

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A szőlő botritiszes fertőzései és tőkebetegségei
a molekuláris és mikrobiális kölcsönhatások tükrében**

Váczy Kálmán Zoltán

Eger, 2025

Nunquam retro!

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS	3
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
2.1.	A <i>BOTRYTIS</i> NEMZETSÉG ÉS A <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	5
2.1.1.	A <i>B. CINEREA</i> , MINT KÓROKOZÓ	5
2.1.2.	A SZŐLŐ SZÜRKE- ÉS NEMESROTHADÁSA	5
2.1.3.	A NEMESROTHADÁS KIALAKULÁSÁNAK FELTÉTELEI	7
2.1.4.	A <i>B. CINEREA</i> ÉS A <i>VITIS VINIFERA</i> INTERAKCIÓJA	7
2.1.5.	A NEMESROTHADÁS KIALAKULÁSÁNAK FIZIKAI ÉS KÉMIAI PARAMÉTEREI	8
2.1.6.	AZ ÉP ÉS ASZÚSODÓ SZŐLŐBOGYÓK MIKROBIÓTÁJA	9
2.1.7.	A NEMESROTHADÁSOS IZOLÁTUMOK FENOTÍPUSOS JELLEMZŐI	10
2.1.8.	ÚJ MEGKÖZELÍTÉSEK A BOTRITIZÁLÓDÁSI FOLYAMATOK VIZSGÁLATÁBAN	10
2.2.	A SZŐLŐ TŐKEBETEGSÉGEI	12
2.3.	AZ ESCA KOMPLEX	14
2.3.1.	AZ ESCA KOMPLEX KÓROKOZÓI ÉS A BETEGSÉG KIALAKULÁSA	14
2.4.	BIOLÓGIAI VÉDEKEZÉS	16
2.4.1.	AZ <i>AUREOBASIDIUM PULLULNANS</i> BOKONTROLL ÉS FITOPATOGÉN TULAJDONSÁGAI	17
2.4.2.	A VIZSGÁLT MIKROORGANIZMUSOK LEHETSÉGES BOKONTROLL HÁTTERE	18
2.4.3.	BOKONTROLL STRATÉGIÁK A SZŐLŐ TŐKEBETEGSÉGEI ELLENI VÉDEKEZÉSBEN	19
2.5.	A TŐKEBETEGSÉGEKHEZ KAPCSOLÓDÓ GOMBAKÖZÖSSÉGEK	20
2.5.1.	TENYÉSZTHETŐ ÉS NEM TENYÉSZTHETŐ GOMBÁK	21
2.5.2.	A TŐKEBETEGSÉGEK KÓROKOZÓI ÉS A SZŐLŐ MIKROBIOMJÁNAK KÖLCSONHATÁSA.....	21
2.5.3.	A VIZSGÁLT ÉS LEÍRT MIKROORGANIZMUSOK PATOGÉN ÖSSZEFÜGGÉSEI.....	22
3.	CÉLKITŰZÉSEK.....	25
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	27
4.1.	<i>B. CINEREA</i> MINTÁK GYŰJTÉSE, FELDOLGOZÁSA ÉS ÉRTÉKELÉSE	27
4.1.1.	MINTÁK GYŰJTÉSE AZ EGRI ÉS A TOKAJI BORVIDÉKEN	27
4.1.2.	A <i>B. CINEREA</i> TENYÉSZTÉSE ÉS A KAPCSOLÓDÓ VIZSGÁLATOK PARAMÉTEREI	27
4.1.3.	SZŐLŐBOGYÓK FIZIKAI, KÉMIAI ÉS MIKROBIOLÓGIAI JELLEGZETESSÉGEI	29
4.1.4.	A SZŐLŐBOGYÓK TELJES DNS ÉS RNS KIVONÁSA	30
4.1.5.	SZEKVENÁLÁS ÉS SZEKVENCIA ADATOK FELDOLGOZÁSA	30
4.1.6.	SZEKVENCIA ADATOK ELEMZÉSE.....	31

4.1.7.	HÁLÓZATELEMZÉS A METATRANSZKRIPTOMIKAI ADATOK ELEMZÉSÉHEZ	33
4.2.	SZŐLŐ TŐKEELHALÁS MINTÁK GYŰJTÉSE, FELDOLGOZÁSA ÉS ÉRTÉKELÉSE	34
4.2.1.	A SZŐLŐ FÁS RÉSZEINEK ÉS KÖRNYEZETÉNEK MIKROBIOM ANALÍZISE	34
4.2.2.	MIKROBIÁLIS KÖLCÖNKHATÁS VIZSGÁLATOK.....	36
4.2.3.	POTENCIÁLIS BIOKONTOLL ÁGENSEK VIZSGÁLATA	38
4.2.4.	A TŐKEBETEGSÉGEK KÓROKOZÓINAK FAJGAZDAGSÁG VIZSGÁLATA	41
5.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	44
5.1.	<i>BOTRYTIS CINEREA</i> : A JANUS ARCÚ GOMBA	44
5.1.1.	A <i>B. CINEREA</i> EXPRESSZIÓS PROFILJÁNAK ÉS METABOLIZMUSÁNAK VIZSGÁLATA	44
5.1.2.	A SZÜRKE ÉS NEMESROTHADÁSOS FOLYAMATOK TOVÁBBI MIKRÓBÁI.....	49
5.1.3.	A SZŐLŐNÖVÉNY <i>B. CINEREA</i> FERTŐZÉSRE ADOTT VÁLASZAI	56
5.2.	AZ ASZÚSODÁS FOLYAMATÁNAK ALAPJAI	65
5.2.1.	A NEMESROTHADÁSOS <i>B. CINEREA</i> IZOLÁTUMOK JELLEGZETESSÉGEI.....	65
5.2.2.	A SZŐLŐBOGYÓK FIZIKAI ÉS KÉMIAI VÁLTOZÁSA A NEMESROTHADÁS SORÁN	68
5.2.3.	A <i>B. CINEREA</i> GÉNEXPRESSZIÓS PROFILJÁNAK VÁLTOZÁSA A NEMESROTHADÁS SORÁN	73
5.2.4.	A GOMBAKÖZÖSSÉG SZEREPE AZ ASZÚBOGYÓ AROMA PROFILJÁNAK KIALAKULÁSÁBAN	77
5.3.	AZ ESCA TŐKEBETEGSÉG KIALAKULÁSÁNAK JELLEGZETESSÉGEI	84
5.3.1.	AZ EGÉSZSÉGES ÉS ESCA TÜNETEKET MUTATÓ SZŐLŐNÖVÉNYEK GOMBA KÖZÖSSÉGEI.....	84
5.3.2.	<i>AUREOBASIDIUM PULLULANS</i> SZEREPE AZ ESCA LOMBTÜNETEINEK KIALAKULÁSÁBAN	88
5.4.	A SZŐLŐ TŐKEBETEGSÉGEK KÓROKOZÓINAK LEHETSÉGES ANTAGONISTÁI	94
5.4.1.	A <i>CLONOSTACHYS ROSEA</i> MIKOPARAZITA KÉPESSÉGÉNEK ÉS NÖVEKEDÉSGÁTLÓ HATÁSA	94
5.4.2.	<i>BACILLUS VELEZENSIS</i> , A SZŐLŐ TŐKEBETEGSÉGEK BAKTERIÁLIS ANTAGONISTÁJA.....	98
5.5.	A TŐKEBETEGSÉGEK ÚJONNAN LEÍRT KÓROKOZÓI	101
5.5.1.	<i>KALMUSIA LONGISPORA</i>	101
5.5.2.	<i>NEOFABRAEA KIENHOLZII</i>	104
5.5.3.	<i>DOTHIORELLA OMNIVORA</i>	107
5.5.4.	<i>DIAPORTHE HUNGARIAE</i>	107
5.5.5.	<i>SEIMATOSPORIUM VITIS</i>	109
6.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	111
7.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	114
8.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	116
9.	IRODALOMJEGYZÉK	117
10.	KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	134

1. BEVEZETÉS

A borszőlő (*Vitis vinifera*) és az emberiség kapcsolata több ezer évre nyúlik vissza, meghatározó szerepet betöltve gazdasági, kulturális, vallási és társadalmi szempontból. Régészeti leletek tanúsága szerint a szőlő termesztése és a borkészítés a neolitikum idején, jelen volt a Kaukázus és a Közel-Kelet térségében, majd a mediterráneumban a görögök és rómaiak fejlesztették magas szintre kultúráját (McGovern, 2019). A szőlő és a bor a történelem során mezőgazdasági terményként, kereskedelmi árucikként és liturgikus italként is kiemelt jelentőségű volt, a mai napig fontos identitásképző szereppel bír borvidékek és közösségek életében (Unwin, 2005). A szőlőtermesztés és borászat a világ számos részén meghatározó gazdasági ágazattá vált, miközben kulturális szimbolikája – az ünnep, a közösség, az életöröm kifejezőjeként – töretlenül fennmaradt. A szőlő betegségei évszázadok óta meghatározzák a termesztés sikerét, mivel közvetlenül befolyásolják a termés mennyiségét és minőségét, ezáltal a borászat gazdasági stabilitását is. A 19. században Európába behurcolt kórokozók – a lisztharmat (*Erysiphe necator*), a peronoszpóra (*Plasmopara viticola*), a feketerothadás (*Guignardia bidwellii*) és a filoxéra (*Daktulosphaira vitifoliae*) – járványszerűen terjedtek, alapjaiban alakítva át a kontinens szőlőkultúráját. A védekezés ekkor kapott tudományos alapot: a bordói lé felfedezése (Bailey és mtsai, 2024) mérföldkő volt a modern növényvédelemben.

Magyarországon a szőlőbetegségek tudományos feldolgozása a 19–20. század fordulóján kezdődött. Linhart György és Mezey Gyula 1895-ben megjelent „Szőlőbetegségek” című monográfiája volt az első magyar nyelvű, átfogó szakmű (Linhart és Mezey, 1895). Az 1896-ban létrehozott Magyar Királyi Központi Szőlészeti Kísérleti Állomás és Ampelológiai Intézet Európa egyik legkorszerűbb kutatóhelyévé vált, megalapozva a hazai növénykórtani kutatások intézményes kereteit (Mikulás, 2013).

A jelen dolgozat témájául szolgáló megbetegedések kutatási háttere, megítélése és a feléjük irányuló érdeklődés változó dinamikát mutatott az elmúlt évtizedekben. A Tokaj-hegyaljai Album megjelenése óta (Szabó, 1867), amikor leírásra kerül az aszúsodás és az aszúszem pontos meghatározása, a kutatások elsősorban a borászati vonatkozásokat helyezték előtérbe, míg a szürke- és nemesrothadás kórokozójának vizsgálata egészen a legutóbbi időkig nem volt meghatározó a magyar szőlőnövényvédelmi kutatásokban. A szőlő tőkebetegségeihez kapcsolódóan Lehoczky János, a 20. századi magyar szőlőnövénykórtan meghatározó alakja, úttörőként foglalkozott a betegség kórtanával és ökológiai összefüggéseivel. Kutatásai új irányt szabtak a növénykórtan hazai fejlődésének, és hozzájárultak a komplex, többkórokozós rendszerek integrált szemléletű megközelítéséhez, amely a jelen dolgozatban is alapvető jelentőségű.

A disszertációban ismertetett kutatási eredmények illeszkednek a nemzetközi tudományos irányvonalakhoz, miközben arra törekednek, hogy feltárják az eddig még nem ismert folyamatokat, ugyanakkor kiemelt figyelmet fordítanak a hazai ágazati igényekre, elméleti, és gyakorlati vonatkozásban egyaránt.

A szőlő szürke- és nemesrothadásában meghatározó *Botrytis cinerea* az egyik legismertebb növénykórokozó, kártétele szinte minden gazdaságilag kiemelt jelentőségű növény kultúrákban jelentős, amelyet globálisan évi mintegy 100 milliárd amerikai dollárra becsülnek (Canessa és Ferrari, 2025). A *B. cinerea* mint tipikus nekrotróf növénypatogén kiterjedt gazdasejt-elhalást idéz elő, hogy elősegítse a szövetek kolonizációját (Bi és mtsai, 2023), ezért a nekrotróf gombák kutatásának egyik kiemelt modellorganizmusává vált. Az -omikai módszerek rohamos fejlődésével ma már több teljes genom-szekvencia és egy rendkívüli részletességgel feltárt referencia-genom (Van Kan és mtsai, 2017) áll rendelkezésre, átfogó és részletekbe menő betekintést biztosítva a kórokozó és gazdanövényei molekuláris szintű kölcsönhatásaiba. Paradox módon ugyanakkor sajátos környezeti feltételek között ez a kórokozó képes arra is, hogy növelje a termés értékét egyetlen növényfaj esetében: a szőlőbogyókban kialakuló nemesrothadás révén lehetővé válik a kivételes minőségű tokaji és sauternes-i borok előállítása.

A szőlőtőkék vaszkuláris gombás fertőzései – a szőlő tőkebetegségei (grapevine trunk diseases, GTDs) – világszerte súlyos és mindmáig megoldatlan problémát jelentenek. A védekezést a kórokozók látens életmódja, sokfélesége és a hatékony fungicidek hiánya is nehezíti, ami a kutatásokat a biológiai védekezés és a biokontroll-ágensek alkalmazása felé tereli (Songy és mtsai, 2019). A jelentősen fertőzött vagy már elhalt szőlőtőkék eltávolítása és pótlása világszinten évente mintegy 1,5 milliárd dollár veszteséget jelent (Fischer és Peighami-Ashnaei, 2019), míg az alacsony termőképességű vagy kieső ültetvények újra telepítésének globális éves költsége elérheti az 1,132 milliárd eurót (Hofstetter és mtsai, 2012). A korábbi vizsgálatok alapján eddig 34 gombanemzetség 133 faja hozható összefüggésbe a tőkebetegségek kialakulásával, amely révén ezek a kórokozók jelentik a növényeket fertőző gombák legnagyobb ismert csoportját (Gramaje és mtsai, 2018). A legújabb, metagenomikai megközelítésű vizsgálatok 174 fajt és 32 nemzetséget mutattak ki a szőlőtörzs-betegségekkel összefüggésben (Li és mtsai, 2023). A korábban eredményesen alkalmazott nátrium-arsenit használatát toxikológiai okokból betiltották (Mondello és mtsai 2018), így ma a védekezés elsősorban a megelőzésre és a tünetek enyhítésére épül.

A molekuláris és mikrobiális kölcsönhatások megismerése a nemesrothadás folyamatában nemcsak elméleti szempontból lehet érdekes, hanem gyakorlati oldalról is segítheti a szakembereket a folyamat jobb megismerésén túl, az eredményesebb termés és termelés biztonság elérésében, a szüreti időpontok és megfelelő termesztéstechnológiai elemek kiválasztásában. Ugyanez a kölcsönhatásvizsgálat a szőlő tőkebetegségei esetében a kórokozók közösségek elemeinek és ökológiájának megismerését és a biokontroll-alkalmazásokra épülő, integrált megelőzési protokollok megalapozását szolgálják, amelyek a kuratív kémiai eszköztár hiánya mellett is növelhetik a tőkék élettartamát, csökkenthetik az ültetvényszintű gazdasági kockázatot és elősegítik a fenntartható szőlőtermelést.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A *Botrytis* nemzetség és a *Botrytis cinerea*

A *Botrytis* nemzetség rendkívül sok fajt foglal magában, amelyek biológiai, ökológiai, morfológiai jellemzőikben és gazdanövény-spektrumukban jelentősen különböznek egymástól. Különösen a molekuláris genetika és a releváns filogenetikai markerek fejlődése révén az elmúlt években a nemzetségen belül mintegy 30 faj jellemzése történt meg, köztük hét új faj, egy hibrid és egy fajkomplex leírása (Walker, 2016). A *Botrytis* fajok számos gazdaságilag jelentős kertészeti és dísznövénykultúrában okoznak súlyos veszteségeket. A legtöbb kórokozó gazdanövényköre szűk, többnyire csak egyszikű vagy kétszikű növényeket fertőznek. Kivételt képez azonban a rendkívül széles gazdakörrel rendelkező *B. cinerea*, valamint a *B. pseudocinerea*, amelyről feltételezhető, hogy hasonlóan széles gazdanövénysspektrummal rendelkezik. Összességében a *Botrytis spp.* több mint 170 termesztett növénycsalád különböző fajait képes megfertőzni (Elad és mtsai, 2016), amelyek fenotípusosan rendkívül változatosak és egyre több bizonyíték utal arra, hogy egyes fajok tünetmentes endofitonként is jelen lehetnek a növényi szövetekben.

