments the individual genetic markers (MSB1, *tef1*, *tub1*) in themselves are not present enough genetic information, but all of them completed with microsatellite (Bc2, Bc3, Bc6, Bc7, Bc10) markers are suited for genetic analysis of isolates. In the score of our examination a very high degree of linkage disequilibrium was shown both by analyses of gene sequences as well as of microsatellites, which minimizes a potential bias. However, the Association Index test also suggested an element of clonality. A corresponding analysis of the fixation index revealed that indeed the vacuma population exhibited some differentiation from both the Flipper and the transposa populations, which may explain these results. We could also detect some (albeit very moderate) differentiation between some geographic populations.

In the course of fungicide resistance examinations, different resistance levels were found in isolates against all of three tested fungicides. It is especially interesting, and the fact indicates further examinations, that in case of for long time did not used fungicide like benomyl we found a great number of resistant isolates and in case of examination a relative new fungicide (in the time of examination), fenhexamide we found a great number of medium resistant isolates.

In summary, our data underline a significant genetic variability within populations and consistently indicates that the population of *B. cinerea* in the Eger wine region undergoes sexual reproduction. The complexity and variability of this fungus make it difficult to control, thus the high genetical variability and the sexual reproduction is an unambiguous answer for evolving of rapidly and easily fungicide resistance among isolations against fungicides.

## 9. Irodalomjegyzék

- Albertini, C., Thébaud, C., Fournier, E., Leraux, P.** (2002) Eburicol 14 $\alpha$ -demethylase gene (CYP51) polymorphism and speciation of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 106: 1171-1178.
- Alfonso, C., Raposo, R., Melegare, P.** (2000) Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathology*, 49: 243-251.
- Andersen, T. H., Torsten, N.-T.** (1997) A fungal minisatellite. *Nature*, 386: 771.
- Baladauf, S. L., Doolittle, W. F.** (1997) Origin and evolution of slime molds (*Mycetozoa*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12007-1210.
- Bardas, G. A., Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S.** (2008) Stability and fitness of anilino-pyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 98: 443-450.
- Barlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B.** (2002) The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58: 659-662.
- Baroffio, C. A., Siegfried, W., Hilber, V. W.** (2003) Long term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilino-pyrimidine, phenylpyrrole and hydroxyanilide fungicides in Switzerland. *Plant Disease*, 87: 662-666.
- Beever, R. E., Parkers, S. L.** (1993) Mating behaviour and genetics of fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in New Zealand. *Journal of Crop and Horticultural Science*, 21: 303-310.
- Beever, R. E., Parkers, S. L.** (2003). Use of nitrate non-utilising (Nit) mutants to determine vegetative compatibility in *Botryotinia*

- fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). European Journal of Plant Pathology, 109: 607-613.
- Beever, R. E., Weeds, P. L.** (2004) Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Elad, Y., Williamson, B. Tudzynski, P. és Delen, N. szerk. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. pp. 29-52. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ben Ahmed, D., Hamada, W.** (2005) Genetic diversity of some Tunisian *Botrytis cinerea* isolates using molecular markers. Phytopathol. Mediterr., 44: 300-306.
- Boeke, D. J., Eichinger, D., Castrillon, D., Fink, G. R.** (1989) The *Saccharomyces cerevisiae* genome contains functional and nonfunctional copies of transposon Tyl. Molecular and Cellular Biology, 8: 1432-1442.
- Bollen, G. J., Scholten, G.** (1971) Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. Netherlands J. of Plant Pathology, 77: 83-90.
- Brent, K. J., Hollomon D. W.** (1998) Fungicide resistance: The assessment of risk. In: FRAC Monograph No. 2: 1-48. Global Crop protection Federation, Brussels, Belgium.
- Brown, A. H. D., Feldman, M. W. és Nevo, E.** (1980) Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. Genetics, 96:523-536.
- Bruen, T., Philiipe, H., Bryant, D.** (2006) A quick and robust statistical test to detect the presence of recombination. Genetics, 172: 2665—2681.

- Bruns, T. D., White, T. J., Taylor, J. W.** (1991) Fungal Molecular Systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, 22: 525-564.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.** (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol. Ecol., 9: 1657-1660.
- Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. és Jarvis, W. R.** szerk. (1980) The biology of *Botrytis*. Academic Press, London, UK.
- Colot, V., Rossignol, J. L.** (1995) Isolation of the *Ascobolus immersus* spore color gene b2 and study in single cells of gene silencing by methylation induced premeiotically. Genetics, 141: 1299-1314.
- Commenil, P., Burnet, L., Audran, J.-C.** (1997) The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. J. of Exp. Botany., 48: 1599-1607.
- Cruickshank, G. C., Wade, G. C.** (1992) The activation of latent infections of *Monilia fructicola* on apricots by volatiles from the ripening fruit. J. of Phytopathology, 136: 107-112.
- Daboussi, M. J., Capy, P.** (2003) Transposable elements in filamentous fungi. Ann. Rev. Microbiol., 57: 275-299.
- Davidse, L. C., Ishii, H.** (1995) Biochemical and molecular aspects of the mechanisms of action of benzimidazoles, N-phenylcarbamates and N-phenylformamidoximes and the mechanisms of resistance of this compounds in fungi. In: Lyr, H. szerk. Modern selective fungicides. pp. 305-322. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany.
- Debieu, D., Bach, J., Hugon, M., Malosse, C., Leraux, P.** (2001) The hydroxyanalide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Pest Management Science, 57: 1060-1067.

- Dioloz, A., Marches, F., Fortini, D., Brygoo, Y.** (1995) *Boty*, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Applied and Environmental Microbiology, 61: 103-108.
- Dittrich, H. H., Sponholz, W. R.** (1975) Die Aminosäureabnahme in *Botrytis* – infizierten Traubenbeeren und die Bildung höherer Alkohole in diesem Mosten bei ihrer Vergärung. Wein – Wiss, 30: 188-210.
- Donèche, B.** (1989) Carbohydrate metabolism and gluconic acid synthesis by *Botrytis cinerea*. Can. J. Botany, 67: 2888-2893.
- Druzhinina, I., Kubicek, C. P.** (2005) Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? J Zhejiang Univ SCI 2005, 6: 100-112.
- Duobourdiou, D., Pucheu-Planté, B., Mercier, M.** (1978) Structure, rôle et localisation d'un glucane sécrété par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. C. R. Acad. Sci. Paris, 287: 571-573.
- Edwards, A., Hammond, H.A., Jin, L., Caskey, C.T., Chakraborty, R.** (1992) Genetic variation at five trimetric and tetrametric tandem repeat loci in four human population groups. Genomics, 12: 241-253.
- Elmer, P., Michailides, T. J.** (2004) *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In: Elad, Y., Williamson, B. Tudzynski, P. és Delen, N. szerk. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. pp. 243-272. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Enkerli, J., Bhatt, G., Covert, S. F.** (1997) *Nht1*, a transposable element cloned from a dispensable chromosome in *Nectria haematococca*. Mol. Plant-Microbe Interact., 10: 742-749.

- Faretra, F., Antonacci, E., Pollastro, S.** (1988). Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology*, 134: 2543-2550.
- Faretra, F., Pollastro, S.** (1991) Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research*, 95: 943-951.
- Faretra, F., Pollastro, S.** (1993) Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) from nine countries. *Plant Pathology*, 42: 48-57.
- Fermaud, M., Le Menn, R.** (1992) Transmission of *Botrytis cinerea* to grapes by grape berry moth larvae. *Phytopathology*, 82: 1393-1398.
- Feschottes, C., Zhang, X., Wessler, S. R.** (2002) Miniature inverted-repeat transposable elements and their relationship to established DNA transposons. In: Craig N.L., Craigie R., Gellert, M. & Lambowitz, A.M. szerk. *Mobile DNA II*. pp. 1147-1158. ASM, Washington DC, USA.
- Finnegan, N.** (1988) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genet.*, 5: 103-107.
- Flether L. D., McDowell J. M., Tidwell, R. R., Meagher, R. B., Dykstra, C. C.** (1994) Structure, expression and phylogenetic analysis of the gene encoding *actin I* in *Pneumocystis carinii*. *Genetics*, 137:743-750.
- Forbes-Smith, M.** (1999) Induced resistance for the biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables. *Food Australia*, 51:382-358.

- Forster, B., Straub, T.** (1996) Basis for use strategies of anylinopirimidin and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. *Crop Protection*, 15: 529-537.
- Fournier, E., Giraud, T.** (2008) Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *J. Evol. Biol.* 21: 122-132.
- Fournier, E., Giraud, T., Albertini, C., Brygoo, Y.** (2005) Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia*, 97: 1251–1267.
- Fournier, E., Giraud, T., Loiseau, A., Vautrin, D., Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J. M., Brygoo, Y.** (2002) Isolation of nine microsatellite loci from a genomic sequence bank of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* (*Ascomycota*) *Mol Ecol Notes* 2: 253-255.
- Fournier, E., Levis, C., Fortini, D., Leroux, P., Giraud, T., Brygoo, Y.** (2003) Characterisation of *Bc-hch*, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa het-c* vegetative incompatibility locus and its use as a population marker. *Mycologia*, 95: 943-951.
- Fritz, R., Lanen, C., Drouhot, V.** (1993) Effects of various inhibitors including carboxin on *Botrytis cinerea* mitochondria isolated from mycelium. *Agronomie*, 14: 541-554.
- Giannakis, C., Bucheli, C. S., Skene, K. G. M., Robinson, S. P., Scott, N. S.** (1998) Chitinase and beta-1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defence against powdery mildew infection. *Aust. J. of Grape and Wine Research*, 4:86-98.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Brygoo, Y.** (1997) RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*)

and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 1177–1185.

- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Brygoo, Y.** (1998) The minisatellite MSB1, in the fungus *Botrytis cinerea*, probably mutates by slippage. *Mol. Biol. Evol.*, 15: 1524-1531.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuqlio, K., Brygoo, Y.** (1999) Two siblings species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* 89: 967-973.
- Giraud, T., Villaréal, L. M. M. A., Austerlitz, F., Le Gac, M., Lavigne, C.** (2006) Importance of the life cycle in sympatric host race formation and speciation of pathogens. *Phytopathology*, 96:280-287.
- Glaser, D. C., Roberts, I. N., Archer, D. B., Oliver, R. P.** (1995) The isolation of *antI*, a transposable element from *Aspergillus niger*. *Mol. Gen. Genet.*, 249: 432-438.
- Goetz, G. F. A., Metais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R., Pont, V.** (1999) Resistance factors to gray mould in grape berries: identification of some phenolic inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry*, 52: 759-767.
- Goyon, C., Rossignol, J. L., Faugeron, G.** (1996) Native DNA repeats and methylation in *Ascobolus*. *Nucleic Acids Res.*, 24: 3348-3356.
- Guindon, S., Gascuel, O.** (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.*, 52: 696–704.
- Hamann, A., Felle, F., Osiewac, H. D.** (2000) The degenerate DNA transposon *pat* and repeat-induced point mutation (RIP) in *Podospira anserina*. *Mol. Gen. Genet.*, 263: 1061- 1069.



- Hennebert, G. L.** (1973) *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia*, 7:183-204.
- Hennebert, G. L., Groves, J. W.** (1963) Three new species of *Botryotinia* in *Ranunculaceae*. *Canadian Journal of Botany*, 41: 341-373.
- Hudson, R. R., Slatkin, M., Maddison, W. P.** (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583-589.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F.** (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17:754–755.
- Huson, D. H., Bryant, D.** (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.*, 23: 254 – 267.
- Ikeda, K., Nakayashiki, H., Takagi, M., Tosa, Y., Mayama, S.** (2001) Heat shock, copper sulphate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Genet. Genomics*, 266: 318-325.
- Jakucs, E., Vajna, L.** (2003) A gombák ökológiája. In: Jakucs, E., Vajna, L. szerk. *Mikológia* pp. 239-305. Agroiinform Kiadó, Budapest.
- James, W. C.** (1974) Assessment of plant diseases and losses. *Ann. Rev. Phytopathology* 12: 27-48.
- Jarvis, W. R.** (1977) *Botryotinia* and *Botrytis* Species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity. Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S. L.** (1985) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316: 76-79.
- Kachroo, P., Leong, A. S., Chattoo, B. B.** (1994) *Pot2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Gen. Genet.*, 245: 339-348.
- Kalamakaris, A. E., Petsikos-Paragiotarou, N., Mavroides, B., Ziogas, B. N.** (2000) Activity of fluazinam against strains of *Botrytis cinerea*

resistant to benzimidazoles and / or dicarboximides and to a benzimidazole-phenylcarbamate mixture. *J. of Phytopathology*, 148: 449-455.

**Kállay, M.** (1998) *Borászati Kémia* pp. 253-428. In: Eperjesi, I., Kállay, M., Magyar, I. szerk. *Borászat. Mezőgazda Kiadó, Budapest.*

**Kaneko, I., Tanaka, A., Tsuge, T.** (2000) REAL, an LTR retrotransposon from the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Mol. Gen. Genet.*, 263: 625-634.

**Karchani-Balma, S., Gautier, A., Raies, A. Fournier, E.** (2008) Geography, plants and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathology* 98: 1271-1279.

**Kasuga, T., White, T. J., Koenig, G., McEwen, J., Restrepo, A., Castañeda, E., Da Silva Lacaz, C., Heins-Vaccari, E. M., De Freitas, R. S., Zancopé-Oliveira, R. M., Qin, Z., Negroni, R., Carter, D. A., Mikami, Y., Tamura, M., Taylor, M. L., Miller, G. F., Poonwan, N., Taylor, J. W.** (2003) Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol. Ecol.* 12: 3383-3401.

**Kerényi, Z.** (1977) Tokaji borkülönlegességek aromaanyagainak gázkromatográfiás vizsgálata. III. Nem illó és nehezen illó aromakomponensek GLC – analízise. *Borgazdaság*, 25: 26-29.

**Khon, L. M.** (1979) A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. *Mycotaxon* 9: 365-444.

**Kinsey, J. A., Helber, J.** (1989) Isolation of a transposable element from *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 1929-1933.

- Kolmer, J. A.** (1991) Evolution of distinct populations of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* in Canada. *Phytopathology*, 81: 316-322.
- Kulling-Grading, C. M., Szakács, G., Kubicek, C. P.** (2002) Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol Res.*, 158: 125-133.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M.** (2003) MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Analysis and Sequence Alignment Briefings in Bioinformatics, 5: 150-163.
- Latorre, B. A., Spadaro, I., Rioja, M. E.** (2002) Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*, 21: 957-961.
- Lázár, J., Dula, B., Voigt, E., Szendrey, L., Makó, Sz.** (2004) A szőlő védelme I. *Növényvédelem*, 40: 193-206.
- Leroux, P., Clerjeau, M.** (1985) Resistance of *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola* to fungicides in French vineyards. *Crop Protection*, 4: 137-160.
- Leroux, P.** (1996) Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pesticide science*, 47: 191-197.
- Leroux, P.** (2004) *Botrytis* chemical control and resistance. pp. 195-222. In: Elad, Y, Williamson, B., Tudzynski, P. Delen, N. szerk. *Botrytis: Biology, Pathology and control*, Kluyver Academic Publisher, London, UK.
- Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., Gredt, M.** (1999) Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*, 18: 687-697.
- Leroux, P., Descotes, A.** (1996) Resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides and strategies for its control in the Champagne vineyards.

Proceedings of the 1996 Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases, pp. 131-136., UK.

- Leroux, P., Fournier, E., Brygoo, Y., Panon, M. L.** (2002) Biodiversité et variabilité chez *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture gris. Nouveaux resultants sur les especes et les résistances. *Phytoma*, 554: 38-43.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., Chapeland, F.** (2002) Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58: 876-888.
- Leroux, P., Walker, A. S., Senechal, Y.** (2003) Etude de lasensibilité de *Botrytis cinerea* au boscalis. In: 7th International Conference on Plant Diseases (cdROM; [www.afpp.net](http://www.afpp.net)). AFPP, Paris, France.
- Levis, C., Fortini, D., Brygoo, Y.** (1997) Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Mol Gen Genet.*, 254: 674-680.
- Li, J., Edlind, T.** (1994) Phylogeny of *Pneumocystis carinii* based on beta-tubulin sequence. *J Eukaryot Microbiol.*, 41: 79-83
- Li, W. H., Lou, C. C., Wu, C. I.** (1985) Evolution of DNA sequences. In: McIntyre szerk. *Molecular evolutionary genetics*. pp. 1-92. Plenum, New York, USA.
- Lorbeer, J. W.** (1980) Variation in *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. és Jarvis, W. R. szerk. *The Biology of Botrytis*. pp. 19-40. Academic Press, London, UK.
- Magyar, I.** (1998) Borászati mikrobiológia pp. 431-520. In: Eperjesi, I., Kállay, M., Magyar, I. szerk. *Borászat*. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

- Ma, Z., Michailides, T. J.** (2007) Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 26: 145-161.
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., Fernaud, M.** (2003) Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 479-488.
- Mashuda, M., Okawa, E., Nishimura, K., Yunome, H.** (1984) Identification of 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2(5H)-furanon (sotolon) and ethyl-9-hydroynonanoate in botrytised wine and evaluation of the roles of compounds characteristic of it. *Biol. Chemistry* 48: 2707-2710.
- Maynard Smith, J.** (1992) Analysing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol.*, 33:126-129.
- Maynard Smith, J., Smith N. H., O'Rourke, M., Spratt, B. G.** (1993) How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 4384-4388.
- McClintock, B.** (1984) The significance of responses of the genome to challenge. *Science*, 226: 792-801.
- McDonald, B. A., McDermott, J. M.** (1993) Population genetics of plant pathogenic fungi. *BioScience*, 43: 311-319
- Mes, J. J., Haring, M. A., Cornelissen, B. J. Foxy, C.** (2000) An active family of short interspersed nuclear elements from *Fusarium oxysporum*. *Mol. Gen. Genet.*, 263: 271-280.
- Milicevic, T., Topolovec-Pintaric, S., Cvjetcovic, B., Ivic, D., Duralia, B.** (2006) Sympatric subpopulations of *Botrytis cinerea* on strawberries based on the content of transposable elements and

their connection with resistance to botryticides. *Acta Horticulturae*, 708: 115-118 .