2.1.1. A *B. cinerea*, mint kórokozó

A *B. cinerea* által okozott növénybetegségeket az elmúlt 50 évben több tanulmány és összefoglaló mű is részletesen ismertette (Fillinger és Elad, 2016). A védekezéssel kapcsolatos szakirodalom jelentős része a biológiai védekezésről szól, a kapcsolódó kutatások célja hatékony és gazdaságos biológiai stratégiák, valamint más kezelésekkel kombinálva eredményes integrált technológiák kialakítása (Fillinger és Elad, 2016). A *B. cinerea* ellen való védekezés legfontosabb eleme a kémiai fungicidek alkalmazása, ám a gombák rezisztenciájának gyors kialakulása miatt az egyre nagyobb dózisú felhasználás és egyre változatosabb hatóanyag alkalmazás válik szükségessé, amely környezeti és élelmiszerbiztonsági aggályokat is felvet (De Miccolis Angelini és mtsai, 2014).

A *B. cinerea* kifinomult penetrációs és fertőzési stratégiát fejlesztett ki és alkalmaz a növényi védekezési válaszok elnyomására, amelyben különböző enzimek, toxinok, reaktív oxigéngyökök, szekretált fehérjék és másodlagos metabolitok vesznek részt (Choquer és mtsai, 2007). A kémiai védekezés meghatározó elemei a fitoanticipinek és a fitoalexinek (Van Etten és mtsai, 1994). A szalicilsav, a jázmonsav, az etilén, az abszcizinsav, a brassinoszteroidok, az auxinok, a citokininek, a gibberellinek és a strigolaktonok mint fitohormonok együttesen vesznek részt a növényi válaszok szabályozásában és közvetítésében (Torres-Vera és mtsai, 2014).

2.1.2. A szőlő szürke- és nemesrothadása

A *B. cinerea* a szőlő valamennyi zöld részét képes megfertőzni, azonban hűvös és csapadékos időjárási körülmények között a virágzás és az érés fázisában lévő fürtök teljes pusztulását idézheti elő, ami jelentős termésvesztéshez vezethet (Elmer és Michailides, 2007). A szürkerothadásos fertőzés következtében létrejövő változások

nagyon sokrétűek: a cukortartalom, a must nitrogén és vitamin tartalma jelentősen csökken, miközben a borkősav oxidációja gyorsul. Mivel pektinbontó aktivitása is jelentős, ezért a szürkerothadásos szőlő mustjának pektin tartalma akár teljesen le is bomolhat (Magyar, 2011). A *B. cinerea* az erjedő bor fejlődését károsan befolyásoló poliszacharidok szintézisére is képes, amelyek rontják a bor szűrhetőségét, gátolják az alkoholos erjedést és fokozzák az ecetsav termelődést. A szürkerothadás mégis talán legsúlyosabb következménye a gomba által termelt lakkáz enzim aktivitása, melynek következtében a bogyó fenolos vegyületei kinonokká oxidálódnak. Fehér borok esetében ez barnulást, barna törést, keserű ízanyagokat, vörösborokban a színanyagok lebomlását vonja maga után (Magyar, 2010). A szürkerothadást kísérő jelenségeként a bogyóban számos más penészgomba, élesztőgombák és ecetsavbaktériumok is fejlődésnek indulhatnak vegyes rothadást eredményezve, hozzájárulva a bogyó értékes anyagainak lebomlásához, kellemetlen íz- és illatanyagok kialakulásához (Ribéreau-Gayon és mtsai, 2005; Barata és mtsai, 2012).

A nemesrothadásos szőlőbogyókat évszázadok óta használják édes borok készítésére, ám az aszúbor előállítási módja egyedülálló: a hosszan tartó nemesrothadás után a bogyókat szemenként, kézzel gyűjtik, majd dolgozzák fel. A nemesrothadás kialakulásának korai szakaszában két markáns változás figyelhető meg. A folyamat kezdetén (fajtától függően színváltozások), amelyet a héjban bekövetkező fizikai változások követnek. A kutikula mikrorepedései segítik a vízvesztést, amely a cukortartalom koncentrációjához vezet. Ezzel párhuzamosan számos biokémiai folyamat is lezajlik, többek között a cukoralkoholok mennyiségének növekedése, valamint különféle aroma-prekursorok és illékony tiolok képződése. (Thibon és mtsai, 2010). Ezek a folyamatok összességükben járulnak hozzá a nemesrothadású borok karakteres aromaprofiljához.

A nemesrothadás kialakulásához több feltétel egyidejű teljesülése szükséges. A legfontosabbak, hogy az őszi nedves időjárás már a teljes érésben lévő, ép és sérülésmentes bogyókat érje, a nedves periódusokat pedig száraz, meleg napok kövessék. A kedvező folyamat kialakulását a szőlőfajta tulajdonságai, a művelésmód, a talaj összetétele, az évjárat sajátosságai és a termőhely kulturális hagyományai egyaránt befolyásolják (Fournier és mtsai, 2013).

Korábbi ismereteink szerint a szürke- és nemesrothadás közötti eltéréseket elsősorban a környezeti körülmények befolyásolják, míg a nemesrothadást a gomba anyagcseréje és a bogyó töppedésével járó fizikai folyamatok együttesen alakítják ki. A nemesrothadás biokémiai folyamatai alapvetően megegyeznek a szürkerothadás során lezajlókkal, a legfőbb különbség pedig abban áll, hogy a túlérlett szőlő elfásodott fűrtkocsánya miatt a töppedő bogyóból elpárolgó víz már nem pótlódik, így a bogyó beltartalmi anyagai koncentrálnak (Blanco-Ulate és mtsai, 2015; Fournier és mtsai, 2013; Magyar, 2011). Az érett szőlőben ekkor már kialakul a fajtára jellemző cukor- és savtartalom, a „zöld” ízt okozó fenolos anyagok pedig lebomlanak. A koncentráció során egyre növekvő

ozmotikus nyomás korlátozza a folyamatban részt vevő mikroorganizmusok növekedését és metabolizmusát (Cantu és mtsai, 2008). A felületi légmicélium képzés már minimális vagy akár teljesen hiányzik, a gombahíák az epidermisz alatt növekednek. A termés össztömege és must mennyisége töredékére csökken, de mindez érzékszervi és borászati szempontból rendkívüli minőségjavulással jár együtt, a cukortartalom akár a 600 g/l értéket is meghaladhatja (Kallitsounakis és Catarino, 2020).

2.1.3. A nemesrothadás kialakulásának feltételei

A szürke- és nemesrothadásban betöltött meghatározó szerepe miatt különböző szőlőültetvények *B. cinerea* populációit széles körben tanulmányozták. Leírták, hogy a populációik szerkezetét befolyásolhatja a gazdaszervezet, a földrajzi eredet, a fertőzés típusa, a szaporodás, mutációk előfordulása, transzpozon elemek jelenléte és/vagy a génáramlás is (Campia és mtsai, 2017). Franciaország borvidégeiről származó izolátumok vizsgálata során kimutatták, hogy a populációk földrajzi sokfélesége összefüggésbe hozható a szürkerothadás és a nemesrothadás kialakulásával (Fournier és mtsai, 2013; Walker és mtsai, 2015), amit befolyásolhat az éghajlat, a szőlőfajta, az évjárat, a termesztési eljárások és a szőlőbogyó mikrobiomjának együttese is (Blanco-Ulate és mtsai, 2015). Az, hogy egy adott évjáratban kialakul-e a nemesrothadás, az természetesen elsősorban a mikroklimatikus viszonyoktól függ (Ciliberti és mtsai, 2015).

A nemesrothadás szempontjából az ősz kritikus időszak, mivel a szüret során az aszúsodott szőlőbogyók gyűjtésének ideje szeptember közepe és november vége közé esik, ezért az időjárási viszonyok (pl. csapadék, páratartalom, átlaghőmérséklet) meghatározóak a nemesrothadás folyamatában (Ribéreau-Gayon és mtsai, 2005). Borászati tapasztalatok egyértelműen alátámasztják, hogy a Tokaji borvidéken a nemesrothadás szempontjából kedvező időjárási és mikroklimatikus feltételek elsősorban az ősz második felében jelentkeznek, ennek következtében a nemesrothadás kialakulása eredményesebben megy vagy mehet végbe a késői érésű szőlőfajtákon, mint a korai érésűeken. (Bene és Magyar, 2004; Magyar és Bene, 2006).

2.1.4. A *B. cinerea* és a *Vitis vinifera* interakciója

A mikroklimatikus viszonyok döntő szerepe mellett a szürke- és nemesrothadás kialakulását a *B. cinerea* és a szőlő közötti összetett interakciós dinamika is befolyásolja (Haile és mtsai, 2020; Lovato és mtsai, 2019). A *V. vinifera* génexpressziós válaszai a fertőzés korai szakaszában nem voltak részletesen feltárva. Blanco-Ulate és mtsai (2015) három, egymástól elkülönülő nemesrothadásos fázisban vizsgálták a *B. cinerea* és a Sémillon szőlőfajta génexpressziós profiljának változásait, különös tekintettel a bogyófejlődésre és az anyagcsere-folyamatokra. Lovato és mtsai (2019) Garganega és Müller-Thurgau szőlőfajták esetében végeztek átfogó vizsgálatot a nemesrothadás kialakulásáról, azonosítva a fertőzés során megfigyelhető közös és fajtaspecifikus válaszreakciókat. Ez összevetésére került hat további szőlőfajta transzkriptomikai eredményével (Zenoni és mtsai, 2016). Ezek a kutatások több kulcsfontosságú gén

azonosítását tették lehetővé, amelyek nemesrothadás során szabályozott módon expresszálódnak. A közelmúltban Pogány és mtsai (2022) a szőlő redox- és hormonális génexpresszióját hasonlították össze a nemesrothadás és szürkerothadás fázisában. Haile és mtsai pedig (2017, 2020) a fertőzött szőlőbogyók génexpressziós változásait vizsgálták az utóérési időszak különböző fázisaiban: a nyugalmi (egészségesnek tűnő, de fertőzött bogyókon), a pre-egressziós (érett, tünetmentes bogyókon), valamint az egressziós fázisokban (érett, fertőzést mutató bogyókon), amelyek a szürkerothadás jellegzetes fejlődési szakaszai.

A kutatások eredményei arra utalnak, hogy a növényi védekezési reakciók kezdetben gátolják a *B. cinerea* által indukált szürkerothadás kialakulását, ugyanakkor a szőlőbogyók érésével együtt járó sejtfal-önbontás és a magas páratartalom elősegítik a szürkerothadás folyamatának előrehaladását. Amennyiben azonban a fertőzés optimális körülmények között zajlik, a *B. cinerea* jelenléte nemesrothadáshoz vezethet. A szakirodalom többsége egyetért abban, hogy ez a folyamat bármikor kedvezőtlen irányt vehet, és szürkerothadás alakulhat ki (Williamson és mtsai, 2007).

2.1.5. A nemesrothadás kialakulásának fizikai és kémiai paraméterei

Az előzőekben már tárgyaltuk a nemesrothadás kialakulását befolyásoló hatásokat és bár ezek a környezeti vagy éppen termesztéstechnológiai tényezők általánosságban ismertek, ugyanakkor magának a szőlőbogyónak a nemesrothadás során bekövetkező texturális vagy mikrobiális változásairól eddig kevés információnk volt. A szőlőbogyók texturáját korábban jellemzően az étkezési szőlőfajták esetében vizsgálták, mivel a roppanósság, rugalmasság, rágósság stb. az étkezés során fontos tulajdonságok (Rolle és mtsai, 2012). Rolle, illetve korábban Letaief (2008a, 2008b) különböző paraméterek felhasználásával vizsgálták a szőlőfajták közötti eltéréseket a bogyók texturája és héjának jellemzői alapján. Eredményeik szerint a módszer alkalmas a szőlőfajták elkülönítésére, ugyanakkor hatékonyan alkalmazható az érési dinamika és a szüret időpontjának előrejelzésére, valamint a héjban található fenolos vegyületek mennyiségének becslésére is. Carbajal-Ida és mtsai (2016) a Chenin Blanc szőlőfajta fizikai-kémiai tulajdonságait vizsgálták a nemesrothadás során, és kimutatták a texturális jellemzőkben bekövetkező változásokat.

Az aszúbogyó érzékszervileg legfontosabb analitikai paraméterei a cukortartalom és savtartalom mellett az egyedi íz- és zamatanyagok. Ezen aromavegyületek prekursorai közé tartoznak a terpén és tiol prekursor vegyületek (Genovese és mtsai, 2007), valamint jelentős szerepet játszik a furfurol, benzaldehid, fenilacetaldehid és benzilcianid (Magyar, 2011). A mézre, őszibarackra, egyéb gyümölcsökre emlékeztető illat kialakulásában kulcsszerepe van a δ -laktonoknak, az aszú egyedi karakterét valószínűleg a δ és γ laktonoknak eredményezik (Miklósy és Kerényi, 2004). Már korábban azonosították a szotolon nevű (3-hidroxi-4,5-dimetil-2-(5)-furanon) laktont (Masuda és mtsai, 1984), ami mára már bizonyítottan marker vegyületté vált a nemesrothadásos borok elemzése során.

A nemesrothadásos fertőzés kialakulása során, a légmicélium hiánya miatt a gomba oxigén ellátottsága korlátozott, többek között erre vezethető vissza, hogy jelentősebb mennyiségű glicerín és glükonsav keletkezik a folyamatban. Mivel saját élettani folyamataihoz a glükonsav felhasználása a növekedés stacioner fázisában megszűnik, így az feldúsul a bogyóban, illetve az aszús mustokban. Ezek a vegyületek indikátorai az aszú mustnak, mivel az egészséges szőlő mustjában nem találhatók meg. A glicerín tartalom tovább növekszik az erjedés során, míg a glükonsav mennyisége már nem változik, így ezek a vegyületek kész borokban is indikátorként szolgálhatnak (Magyar, 2011).

A fenolos vegyületek mennyisége is változik a nemesrothadás során, legtöbbjük (fenolsavak, stilbének, antocianinok és flavanoidok) a szőlőbogyó héjában halmozódik fel és bár az összpolicfenol mennyiség csökken, azonban a stilbén vegyületek közül a rezveratrol, valamint a flavonoid vegyületek közül az epikatechin és katechin mennyisége növekszik (Blanco-Ulate és mtsai, 2015; Carbajal-Ida és mtsai, 2016)

2.1.6. Az ép és aszúsodó szőlőbogyók mikrobiótája

A túlérett, töppedt szőlőbogyók mikrobaközössége változatos, de a *B. cinerea* általában nem alkotja annak domináns részét (Chen és mtsai, 2020). A *B. cinerea* a nemesen rothadt szőlőszemek felületén és/vagy belsejében fordul elő, ahol más mikroorganizmusokkal együtt vesz részt a folyamatban. (Magyar és Bene, 2006).

Az ép szőlőbogyó felszínén számos élesztő, fonalagomba és baktérium él, amelyek aránya és összetétele nagymértékben függ a bogyók érettségi állapotától és tápanyagtartalmától. Zsendülés után elsősorban a bazidiomikóta gombák (pl. *Cryptococcus spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Sporobolomyces spp.*) és az élesztőszerű *Aureobasidium* fajok dominálnak. A bogyófelszínen az erjesztésben szerepet játszó mikroorganizmusok közül kezdetben a gyengén erjesztő aszkomikóta élesztők, például a *Hanseniaspora spp.*, *Metchnikowia spp.*, *Pichia spp.* és *Candida spp.* jelennek meg, majd ezeket követik az erősebb erjesztőképességű fajok, mint a *Zygosaccharomyces spp.* és a *Torulaspora spp.* (Azzolini és mtsai, 2013; Blanco-Ulate és mtsai, 2015).

Sipiczki és mtsai (2003) az aszúborok erjedésének vizsgálata során egy olyan élesztőgombát azonosítottak, amely a *Saccharomyces cerevisiae*-nél nagyobb cukorkoncentrációt is elviseln, a *Candida zemplinina*-t, amelynek rendszertani besorolása és elnevezése azóta *Starmerella bacillaris*-ra változott (Duarte és mtsai, 2012), és amely olyan magas glükóz tartalmú közegben is képes növekedni, ahol a *S. cerevisiae* már nem. Újabb vizsgálatok a *S. bacillaris*-t a természetes édes borok marker élesztőjeként mutatják be (Masneuf-Pomaredé és mtsai, 2015).

Az élesztők mellett különböző ecetsav baktériumok jelenléte is megfigyelhető (*Gluconobacter spp.*, *Acetobacter spp.*) a magas cukortartalmú szőlőbogyókon, illetve a mustban is, ezek közül elsősorban az *Acetobacter aceti* és *Acetobacter pasteurianus* a meghatározó, de dominanciájuk fokozódhat, ha az erjedés során magasabb a pH és a hőmérséklet (Kallitsounakis és Catarino, 2020).