- Milling, R. J., Richardson, C. J.** (1995) Mode of action of the anilinopyrimidine fungicide pyrimetamil. Effects on enzyme excretion in *Botrytis cinerea*. *Pesticides Science*, 45: 43-48.
- Mlikota Gabler, F., Smilanick, J. L., Mansour, M., Ramming, D. W., Mackey, B. E.** (2003) Correlations of morphological, anatomical and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 93: 1263-1273.
- Moldave, K.** (1985) Eukaryotic protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, 54: 1109-1149.
- Mondy, N., Corio-Costet, M-F.** (2000) The response to the grape berry moth (*Lobesia botrana*) to a dietary phytopathogenic fungus (*Botrytis cinerea*): the significance of fungus sterols. *J. of Insect Physiology*, 46: 1557-1564.
- Mondy, N., Pracros, P., Fermaud, M., Corio-Costet, M-F.** (1998) Olfactory and gustatory behaviour by larvae of *Lobesia botrana* in response to *Botrytis cinerea*. *Entom. Experim. et Applicata* 88:1-7.
- Munoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y., Giraud, T.** (2002) Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycol Research*, 106: 594-601.
- Nair, N. G., Hill, G. K.** (1992) Bunch rot of grapes caused by *Botrytis cinerea*. In: Kumar, J., Chaube, H. S., Singh, U. S., Mukhopadhyay, A. N. szerk. *Plant diseases of international importance: Diseases of fruit crops*. pp. 147-169. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.

- Neuvéglise, C., Sarfati, J., Latgé, J. P., Paris, S.** (1996) Afut1, a retrotransposon-like element from *Aspergillus fumigatus*. *Nucleic Acids Res.*, 24: 1428-1434.
- Nicholas, K. B., Nicholas Jr, H. B., Deerfield II, D.W.** (2007) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>) *EMBNET.news*, 4: 1-4.
- Nielsen, K., Justesen, A. F., Jensen, D. F., Yohalem, D. S.** (2001) Universally primed polymerase chain reaction alleles and internal transcribed spacer restriction fragment length polymorphisms distinguish two subgroups in *Botrytis aclada* distinct from *B. byssoidea*. *Phytopathology*, 91: 527-533.
- Nielsen, M. L., Hermansen, T. D., Aleksenko, A.** (2001) A family of DNA repeats in *Aspergillus nidulans* has assimilated degenerated retrotransposons. *Mol. Genet. Genomics*, 265: 883-887.
- Padgett, M., Morisson, J. C.** (1990) Changes in grape berry exudates during fruit development and their effect on mycelical growth of *Botrytis cinerea*. *J. of Am. Soc. of Hort Sci.*, 115: 269-273.
- Parker, P. G., Snow, A. A., Malcolm, D. S., Booton, G. C., Fuerst, P. A.** (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79: 361-382.
- Petsikos-Panayotarou, N., Markelou, E., Kalamarakis, A. E.** (2003) In vitro and in vivo activity of cyprodinil and pyrimethanil on *Botrytis cinerea* resistant to other botryticides and selection of resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece. *Eur. J. of Plant Pathology*, 109: 173-182.
- Pezet, R.** (1988) Une résistance naturelle au *Botrytis*. *Phytoma* 394:44-45.
- Pezet, R., Viret, O., Perret, C., Tabacchi, R.** (2003) Latency of *Botrytis cinerea* Prs.: Fr. and biochemical studies during growth and

ripening of two grape berry cultivars, respectively susceptible and resistant to gray mould. *J. of Phytopath.*, 151: 208-214.

- Piganeau, G., Gardner, M., Eyre-Walker, A.** (2004) A broad survey of recombination in animal mitochondria. *Mol. Biol. Evol.* 21: 2319-2325.
- Pillonel, C., Meyer, T.** (1997) Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of *Neurospora crassa*. *Pesticide Science*, 49: 229-236.
- Pollastro, S., Faretra, F., Canio, V., De Guido, A.** (1996) Characterisation and genetic analysis of field isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to dichlofluanid. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 607-613.
- Posada, D., Crandall, K. A.** (1998) "Modeltest: Testing the model of DNA substitution." *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Pringle, A., Baker, D. M., Platt, J. L., Wares, J. P., Latge, J. P., Taylor, J. W.** (2005) Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution*, 59: 1886-1899.
- Puhalla, J. E.** (1985) Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63: 179-183.
- Raju, N. B., Perkins, D.** (2000) Programmed ascospore death in the homothallic ascomycete *Coniochaeta tetraspora*. *Fungal Genetics and Biology*, 30: 213-221.
- Renault, A. S., Deloir, A., Bierne, J.** (1996) Pathogenesis related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 35:49-52.
- Riberéau-Gayon, P., Lafon-Lafourcade, S., Duobourdiou, D., Lucmaret, V., Laure, F.** (1979) Métabolisme de *saccharomyces cerevisiae*



dans le mount de raisins parastés par *Botrytis cinerea*. Inhibition de la fermentation, formation d'acid acétique et de glycérol. C. R. Acad. Sci. Paris, 289: 441-444.

- Roger, A. J., Sandblom, O., Doolittle, W. F., Philippe, H.** (1999) An evaluation of elongation factor 1a as a phylogenetic marker for eukaryots. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 218-233.
- Rozas, J., Sanchez-Delbarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R.** (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.
- Sabeti, P., Schaffner, S., Fry, B., Lohmueller, J., Varilyl., P, Shamovsky, O., Palma, A., Mikkelsen, T., Altshuler, D., Lander, E.** (2006) Positive natural selection in the human lineage. *Science*, 312: 1614–1620.
- Sambrook, J., Friths, E., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sbaghi, M., Jeandet, P., Bessis, R., Leraux, P.** (1996) Degradation of stilbene type phytoalexins in relation to the patogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. *Plant Pathology*, 45: 139-144.
- Smith, P. A., Corces, V. G.** (1991) *Drosophila* transposable elements: mechanisms of mutagenesis and interactions with the host genome. *Adv Genet.*, 29: 229-300.
- Sonnenberg, A. S., Baars, J. J., Mikosch, T. S., Schaap, P. J., Vanriensven, L. J.** (1999) Abr1, a transposon-like element in the genome of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3347-3353.
- Stakman, E. C.** (1959) The role of plant pathology in the scientific and social development of the world. pp. 3-13 In: Holton, C. S.,

Fischer, G. W., Fulton, R. W., Hart, H., McCallan, S. E. szerk.  
Plant pathology: Problems and progress 1908-1958. University of  
Wisconsin Press, Madison.

- Staats, M., van Baarlen, P., and van Kan, J. A. L.** (2005) Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol. Biol. Evol.* 22: 333-346.
- Steel, C. C.** (2001) Effects of altered UV light and climate change on the susceptibility of grapevines to fungal diseases. *The Aust. Grapegrower and Winemaker* Jun: 13-15.
- Swofford, D. L.** (1998) PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Tamura, H., Mizutani, A., Yukioka, H., Miki, N., Ohba, K., Masuko, M.** (1999) Effect of the methoximinooacetamide fungicide, SSF 129, on respiratory activity in *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science*, 55: 681-686.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G.** (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.
- Vignutelli, A., Hilber-Bodmer, M., Hilber, U. W.** (2002) Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana*. *Mycological Research*, 106: 329-335.
- Vivier, M. A., Pretorius, I. S.** (2002) Genetically tailored grapevines for the wine industry *Trends in Biotechnology*, 20: 472-478.

- Weber, B., Hoesch, L., Rast, D. M.** (1995) Protocatechualdehyde and other phenols as cell wall components of grapevine leaves. *Phytochemistry*, 40: 433-437.
- Weber, J. L.** (1990) Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, 7: 524–530.
- Weeds, P. L., Beever, R. E., Long, P. G.** (1998) New genetic markers for *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). *Mycological Research* 102: 791-800.
- Weeds, P. L., Beever, R. E.** (1995) Vegetative compatibility groups in *Botryotinia fuckeliana*. *Fungal genetics newsletter* 52 Supplement : XXIII Fungal Genetics Conference, 2005: 76
- White T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor J. W.** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 324-340. In: Innis M.A., Gelgard, D.H., Snisky, J.J., & White, T.J. szerk. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*.
- Wood, P. M., Hollomon, D. H.** (2003) A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site complex III. *Pest Management Science* 59: 499-511.
- Wright, S.** (1978) Variability within and among natural populations. *Evolution and genetics of populations*, Vol. 4. University of Chicago Press, Chicago, Ill., U.S.A.
- Wyman, A., White, R.** (1980) A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6754-6758.
- Yeadon, P. J., Catcheside, D. E.** (1995) Guest: A 98pb inverted repeat transposable element in *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.*, 247: 105-109.

**Zane, L., Bargelloni, L., Paratnello, T.** (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1–16.

## **Internetes hivatkozások**

PhyML program honlapja (Guindon és Gascuel, 2003):

<http://atgc.lirmm.fr/phyml/>

MODELTEST v.3.06 program honlapja (Posada és Crandall, 1998):

<http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html>

MLST program honlapja (Maynard Smith és mtsai, 1993):

[http://linux.mlst.net/link\\_dis/index.htm](http://linux.mlst.net/link_dis/index.htm)

TCS program honlapja (Clement és mtsai, 2000):

<http://darwin.uvigo.es/software/tcs.html>

Magyar biostatisztika értelmező szótár

<http://www.biostat.hu/biostat/indit1.asp?p=szotar1>

A *Botrytis cinerea* genom adatbázis:

[http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/botrytis\\_cinerea/Home.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/botrytis_cinerea/Home.html)

## Publikációs lista

### A dolgozat alapjául szolgáló publikációk:

- 1) **Váczy K. Z.**, Sándor E., Karaffa L., Fekete E., Fekete É. Árnási M., Czeglédi L., Kövics Gy., Druzhinina I., Kubicek C. P. (2008): Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards. *Phytopathology* **98**:1312-1319. **I.F.: 2,378**
- 2) **Váczy K. Z.**, Karaffa L., Kövics Gy. J., Sándor E. (2007): Szürkerothadást okozó *Botrytis cinerea* populációk jellemzése miniszatellit szekvencia vizsgálatával. (Characterization of causal agent of grey mould disease, *Botrytis cinerea* populations by minisatellite sequency. *Növényvédelem* **43** (2): 57-61.

### További referált közlemények:

- 1) Karaffa, L. **Váczy, K.**, Sándor, E., Biró, S., Szentirmai, A., Pócsi, I. (2000): Cyanide-resistant alternative respiration is strictly correlated to intracellular peroxide levels in *Acremonium chrysogenum*. *Free Radical Research*, **34**:406-416 . **I.F.: 2,468**
- 2) **Váczy K. Z.**, Karaffa L., Fekete E, Kövics Gy, Gál L, Sándor E (2006): Distribution of transposons in *Botrytis cinerea* isolates collected from the wine regions of Eger and Tokaj, Hungary. *4<sup>rd</sup> International Plant Protection Symposium, Proceedings* pp. 69-71.
- 3) Sándor E., **Váczy K.**, Kövics Gy., Karaffa L. (2005): Az Egri borvidék *Botrytis cinerea* populációinak genetikai jellemzése. 10. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum, Debrecen. *Proceedings* pp. 299-308.

- 4) El-Naggar, M., Kövics, G. J., **Váczy, K. Z.**, Karaffa, E. (2008): Pyrimethanyl tolerance of *Botrytis cinerea* isolates from Egypt and Hungary. 10. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum, Debrecen. Proceedings pp. 98-107.

#### **Idegnyelvéü öszsefoglalók:**

- 1) **Váczy K. Z.**, Karaffa L., Váczy Zs., Gál L., Sándor E. (2008): Characterisation of minisatellite sequences from *Botrytis cinerea* populations in The Tokaj wine district. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **55**: 256-257.
- 2) Sándor E., **Váczy K.Z.** (2008): *Botrytis cinerea* populations in Hungary consist of the group II phylogenetic species with a high loss of the transposon Boty. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **55**: 242.
- 3) Szilágyi Z., **Váczy K. Z.**, Gál L. (2007): Application of RT-PCR and GC-MS methods for detection of wine spoilage by *Bretannomyces* 3<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Food Analysis. Prague, Czech Republic. Book of Abstracts pp. 310.
- 4) **Váczy K. Z.**, Karaffa L., Kövics Gy. J., Gál L., Sándor E. (2007): Genetic characterisation of *Botrytis cinerea* populations in the Eger wine district *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **54**: 137-138.
- 5) **Váczy K. Z.**, Karaffa L., Kövics Gy. J., Gál L., Sándor E. (2006): Comparative characterisation of minisatellite sequences from *Botrytis cinerea* populations in the Eger and Tokaj wine regions. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **53**: 355-356.

- 6) Szilágyi, Z., Váczy, K. Z., Szabó, P. T. (2006): Investigation of metabolite diversity of genetically different *Botrytis cinerea* fungal isolates by HPLC and LC-MS techniques. 17<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference. Prague, Czech Republic. Abstract Book pp. 214
- 7) Váczy K. Z., Karaffa L., Kövics Gy. J., Gál L., Rudó N., Sándor E. (2006): Transposon elements and mycelial compatibility groups of *Botrytis cinerea* in the Eger and Tokaj wine regions. 8th European Conference on Fungal Genetics. Vienna Book of Abstracts pp. 431.
- 8) Váczy K. Z., Druzhinina I. S., Kubicek Ch. P., Karaffa L., Gál L., Kövics Gy. J., Sándor E. (2006): Analysis of *Botrytis cinerea* populations in the Eger and Tokaj wine regions - a multiloci approach. 8th European Conference on Fungal Genetics. Vienna Book of Abstracts pp. 413.
- 9) Sándor E., Váczy K., Druzhinina, I., Kubicek, C. P., Kövics Gy. J., Karaffa L (2005): Genetic characterization of grape-infecting *Botrytis cinerea* populations from the Eger wine region, Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **52**: 135-136.
- 10) Váczy K.Z., Gál L., Karaffa L., Kövics Gy., Sándor E. (2005): Genetic characterization of *Botrytis cinerea* isolates of Eger and Tokaj wine regions. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **52**: 167-168.
- 11) Karaffa, L., Váczy, K., Sándor, E., Pócsi, I., Szentirmai, A. (1999): Connection between the cyanid-resistant alternative respiration and the peroxide levels in *Acremonium chrisogenum*. *Acta Microbiologica et immunologica Hungarica*. **46**:339-340.

## Magyar nyelvű összefoglalók:

- 1) **Váczy K.**, Karaffa L., Sándor E. (2009): *Botrytis cinerea* populációk vizsgálata az Egri borvidéken. 55. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest. Proceeding book: pp 38.
- 2) **Váczy K.**, Váczy Zs., Kaptás T., Sándor E. (2009): *Botrytis cinerea* izolátumok dikarboximid és hidroxianilid rezisztenciájának alakulása magyarországi borvidékeken. 55. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest. Proceeding book: pp 79.
- 3) **Váczy K.**, Karaffa L., Kövics Gy., Gál L., Rudó N., Sándor E. (2007): A *Botrytis cinerea* transzpozon elemeinek és micéliális kompatibilitási csoportjainak vizsgálata az Egri és Tokaji borvidékeken. Lippay-Ormos-Vas Tudományos ülészak Budapest. Összefoglalók: pp.:98-99 (magyar-angol).
- 4) **Váczy K.** (2006): A *Botrytis cinerea* jelentősége a borminőség kialakulásában. VII Szőlészeti és Borászati Konferencia, Eger. Program és absztrakt: pp. 14.
- 5) **Váczy K.**, Gál L., Karaffa, L., Kövics Gy., Sándor E. (2005): Az Egri és Tokaji borvidékről származó *Botrytis cinerea* izolátumok összehasonlítása. MTSZ. Tudományos közlemények 8. pp. 43.
- 6) **Váczy K.**, Gál L., Karaffa, L., Kövics Gy., Sándor E. (2005): Az Egri és Tokaji borvidékről származó *Botrytis cinerea* izolátumok összehasonlítása. Lippay-Ormos-Vas Tudományos Ülészak, Budapest. Abstracts 180-181 (magyar-angol).
- 7) **Váczy K.**, Karaffa L., Kövics Gy., Sándor E. (2005): Szürkerothadást okozó *Botrytis cinerea* populációk jellemzése miniszatellit szekvencia vizsgálatával. 51. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest. Proceeding book: pp 31.