Az ép bogyó felületén a fonalgombák közül az *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. fajok előfordulása jellemző, azonban az aszúsodásnak induló bogyók felületén ezek előfordulása csökken, és a *B. cinerea* jelenléte válik meghatározóvá. További kísérletek kimutatták azt is, hogy a szőlő termőterület (terroir), a szőlőfajta és az évjárat is hatással van a mikrobiális közösségre (Bokulich és mtsai, 2013). Mindezek ellenére számos kérdés továbbra is nyitott a bogyók fizikai, kémiai és mikrobiális jellemzői, valamint az érés és a nemesrothadás során kialakuló kölcsönhatásaik közötti összefüggéseket illetően.

2.1.7. A nemesrothadásos izolátumok fenotípusos jellemzői

Több tanulmány is elemzett különböző szőlőfajtákról gyűjtött *B. cinerea* izolátumokat (Ciliberti és mtsai, 2015; Martinez és mtsai, 2005; Váczy és mtsai, 2008), de ezek fenotípusos jellemzői nem képezték elemzés tárgyát, míg a micélium növekedési sebességet, mint az izolátumok alapvető jellemzőjét széles körben vizsgálták (Youssef és Roberto, 2014).

Az intenzív micéliumnövekedés erőteljesebb fertőzőképességet eredményez, ugyanakkor, ha alacsonyabb fertőzőképességűek gyengébb szklerócium képzés tapasztalható (Cantoral és Collado, 2011). Nemesrothadásos szőlőbogyókról izolált *B. cinerea* törzsek szélesebb körű fenotípusos jellemzése a morfológiai típusok és jellemzők leírásával (Martinez és mtsai, 2003; Lorenzini és Zapparoli, 2014) vagy a vízaktivitás hatásának a micélium- és konídium növekedési sebességére (Rousseau és Donèche, 2001) megtörtént, de a morfológiai típusok, a mintavételi időszakok vagy a szőlőfajták közötti összefüggések nem kerültek meghatározásra.

2.1.8. Új megközelítések a botritizálódási folyamatok vizsgálatában

A növényekhez társuló mikrobiális közösségek rendkívül összetett diverzitása, valamint a mikroorganizmusok és a növények közötti kölcsönhatások komplexitása megnehezíti e rendszerek átfogó megismerését (Francioli és mtsai, 2018). A vizsgálni kívánt növényi mintákat korábban mikrobiológiai fekete doboznak (black box) nevezték a mikrobiális populációk nagy abundanciája és a jellemzésükkel kapcsolatos komplex kihívások miatt (Cortois és De Deyn, 2012).

A molekuláris biológiai módszerek fejlődése, a terepi alkalmazhatóság és a költségek csökkenése révén mára rutinszerűvé vált a növényi és talajmikrobiomok vizsgálata. Az új omikai technikák – a transzkriptomika, proteomika és metabolomika – kombinált alkalmazása e folyamatok komplex, integrált feltárását teszi lehetővé, korábban elérhetetlen részletességgel. Az omikai megközelítések önállóan is jelentős ismeretanyagot kínálnak, integráltan alkalmazva azonban lehetőséget nyújtanak arra, hogy a gombák növénykórtani vonatkozásait a génexpresszió, a fehérjeműködés és a metabolitprofil szintjén egyszerre, komplex módon tárjuk fel. A növényi gombakórokozók metabolomikai vizsgálatai még viszonylag újak számítanak, ám a kórokozók és az

általuk okozott betegségek számos aspektusának feltárásában rejlő lehetőségeiknek köszönhetően alkalmazásuk gyors ütemben terjed és egyre nagyobb népszerűségnek örvend. (Gupta és mtsai, 2022, Muñoz-Hoyos és Stam, 2023).

A transzkriptomika lehetővé teszi a génexpresszió mennyiségi és minőségi különbségeinek pontos azonosítását különböző mRNS-populációk összehasonlítása révén (Ozsolak és Milos, 2011). A fertőzéshez kapcsolódó génexpressziós mintázatok és az eltérő expressziós profilok vizsgálata kulcsfontosságú a kórokozók patogenitásának mélyebb megértéséhez, amely számos eltérő *in vitro* növekedési feltétel mellett nyer új értelmezést (Nilsson és mtsai, 2019).

Az utóbbi években egyre több tanulmány számol be újgenerációs szekvenálási technológiák transzkriptomprofil-alkotásban való alkalmazásáról. Ilyen például a SOLiD rendszer (Applied Biosystems, CA, USA) vagy a Genome Analyzer platform (Illumina, CA, USA), amelyek nagyságrendekkel képesek növelni a szekvenálási teljesítményt, miközben viszonylag alacsony költségkereten belül is működtethetők (Ansorge, 2009).

A nagy áteresztőképességű szekvenálási (HT-NGS) módszerek gyors és hatékony eszközt kínálnak a *B. cinerea* és gazdanövénye közötti fertőzési és védekezési mechanizmusok feltárására, akár közvetlenül *in planta* mintákban is. Ezen technológiák alkalmazása lehetővé teszi a gombagenom variabilitásának átfogó elemzését, a patogenitás diverzitásának és evolúciójának részletes vizsgálatát, ezáltal hozzájárulva a fertőzésre adott növényi válaszok mélyebb megértéséhez. A faj alaposabb megismerését szolgálta a Syngenta AG által kezdeményezett genomszekvenálási projekt (Van Kan és mtsai, 2017), mely során a genom elemzése nagymértékű szekvenciahomológiát és hasonlóságot tárt fel a *B. cinerea* és a közeli rokonságba tartozó *Sclerotinia sclerotiorum* között.

B. cinerea-val fertőzött szőlőről izolált törzs genomjának szekvenálása során kapott adatoknak a korábban szekvenált két törzzsel való összevetése számos, a növényi szövetekbe történő behatolásban és azok lebontásában szerepet játszó gén azonosítását tette lehetővé, köztük szekretált fehérjékét, glikozid-hidrolázokét, szénhidrát-észterázokét, lakkázokét és poliszacharid-liázokét, amelyek jelenlétét korábban már leírták (Blanco-Ulate és mtsai, 2015). Az omikai technológiák fejlődése lehetővé tette a *B. cinerea* környezeti alkalmazkodóképességének és gazdaspecifitásának részletesebb feltárását is. Ennek keretében 13 különböző izolátum genomját szekvenálták a fajon belüli genetikai diverzitás vizsgálatára (Atwell és mtsai, 2015).

Az összehasonlító génexpressziós vizsgálatok transzkriptomikai módszerekkel képesek betekintést nyújtani a növények biotikus és abiotikus stresszre adott válaszaiba, valamint ezek génexpressziós mintázatainak alakulásába, alkalmasak különböző stresszfaktorok által kiváltott génexpressziós változások feltárására is. Az *Arabidopsis* esetében például a genom több mint 12%-a mutat differenciális expressziót *B. cinerea* fertőzés hatására (Sham és mtsai, 2014). Számos, a különböző stresszhatásokra adott válaszok transzkripciós szabályozását vizsgáló tanulmány microarray-elemzések révén

azonosított olyan géneket *Arabidopsis*-ban, amelyek differenciálisan szabályozott expressziót mutatnak mind *B. cinerea* fertőzés, mind pedig egyidejű abiotikus stressz, például szárazság, hőhatás vagy magas sótartalom esetén is (Atkinson és Urwin, 2012). Paradicsomban végzett transzkriptomikai vizsgálatok RNA-seq elemzés segítségével lehetővé tették a vad *Solanum* fajok közötti természetes variabilitás feltárását. *B. cinerea* fertőzést követően a vizsgált növényekben a fotoszintézissel és a metabolikus folyamatokkal kapcsolatos gének expressziója visszaszorult, míg a védekezésben szerepet játszó gének, például a PR-protein 1 (PR1), a β -1,3-glükánázt, illetve a szubtilizinszerű proteázt kódoló gének egyidejűleg fokozott expressziót mutattak a kórokozóval szemben ellenálló fajban, a *Solanum lycopersicoides*-ben (Smith és mtsai, 2014).

2.2. A szőlő tőkebetegségei

A szőlő korai tőkeelhalása szűkebb értelemben vett definíció szerint, olyan komplex betegségcsoport, amely a telepítést követő néhány éven belül, rendszerint a tőkék 3–8 éves korában jelentkezik, és a fiatal ültetvényekben a szőlőtőkék pusztulásához vezet. A betegség tünetei közé tartozik a tőkék lassú és gyenge fejlődése, a levelek elszíneződése, a víz- és tápanyagszállítás zavara, majd a tőkék idő előtti pusztulása. Tágabb értelemben az idősebb ültetvényeket érintő – akár ugyanazon kórokozó csoportokra épülő – krónikus tünetekkel jelentkező, további, a fás részeket érintő tünetegyüttesek is idetartoznak, hiszen minden a szőlőültetvény potenciális és tervezett élettartama előtti tőkepusztulást korai tőkeelhalásnak tekintünk.

A szőlő tőkeelhalásos betegségeit (Grapevine Trunk Diseases – GTD) különböző rendszertani családba tartozó gombafajok és azok együttes fertőzése idézik elő, amelyek fertőzött szaporítóanyag vagy metszési sebek révén jutnak a tőkébe (Mondello és mtsai, 2018). Ezek a kórokozók a szőlőtőke fás részeinek nektrózisát okozzák, levéltünetekkel, termésveszteséggel, valamint a hajtások, kordonkarok, tőkefejek, súlyosabb esetben az egész szőlőtőke pusztulásával járhatnak (Bertsch és mtsai, 2013; Gramaje és mtsai, 2018; Guerin-Dubrana és mtsai, 2019). A tőkebetegségek napjainkra a szőlőültetvények pusztulásának egyik legfontosabb okává váltak, különösen az európai borvidékeken.

A betegségek különféle szindrómákba sorolhatók, amelyek megkülönböztetése a tünetek, a kórokozók, a környezeti tényezők, valamint a szőlőtőkék életkora alapján történik. A szőlőtőkét érintő legjelentősebb tőkebetegségek közé tartozik az Esca betegség, a *Botryosphaeriás* tőkeelhalás, valamint az *Eutypás* tőkeelhalás. A fiatal szőlőtőkék esetében a leggyakoribb kórképek a fekete láb betegség (black foot disease), a Petri-betegség, valamint további a *Botryosphaeriaceae*, *Verticillium*, *Fusarium* vagy *Aspergillus* nemzetségekhez tartozó kórokozók által kiváltott elhalásos folyamatok (Mugnai és mtsai, 1999; Gramaje és mtsai, 2018). A szőlőtőkék törzsét és kordonkarjait kolonizáló élő gombák, valamint az általuk okozott nektrózisok kapcsolatba hozhatók levéltünetek megjelenésével. Ugyanakkor egyes tőkebetegségek esetében nem áll rendelkezésre egyértelmű bizonyíték arra vonatkozóan, hogy ezek a kórokozók közvetlen

szerepet játszanának a tünetek kialakításában. Kísérleti körülmények között valamennyi kapcsolódó kórokozóról kimutatták, hogy képesek fás szövetekben nekrozist okozni, amennyiben azokat a szőlő fiatalabb fás részeibe oltották (Bertsch és mtsai, 2013; Larignon és mtsai, 2009; Mugnai és mtsai, 1999). A levéltünetek azonban nem reprodukálhatóak maradéktalanul a Koch-féle posztulátumokkal. Az Eutypás elhalás levéltünetei, például a törpe hajtásfejlődés és a seprűszerű elágazás („boszorkányseprű”) teljes mértékben előidézhetők voltak fiatal és idős tőkék esetében is, amikor azokat *Eutypa lata*-val inokulálták (Sosnowski és mtsai, 2007), viszont az Esca és a *Botryosphaeria* eredetű tőkeelhalások esetében a levéltüneteket nem mindig sikerült megbízhatóan előidézni. A kórképek etiológiája tehát jelenleg sem tekinthető teljes mértékben feltártnak.

Ahogy azt az előzőekben is megfogalmaztuk a szőlőtőkék korai elhalása olyan rendellenesség, amelyet több tényező – biotikus és abiotikus – együttes hatása vált ki. Noha a betegséget már régóta ismerik (Chiarappa, 2000), előfordulásuk a 2000-es évektől kezdődően folyamatosan, évente átlagosan 13%-kal emelkedett. Egyes idős dél-európai ültetvényekben a fertőzöttség mértéke elérte a 60–80%-ot is. Európán kívül Dél-Amerikában a szőlőültetvények 30%-a érintett, de az Amerikai Egyesült Államokban, Ausztráliában és Új-Zélandon is jelentős gazdasági veszteségekről számoltak be a betegséghez kapcsolódóan (De la Fuente Lloreda és mtsai, 2016).

A magyarországi szőlőtermesztés már több mint 100 éve küzd a szőlőtőkék idő előtti pusztulásával. Istvánffy 1915-ben írt először a szőlőtőke pusztulásának lehetséges okairól a „Magyar Királyi Ampelológiai Intézet szőlészeti útmutatásai” című művében. Már egy 1936-ban megjelent közleményben találunk leírást a szőlőtőkék hirtelen leromlásáról és pusztulásáról, részletesen ismertetve a jellegzetes tüneteket, többek között a növekedés leállását, a rövid és vékony hajtások képződését, a levelek zöld színének elváltozását és sárgulását, valamint a részleges vagy teljes elszáradást, illetve a hirtelen bekövetkező lombhullást (Kosinczky, 1936). Néhány évtizeddel később, 1965-ben Ubrizsy már kifejezetten az „Esca” betegségről tesz említést, amelyet a tőkeelhalás egyik formájaként ír le, és amelyhez a jellegzetes tigriscsíkos levéltünetek, valamint az akut forma, a szőlő gutaütésének megjelenése társul. Megjegyzi továbbá, hogy a kórkép kialakulásában szerepet játszhat a *Stereum hirsutum* és a *Phellinus igniarius* jelenléte (Ubrizsy, 1965). Az 1970-es évektől kezdődően Lehoczky készített részletes vizsgálatokat a szőlő korai tőkeelhalásának lehetséges okairól, amelyek jelentős mértékben hozzájárultak a betegségkör tudományos megértéséhez. Lehoczky János kutatásai világítottak rá először arra, hogy a szőlő tőkebetegségei komplex, többgombás eredetű és a környezeti tényezőkkel szoros kapcsolatban álló kórképek. Munkássága nemzetközi jelentőségű, amellyel megalapozta a magyarországi tőkebetegség kutatást, és hozzájárult ahhoz a szemlélethez, amely a betegséget nem egyetlen kórokozóhoz, hanem egy dinamikus kórokozó-közösséghez és ökológiai összefüggésrendszerhez kapcsolja (Lehoczky, 1972; 1974).

2.3. Az ESCA komplex

Az Esca-betegség a szőlő tőkebetegségei közé tartozik, amelyek jelentős károkat okoznak a szőlőültetvényekben. A kórokozók rendszerint metszési vagy mechanikai sérüléseken keresztül fertőzik meg a szőlőtőkét, majd a fás részekben megtelepedve szövetszintű elszíneződéseket és nekrozist idéznek elő (Bertsch és mtsai, 2013). Bár a gombák a tőke belsejében fejlődnek, a fertőzés külső tünetei a zöld hajtásokon, leveleken, sőt esetenként a bogyókon is jelentkezhetnek. A hajtások és levelek akár hirtelen is elszáradhatnak, sokszor a teljes tőkére kiterjedő apoplexiát okozva. A leveleken klorotikus és nekrotikus foltok jelennek meg, a bogyók pedig a betegség típusától függően kis fekete pontokkal borítottá válhatnak vagy teljesen kiszáradhatnak. Mivel a tőkebetegségekkel szemben eredményesen alkalmazható nátrium-arsenit és bizonyos benzimidazolok használata betiltásra került, jelenleg sem az ültetvényekben, sem a szaporítóanyag-előállításban nem áll rendelkezésre megbízható védekezési módszer (Gramaje és mtsai, 2018; Mondello és mtsai, 2018).

2.3.1. Az Esca komplex kórokozói és a betegség kialakulása

A betegségkomplex több, eltérő taxonómiai csoportba tartozó gombafaj együttélésének és kölcsönhatásainak eredménye. Fő kórokozói az aszkuszos *Phaeoacremonium minimum* és *Phaeomoniella chlamydospora*, amelyekhez másodlagos kolonizálóként társulnak a bazídiumos *Fomitiporia* fajok, mindenekelőtt a *Fomitiporia mediterranea*, amelyek előrehaladott fertőzés esetén fehérkorhadást okoznak (Cloete és mtsai, 2014; Fischer, 2002; Moretti és mtsai, 2021). A kórokozók a szőlőtőkébe jellemzően mechanikai sérülések, különösen a metszési sebek mentén hatolnak be. A xilémbe jutva megtelepednek az érszövetekben, és sejtfalbontó enzimek – pl. cellulázok, xilanázok, pektinázok és hemicellulázok – segítségével megbontják a szövetek szerkezetét (Fleurat-Lessard és mtsai, 2023). Ezzel párhuzamosan reaktív oxigénformák, köztük hidroxilgyökök keletkeznek (Perez-Gonzalez és mtsai, 2022), amelyek oxidatív stresszt váltanak ki, tovább károsítva a xilém integritását. A folyamat eredményeként a szállítóyalabokban nekrosis alakul ki, amely a *Fomitiporia* fajok kolonizációjával fehérkorhadássá alakul, létrehozva a teljes és valódi Esca szindrómát (Beris és mtsai, 2023).

A betegség belső tünetei közé tartozik a farészek erezetének sötét elszíneződése, kátrányszerű váladékcseppek képződése és kiterjedt nekrosis. A külső tünetek sokfélék lehetnek: az egyéves hajtásokon és leveleken jellegzetes tigrismintás elszíneződés jelenik meg, amelyet *Grapevine Leaf Stripe Disease (GLSD)* néven külön tünetegyüttesként írtak le (Mugnai és mtsai, 1999). Emellett a bogyókon nekrozisfoltok, valamint a tőkék hirtelen pusztulása is jellemző (Beris és mtsai, 2023; Bertsch és mtsai, 2013). A tünetek ugyanakkor rendkívül változatosak: előfordulhatnak időszakosan, évekig tünetmentes állapot után is, és gyakran csak több évvel a fertőzés bekövetkezése után válnak nyilvánvalóvá (Beris és mtsai, 2023; Maher és mtsai, 2012). Különösen problematikus, hogy a lombtünetekkel rendelkező levelekből a kórokozók többnyire nem

mutathatók ki, ugyanakkor ugyanazon növény fás részeiből vagy akár tünetmentes tőkék endofitonjából izolálhatók (Bruez és mtsai, 2014; 2015; Del Frari és mtsai, 2019; Mondello és mtsai, 2022). Ez arra utal, hogy a kórokozók jelenléte önmagában nem elégséges feltétele a külső tünetek kialakulásának.

A tünetképződés mechanizmusának megértése komoly kihívást jelent, és több, egymással részben konkuráló hipotézis született. Az egyik megközelítés szerint a xilémnedv áramlásának akadályozottsága játszik kulcsszerepet: a tápanyagok és a víz szállításának gátlása közvetlenül idézi elő a lombozat színeződési zavarait és nekrózist. Ez az akadályozottság nemcsak a kórokozók szövetkárosító hatásának következménye, hanem a gazdanövény saját védekezési reakciói is hozzájárulhatnak. A szőlő az érszövetekben fenolos vegyületek felhalmozásával, gélanyagok kiválasztásával, sejtkitüremkedésekkel és kalluszképződéssel próbálja korlátozni a patogének terjedését, ugyanakkor ezek az elzáródások tovább súlyosbítják a nedváramlási zavarokat (Bortolami és mtsai, 2023). Más kutatók a kórokozók által termelt fitotoxinokat tekintik a tünetek fő kiváltóinak. Számos másodlagos metabolitot és effektormolekulát azonosítottak, köztük az öt szénatomos ketideket (szkitalon, izoszkleron), naftalénont és melleint (Abou-Mansour és mtsai, 2015; Andolfi és mtsai, 2011; Bruno és mtsai, 2007; Bruno és Sparapano 2006), valamint extracelluláris poliszacharidokat, mint a pullulán (Bruno and Sparapano, 2006; Burrano és mtsai, 2016). A pullulán esetében az is bizonyított, hogy más patogének – például a *Cryphonectria parasitica* a gesztenyén – is képesek termelni, ami arra utal, hogy széles körben előforduló, nem gazdaspecifikus fitotoxinról lehet szó (Forabosco és mtsai, 2006). A fehérjetermészetű effektorok és polipeptidek közvetlen citotoxikus hatást gyakorolhatnak a szőlősejtekre, illetve lebontó enzimekként roncsolják az érszöveteket (Luini és mtsai, 2010; Bruno és Sparapano, 2006). Bár számos laboratóriumi vizsgálat igazolta fitotoxikus hatásukat, természetes körülmények közötti szerepük nem teljesen tisztázott. Ezt támasztja alá az a tény, hogy mesterséges fertőzések során a tigrismintás levéltünetek akkor sem alakultak ki, amikor a *P. chlamydospora*, *Ph. minimum* vagy *F. mediterranea* törzsekkel inokulálták a szőlőt, akár külön, akár kombinációban (Bruno és mtsai, 2007; Trotel-Aziz és mtsai, 2019). Ez arra utal, hogy a fitotoxinok önmagukban nem képesek teljes mértékben előidézni a tünetegyüttest, és más tényezők – például klimatikus hatások, mikrobiális interakciók vagy a gazdanövény saját válaszreakciói – közreműködésére van szükség.

Az Esca értelmezését az is bonyolítja, hogy természetes fertőzési körülmények között gyakran nem áll fenn egyértelmű kapcsolat a kórokozó biomasszája és a tünetek súlyossága között (Bruez és mtsai, 2014; Mondello és mtsai, 2018). Ennek magyarázatára több elmélet született. Az egyik a biomassza-küszöb hipotézise, amely szerint a tünetek akkor manifesztálódnak, ha a kórokozók elérnek egy kritikus szintet, amelyhez fokozott patogenitási faktor-termelés vagy sejtsűrűséghez kötött viselkedésváltás kapcsolódhat (Hrycan és mtsai, 2020). Egy másik megközelítés szerint a tünetek kialakulása erősen függ a klimatikus viszonyoktól – például a csapadék és a hőmérséklet alakulásától

(Calzarano és Di Marco, 2018) – és a szőlőtermesztési gyakorlatoktól, így a metszés időzítésétől és módjától (Lecomte és mtsai, 2018).

Ugyancsak fontos tényezők a mikrobiális kölcsönhatások: a kórokozók egymás közötti kapcsolatai, valamint a nem kórokozó baktériumok (*Bacillus*, *Pseudomonas*) (Haidar és mtsai, 2021) és gombák (*Trichoderma*, *Aureobasidium*) antagonista vagy támogató hatásai (Karácsony és mtsai, 2023). A legújabb kutatások szerint a szőlőtőke mikrobiomjának összetétele kulcsfontosságú: az egészséges növények stabil mikrobiom-egyensúlyi állapotot tükröznek, míg a beteg tőkékben ez az egyensúly felborul, diszbiózis alakul ki, ami elősegíti a kórokozók patogenitásának érvényesülését (Bettenfeld és mtsai, 2020, 2022; Niem és mtsai, 2020)

Az Esca olyan soktényezős betegség, amelynek tünetei a kórokozók közvetlen hatásai, a gazdanövény komplex védekezési reakciói, a mikrobiális közösségek közötti kölcsönhatások és a környezeti stressztényezők együttese révén alakulnak ki. A betegség hosszú látenciája, a tünetek változékonysága és a kórokozók endofiton jelenléte miatt az Esca továbbra is az egyik legnagyobb kihívást jelenti a szőlőegészségügyben.

2.4. Biológiai védekezés

A fertőzött szaporítóanyag szerepe különösen fontos, a tőkebetegségek már szaporítóanyag előállításánál során bekerülhetnek a szőlőoltványokba (Del Pilar Martínez-Diz és mtsai, 2020; Yacoub és mtsai, 2016) aminek következtében a növények már telepítéskor fertőzöttek lehetnek, és ez jelentősen megnehezíti az integrált növényvédelmi stratégiák kidolgozását. A rendkívül toxikus nátrium-arsenit alkalmazása csökkentette ugyan a fertőzések előfordulását, azonban nem bizonyult hatékonynak a tőkeelhalás kórokozóinak visszaszorításában (Fussler és mtsai, 2008). Ennek a vegyületnek és más fungicideknek a betiltása óta nem áll rendelkezésre hatékony növényvédelmi módszer a tőkebetegségekkel szemben. A természetes vegyületeken és biológiai védekező szervezeteken alapuló alternatív védekezési eljárások kifejlesztése ezért ígéretes megoldást jelenthet (Mondello és mtsai, 2018)

A tőkebetegségek elleni védekezés során már számos mikroorganizmust teszteltek, például *Bacillus subtilis*-t (Kotze és mtsai, 2011), *Fusarium lateritium*-ot (Christen és mtsai, 2005) és *Pythium oligandrum*-ot (Yacoub és mtsai, 2016) de még mindig a *Trichoderma* fajok képezik a legszélesebb körben vizsgált biológiai kontroll szervezeteket ebben a témában. Számos vizsgálat irányult a *Trichoderma* fajok metszési sebek védelmében betöltött szerepére (Mutawila és mtsai, 2011; Del Pilar Martínez-Diz és mtsai, 2020), míg további kutatások a gyökérszónába vagy a talajba való kijuttatásuk hatékonyságát vizsgálta (Di Marco és mtsai, 2022).

Az eddigi ígéretes eredmények ellenére azonban jelenleg még mindig nincs olyan elérhető és széles körben alkalmazható kezelés, amely hatékony védelmet biztosítana a tőkebetegségek kórokozóival szemben a szaporítóanyag nevelésben vagy a szabadföldi termesztés során. Gramaje és mtsai (2018) hangsúlyozták az ökológiai vizsgálatok

jelentőségét, amelyek célja potenciális biokontroll ágensek azonosítása a szőlőtőkék mikrobiomjából. Egy új biokontroll ágens megtalálásának egyik lehetséges útja a kórokozók hatékony antagonista szervezeteinek felkutatása. Az ilyen szervezeteknek képesnek kell lenniük ugyanazon ökológiai nicheben működni, mint a kontrollálni kívánt kórokozók, ezért célszerű a védekezésre alkalmas mikrobákat közvetlenül a gazdanövény mikrobiotájában keresni. Egy adott gazdanövényből izolált potenciális biokontroll ágens több, hasonló fiziológiájú, ökológiájú és járványtanú kórokozó által okozott betegség ellen is eredményes lehet.

2.4.1. Az *Aureobasidium pullulans* biokontroll és fitopatogén tulajdonságai

Az *A. pullulans* egy általánosan elterjedt dimorf gomba, amely a szőlőtőke föld feletti részeinek epifita (Barata és mtsai, 2012) és endofiton (Knapp és mtsai, 2021) mikrobiomjában egyaránt jelen van. Az *A. pullulans* jólismert biokontroll tulajdonságairól, valamint iparilag is értékes enzimek és a pullulán nevű poliszacharid termeléséről (Prasongsuk és mtsai, 2018). A szőlő növényvédelmében több kutatás és gyakorlati tapasztalat szerint is eredményesen alkalmazható, biológiai hatékonysága bizonyított *B. cinerea* (szürkerothadás) és *Greeneria uvicola* (keserűrothadás) ellen is (Rathnayake és mtsai, 2018; Galli és mtsai, 2021). Hatékonyan gátolja a *Diplodia seriata* közreműködésével kialakuló botryosphaeriás tőkeelhalás kialakulását és egyes vizsgálatok szerint magának a szőlőnek a védekezési reakcióit is erősítheti, amint azt a PR6 kórokozó-reaktív gén fokozott expressziója is bizonyította (Pinto és mtsai, 2018). Ugyanakkor számos esetben patogénként is viselkedhet (Guo és mtsai, 2020; Lee és mtsai, 2019; Xie és mtsai, 2022) és az a tény, hogy képes jelentős mennyiségű pullulánt termelni, tovább árnyalja, hogy valóban jótékony mikroorganizmusnak tekinthető-e.

Az *A. pullulans*-ra mindeddig jellemzően nem kórokozóként tekintettünk, bár bizonyos növényeken kórokozóként is azonosították – például levélfoltosságot okoz körtén (Xie és mtsai, 2022), antraknózist *Paeonia suffruticosa*-n (Lee és mtsai, 2019), mégis nem egy jelentős gazdasági károkat okozó kórokozó. Ezen kívül megemlítik, mint tárolási kórokozót cseresznyén (Kim 2014), körtén, illetve szőlőn is (Lorenzini és Zapparoli, 2015). Gyomnövényeken is kimutatták patogenitását (Guo és mtsai, 2020). Fontos megjegyezni, hogy ezek lágyszárú vagy zöld növényi részek megbetegedései, ellentétben a szőlő tőkebetegségeivel, amelyek több éves, fás szöveteket támadnak.

Mivel az *A. pullulans* kórokozó szerepe csekély, a jóval hatékonyabb antagonista hatása miatt inkább biológiai ágensként tartják számon (Prasongsuk és mtsai, 2018). Az *A. pullulans* Esca-beteg tőkéből való kimutatásával kapcsolatos irodalmi adatok ellentmondásosak. Egyes tanulmányok szerint jelenléte nem jellemző (Bruez és mtsai, 2014), más kutatások hasonló gyakoriságot mutattak ki tünetes és tünetmentes növényekben (Hofstetter és mtsai, 2012), míg megint mások szerint egészséges szövetek jellemző endofiton tagja tünetes szőlőtőkékben (Rusjan és mtsai, 2017). Az *A. pullulans* és az Esca-kórokozók közötti egyetlen ismert kapcsolat a pullulán termeléséhez köthető. Ez a nem toxikus, ételízeszer- és gyógyszeriparban is használt poliszacharid

feltételezések szerint részt vesz az Esca-betegség patogenezisében (Bruno és mtsai, 2007). Egyes szerzők úgy vélik, hogy a pullulán az edénnyalábok eltömítésével akadályozhatja a víz és a tápanyagok áramlását, bár ezt a feltételezést eddig még nem igazolták kísérletileg.

A szőlő tőkebetegségek természetére tekintettel feltételezhető, hogy mikrobiom-kölcsönhatások is részt vesznek a tünetek és a betegség kialakulásában. A tőkebetegség kórokozók közötti interakciókkal már több tanulmányban is foglalkoztak. Az Esca kórokozói (*P. chlamydospora*, *P. minimum*, *F. mediterranea*) közötti interakciókat részletesen vizsgálták (Bruno és Sparapano 2006) és a nem-Esca kórokozók kóroki szerepe is felmerült (Martín és mtsai, 2022). Újabban olyan mikroorganizmusokat is lehetséges kóroki tényezőként azonosítottak, amelyek tünetmentes szőlőben is gyakran előfordulnak. Ilyenek például az *Acremonium alternatum* gombafaj, illetve a *Xanthomonadales*, *Rhizobiales* és *Enterobacteriales* baktériumrendek képviselői, amelyek jelentős mértékben felülreprezentáltak tünetes tőkék mikrobiomjában (Bekris és mtsai, 2021; Bruez és mtsai, 2015).

Bár több tanulmány is foglalkozott a betegséget elősegítő kölcsönhatások lehetőségeivel, ezek igazolása és funkcionális jellemzése kevés esetben történt meg. Haidar és mtsai kimutatták, hogy a *Paenibacillus sp.* és a *F. mediterranea* közötti szinergizmus összefüggésben áll a fatest degradációjával *in vitro* (Haidar és mtsai, 2021), valamint egy másik tanulmányukban a *Neofusicoccum parvum* és a *Bacillus pumilus*, illetve a *Xanthomonas sp.* közötti együttműködés kapcsán mutattak ki kifejezett edénnyaláb nekrozist mesterségesen inokulált vesszőkben (Haidar és mtsai, 2016).

2.4.2. A vizsgált mikroorganizmusok lehetséges biokontroll háttere

A *Clonostachys rosea* a *Hypocreales* rendbe és a *Bionectriaceae* családba tartozó talajlakó tömlősgomba, amely biotechnológiai alkalmazási lehetőségei révén kiemelt tudományos érdeklődés tárgyát képezi (Sun és mtsai, 2020). Biotechnológiai potenciálját jól mutatja, hogy képes különféle vegyületek, például a zearalenon biotranszformációjára (Kakeya és mtsai, 2002), műanyagok biodegradációjára (Urbanek és mtsai, 2017), valamint bioüzemanyagok előállítására (Strobel és mtsai, 2008). Kereskedelmi értékének köszönhetően a *C. rosea* ipari termelési lehetőségeit is alaposan vizsgálták, mind folyékony (De Andrade Carvalho és mtsai, 2018), mind szilárd közegű fermentációs rendszerekben (Zhang és mtsai, 2015). A többi *Hypocreales* gombához hasonlóan számos növénykórokozóval, köztük gombákkal, fonálférgekkel és rovarokkal szemben is mutat antagonista hatást (Lysøe és mtsai, 2017; Anwar és mtsai, 2018). Világszerte előfordul talajban és korhadó növényi anyagokban, mind trópusi, mind mérsékelt éghajlatú övezetekben és gyakori előfordulása a szőlőn is dokumentált (Abdullah és mtsai, 2015; Akgül és Ahioğlu, 2019).