- 8) **Váczy K.**, Karaffa L., Kövics Gy., Sándor E. (2004): Az Egri borvidéken szürkerothadást okozó *Botrytis cinerea* populációk változékonyságának vizsgálata. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004 évi Nagygyűlése, Keszthely. Előadás kivonatok pp. 129-130.
- 9) **Váczy K.**(2002): Molekuláris biológiai módszerek a szőlő gombabetegségekkel szembeni rezisztencianemesítésében. MTSZ. Tudományos közlemények 5. pp. 30.
- 10) **Váczy K.**, Sándor E., Szentirmai A., Pócsi I., Karaffa L. (2000): Peroxidok és szerves savak szerepe az *Acremonium chrysogenum* alternatív légzésének szabályozásában. *Acta Biologica Debrecina* **22**: 180.

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton köszönöm témavezetőim, Dr. Karaffa Levente - aki másodéves egyetemista korom óta témavezetőm, és aki megtanított a mikrobiológia művelésére - és Dr. Karaffa Erzsébet - akivel 2003 óta dolgozunk a botritisszel - szakmai segítségét, irányítását, koordinálását, a kitűnő munka- és baráti kapcsolatot. Nélkülük ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Köszönönettel tartozom az egri Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet mindenkori vezetésének munkám támogatásáért, közvetlen munkatársaimnak a laboratóriumban és a szőlőültetvényekben nyújtott segítségért és minden kollégámnak azért a kellemes és nyugodt (mondhatni baráti) légkörért, ami az eredményes munkát nagyban elősegítette.

Munkám jelentős részét a Debreceni Egyetem Növényvédelmi Tanszékének, illetve Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékének laboratóriumaiban végeztem. Köszönöm a lehetőséget, hogy itt dolgozhattam, és minden kedves kollégának köszönöm a sok esetben nélkülözhetetlen segítséget.

Jelentős segítséget kaptam bécsi Technische Universität, ICE, Division of Gene Technology and Applied Biochemistry munkatársaitól a populáció genetikai vizsgálatok végzésében.

Munkám során több szőlész és borász szakemberrel is kapcsolatba kerültem. Közülük külön kiemelném Kaló Imre egri és Szepsy István tokaji

borászt. Rendkívül sokat segítettek abban, hogy a botritiszt ne csak a laboratórium száraz genetikai oldaláról, hanem annak komplex, a szőlő, a mikroorganizmus és a bor kapcsolatának valóságán keresztül is megismerhessem.

Végül, de nem utolsó sorban, végtelen hálával tartozom családomnak, amiért mindig mellettem voltak, és türelmükért, amikor én nem lehettem velük. Velem örültek sikereknek és támogattak kudarckor esetén, ez a biztos háttér rendkívül sok erőt adott a munkához.

Vizsgálatainkat az NKFP-A2-2006/0017, OM-00037/2007 sz. Jedlik Ányos program támogatásával végeztük.



Jedlik Ányos program

A projekt a Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal támogatásával valósult meg.



# Függelék

## 1. Az izolátumok származási helye, Egri borvidék

Izolátum száma	Gyűjtés helye	Gyűjtés éve	Szőlőfajta
3	Demjén, Szőlőhegy	2003	Zenit
9	Demjén, Farkashegy	2003	Olaszrizling
13	Demjén, Farkashegy	2003	Leányka
17	Egerszólát, Szóláti tető	2003	Olaszrizling
18	Verpelét, Fődülő	2003	Hárslevelű
22	Andornaktálya, Felsőlápa	2003	Medina
29	Demjén, Farkashegy	2003	Zenit
30	Demjén, Farkashegy	2003	Zenit
31	Demjén, Farkashegy	2003	Olaszrizling
32	Demjén, Farkashegy	2003	Olaszrizling
33	Demjén, Farkashegy	2003	Leányka
34	Demjén, Farkashegy	2003	Leányka
36	Egerszólát, Franc lapos	2003	Kékfarnkos
38	Egerszólát, Szóláti tető	2003	Olaszrizling
41	Verpelét, Fődülő	2003	Hárslevelű
43	Eger, Kőlyuktető	2003	Eger csillaga
45	Eger, Papphegy	2003	Leányka
46	Eger, Papphegy	2003	Leányka
47	Eger, Papphegy	2003	Leányka
49	Egerbakta, Baktai tető	2003	Leányka
53	Egerbakta, Baktai tető	2003	Kékoportó
54	Egerbakta, Baktai tető	2003	Kékoportó
55	Egerbakta, Baktai tető	2003	Kékoportó
56	Eger, Szarkás tető	2003	Leányka
57	Eger, Szarkás tető	2003	Leányka
58	Eger, Szarkás tető	2003	Leányka
59	Eger, Szarkás tető	2003	Leányka
60	Eger, Cegléd dűlő	2003	Leányka
61	Eger, Cegléd dűlő	2003	Leányka
63	Eger, Kiseged alja	2003	Kékfrankos
64	Eger, Külsősikhegy	2003	Leányka
65	Eger, Külsősikhegy	2003	Leányka
67	Eger, Külsősikhegy	2003	Leányka
68	Ostoros, Pajdos dűlő	2003	Zengő
70	Ostoros, Pajdos dűlő	2003	Zengő
75	Feldebrő, Szőlőhát	2003	Hárslevelű
76	Feldebrő, Szőlőhát	2003	Hárslevelű
86	Egerszalók, Tóberc	2003	Kékfrankos
401	Eger, Kőlyuktető	2004	Leányka
402	Eger, Kőlyuktető	2004	Leányka
405	Eger, Kőlyuktető	2004	Chardonnay

407	Eger, Kölyuktető	2004	Blauburger
408	Eger, Kölyuktető	2004	Blauburger
409	Eger, Kölyuktető	2004	Néro
410	Eger, Kölyuktető	2004	Néro
411	Eger, Kölyuktető	2004	Néro
412	Felsőtárkány, Cserepart	2004	Pinot noir
413	Felsőtárkány, Cserepart	2004	Pinot noir
414	Felsőtárkány, Cserepart	2004	Chardonnay
415	Felsőtárkány, Cserepart	2004	Chardonnay
417	Felsőtárkány, Tiba	2004	Savignon blanc
419	Felsőtárkány, Nagyparlag	2004	Cabernet savignon
421	Felsőtárkány, Tiba	2004	Savignon blanc
423	Felsőtárkány, Nagyparlagalja	2004	Turán
424	Felsőtárkány, Nagyparlagalja	2004	Turán
425	Eger, Kisgalagonyás	2004	Rizlingszilváni
427	Eger, Kisgalagonyás	2004	Cabernet franc
431	Eger, Kisgalagonyás	2004	Kékfrankos
432	Eger, Nagygalagonyás	2004	Kékfrankos
433	Eger, Nagygalagonyás	2004	Kékfrankos
435	Egerszalók, Hosszúmagyaros	2004	Kékfrankos
437	Egerszalók, Hosszúmagyaros	2004	Kékfrankos
438	Egerszalók, Hosszúmagyaros	2004	Kékfrankos
439	Egerszalók, Hosszúmagyaros	2004	Kékfrankos
440	Egerszalók, Hosszúmagyaros	2004	Merlot
441	Egerszalók, Hosszúmagyaros	2004	Merlot
442	Egerszalók, Tóberc	2004	Kékfrankos
443	Egerszalók, Tóberc	2004	Kékfrankos
445	Egerszalók, Tóberc	2004	Chaslas
448	Egerszalók, Tóberc	2004	Olaszrizling
449	Egerszalók, Tóberc	2004	Rizlingszilváni
450	Egerszalók, Tóberc	2004	Rizlingszilváni
451	Egerszalók, Tóberc	2004	Rizlingszilváni
454	Verpelét, Kishárs	2004	Hárslevelű
455	Verpelét, Kishárs	2004	Hárslevelű
456	Verpelét, Kishárs	2004	Hárslevelű
457	Verpelét, Kishárs	2004	Hárslevelű
458	Verpelét, Kishárs	2004	Hárslevelű
460	Verpelét, Kishárs	2004	Bianka
461	Szomolya, Istvánberki	2004	Chardonnay
464	Verpelét, Kishárs	2004	Merlot
465	Verpelét, Födülő	2004	Chaslas
466	Verpelét, Födülő	2004	Chaslas
468	Feldebrő, Szőlőhát	2004	Kékfrankos
471	Feldebrő, Szőlőhát	2004	Cabernet savignon
473	Feldebrő, Szőlőhát	2004	Hárslevelű
474	Feldebrő, Szőlőhát	2004	Hárslevelű
475	Feldebrő, Szőlőhát	2004	Hárslevelű
476	Feldebrő, Szőlőhát	2004	Hárslevelű