A *C. rosea* tőkebetegségek elleni biológiai védekezésben való alkalmazásáról eddig csupán kevés megfigyelés áll rendelkezésre (Silva-Valderrama és mtsai, 2021; Billar De

Almeida és mtsai, 2020), és ezek a tanulmányok mindössze néhány GTD-kórokozóra terjedtek ki, *in planta* kísérletek nélkül.

A *Bacillus velezensis* az utóbbi évtizedekben a biológiai növényvédelem kutatásának egyik központi szereplőjévé vált, mivel számos vizsgálat igazolta antagonisztikus aktivitását különféle növénypatogén gombákkal és baktériumokkal szemben. Több olyan tulajdonsággal rendelkezik, amelyek indokolják szerepét a fenntartható növényvédelmi stratégiákban: széles spektrumú antimikrobiális hatása, sejtfalbontó enzimeinek termelése, valamint másodlagos metabolitjainak sokrétűsége mind hozzájárulnak ahhoz, hogy a szőlő tőkebetegségek elleni védekezés egyik ígéretes jelöltjeként tekintsünk rá (Keshmirshekan és mtsai, 2024).

A biokontroll-hatás egyik alapvető mechanizmusa az antibiózis, amely során a *B. velezensis* különféle bioaktív molekulákat, így lipopeptideket valamint poliketideket állít elő. Ezek a metabolitok képesek közvetlenül gátolni a kórokozók vegetatív növekedését, spóráképződését és patogenitását (Chen és mtsai, 2024).

A *B. velezensis* további előnyét a sejtfal-degradáló enzimek – így kitinázok, proteázok és cellulázok – termelése jelenti, amelyek közvetlenül képesek a gombák sejtfalának strukturális károsítására (Wockenfuss és mtsai, 2024). Az ilyen többletényezőes támadási stratégia különösen releváns a fatörzsi betegségek ellen, amelyek többgombás eredetűek és komplex patogénközösségekkel járnak együtt. E kórokozókomplexek hatékony visszaszorítása jellemzően csak több, egymást erősítő biológiai mechanizmus egyidejű érvényesülésével valósítható meg (Kenfaoui és mtsai, 2024).

A *B. velezensis* ígéretes biokontroll ágens lehet a tőkebetegségek vonatkozásában is, amelyet az utóbbi években egyre intenzívebben vizsgálnak (Langa-Lomba és mtsai, 2023; Blundell és mtsai, 2021; Bustamante és mtsai, 2022), döntően laboratóriumi környezetben, így a biokontroll-aktivitás tényleges relevanciájának igazolásához elengedhetetlen a terepi körülmények közötti validáció (Castillo-Novales és mtsai, 2025). Az alkalmazhatóság kulcsfeltétele a *B. velezensis* környezeti stabilitásának biztosítása.

A szőlőültetvények ökológiai heterogenitása – beleértve a hőmérsékleti és páratartalmi ingadozásokat, valamint a talajmikrobiom összetételének változatosságát – jelentős mértékben befolyásolja a biokontroll kezelések eredményességét (Mesguida és mtsai, 2023). Ennek megfelelően a hosszú távú, több évjáratra kiterjedő kísérletek szükségesek ahhoz, hogy bizonyítást nyerjen, hogy a *B. velezensis* tartósan hozzájárulhat a tőkebetegségek előfordulásának mérsékléséhez, a szőlőtőkék élettartamának meghosszabbításához és a fenntartható szőlőtermesztés gyakorlati megvalósításához (Rabbee és mtsai, 2023).

2.4.3. Biokontroll stratégiák a szőlő tőkebetegségei elleni védekezésben

A szőlő tőkebetegségeivel szembeni jelenlegi vagy potenciális biológiai védekezési stratégiái között több, egymást kiegészítő megközelítés rajzolódik ki, amelyek célja a

kórokozók megtelepedésének megakadályozása és a növény hosszú távú egészségének fenntartása.

Az egyik legfontosabb beavatkozási pont a metszési sebek kezelése, mivel ezek jelentik a fő fertőzési kaput a fatörzsi patogének számára. A metszés után közvetlenül alkalmazott biokontroll-készítmények, különösen egyes *Trichoderma* törzsek, hatékonyan csökkenthetik a fertőzési kockázatot (Mondello és mtsai, 2018; Yacoub és mtsai, 2024).

Ígéretes kutatási irányt jelent a szőlőnövényhez természetes módon társuló endofiton és rizoszférikus mikroorganizmusok kutatása. Ezek a mikrobák eleve jelen vannak a szőlőtőke szöveteiben vagy a környező talajban, így jól alkalmazkodtak az adott ökológiai feltételekhez. *In vitro* és terepi vizsgálatok során több ilyen izolátum bizonyította antagonistikus hatását a főbb tőkebetegség-kórokozókkal szemben (Silva-Valderrama és mtsai, 2021). Hasonló jelentőséggel bír a természetes élőhelyükről izolált (pl. a szőlőültetvény talajából, rizoszférájából) mikroorganizmusokban rejlő lehetőségek kiaknázása is, mivel ezek nagyobb eséllyel maradnak életképesek és hatékonyak az adott klimatikus és talajviszonyok között (Zanfaño és mtsai, 2025).

A már feltárt biokontroll hatásmechanizmusok megismerése rámutatott, hogy a hatékonyság több tényező együttes eredménye. Az antibiózis során a mikroorganizmusok olyan másodlagos metabolitokat termelnek, amelyek közvetlenül gátolják a patogén gombák növekedését. Emellett számos törzs képes sejtfalbontó enzimek – például cellulázok és kitinázok – termelésére, amelyek elősegítik a kórokozók inaktiválását. Fontos szerepet játszik a tápanyagokért és a kolonizációs helyekért folytatott versengés, valamint, hogy egyes mikrobák indukálják a gazdanövény védekező mechanizmusait, fokozva ezzel a szőlő ellenálló képességét (Mesguida és mtsai, 2023).

A gyakorlati alkalmazás szempontjából meghatározó, hogy a biokontroll ágensek mennyire stabilak különböző hőmérsékleti és környezeti feltételek mellett. A laboratóriumi és üvegházi körülmények között ígéretesnek bizonyuló törzsek terepi környezetben gyakran eltérően viselkednek, ezért elengedhetetlen a helyszíni validáció (Castillo-Novales és mtsai, 2025). Hangsúlyoznunk kell, hogy csak rövid távú kísérletek önmagukban nem elegendőek a tényleges hatás megítéléséhez: a több évjáraton átívelő vizsgálatok bizonyítják igazán, hogy a biokontroll alkalmazása tartósan mérsékelheti a fatörzsi betegségek előfordulását és lassíthatja a tőkék elhalását.

2.5. A tőkebetegségekhez kapcsolódó gombaközösségek

A szőlő tőkebetegségeiért felelős gombafajok eltérő képességekkel rendelkeznek a fás szövetek kolonizálásában. Ilyen tényező a faanyag bontásának hatékonysága, a különféle védekező vegyületek előállítására, valamint a szőlőtőke metabolitjaival szembeni adaptív válaszreakciók. A gombák és a gazdanövény által szintetizált bioaktív vegyületek kutatása napjainkban különösen intenzíven zajlik. Ezt nagymértékben elősegíti a molekuláris technológiák közelmúltbeli fejlődése, amely lehetővé teszi a gombaközösségek

megismerésén túl a bioszintetikus útvonalak és a gomba–gazda kölcsönhatások részletesebb feltárását is.

2.5.1. Tenyészthető és nem tenyészthető gombák

A növényekhez társuló gombák kimutatására hagyományosan tenyésztésalapú módszereket alkalmaztak, azonban ezek szelektív jellegük miatt csak korlátozott információt szolgáltatnak, és becslések szerint a mikroorganizmusoknak csupán kis százaléka tenyészthető hagyományos módszerekkel (Amann és mtsai, 1995; Dissanayake és mtsai, 2018; Eichmeier és mtsai, 2018). Ezzel szemben a tenyésztésfüggetlen módszerek, különösen a DNS-alapú metabarcoding, lehetővé tették teljes gombaközösségek feltérképezését, és az elmúlt két évtizedben forradalmasították a mikrobiális ökológiát. A környezeti minták nagy áteresztőképességű szekvenálása jelentős mértékben hozzájárult ismereteink bővüléséhez a gombák diverzitásáról, elterjedéséről és ökológiai sajátosságairól (Frąc és mtsai, 2018).

A DNS-alapú vizsgálatok alapján a talaj szolgál a gyökérzóna és a föld feletti szövetek mikrobiomjának elsődleges forrásául (Zarraonaindia és mtsai, 2015). A környezeti tényezők közötti különbségek (pl. a talajkémia, a mezoklíma) mellett a borászati tulajdonságok regionális eltérései („terroir”) is összefüggésbe hozhatók a régióként eltérő szőlő mikrobiommal (Bokulich és mtsai, 2013; Zarraonaindia és mtsai, 2015). Nerva és mtsai (2019) Olaszországban tünetmentes és Esca-betegség által érintett szőlőtőkék alatti talajmintákat elemeztek és nem találtak szignifikáns különbséget a fajgazdagságban, ugyanakkor a kórokozók nagyobb gyakorisággal voltak jelen a beteg tőkék alatti talajban, mint a tünetmenteseknél, ami alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a talaj jelentős inokulumforrás lehet. Del Frari és mtsai (2019) a szőlőtőkék föld feletti évelő szöveteiben vizsgálták a mikrobiótát tünetmentes és Esca-beteg tőkék esetében, és kimutatták, hogy bár az évelő és egynyári fűfélék között jelentős összetételbeli különbségek vannak, a tünetmentes és beteg növények között nem észleltek lényeges eltérést.

2.5.2. A tőkebetegségek kórokozói és a szőlő mikrobiomjának kölcsönhatása

Antagonista mikroorganizmusok jelentős hatást gyakorolhatnak más mikrobákra azáltal, hogy versengenek velük az élőhelyért vagy a tápanyagokért, közömbösítik azok toxinjait, illetve saját maguk is toxikus vegyületeket választanak ki (Compant és mtsai, 2013). Képesek serkenteni a szőlőtőke védekezőmechanizmusait, különösen a szisztémikus védekezést, vagy fokozhatják a gazdanövény stressztűrő képességét is (Mondello és mtsai, 2018). Számos kutatás szerint nem mutatható ki egyértelmű összefüggés a tünetes és tünetmentes fás részek gombaközösségei között (Elena és mtsai, 2018). Ez több tényező együttes fennállásával is magyarázható, amelyek elengedhetetlenek a levéltünetek kialakulásához, például a növény aktuális élettani állapota vagy az elhalt, elszíneződött fás szövetek mennyisége, amely elér egy küszöbértéket a tünetek megjelenéséhez. Egy másik magyarázat a szőlőtőke mikrobiótájának dinamikus

változása lehet akár egy éven belül is, szemben a fertőzéstől a tünetek kialakulásáig általában több éven át tartó folyamat lassú előrehaladásával.

Feltételezhető, hogy az antagonista mikroorganizmusok hatást gyakorolnak a tőkeelhaláshoz köthető gombapopulációkra. Nagy számban mutattak ki tőkebetegség kórokozókat és *Trichoderma* fajokat látszólag egészséges, 50 éves tünetmentes tőkék vizuálisan tiszta fájában, ami arra utal, hogy egyensúlyi mikrobiális közösség állhat fenn, amely hozzájárulhat a növények egészségi állapotának fenntartásához (Bruez és mtsai, 2016). Egyes elképzelések szerint egy ilyen, a gazdanövény, környezet és a mikrobióta közötti egyensúlyi állapot képes lehet kiváltani az endofiton, nem patogén fajokból a patogenitást, ami ismételten ráirányítja a figyelmet a gazdanövény – kórokozó – környezet hármasának fontosságára (Fischer és Peighami-Ashnaei, 2019), sőt egyes kutatók egy negyedik tényezőt is beemelnek ebbe az interakciós rendszerbe, megalkotva ezzel a patobiom koncepcióját (Brader és mtsai, 2017). Mondello és mtsai (2018) szerint összesen mintegy 40 baktériumot vagy gombát vizsgáltak potenciális biológiai védekezési ágensként a tőkebetegségek ellen. Ezek az ágensek a betegség kialakulásának különböző szakaszaiban fejthetik ki hatásukat, módosíthatják a szőlőtőkék belső mikrobiális egyensúlyát, alkalmazhatók lehetnek metszési sebek védelmére vagy védekezési reakciók serkentésére (Yacoub és mtsai, 2016). Az egyre növekvő igény a környezetkímélő betegségkezelési stratégiák iránt, valamint a molekuláris technológiák fejlődésének köszönhetően felgyorsuló kiválasztási és hatékonyság-értékelési folyamatok indokoltá teszik a szőlő mikrobiótájának biológiai védekezési potenciáljára irányuló kutatások kiemelt kutatását.

2.5.3. A vizsgált és leírt mikroorganizmusok patogén összefüggései

A gazdanövény, a kórokozók és a környezeti tényezők közötti komplex kölcsönhatások még nem feltártak teljes részletességgel, és a betegség kialakulásában részt vevő mikroorganizmusok pontos köre, biológiája és patogenitása sem ismert teljes mértékben (Songy és mtsai, 2019). E hiányos ismeretek indokolják a tőkebetegségek kórokozóinak átfogóbb vizsgálatát, amely elengedhetetlen a hosszú távon hatékony és fenntartható védekezési módszerek megalapozásához.

A *Kalmusia* nemzetséget mintegy 150 évvel ezelőtt írták le az *Kalmusia ebuli* típusfaj alapján (Niessl 1872), és korábban több mint 40 fonalas gombafajt soroltak ide (Zhang és mtsai, 2014). Ezek a gombák számos növény mikrobiomjának gyakori tagjai, gazdanövény-spektrumuk széles: például bambuszból (Tanaka és mtsai, 2005), tölgyből (Ghobad-Nejhad és mtsai, 2017) vagy málnából (Iznova és Rukšėnienė, 2012) is izolálták őket. Az utóbbi években a nemzetség rendszertani átsorolása következtében a *Kalmusia sensu stricto* már kevesebb mint 10 fajt foglal magában. 2014-ben Verkley és mtsai (2014) leírták a *Dendrothyrium longisporum* fajt, amelyet később a *Kalmusia* nemzetségbe soroltak át (Ariyawansa és mtsai, 2014). Morfológiai és molekuláris jellemzését két izolátum alapján végezték, amelyek közül az egyiket törpe fagyöngyből (*Arceuthobium pusillum*), a másikat közönséges búzából (*Triticum aestivum*) nyerték. Annak ellenére,

hogy növényi eredetű mintákból származik, a *Kalmusia longispora* és növényi betegségek közötti esetleges kapcsolatot korábban nem vizsgálták. A *K. longispora* közeli rokona a *Kalmusia variispora* (korábbi nevén *Dendrothyrium variisporum*); a fajleírás alapjául szolgáló törzseket (CBS 121517 és CBS 197.82) egy szír szőlőtőkéről, valamint a Svájcban honos kétszikű hangafajról (*Erica carnea*) izolálták (Verkley és mtsai, 2014). Ezen kívül a *K. variispora*-t kimutatták iráni perzsa tölgyből (*Quercus brantii*), valamint tünetes szőlőtőkékől Horvátországban. A közelmúltban bizonyították a *K. variispora* patogenitását szőlőn (Abed-Ashtiani és mtsai, 2019), kimutatva, hogy a törzsek képesek nektrózisos léziókat létrehozni a szőlő farészeiben. Ettől az egy esettől eltekintve eddig nem állt rendelkezésre más megerősített adat a *Kalmusia sensu stricto* fajok növénykórokozó szerepéről.

A *Neofabraea* nemzetség (Helotiales, Ascomycota) jelenleg nyolc fajt foglal magában (Chen és mtsai, 2016). Ezek a fajok különböző növényfajokról izolált kórokozó gombák, többek között almáról és körtéről, amelyek esetében a *N. kienholzii* ismertén perzisztens rákosodást, valamint tárolási körülmények között bull's eye rothadást idéz elő (Wenneker és mtsai, 2017). Míg a perzisztens rákosodásnak nem nagy a gazdasági jelentősége, a tárolási betegség bull's eye rothadás a vizsgált évjáráttól és fajtától függően 5–50%-os termésveszteséget is okozhat (Gariépy és mtsai, 2005). Bár *N. malicorticis* törzseket egészséges szőlőtőkékől is izoláltak (Hofstetter és mtsai, 2012), és egyetlen *N. kienholzii* izolátumot is kimutattak GTD-vel érintett szőlőtőkék törzséből (Baránek és mtsai, 2018), eddig nem voltak ismereteink arról, hogy a *Neofabraea* fajok a szőlőn előforduló tőkebetegség-tünetek kialakításával egyértelműen összefüggésbe hozhatóak lennének.