478	Aldebrő, Szent Donát	2004	Hárslevelű
488	Eger, Nagyalagonyás	2004	Kékfrankos
489	Eger, Nagyalagonyás	2004	Kékfrankos
490	Eger, Nagyalagonyás	2004	Kékfrankos
491	Eger, Nagyalagonyás	2004	Kékfrankos
4107	Eger, Pajdos	2004	Pinot blanc
4147	Szomolya, Csájszél	2004	Olaszrizling
4149	Szomolya, Istvánberki	2004	Turán
4150	Szomolya, Istvánberki	2004	Turán
4151	Szomolya, Istvánberki	2004	Turán
4152	Szomolya, Istvánberki	2004	Turán
4163	Novaj, Öreghegy	2004	Leányka
4165	Novaj, Öreghegy	2004	Leányka
4167	Novaj, Öreghegy	2004	Leányka
4168	Novaj, Öreghegy	2004	Leányka
4171	Szomolya, Mácsalma	2004	Leányka
4183	Szomolya, Mácsalma	2004	Leányka
4185	Szomolya, Mácsalma	2004	Olaszrizling
4186	Szomolya, Mácsalma	2004	Olaszrizling
4188	Szomolya, Mácsalma	2004	Rizlingszilváni

## 2. Az izolátumok származási helye, Tokaji borvidék

Izolátum száma	Gyűjtés helye	Gyűjtés éve	Szőlőfajta
2	Bodrogkisfalud, Várhegy	2006	Furmint
3	Bodrogkisfalud, Várhegy	2006	Furmint
4	Bodrogkisfalud, Várhegy	2006	Furmint
5	Bodrogkisfalud, Várhegy	2006	Furmint
6	Bodrogkisfalud, Várhegy	2006	Furmint
7	Bodrogkisfalud, Várhegy	2006	Zéta
8	Bodrogkisfalud, Várhegy	2006	Zéta
9	Bodrogkisfalud, Várhegy	2006	Zéta
10	Mád, Királyok	2006	Hárslevelű
11	Mád, Királyok	2006	Hárslevelű
12	Mád, Királyok	2006	Hárslevelű
13	Mád, Szent Tamás	2006	Furmint
14	Mád, Szent Tamás	2006	Furmint
15	Mád, Szent Tamás	2006	Furmint
16	Mád, Úrágya felső	2006	Furmint
17	Mád, Úrágya felső	2006	Furmint
18	Mád, Úrágya felső	2006	Furmint
19	Mád, Úrágya felső	2006	Furmint
20	Mád, Úrágya felső	2006	Furmint
21	Mád, Úrágya felső	2006	Furmint
22	Mád, Úrágya felső	2006	Furmint
23	Mád, Úrágya felső	2006	Hárslevelű
24	Mád, Úrágya felső	2006	Hárslevelű
25	Mád, Úrágya felső	2006	Hárslevelű
26	Mád, Úrágya felső	2006	Hárslevelű
27	Mád, Dancka tető	2006	Zenit
28	Mád, Dancka tető	2006	Zenit
29	Mád, Dancka alsó, Mikepéres	2006	Furmint
30	Mád, Dancka alsó, Mikepéres	2006	Furmint
31	Mád, Dancka alsó, Mikepéres	2006	Furmint
32	Mád, Dancka alsó, Mikepéres	2006	Furmint
33	Mád, Szent Tamás tető	2006	Furmint
34	Mád, Szent Tamás tető	2006	Furmint
35	Mád, Szent Tamás közép	2006	Muskotály
36	Mád, Szent Tamás közép	2006	Muskotály
37	Mád, Szent Tamás közép	2006	Muskotály
38	Mád, Szent Tamás közép	2006	Muskotály
39	Mád, Király dűlő, tető	2006	Furmint
40	Mád, Király dűlő, tető	2006	Furmint
41	Mád, Király dűlő, tető	2006	Furmint
42	Mád, Király dűlő, tető	2006	Furmint
43	Mád, Király dűlő, tető	2006	Furmint
44	Mád, Király dűlő, tető	2006	Furmint
45	Mád, Király dűlő, tető	2006	Furmint
46	Mád, Király dűlő, tető	2006	Furmint

47	Mád, Király dűlő, tető	2006	Furmint
48	Mád, Becsek tető	2006	Furmint
49	Mád, Becsek tető	2006	Furmint
50	Mád, Becsek tető	2006	Furmint
51	Mád, Becsek tető	2006	Furmint
52	Mád, Becsek tető	2006	Furmint
53	Mád, Becsek tető	2006	Furmint
54	Mád, Becsek tető	2006	Furmint
55	Mád, Becsek tető	2006	Furmint
56	Sárazsadány, Szárhegy alsó	2006	Furmint
57	Sárazsadány, Szárhegy alsó	2006	Furmint
58	Sárazsadány, Szárhegy alsó	2006	Furmint
59	Sárazsadány, Szárhegy alsó	2006	Furmint
60	Sárazsadány, Szárhegy felső	2006	Furmint
61	Sárazsadány, Szárhegy felső	2006	Furmint
62	Sárazsadány, Szárhegy felső	2006	Furmint
63	Sárazsadány, Szárhegy felső	2006	Furmint
64	Sárazsadány, Szárhegy felső	2006	Furmint
65	Sárazsadány, Szárhegy felső	2006	Furmint
66	Sárazsadány, Szárhegy felső	2006	Furmint
67	Sárazsadány, Szárhegy felső	2006	Furmint
68	Sárazsadány, Szárhegy felső	2006	Furmint
69	Bodrogkisfalud, Cigány dűlő	2006	Furmint
70	Bodrogkisfalud, Cigány dűlő	2006	Furmint
71	Bodrogkisfalud, Cigány dűlő	2006	Furmint
72	Bodrogkisfalud, Cigány dűlő	2006	Furmint
73	Bodrogkisfalud, Cigány dűlő	2006	Furmint
74	Bodrogkeresztúr, Lapis dűlő	2006	Furmint
75	Bodrogkeresztúr, Lapis dűlő	2006	Furmint
76	Bodrogkeresztúr, Lapis dűlő	2006	Furmint
77	Bodrogkeresztúr, Lapis dűlő	2006	Furmint
78	Bodrogkeresztúr, Lapis dűlő	2006	Furmint
79	Bodrogkeresztúr, Lapis dűlő	2006	Furmint
80	Bodrogkeresztúr, Lapis dűlő	2006	Furmint
81	Bodrogkeresztúr, Lapis dűlő	2006	Furmint
T1/1	Mád, Királyok	2004	Furmint T85
T3/1	Bodrogkeresztúr, Kapi	2004	Zéta
T4/1	Bodrogszegi, Bartalos	2004	Hárslevelű
T4/2	Bodrogszegi, Bartalos	2004	Hárslevelű
T5/1	Tarcal, Mézesmáj	2004	Hárslevelű
T5/2	Tarcal, Mézesmáj	2004	Hárslevelű
T5/3	Tarcal, Mézesmáj	2004	Hárslevelű
T5/4	Tarcal, Mézesmáj	2004	Hárslevelű
T6/1	Tarcal, Szarvas alsó	2004	Hárslevelű
T6/2	Tarcal, Szarvas alsó	2004	Hárslevelű
T6/3	Tarcal, Szarvas alsó	2004	Hárslevelű
T6/4	Tarcal, Szarvas alsó	2004	Hárslevelű
T8/1	Tarcal, Bakonyi alsó	2004	Hárslevelű



T8/2	Tarcal, Bakonyi alsó	2004	Hárslevelű
T9/1	Tarcal, Bakonyi alsó	2004	Furmint Pécs 27
T9/2	Tarcal, Bakonyi alsó	2004	Furmint Pécs 27
T9/3	Tarcal, Bakonyi alsó	2004	Furmint Pécs 27

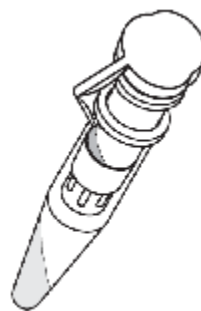
### 3. DNS izolálás Quiagen Dneasy Plant Mini Kittel