A *Botryosphaeriaceae* fajok által okozott szőlő tőkebetegségek hazánkban már évtizedek óta ismertek. A betegségek közül a fekete kordonkar elhalás, amely a fertőzött tőkék törzsében és karjaiban kialakuló farész-nekrózissal, valamint a hozzájuk kapcsolódó levéltünetekkel jellemezhető, első alakommal a Tokaji borvidéken került leírásra (Lehoczy, 1974). Az azóta eltelt időszakban azonban viszonylag kevés vizsgálat irányult ennek a betegségnek a vizsgálatára, a *Diplodia seriata* által okozott tőkebetegségekre fókuszáló közelmúltbeli tanulmány (Kovács és mtsai, 2017), valamint a *Seimatosporium vitis* első magyarországi kimutatása (Váczy, 2017) kivételével. A *Dothiorella omnivora* egy nemrégiben leírt faj, világszerte kevés izolátuma ismert, járványtani szerepe még kevésbé tisztázott. Kórokozóként mogyoróról, dióról, kőrisről és más, nem közeli rokonságban álló fás növényekről izolálták, és eddig világszerte mindössze egyetlen, szőlőről Ausztráliában izolált törzse volt ismert (Linaldeddu és mtsai, 2016). Potenciális kockázatot jelenthet a sokgazdás életmódja, különösen ott, ahol több, érzékeny fás növényfaj él együtt (pl. ültetvények, erdőszegélyek, tájgazdálkodási mozaikok), de jelenleg nem tartozik a legjelentősebb tőkebetegség kórokozók közé.

A *Diaporthe* nemzetség újraértékelése különösen fontos a szőlő tőkebetegségek kutatásában, mivel e fajok ökológiai szerepe sokrétű: előfordulhatnak endofitonként tünetmentes tőkékben, szaprobitaként elhalt szövetekben, de jelentősek kórokozóként

is, amely a farészekben nektrózt, a leveleken és fűrtökön pedig különböző tüneteket idézhetnek elő. A nemzetségen belüli fajhatárok és fajfogalmak változása tovább nehezítette a pontos diagnózist és a járványtani értékelést. Fajai világszerte elterjedtek, és számos jelentős növénybetegség kórokozóiként is ismertek, beleértve a gyökér- és gyümölcsrothadást, a tőkeelhalást, a szár- és ágrákosodást, a levélfoltosságot, a levél- és hüvelyfoltbetegségeket, valamint a magrothadást (Santos és mtsai, 2017).

A nemzetséget emellett a másodlagos metabolitok kutatásában is széles körben vizsgálták, mivel nagyszámú poliketidet, valamint egyedi, kis- és nagymolekulájú metabolitokat termelnek, amelyek különböző antibakteriális, daganatellenes, gombaellenes, maláriaellenes, vírusellenes, citotoxikus és herbicid aktivitással rendelkeznek. Egyes *Diaporthe* fajokat pedig a gombapatogének biológiai védekezésében is alkalmazzák (Dos Santos és mtsai, 2016).

A gombák kettős nevezéktanának eltörlése után a *Diaporthe* és a *Phomopsis* nemzetség többé nem tekinthető különállónak, nem alkalmazhatók a morfortípusok megkülönböztetésére. A névhasználati elsőbbség, valamint a fajok többségének ide sorolása miatt a *Diaporthe* elnevezés megtartását javasolták (Rossman és mtsai, 2015), amelyet a szakirodalom azóta széles körben elfogadott.

A *Diaporthe* fajok európai és mediterráneumbeli elterjedésével szőlőültetvényekben eddig kevés tanulmány foglalkozott, ugyanakkor több jelentős szőlőtermesztő régióban is leírtak kórokozó *Diaporthe* fajokat. Mindezek után a fajfogalom változásait is figyelembe véve, szükségessé vált újabb felmérések végzése a szőlőhöz kapcsolódó fajok előfordulásának és diverzitásának vizsgálatával, valamint a betegségekkel való összefüggések feltárásával kapcsolatban.

A *S. vitis* a *Sporocadaceae* családba tartozó aszkomikóta gombafaj, amelyet elsőként szőlőből írtak le, és azóta világszerte kimutatták különböző szőlőtermő régiókban, többek között Kaliforniában, Magyarországon, Olaszországban és Iránban is (Crous és mtsai, 2021; Lawrence és mtsai, 2013; Senanayake és mtsai, 2015).

A *S. vitis* és rokon fajai elsősorban endofiton vagy szaprofita életmódot folytatnak, azonban kedvező körülmények között opportunistá kórokozóként viselkedhetnek, és hozzájárulhatnak a szőlő tőkebetegségek komplex kóroki rendszeréhez. Kórokozó tulajdonságainak első magyarországi igazolása után (Váczy, 2017), kaliforniai vizsgálatokban a mesterségesen fertőzött szőlőnővényeken a faj nagyobb elváltozásokat okozott, mint a kontrollokban és a gomba sikeresen visszaizolálható volt. (Lawrence és mtsai, 2013). A rendelkezésre álló adatok alapján a *S. vitis* fontos kísérőeleme lehet a szőlőfatörzsi betegségek komplexének, bár önálló jelentősége valószínűleg csekélyebb.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A szőlőt megtámadó kórokozó gombák biológiájának és ökológiájának mélyreható ismerete alapvető a gyakorlati növényvédelem szempontjából – akár a vegetációs periódushoz kötődő fertőzésekről, akár a fás részekben perzisztensen fennmaradó tüneteket kiváltó kórokozókról van szó. Optimális esetben bőséges információ áll rendelkezésre azokról a kórokozó fajokról, amelyek modellorganizmusokként szolgálnak; más esetekben azonban – különösen, ha a tünetképződés mikrobiális interakciókhoz kapcsolódik – jóval korlátozottabbak az ismereteink.

Bár a *B. cinerea* a növénykórtani kutatás elismert modellmikroorganizmusának számít, és a szőlőtermesztésben értéknövelő szerepet is betölthet, a nemesrothadással összefüggő biológiai és ökológiai ismeretek sokáig hiányosak voltak. Az utóbbi években azonban lehetőség nyílt arra, hogy a nemes- és a szürkerothadás közötti különbségek biológiai, élettani és környezeti alapjai feltárásra kerüljenek.

A szőlő tőkebetegségei esetében a kórfolyamatok összetett, több mikroorganizmusra épülő etiológiája, a mikrobaközösségek kölcsönhatásai és a gazdanövény elhúzódó reakciói miatt a betegségek sokáig „black box”-ként (nehezen feltárható rendszerként) jelentek meg: a tünetek és a kórokozók pontos összekapcsolása, valamint a betegség dinamikájának leírása mindmáig csak részlegesen ismert, ami komoly kihívást jelent a gyakorlati növényvédelem számára.

E szempontok alapján munkánk alapvető célkitűzéseként a szőlő botritiszes fertőzései és tőkebetegségei során érvényesülő molekuláris és mikrobiális kölcsönhatások feltárását határoztuk meg:

1. A *B. cinerea* okozta szürke és nemesrothadásos folyamatok biológiai hátterének és a folyamatok különbségeinek kimutatása a funkcionális gének expressziós profiljának elemzésére alapozva egészséges, szürkerothadásos és nemesrothadásos minták transzkriptomjának vizsgálatával, valamint a szüreti időpontoknak a biokémiai folyamatokra és azok borászati következményeire gyakorolt hatásával összefüggésben.
2. A nemesrothadás és szürkerothadás mikrobiális hátterének feltárása, különös tekintettel a *B. cinerea* mellett jelen lévő és a folyamatokban meghatározó fonalas gombák és élesztők génexpressziós és metabolikus aktivitásának összehasonlító elemzésére, valamint a gazda–kórokozó és mikroba–mikroba kölcsönhatásokra.
3. A nemesrothadás és a szürkerothadás fejlődési fázisainak és a szőlő–kórokozó kölcsönhatások összehasonlító vizsgálata, a környezeti feltételek, a génexpressziós mintázatok és a *B. cinerea* életmódváltásának szerepe a két rothadástípus elkülönülésében és egymásba alakulásában.
4. A nemesrothadásban részt vevő fonalas gombák milyen funkcionális génexpressziós és metabolikus folyamatokon keresztül járulnak hozzá az aszúsodó szőlőbogyók biokémiai átalakulásaihoz és a botritiszes borok egyedi aroma- és érzékszervi profiljának kialakulásához.

5. A nemesrothadás dinamikájának és környezeti feltételeinek meghatározása; a szüreti hónapok és az évjáratok sajátosságok milyen mértékben befolyásolják a *B. cinerea* micéliumnövekedését és morfortípusait, valamint ezek hogyan kapcsolódnak a nemesrothadás előfordulásához és lefolyásához.
6. A nemesrothadás különböző fázisainak, a szüreti időpontnak és a szőlőfajtnak a szőlőbogyók fizikai, kémiai és mikrobiológiai tulajdonságaira gyakorolt hatásának vizsgálata, különös tekintettel a texturális jellemzők, a kémiai összetétel és a gombaközösségek dinamikájának feltárására.
7. A nemesrothadás fázisainak transzkriptomikai jellemzése, a *B. cinerea* génexpressziós mintázatainak és anyagcsere-folyamatainak feltárása annak megértésére, miként járul hozzá a szőlőbogyó szerkezeti változásaihoz, és mely génfunkciók segítik kompetitív előnyét és ökológiai dominanciáját.
8. Az aszúsodó szőlőbogyó mikrobiomjában jelen lévő, további fonalas gombák és élesztők funkcionális génexpressziójuk és metabolikus aktivitásuk révén miként járulnak hozzá a szőlőbogyók szerkezeti átalakulásaihoz és a botritiszes borok egyedi aroma- és érzékszervi profiljának kialakításához.
9. Az Esca-betegséggel összefüggésbe hozott gombák jellemzése, amelyek a szőlő „magmikrobiomjának” részeként, jellemzően kommenszális endofitonok és/vagy látens szaprotrófok formájában vannak jelen és amelyek opportunistákként léphetnek fel stresszhatásoknak kitett növényekben; valamint, hogy az abiotikus környezeti tényezők milyen szerepet játszanak a gombaközösségek dinamikájában és a betegség kialakulásában.
10. A növényi mikrobiom jellemzően hasznosnak tekintett tagjai, különösen az *A. pullulans* bizonyos törzsei, milyen mechanizmusokon – például poliszacharid- és fehérjetermelésükön, valamint szinergikus kölcsönhatásaikon – keresztül járulhatnak hozzá az Esca-betegség patogeneziséhez és a levéltünetek intenzitásának alakulásához.
11. Lehetséges tőkebetegség-antagonisták milyen mechanizmusokon – különösen antibiotikus metabolit termelésen vagy mikoparazita képességen – keresztül képesek gátolni a szőlő tőkeelhalással összefüggő patogén gombafajok fejlődését, és *in vitro* és *in planta* kísérletekben igazolt hatékonyságuk megalapozhatja-e a tőkebetegségek elleni biológiai védekezés gyakorlati alkalmazását.
12. A szőlő tőkebetegségeink kialakulásában részt vevő, de eddig a betegség komplexhez nem társított vagy azonosított új mikroorganizmusok meghatározása, patogén tulajdonságuk vizsgálata.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. *B. cinerea* minták gyűjtése, feldolgozása és értékelése

4.1.1. Minták gyűjtése az Egri és a Tokaji borvidéken

A *B. cinerea* izolátumok és a nemesrothadás előfordulásdinamikájának vizsgálatához szükséges mintákat az Egri borvidékhez tartozó Szomolya község határában lévő szőlőültetvényekből gyűjtöttük 2013–2015 őszén. A természetes nemesrothadás következtében kialakult aszús szőlőfürtökről évenként, időszakonként (szeptember, október, november) és szőlőfajtánként gyűjtöttünk aszúsodott bogyókat. A minták feldolgozását a mintavétel napján megkezdjük.

Az aszúszemek vizsgálatához szükséges bogyókat a 2016-os és 2017-es évjáratban a Tokaji borvidékhez tartozó Mád község határában fekvő Betsek-dűlő Furmint- és Hárslevelű-ültetvényeiből gyűjtöttük. A mintavételi időszakot három, egyhónapos periódusra osztottuk (szeptember, október, november), figyelembe véve az aszúszemek fejlődési stádiumait: (1) ép, teljes érettségű szőlőszem; (2) még nem töppedt, barnás-lilás színeződésű szőlőszem; (3) töppedésnek induló, botritiszes szőlőszem; (4) lilás aszúszem, látens gombafonalakkal vagy sporuláló légmicéliummal. A mintákat véletlenszerűen gyűjtöttük, úgy, hogy az előre definiált stádiumok morfológiai variabilitását megfelelően reprezentálják.

A vizsgálatokhoz teljesen sérülésmentes bogyókat választottunk, amelyeket a fürtről kocsánnyal együtt vágunk le. A minták hűtött körülmények között, legkésőbb két órán belül laboratóriumba kerültek, és vizsgálatukat azonnal megkezdjük. A DNS- és RNS-izoláláshoz szánt mintákat steril körülmények között gyűjtöttük, azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, száraz jégen szállítottuk a laboratóriumba, majd feldolgozásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

4.1.2. A *B. cinerea* tenyésztése és a kapcsolódó vizsgálatok paraméterei

B. cinerea tenyésztése fenotípusos vizsgálatokhoz

A mintaterületekről természetes módon aszúsodott szőlőbogyókat gyűjtöttünk a két szőlőfajtról az adott év–hónap kombinációkban. A mintákat Rose Bengal–klóramfenikol (RBCA) táptalajon tenyésztettük, majd egyspórás *B. cinerea*-izolátumokat állítottunk elő, amelyeket burgonya–dextróz agaron (PDA) tartottunk fenn. A növekedési tesztekhez az izolátumok aktívan növekvő pereméről 5 mm átmérőjű micéliumkorongokat vágunk, és a Petri-csészék közepére helyeztük. A lemezeket sötétben, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (optimális hőmérséklet), valamint $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (szuboptimális hőmérsékletek) inkubáltuk.

B. cinerea tenyészetek morfológiai jellemzőinek megállapítása

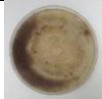
A morfológiai jellemzőket három éven át, három mintavételi hónapban és két szőlőfajtan vizsgáltuk. Az optimális hőmérsékleten ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) tenyésztett izolátumokat 21 napos, sötétben végzett inkubálást követően különböző morfológiai típusokba soroltuk. A tenyészeteket makroszkóposan értékeltük: a sporuláció, valamint a micélium- és

szkleróciumtermelés alapján. E kritériumok szerint az izolátumokat micéliumos (M) vagy szklerotikus (S) típusokba soroltuk a Martinez és mtsai (2003) által leírt beosztás szerint: négy micéliumos (M I–M IV) és négy szklerotikus (S I–S IV) típus. Minden izolátum esetében három ismétlést alkalmaztunk, és a kísérletet kétszer ismételtük.

1. táblázat *A. B. cinerea* izolátumok morfológiai típusai PDA táptalajon 20 °C-on sötétben tenyésztve

^aSporuláció: - = nagyon ritka sporuláció, ± = végül sporulál

^bSzklerócium képzés: 0 = szkleróciumok hiánya, - = nagyon ritka szklerócium képzés¹

Morfológiai típus	Micéliális típus M				Szklerociális típus S			
	M I	M II	M III	M IV	S I	S II	S III	S IV
Micélium	rövid	lég micélium	micélium tömegek	lég micélium	rövid	rövid	rövid	rövid
Sporuláció ^a	-	±	-	±	±	±	-	-
Szklerócium képzés ^b	-	0	-	-	nagy és kicsi szabálytalan	körben	nagy szabálytalan	több elszórt
Megjelenés								

B. cinerea növekedési és morfológiai profiljának statisztikai elemzése

A. B. cinerea-izolátumok növekedési profilját varianciaanalízissel (ANOVA) értékeltük. A kísérleti elrendezésben a tényezőket évjárat, szüretidőpont és szőlőfajta (mint faktorparaméterek), valamint hőmérséklet (ismert, kontrollált változó) szerint variáltuk. A változók együttes hatását is vizsgáltuk (többtenyezős varianciaanalízis), az átlagok összehasonlítását LSD (Least Significant Difference) próbával végeztük ($\alpha = 0,05$).