1. Az összegyűjtött, maximum 100 mg nedves vagy száraz tömegű micéliumot a kerámiagolyókat tartalmazó feltáró csőbe (Green Beds) tesszük, amelybe előzőleg már belemértünk **400 ml AP1** puffert és **4 µl RNáz** oldatot.
2. Feltárás a MagNaLyser készülékkel (90 másodperc, 5000 rpm).
3. A feltárt mintákat **10 percig 65<sup>0</sup>C-on** inkubáljuk a fűthető eppendorf rázóban, folyamatos rázatás mellett.
4. Az inkubáció után adjunk **130 µl AP2** puffert a lizátumhoz, keverjük össze és tartsuk **5 percig jégen**. (A detergens, fehérje és poliszacharidok kicsapásához.)
5. Centrifugálás **20.000 g-n 5 percig**. Ezután a felülúszóval dolgozunk tovább.
6. A sejtlizátumot tartalmazó felülúszót a **lila QIAshredder Mini Spin oszlopokra** pipetázzuk, melyeket 2 ml-es centrifuga csőbe helyezünk (vagy azokban vannak).
7. Centrifugálás **20.000 g-n 5 percig**. (Ha a centrifuga csőben pellet fedezhető fel ügyeljünk, hogy ne kavargassuk fel a pipetázással.)
8. Pipetázzuk át centrifugálás után átkerült oldatot új, steril 1,5 ml-es eppendorf csőbe.
9. Adjunk **1,5-szeres** mennyiségű **AP3/E** puffert a tiszta lizátumhoz és keverjük azonnal pipetázással.
10. Pipetázzunk rá max. **650 µl oldatot** a **DNeasy Mini Spin oszlopra**, melyeket előzőleg 2 ml-es eppendorfba tettünk (vagy abban van), majd **centrifugálás ≥6.000 g-n 1 percig** (6010 g), majd öntsük ki az átfolyót.
11. A 8. lépést megismételjük azzal a maradék mintával, amely az előző pipetázásból nem fért az oszlopra.
12. A DNS-t tartalmazó szűrőt (DNeasy Mini Spin oszlop) a 2 ml-es gyűjtőbe, **500 µl AW** puffert pipetázzunk rá és centrifugáljuk **≥ 6.000 g-n 1 percig**, az átfolyót öntsük ki.
13. **500 µl AW** puffert pipetázzunk rá a membránra és centrifugáljuk **20.000 g-n 2 percig**. A maradék etanol gátolhatja a további lépéseket.

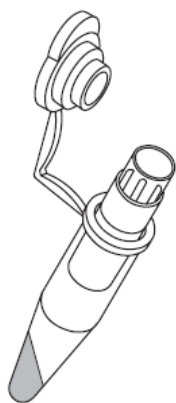
14. Tegyük a membrán szűrőt egy tiszta 1,5 ml-es (vagy 2 ml-es) eppendorfba és pipetázzunk **100  $\mu$ l 65<sup>0</sup>C-os AE puffert** közvetlenül a membránra, majd inkubáljuk **5 percig szobahőmérsékleten** (15-25<sup>0</sup>C). centrifugáljuk  **$\geq$  6.000 g-n 1 percig**.
15. Centrifugáljuk  **$\geq$  6.000 g-n 1 percig**. Így a DNS az oldatba kerül.
16. Amennyiben még több DNS-re van szükség, ismételjük meg a 12. lépést és + 5-10%nyi DNS-t nyerhetünk még ki.

#### 4. A PCR termék tisztítása szekvenálás előtt Microcon YM-100 szűrővel

1. A Microcon szűrőt 1,5 ml-es eppendorf csőbe helyezük úgy, hogy kék színű része legyen felül (2F-1. ábra).
2. Belepipettázzuk a maximum 0,5 ml térfogatú tisztítandó mintánkat.
3. Centrifugálás 500 g-n 7 percig.



2F-1. ábra



4. Új 1,5 ml-es eppendorf csőbe helyezük a Microcon szűrőt úgy, hogy a kék fehér része legyen felül (2F-2. ábra).
5. Centrifugálás 1000 g-n 3 percig.

2F-2. ábra

## **5. DNS szakasz tisztítása agaróz gélből Roche „High Pure PCR Product Purification Kit”-tel**

6. Az agaróz gélből kivágjuk a megfelelő DNS fragmentumot tartalmazó részt és előzőleg lemért eppendorf csőbe tesszük.
7. Lemérjük az agaróz gél darabját tartalmazó eppendorf csövet, és kiszámítjuk a kivágott agaróz gél tömegét ( $\mu\text{g}$  –ban) (x).
8. Minden 100 mg gélhez 300  $\mu\text{l}$  „Binding Buffer”-t pipetázunk.
9. Inkubálás 56°C-on folyamatos rázatással, 10 percig, vagy ameddig az agaróz feloldódik.
10. Minden 100 mg gélhez számítva 150  $\mu\text{l}$  izopropanolt pipetázunk az elegyhez.
11. A „High Pure” filtert egy steril, 1,5 ml-es eppendorf csőbe tesszük, és rápipetázunk a feloldódott agarózt tartalmazó oldatot, de egyszerre maximum 700  $\mu\text{l}$ -t.
12. Centrifugálás 13 000 rpm-en, 1 percig.
13. A centrifugált folyadékot eldobjuk, és a filtert visszatesszük az eppendorf csőbe.
14. 500  $\mu\text{l}$  „Wash Buffer”-t pipetázunk a filterre.
15. Centrifugálás 13 000 rpm-en, 1 percig.
16. A centrifugált folyadékot eldobjuk, és a filtert visszatesszük az eppendorf csőbe.
17. 200  $\mu\text{l}$  „Wash Buffer”-t pipetázunk a filterre.
18. A filtert új, steril eppendorf csőbe tesszük.

19. 50  $\mu$ l „Elution Buffer”-t pipetázunk a filterre. 1 percig inkubáljuk szobahőmérsékleten.
20. Centrifugálás 13 000 rpm-en, 1 percig.
21. A tisztított DNS a centrifugált folyadékban van, -20 °C-on tárolható.

## 6. Az NCBI oldalán elhelyezett szekvenciák adatai

Az adatbázis a következő címen érhető el:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>

1: EU194951  
Botryotinia fuckeliana isolate 36 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430950|gb|EU194951.1|[164430950]  
2: EU194950  
Botryotinia fuckeliana isolate 457 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430949|gb|EU194950.1|[164430949]  
3: EU194949  
Botryotinia fuckeliana isolate 33 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430948|gb|EU194949.1|[164430948]  
4: EU194948  
Botryotinia fuckeliana isolate 18 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430947|gb|EU194948.1|[164430947]  
5: EU194947  
Botryotinia fuckeliana isolate 458 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430946|gb|EU194947.1|[164430946]  
6: EU194946  
Botryotinia fuckeliana isolate 432 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430945|gb|EU194946.1|[164430945]  
7: EU194945  
Botryotinia fuckeliana isolate 61 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430944|gb|EU194945.1|[164430944]  
8: EU194944  
Botryotinia fuckeliana isolate 448 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430943|gb|EU194944.1|[164430943]  
9: EU194943  
Botryotinia fuckeliana isolate 31 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430942|gb|EU194943.1|[164430942]  
10: EU194942  
Botryotinia fuckeliana isolate 46 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430941|gb|EU194942.1|[164430941]  
11: EU194941  
Botryotinia fuckeliana isolate 17 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430940|gb|EU194941.1|[164430940]

12: EU194940  
Botryotinia fuckeliana isolate 401 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430939|gb|EU194940.1|[164430939]  
13: EU194939  
Botryotinia fuckeliana isolate 407 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430938|gb|EU194939.1|[164430938]  
14: EU194938  
Botryotinia fuckeliana isolate 9 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430937|gb|EU194938.1|[164430937]  
15: EU194937  
Botryotinia fuckeliana isolate 41 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430936|gb|EU194937.1|[164430936]  
16: EU194936  
Botryotinia fuckeliana isolate 3 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430935|gb|EU194936.1|[164430935]  
17: EU194935  
Botryotinia fuckeliana isolate 476 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430934|gb|EU194935.1|[164430934]  
18: EU194934  
Botryotinia fuckeliana isolate 488 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430933|gb|EU194934.1|[164430933]  
19: EU194933  
Botryotinia fuckeliana isolate 49 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430932|gb|EU194933.1|[164430932]  
20: EU194932  
Botryotinia fuckeliana isolate 38 beta-tubulin gene, partial  
sequence  
gi|164430931|gb|EU194932.1|[164430931]  
21: EU194931  
Botryotinia fuckeliana isolate 4166 TEF1 gene, partial  
sequence  
gi|164430930|gb|EU194931.1|[164430930]  
22: EU194930  
Botryotinia fuckeliana isolate 407 TEF1 gene, partial sequence  
gi|164430929|gb|EU194930.1|[164430929]  
23: EU194929  
Botryotinia fuckeliana isolate 63 TEF1 gene, partial sequence  
gi|164430928|gb|EU194929.1|[164430928]  
24: EU194928  
Botryotinia fuckeliana isolate 22 TEF1 gene, partial sequence  
gi|164430927|gb|EU194928.1|[164430927]  
25: EU194927  
Botryotinia fuckeliana isolate 29 TEF1 gene, partial sequence



gi|164430926|gb|EU194927.1|[164430926]  
26: EU194926  
Botryotinia fuckeliana isolate 18 TEF1 gene, partial sequence  
gi|164430925|gb|EU194926.1|[164430925]  
27: EU194925  
Botryotinia fuckeliana isolate 3 TEF1 gene, partial sequence  
gi|164430924|gb|EU194925.1|[164430924]  
28: EU194924  
Botryotinia fuckeliana isolate 3 ATPase gene, partial sequence  
gi|164430923|gb|EU194924.1|[164430923]  
29: EU194923  
Botryotinia fuckeliana isolate 18 ATPase gene, partial  
sequence  
gi|164430922|gb|EU194923.1|[164430922]  
30: EU194922  
Botryotinia fuckeliana isolate 45 ATPase gene, partial  
sequence  
gi|164430921|gb|EU194922.1|[164430921]  
31: EU194921  
Botryotinia fuckeliana isolate 13 ATPase gene, partial  
sequence  
gi|164430920|gb|EU194921.1|[164430920]  
32: EU194920  
Botryotinia fuckeliana isolate 9 ATPase gene, partial sequence  
gi|164430919|gb|EU194920.1|[164430919]  
33: EU194919  
Botryotinia fuckeliana isolate 412 ATPase gene, partial  
sequence  
gi|164430918|gb|EU194919.1|[164430918]  
34: EU194918  
Botryotinia fuckeliana isolate 61 ATPase gene, partial  
sequence  
gi|164430917|gb|EU194918.1|[164430917]  
35: EU194917  
Botryotinia fuckeliana isolate 29 ATPase gene, partial  
sequence  
gi|164430916|gb|EU194917.1|[164430916]

## 7. Mikroszatellit allélhosszúság és változékonyság a különböző izolátumokban

Minta szám	Gyűjtési év	Szőlőfajta	Bc2 msat	Bc3 msat	Bc6 msat	Bc7 msat	Bc10 msat
3	2003	Zenit	166	217	116	118	179
9	2003	Olaszrizling	166	223	116	118	165
13	2003	Leányka	166	219	116	110	179
17	2003	Olaszrizling	160	221	116	114	181
18	2003	Hárslevelű	168	211	160	110	171
22	2003	Medina	160	219	116	118	181
29	2003	Zenit	168	219	120	116	187
30	2003	Zenit	166	213	116	110	179
31	2003	Olaszrizling	166	221	116	118	165
32	2003	Olaszrizling	166	213	116	110	179
33	2003	Leányka	166	221	116	118	181
34	2003	Leányka	166	221	116	118	165
36	2003	Kékfarnkos	166	221	116	116	165
38	2003	Olaszrizling	166	219	116	110	181
41	2003	Hárslevelű	168	219	116	116	181
43	2003	Eger csillaga	166	219	116	118	181
45	2003	Leányka	166	213	116	118	179
46	2003	Leányka	166	221	116	118	165
47	2003	Leányka	160	219	116	116	177
49	2003	Leányka	166	217	116	110	179
53	2003	Kékoportó	160	221	116	118	181
54	2003	Kékoportó	168	217	116	116	183
55	2003	Kékoportó	180	219	116	110	177
56	2003	Leányka	166	217	116	118	169
57	2003	Leányka	168	211	128	110	173
58	2003	Leányka	166	219	116	118	165
59	2003	Leányka	168	211	116	118	173
60	2003	Leányka	168	219	116	116	177
61	2003	Leányka	168	219	116	116	177
63	2003	Kékfrankos	166	219	116	114	179
64	2003	Leányka	180	217	116	118	181
65	2003	Leányka	166	219	116	118	181
67	2003	Leányka	166	221	116	116	165
68	2003	Zengő	166	221	116	116	165
70	2003	Zengő	164	219	116	110	165
75	2003	Hárslevelű	180	219	116	118	189
76	2003	Hárslevelű	166	221	116	116	165
86	2003	Kékfrankos	180	219	116	116	181
401	2004	Leányka	166	219	116	116	183
402	2004	Leányka	166	219	116	116	183
405	2004	Chardonnay	166	217	116	118	179
407	2004	Blauburger	180	219	122	110	177
408	2004	Blauburger	180	219	122	110	177

409	2004	Néro	166	221	116	116	181
410	2004	Néro	166	221	116	116	181
411	2004	Néro	166	221	116	116	181
412	2004	Pinot noir	170	217	150	110	171
413	2004	Pinot noir	170	219	150	110	171
414	2004	Chardonnay	180	219	116	118	177
415	2004	Chardonnay	180	219	116	114	177
417	2004	Savignon blanc	160	219	120	120	181
419	2004	Cabernet savignon	166	219	116	116	181
421	2004	Savignon blanc	168	219	116	110	179
423	2004	Turán	166	219	116	116	179
424	2004	Turán	166	219	116	116	179
425	2004	Rizlingszilváni	166	217	116	118	179
427	2004	Cabernet franc	166	219	116	116	183
431	2004	Kékfrankos	166	217	116	118	179
432	2004	Kékfrankos	180	219	116	116	179
433	2004	Kékfrankos	180	219	116	116	179
435	2004	Kékfrankos	166	221	122	118	181
437	2004	Kékfrankos	166	219	116	120	181
438	2004	Kékfrankos	166	217	116	120	179
439	2004	Kékfrankos	166	219	116	110	181
440	2004	Merlot	160	221	116	118	175
441	2004	Merlot	160	221	116	118	175
442	2004	Kékfrankos	166	217	116	110	179
443	2004	Kékfrankos	166	219	116	116	181
445	2004	Chaslas	180	219	116	116	181
448	2004	Olaszrizling	166	217	116	116	181
449	2004	Rizlinszilváni	166	217	116	118	179
450	2004	Rizlinszilváni	166	217	116	118	179
451	2004	Rizlinszilváni	166	217	116	118	179
454	2004	Hárslevelű	166	217	116	110	169
455	2004	Hárslevelű	166	219	116	110	183
456	2004	Hárslevelű	166	219	116	118	183
457	2004	Hárslevelű	166	219	116	120	183
458	2004	Hárslevelű	166	219	116	110	183
460	2004	Bianka	166	213	116	118	179
461	2004	Chardonnay	166	213	116	118	179
464	2004	Merlot	166	219	116	118	181
465	2004	Chaslas	166	221	116	116	165
466	2004	Chaslas	166	219	116	116	165
468	2004	Kékfrankos	166	221	116	116	181
471	2004	Cabernet savignon	164	219	116	118	181
473	2004	Hárslevelű	166	219	116	118	181
474	2004	Hárslevelű	166	219	116	118	181
475	2004	Hárslevelű	166	219	116	118	165
476	2004	Hárslevelű	166	219	116	116	183
478	2004	Hárslevelű	166	221	116	116	165
488	2004	Kékfrankos	164	213	116	118	181

489	2004	Kékfrankos	166	219	116	116	181
490	2004	Kékfrankos	166	219	116	118	181
491	2004	Kékfrankos	166	221	116	116	165
4107	2004	Pinot blanc	166	221	116	116	165
4147	2004	Olaszrizling	166	219	116	116	181
4149	2004	Turán	166	213	116	118	179
4150	2004	Turán	166	221	116	116	181
4151	2004	Turán	166	221	116	116	181
4152	2004	Turán	166	221	116	116	181
4163	2004	Leányka	166	219	116	118	181
4165	2004	Leányka	166	221	116	118	165
4167	2004	Leányka	166	223	116	114	165
4168	2004	Leányka	166	219	116	116	165
4171	2004	Leányka	166	219	116	116	183
4183	2004	Leányka	166	221	116	118	165
4185	2004	Olaszrizling	166	219	116	118	183
4186	2004	Olaszrizling	166	219	116	118	183
4188	2004	Rizlingszilváni	166	219	116	116	179