Az egyes morfológiai típusok gyakoriságát (FD%) évjáratonként, mintavételi hónaponként és fajtánként az alábbiak szerint számítottuk:

$$FD\% = \frac{\text{izolátumok száma a morfológiai típus adott osztályaiban}}{\text{izolátumok teljes száma}} \times 100$$

A gyakoriságok eloszlását az évjárat, szőlőfajta, szüretidőpont, morfológiai tulajdonságok, valamint ezek interakciói szerint varianciaanalízissel értékeltük; az átlagcsoportosítást itt is LSD-próbával végeztük ($\alpha = 0,05$).

A morfológiai csoportok évjárat és szüretidőpont szerinti eloszlásának feltárására nem-metrikus többdimenziós skálázást (NMDS) alkalmaztunk. Az ordinációban vizuálisan észlelt elkülönülés szignifikanciáját PERMANOVA-val (permutációs varianciaanalízis) teszteltük. Az elemzéseket a Genstat 5 Release 4.1 (Lawes Agricultural Trust, IACR, Rothamsted, Egyesült Királyság) szoftverrel végeztük.

¹ A dolgozat valamennyi táblázata és ábrája a dolgozat alapjául szolgáló saját publikációkból származik.

4.1.3. Szőlőbogyók fizikai, kémiai és mikrobiológiai jellegzetességei

A szőlőbogyók fizikai (texturális) tulajdonságait TA.XT2i típusú textúraelemző készülékkel (Stable Micro Systems, Surrey, Egyesült Királyság) mértük; az adatok kiértékelését a készülékhez tartozó Texture Expert Exceed szoftvercsomaggal végeztük.

Az alapanalitikai paramétereket WineScan készülékkel (FOSS Analytical, Dánia) határoztuk meg. A nemesrothadás stádiumaiban minden szőlőfajta × hónap × év kombinációban a begyűjtött bogyókat zúztuk, majd a keletkezett mustot szűrést és centrifugálást követően vizsgáltuk: cukortartalom (°Brix), titrálható savtartalom (TA) és pH.

A botritizálódási stádiumok fiziko-kémiai összefüggéseinek elemzése

A fizikai és kémiai vizsgálatok eredményeit egységes adatbázisba rendeztük; az így kapott, tipikusan sokváltozós statisztikai problémához a szakirodalomban szokásos vizualizációs és értelmezési eljárásokat alkalmaztuk. Az adatok statisztikai elemzését R 4.0.3 környezetben, RStudio felületen végeztük, több csomag (vegan, mixOmics, FactoMineR 2.0-5) felhasználásával (Oksanen és mtsai, 2001).

A vizsgált változókra varianciaanalízist alkalmaztunk. Az aszúsodási fázisok (1–4. fázis), a szőlőfajták (Furmint, Hárslevelű), valamint a gyűjtési időpontok (szeptember, október, november) csoportjait Fsk, Esk, Wsk, bogyókeménység (BH), cukortartalom (°Brix), pH, titrálható savtartalom (TA, borkősav-egyenértékben) és mikrobiális összetétel alapján hasonlítottuk össze. Az adattisztításhoz Rosner-féle kiugróérték-tesztet alkalmaztunk; az adatokat skáláztuk és standardizáltuk (0 átlag, 1 szórás). Szükség esetén transzformált (normalizált) adatokat használtunk.

A bogyók mikroorganizmus közösségének meghatározása

A mikrobiális sokféleség elemzéséhez szelektív táptalajokat alkalmaztunk: klóramfenikol–glükóz agar (CGA), Czapek–Dox agar (CZA) és tripton–glükóz–kivonat agar (TGEA) a gombák tenyésztéséhez. A monospórás izolátumokat burgonya–dextróz agaron (PDA) és élesztőkivonat–pepton–dextróz agaron (YPD) tartottuk fenn. A gombák DNS-kivonását NucleoSpin Plant II készlettel végeztük (Macherey-Nagel, Düren, Németország). A molekuláris azonosításhoz fonalas gombák esetén az ITS1-F (Gardes és Bruns, 1993) és ITS4 (White és mtsai, 1990), élesztőgombák esetén NL1 és NL4 (Peterson és Kurtzman, 1991) primereket használtuk. A PCR-termékeket QIAquick PCR Purification Kit segítségével tisztítottuk (Qiagen, Hilden, Németország), a szekvenálást a BaseClear (Leiden, Hollandia) végezte.

A jó minőségű szekvenciákat 97%-os szekvencia-hasonlósági küszöb mellett operatív taxonómiai egységekbe (OTU-k) csoportosítottuk az USEARCH v11(Edgar, 2013) programmal. Az OTU-kat az NCBI nukleotid-adatbázisban végzett páronkénti hasonlóságkeresés alapján rendeltük taxonómiai csoportokhoz.

4.1.4. A szőlőbogyók teljes DNS és RNS kivonása

A begyűjtött, mélyfagyasztva tárolt szőlőbogyókat előhűtött kerámia dörzsmozsárban, folyékony nitrogén jelenlétében porrá őröltük, majd a port mintánként 2 ml-es Eppendorf-csövekbe transzferáltuk, és a felolvadás elkerülésével visszahelyeztük -80°C -ra. A minták őrlését követően a teljes DNS-t DNeasy Plant Mini Kit-tel izoláltuk (Qiagen GmbH, Németország). A kivont DNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 2000 UV-látható spektrofotométerrel ellenőriztük (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Az aszúsodott szőlőbogyókból történő RNS-izolálás és az izolátumok újgenerációs szekvenálásra (NGS) történő előkészítése nem bizonyult rutinszerűnek. A bogyók magas cukor- és polifenoltartalma megnehezítette az RNS elkülönítését, tisztítását és az esetleges amplifikációt. A teljes RNS izolálásához a céljainknak megfelelő, hatékony módszert dolgoztunk ki, amelyet módszertani fejlesztésként publikáltunk, és amellyel jó minőségű RNS-t nyertünk mintáinkból (Kiss és mtsai, 2024).

A kivont RNS-mintákat -80°C -on tároltuk a szekvenálásig. Az RNS minőségét NanoDrop 2000 spektrofotométerrel és Agilent 2100 Bioanalyzer készülékkel (RNA 6000 Nano Kit; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) ellenőriztük. Megfelelő minőségűnek és mennyiségűnek azokat a mintákat tekintettük, amelyek RNS-koncentrációja $\geq 50\text{ ng}/\mu\text{l}$ volt, és a számított RIN (RNA Integrity Number) érték elérte a 4-et.

4.1.5. Szekvenálás és szekvencia-adatok feldolgozása

A DNS-amplikon-szekvenálást és a metatranszkriptomikai RNS-szekvenálást külső szolgáltató végezte. A kapott nyers leolvasásokat (FASTQ) minőségellenőrzés, trimmelés és szűrés után feldolgoztuk, amely magában foglalta az olvasatok összeillesztését/denoizálását, a kiméra-szekvenciák eltávolítását és a taxonómiai hozzárendelést; a metatranszkriptomok esetében pedig a térképezést és a génexpressziós mátrix előállítását.

DNS amplikon szekvenálás és feldolgozás

A nyers DNS-szekvenciákat R környezetben (R Core Team, 2023), DADA2 csomaggal dolgoztuk fel (Callahan és mtsai, 2016) amely a finom szekvencia-variáció felismerésére szolgál. A munkafolyamat magában foglalta a minőségi szűrést, a primerlevágást, az egyedi amplikonszekvencia-variánsok (ASV-k) meghatározását, a páros olvasatok összeillesztését, valamint a kiméra-szekvenciák eltávolítását. Mivel a DADA2 nem végez 97%-os operatív taxonómiai egység (OTU) szerinti klaszterezést, a továbbiakban az ASV-alapú kimenetet használtuk; ez az intra- és interspecifikus variációt egyaránt megőrzi, és lehetővé teszi a fajszintű különbségek feltárását a kölcsönhatások elemzésében.

A nyers olvasatokat 240 bp-ra (forward) és 200 bp-ra (reverse) vágtuk, az olvasatonként megengedett maximális várható hibák számát 2-re állítottuk. A zaj- és kiméra-szűrést követően az összeillesztett ASV-kat használtuk a downstream elemzésekhez (nem végeztünk külön 97%-os OTU-klaszterezést).

A gombák taxonómiai hozzárendelését az UNITE referenciaadatbázisra a „dynamic delimitation” fajhipotézis-kerette (Köljalg és mtsai, 2013), alapoztuk, USEARCH v11 szoftverrel (Edgar, 2010) végzett páronkénti hasonlóságkeresés segítségével.

MetaRNS szekvencia-adatok feldolgozása

Az RNS-leolvasások minőségét a FastQC v0.11.5 (Babraham Bioinformatics, Egyesült Királyság) segítségével értékeltük. A leolvasások szűréséhez a Trimmomatic v0.36-ot használtuk a TruSeq2-PE adapterek eltávolítására (single clip threshold, palindrome threshold, seed mismatches; Bolger és mtsai, 2014). Ezt követően a leolvasásokat minőség szerint tovább szűrtük a FASTX-Toolkit eszközeivel, majd a khmer v2.1.1 Python-szkripttel (Howe és mtsai, 2014) normalizáltuk. Az alacsony abundanciájú fragmentumokat a filter-abund.py -V paranccsal távolítottuk el.

Az így kapott jó minőségű leolvasásokat a *B. cinerea*, *A. alternata*, *A. pullulans*, *E. nigrum* és *R. graminis* referencia-genomokra igazítottuk (Van Kan és mtsai, 2017), majd a Salmon v1.3.0 (Patro és mtsai, 2017) segítségével kvantifikáltuk. Ezt követően a transzkripteket génekhez rendeltük az egyes genomok GFF-annotációja alapján, az R GenomicFeatures csomagját használva (Lawrence és mtsai, 2013). Az RNS-szekvenciákat az NCBI-ban a BioProject PRJNA736205 és a BioSample SAMN19612984 alatt tettük hozzáférhetővé.

4.1.6. Szekvencia-adatok elemzése

Alapvető statisztikai módszerek

Mind a textúraadatokat, mind az újgenerációs szekvenálással előállított adatokat alapvető statisztikai elemzésnek vetettük alá. Megvizsgáltuk az adathalmaz általános tulajdonságait, eloszlását, az esetleges kiugró (outlier) értékeket, és egyszerű szignifikáns eltéréseket kerestünk az általunk definiált mintacsoportok között (mintagyűjtési idő, aszúsodási fázis, szürke- vagy nemesrothadás stb.). Az alapvető statisztikai elemzéseket az R programkörnyezetben, RStudio felhasználói felületen végeztük (R 4.2.0; RStudio „Prairie Trillium”).

A minták közötti szignifikáns különbséget minden esetben $p = 0,05$ szignifikanciaszinten határoztuk meg. A DNS-szekvenciákból származó ASV-k abundancia- és gyakoriságértékeit (richness) hasonlítottuk össze a különböző kategóriák között, és ugyanezt elvégeztük a génexpressziós adatok abundancia- és gyakoriságértékeire is. Mindkét szekvenciaadatsor esetében Bray–Curtis távolságmetrikát alkalmazva mind PCA-t (főkomponens-analízis), mind NMDS-t (nem-metrikus többdimenziós skálázás) számítottunk.

A kétdimenziós (2D) ábrázolás alapján választottuk ki, melyik ordinációs eljárás felel meg jobban a célkitűzéseinknek. A főkomponens-analízis az adatok legnagyobb varianciáját emeli ki, ugyanakkor a >5000-dimenziós génexpressziós adathalmaz 2D-re redukálásakor az információ jelentős része elveszhet. Erre megoldást jelent az NMDS ordináció, amely jobban megőrzi az adatpontok pártávolságait, noha kevésbé hangsúlyozza a legnagyobb

variációjú tengelyeket. A transzkriptomikai és a gombaközösség-adatok esetében is az NMDS bizonyult megfelelőbbnek. Az ordináció során vizualizált kategóriák közötti elkülönülés mértékét és szignifikanciáját PERMANOVA-val (permutációs varianciaanalízis) ellenőriztük.

DNS adatok elemzése

Az amplitikon szekvenálással nyert DNS adatokat előzetes feldolgozás után bioinformatikai módszerekkel értelmeztük. A gombaközösségi mátrixot, amely a mintákban azonosított ASV-k (amplitikon szekvencia variáns) esetén az adott ASV-hez tartozó read-ek számát tartalmazza, a legkisebb könyvtárméretre (413 538 read) történő véletlenszerű almintavétellel normalizáltuk (ritkítettük), mintánként a vegan_R csomagban található rarefy függvény segítségével (Oksanen és mtsai, 2001). Az egyetlen mintában előforduló ASV-ket kizártuk; a végső elemzésekhez 1157 ASV maradt.

A kategóriás változók (aszúsodás típusa, mintavétel ideje) fajgazdagságra (ASV-szám) és abundanciára gyakorolt hatását egy- és kétutas varianciaanalízissel vizsgáltuk; a páronkénti különbségeket Tukey HSD próbával azonosítottuk. Az ASV-abundanciát és a fajgazdagságot boxploton ábráztuk (ggplot2; Wickham, 2016). A minták összetételbeli különbségeit Bray–Curtis távolság alapján NMDS-szel (vegan metaMDS) szemléltettük, az elkülönülés szignifikanciáját pedig PERMANOVA-val becsültük (vegan adonis; 999 permutáció; Oksanen és mtsai, 2001). A különböző bogyótípusoknál meghatároztuk a leggyakoribb gombanemzetségeket, és ezeket használtuk a metatranszkriptomikai illesztéshez szükséges referencia-genomok kiválasztásához.

RNS-adatok elemzése

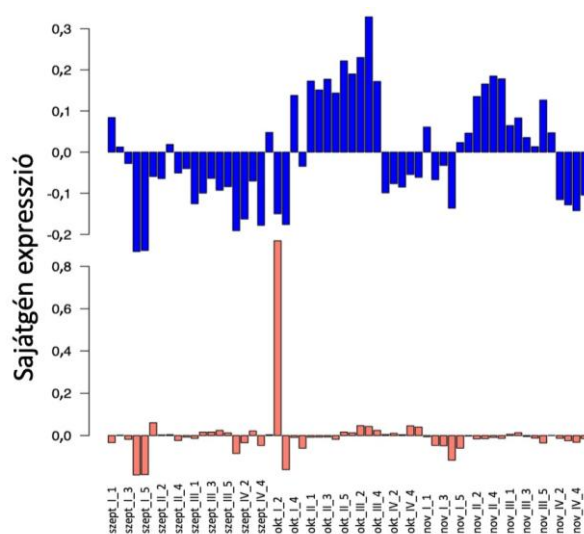
Az RNS-adatok elemzéséhez az R statisztikai környezetet használtuk (R Core Team, 2023). ANOVA-t és Tukey HSD-tesztet végeztünk a *B. cinerea* funkcionális gének abundanciájának és gyakoriságának elemzésére a négy aszúsodási fázis és a három mintavételi időpont szerint, valamint a szürke- és nemesrothadási típusok esetében két mintavételi időpont szerint. Ezzel a vizsgált gének mennyiségi eloszlását értékeltük. A funkcionális gének fázisok és időpontok közötti trendjeinek vizualizálására a korábban is használt NMDS-ordinációt alkalmaztuk (a vegan R-csomaggal) az összes *B. cinerea* gén esetében, a normalizált arányok mediánjaira alapozva (Oksanen és mtsai, 2001). Az NMDS futtatásakor Bray–Curtis-disszimilaritást és véletlenszerű kezdőszámot használtunk, futtatásonként 9 999 iterációval.

A funkcionális génösszetétel változásainak összehasonlítására az aszús fázisok között páros differenciális expressziós (DE) elemzést végeztünk az I–II., II–III. és III–IV. fázisok között a DESeq2 R-csomaggal (Love és mtsai, 2014). A szignifikánsan differenciálisan expresszált gének küszöbértékeként $p < 0,05$ és $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ feltételt alkalmaztunk. Az expressziós mátrixot hálózatelemzési módszerrel modulokba rendeztük.

A szomszédos fázisokhoz tartozó, differenciálisan expresszáldó, felül- vagy alulszabályozott funkcionális géneket NRCM-tagság alapján rendeztük és csoportosítottuk. A kiválasztott modulok génontológiai elemzését a topGO R-csomaggal (Ashburner és mtsai, 2000), míg az útvonal-feldúsulást a KOBAS v2.0 szoftverrel végeztük (Xie és mtsai, 2011). A korrigált p-érték $<0,05$ esetén a génkifejeződések és útvonalak szignifikánsan feldúsultnak minősültek. A szignifikánsan feldúsult anyagcsere-útvonalakhoz tartozó géneket az UniProt adatbázisban azonosítottuk (The UniProt Consortium, 2015), és az innen származó információkat használtuk funkcióik leírásához.

4.1.7. Hálózatelemzés a metatranszkriptomikai adatok elemzéséhez

A *B. cinerea* és a kiválasztott egyéb gombák funkcionális génjeinek elemzését, valamint a génexpressziós szintek és a bogyó textúraadatok összevetését a WGCNA R-csomaggal végeztük (Weighted Gene Coexpression Network Analysis; (Langfelder és Horvath 2008) súlyozott gén-koexpressziós hálózatelemzéssel. Az elemzéseket minimális klaszterméret = 100, Pearson-korreláció mellett futtattuk; a skálázási hatványkitevőt 12-re, a modul-összevonási küszöböt 0,25-re állítottuk. A klaszterezést hálózati dendrogramként vizualizáltuk. A mért texturális paraméterek és a gének között Pearson-korrelációt számoltunk a szignifikáns összefüggések becslésére. Az együtt expresszáldó gének moduljait a modul első főkomponensével (sajátgén, module eigengene) reprezentáltuk. A textúraparaméterek és a koexpressziós modulok közötti korrelációt és szignifikanciát szintén kiszámítottuk. Azokat a koexpressziós modulokat, amelyek az aszúsodás folyamatával összefüggést mutattak – azaz sajátgén-értékeik a mintavételi időpontok vagy az aszúsodási fázisok között szignifikánsan különböztek – NRCM-nek neveztük (Noble Rot Connected Modules; 1. ábra). Az NRCM-ek sajátgén-értékei alapján ANOVA-t alkalmaztunk a szomszédos fázisok és időpontok közötti szignifikáns különbségek kimutatására.



1. ábra Modul sajátgén expressziós profil. Vízszintes tengely: mintanevek, függőleges tengely: normált elméleti abundancia értékek. A vízszintes tengely felirata a jobb olvashatóság érdekében csak minden második oszlophoz tartozó mintanevet jelenít meg: [mintagyűjtési hónap] [aszúsodási fázis] [ismétlés száma], ahol szept szeptembert, okt októbert, nov november jelöli

Az egyes vizsgált modulokon belül meghatároztuk a module membership (kME) értéket, amely a gén expressziós profilja és a modul sajátgénje (eigengene) közötti korreláció. A géneket modulon belül a kME alapján rendeztük sorba; a legnagyobb értékűeket hub-géneknek tekintettük ($kME > 0,8$, és a legmagasabb 10%). Ha ez sok gént eredményezett, a száz legmagasabb kME-értékű gént választottuk ki további vizsgálatra (Panahi és Hejazi, 2021). A kiválasztott hub-géneket funkcionálisan elemeztük; a génfunkciók azonosításához az UniProt adatbázist használtuk (The UniProt Consortium, 2015).

4.2. Szőlő tőkeelhalás minták gyűjtése, feldolgozása és értékelése

4.2.1. A szőlő fás részeinek és környezetének mikrobiom analízise

Mintavétel mikrobiom vizsgálatokhoz

A mintagyűjtés a Tokaji borvidék három, eltérő mezoklimatikus és talajtani adottságú helyszínén történt: a Szent Tamás-dűlőben, valamint a Nagy-Kopasz-hegy déli és északi lejtőin, Furmint-tőkékről. Mindhárom ültetvényben nyolc tőkét választottunk ki: négyet, amelyet az előző évben az Esca-betegség tünetei miatt megjelöltünk, és négy tünetmenteset; így összesen 24 tőkét vontunk be a vizsgálatba.

A tünetesnek minősített növények a szakirodalomban ismertetett diagnosztikai kritériumok szerint tipikus Esca-tüneteket mutattak (pl. „tigrismintás” levélszíneződés, hajtások hirtelen elhalása). Minden növényről három mintaforrásból (mikroélőhelyről) vettünk mintát: kéreg, élő évelő farész és környező talaj. A talajmintákat a tőke körüli 50 cm-es körzetben négy ponton, 20 cm mélységből gyűjtöttük. A kéregmintákat steril szikével távolítottuk el a törzs négy pontjáról.

Az élő farész mintáit a kéreg alól, steril fúróval vettük; a fúrót minták között 4% (v/v) aktív klórtartalmú oldattal fertőtlenítettük. Az egyes mikroélőhely-típusokból származó négy-négy mintát növényenként összevontuk, a mintákat azonnal laboratóriumba szállítottuk, és -80°C -on tároltuk. Feldolgozás előtt a mintákat 72 órán át fagyasztva szárítottuk, majd szövetőrő készülékben fémgolyókkal homogenizáltuk.

Faszöveti- és talajminták DNS izolálása és szekvenálása

A talajból és növényi részekből származó, liofilezett és homogenizált mintákból kb. 0,5 ml-nyi mintaanyagból vontuk ki a genomi DNS-t a NucleoSpin Soil és NucleoSpin Plant DNS-izoláló kitékkel (Macherey-Nagel, Düren, Németország) a gyártói protokoll szerint. Az ITS2 rDNS-régiót PCR-rel amplifikáltuk minden mintából az fITS7 (Ihrmark és mtsai, 2012) és ITS4 (White és mtsai, 1990) primerekkel, Illumina-adapterekkel kiegészítve (Illumina, San Diego, CA).

A mintákhoz tartozó szekvenciák egyértelmű azonosítására második PCR-lépésben az Illumina-adapterekhez mintaspecifikus indexeket kapcsoltunk. A DNS-extraktumok normalizálását, a PCR-reakciókat, valamint a 250 bázispár hosszúságú párosvégű Illumina MiSeq-szekvenálást (amplikon-könyvtárak) a BaseClear laboratórium végezte (Leiden, Hollandia).

Szekvencia-adatok elemzése

A statisztikai elemzéseket R szoftverkörnyezetben végeztük. Azokat a mintákat, amelyekben a gombák szekvenciáinak száma kevesebb volt mint 1000, kizártuk az értékelésből. A gombaközösségek mátrixát véletlenszerű almintavételezéssel normalizáltuk, minden mintára a legkisebb könyvtárméretre, a vegan csomag `rarefy` függvényének segítségével (Oksanen és mtsai, 2001). Az elemzés során kizártuk azokat az amplikonszekvencia-variánsokat (ASV-ket), amelyek egyetlen mintában fordultak elő.

A kategóriaváltozók – a mintavételi forrás, a terroir és az egészségi állapot – szignifikáns befolyásának meghatározásához az ASV-gazdagságot (fajszám) és a patogén gombanemzetségek abundanciáját egy- és kétutas varianciaanalízissel (ANOVA) elemeztük. A kétutas modellekbe csak azokat a változókat vontuk be, amelyek az egyutas ANOVA során szignifikánsnak bizonyultak. A páronkénti különbségeket Tukey-féle HSD (Honestly Significant Difference) próbával azonosítottuk. Az ASV-gazdagság és a patogén gombanemzetségek abundanciája dobozdiagramokon került ábrázolásra a `ggplot2` csomaggal (Wickham, 2016) a „mintaforrás + terroir” kétváltozós modell alapján.

A minták közötti közösségi összetételbeli eltéréseket nem-metrikus többdimenziós skálázással (NMDS) vizualizáltuk Bray–Curtis távolság alapján, a `metaMDS` függvény alkalmazásával. A mintavételi forrás, terroir és egészségi állapot által magyarázott varianciát permutációs többváltozós varianciaanalízissel (PERMANOVA) becsültük a `vegan` csomag `adonis` függvényével, 9999 permutációval. A kategóriaváltozókat külön-külön, majd a szignifikánsnak bizonyult változókat együtt, egy közös modellben is értékeltük, figyelembe véve az esetleges korrelációkat.

A növénypatogén gombák ASV-einek eloszlását a tünetmentes és tünetes szőlőtőkék között hálózati diagramokon szemléltettük a kéreg, az évelő fás szövet és a talaj mintái esetében, jelenlét–hiány mátrixok alapján, az `sna` csomaggal (Butts, 2008) Ezen kívül indikátorfaj-analízist (Dufrêne és Legendre, 1997) is végeztünk az `indicspecies` csomag `multipatt` függvényével (De Cáceres és mtsai, 2010), 999 permutációval, hogy feltárjuk az adott mikroélőhelyre és egészségi állapotra jellemző, diagnosztikus gombapatogéneket.

A nyers DNS-szekvenciák feldolgozása a `dada2` csomaggal (Callahan és mtsai, 2016) történt, R szoftverkörnyezetben (R Development Core Team, 2013). A nyers szekvenciákat 240 bázispárra vágtuk vissza az előre irányuló olvasatoknál, és 200 bázispárra a visszafelé irányulóknál, majd zajsűrés, kiméra-sűrés, olvasat-összeillesztés és variánsképzés történt. A megengedett maximális hibaszám olvasatonként 2 volt. A gombák taxonómiai hozzárendelése az UNITE adatbázis alapján történt, amely az összes gombafaj-hipotézist dinamikusan határolt referenciaszekvenciákkal képviseli (Köljalg és mtsai, 2013), a besorolást a `USEARCH v11` programmal végeztük (Edgar, 2013).

A növénypatogén gombákhoz tartozó ASV-k kiválasztása az ismert növénypatogén gombanemzetségek listája alapján történt (Tedersoo és mtsai, 2014), amelyet irodalmi

kereséssel egészítettünk ki a listán nem szereplő, de tőkebetegség-kórokozóként ismert nemzetségek azonosítására.

4.2.2. Mikrobiális kölcsönhatás vizsgálatok

Mintagyűjtés és feldolgozás

Az endofiton fonalas gombák izolálását *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon Esca-tünetes tőkéknek faszöveti mintáiból végeztük. A faanyagban élő gombák kinyeréséhez a tőkék törzséből kis méretű szövetdarabokat vágunk. Mivel a lombtünetek súlyossága jelentős variabilitást mutatott, a mintavételt közvetlenül azok alatt a törzsszegmensek alatt végeztük, amelyekhez a lombtünetek alapján korábban beazonosított vesszők tartoztak. A mintákat burgonya-dextróz agar (PDA) táptalajra helyeztük, amelyet 10 µg/ml oxitettraciklinnel egészítettünk ki a baktériumnövekedés gátlására. A Petri-csészéket 25 °C-on négy héten át inkubáltuk. A növekvő micéliumokat egyenként új PDA-táptalajra vittük át, majd a tiszta tenyészeteket aktívan növekvő micéliumrész átvitelével, illetve – ahol rendelkezésre állt – konídiumok átvitelével nyertük. A törzseket 50% (v/v) glicerolban, –80 °C-on tároltuk.

A gombatenyészetekből a teljes DNS-t DNeasy Plant Mini Kit-tel (Qiagen) vontuk ki. Az ITS-régiót ITS1-F és ITS4 primerpárral amplifikáltuk, az amplikonokat szekvenáltattuk (BaseClear B.V., Hollandia), majd a kapott szekvenciákat online adatbázisokban BLAST kereséssel hasonlítottuk össze. A gombatörzsek azonosítása szekvenciahasonlóság és morfológiai jellemzők alapján történt.

Az Esca-tüneteket mutató tőkék farészében előforduló *A. pullulans* jelenlétének mennyiségi meghatározásához tünetes és tünetmentes Cabernet Sauvignon tőkékről gyűjtöttünk mintát. A mintavétel a tünetek súlyossága alapján kijelölt vesszők tövéénél, a törzs steril fúrásával történt. A mintákat liofileztük, majd sejtfeltáró készülékben rozsdamentes acélgolyóval homogenizáltuk. A DNS-izolálást a gyártói protokoll szerint DNeasy Plant Mini Kit-tel (Qiagen) végeztük. Az *A. pullulans*-specifikus DNS mennyiségét fajspecifikus primerekkel határoztuk meg (Martini és mtsai, 2009).

Gombák közötti kölcsönhatások in vitro vizsgálata

Az *in vitro* kísérletekhez az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora*, valamint a *Ph. minimum* közötti konfrontációs teszteket végeztünk az Esca-betegség által érintett szőlőtőkéről izolált gombákkal. Az egyhetes telepek széli régióiból kivágott micéliumkorongokat burgonya-dextróz agarra (PDA) helyeztük, egymástól 5 cm távolságra, és kontrollként az adott gombatörzseket külön-külön is beoltottuk (kombinációnként 3 párhuzamos ismétlésben), majd a Petri-csészéket sötétben, 25 °C-on két héten át inkubáltuk.

Az *A. pullulans* Y60 és a *P. chlamydospora* P3 törzseit külön-külön 3 × 100 ml folyékony élesztő kivonat-glükóz táptalajba oltottuk, és 7 napon át 25 °C-on, 180 rpm fordulatszámon inkubáltuk. A tenyésztést követően a gombamicéliumot szűréssel eltávolítottuk, majd a tenyészetfiltrátumot 0,2 µm pórusméretű membránon sterillé

szűrtük. A filtrátumot PDA-ba kevertük, és 50%, 25%, 12,5% és 0% (v/v) koncentrációjú táplemezeket állítottunk elő. Kontrollként 50% (v/v) élesztőkivonat-glükóz tápközzel kiegészített PDA-lemezeket készítettünk.

A növekedési sebesség és a sporuláció hatásának mérésére micéliumkorongokat helyeztünk a táptalajokra, míg a csírázás vizsgálatához konídiumokat oltottunk a lemezekre; a lemezeket 8 napon át sötétben, 25 °C-on inkubáltuk. A micéliumnövekedést és a konídiumok csírázását nyomon követtük, majd kiszámítottuk a csírázási rátákat.

A szőlő zöld hajtásainak mesterséges fertőzését az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* közötti *in planta* kölcsönhatás vizsgálatához levágott szőlőhajtásokon (egy rügy, egy internódium, egy levél) végeztük. A hajtásokat felületileg sterilizáltuk, majd a felső harmadukban steril szikével sebet ejtettünk. A mesterséges fertőzésekhez 3 mm átmérőjű micéliumkorongokat használtunk, amelyeket egyhetes telepek széli részéből vágunk ki, és a sebfelületbe helyeztünk.

Minden törzset külön, illetve másik gombafaj egy adott törzsével kombinációban is beoltottunk. Kombinált fertőzés esetén a két törzset 1 cm távolságra helyeztük el. A kontrollnövényeket steril PDA-koronggal oltottuk. A hajtásokat vízbe helyeztük, természetes fényviszonyok között 15 napon át inkubáltuk, majd a levelek relatív felületét vizsgáltuk. A lombtünetek súlyosságának vizsgálatához a szőlőtőkék tünetes leveleit képelemző szoftverrel (Adobe Photoshop CS5) elemeztük, és kiszámítottuk a lombtünetek súlyosságát. Minden egyes vessző esetében a súlyosságot három levél alapján számított átlagértékként határoztuk meg.

Az extracelluláris virulencia faktorok vizsgálata

A betegség kifejeződésében szerepet játszó kölcsönhatások vizsgálata céljából az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* eredetű exopoliszacharidok lehetséges szerepét tanulmányoztuk a lombtünetek kialakulásában. Az exopoliszacharidok kinyeréséhez az *A. pullulans* és *P. chlamydospora* törzsek folyadéktenyészeinek filtrátumához kétszeres térfogatú, 96% (v/v) etanolt adtunk, majd 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A kicsapódott exopoliszacharidokat 4000 rpm-en, 30 percen át centrifugáltuk, majd kétszer 70% (v/v) etanollal mostuk. A szárított mintákat lemértük, és 5 mg/ml koncentrációjú törzssoldatokat készítettünk. A fehérjekoncentrációt Bradford-módszerrel, a poliszacharid-tartalmat a fenol-kénsav-módszerrel határoztuk meg, standardként az előzőekben leírt *A. pullulans* Y60 törzsből tisztított exopoliszacharidot használva. Az abszorbanciát NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) mértük.

Az *A. pullulans* és *P. chlamydospora* eredetű exopoliszacharidok lombtünetekre gyakorolt hatását külön-külön és kombinációban, levélkorong-tesztel vizsgáltuk. Kezelési csoportonként három levélkorongot értékeltünk. A korongokat 24, 48 és 96 órában vizsgáltuk a nekrosis megjelenése szempontjából. A fitotoxikus hatás kvantitatív meghatározásához a korongokról készült fotókon Fiji szoftverrel végeztünk képelemzést (Schindelin és mtsai, 2012).

A statisztikai elemzések során a csoportok közötti különbségek szignifikanciáját varianciaanalízissel (ANOVA), Tukey-féle utótesztel értékeltük, a korrelációkat Spearman-próbával határoztuk meg. Mindkét esetben a $p < 0,05$ érték alatti eredményeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Mikroszkópos vizsgálatok

A szilárd táptalajon növekvő gombatelepek vizsgálatához a tenyészetekből közvetlenül szikével vágunk szeleteket: 3–5 mm széles, 1–2 mm vastag hossz- vagy keresztmetszeti darabokat. A gombasejteket tárgylemezre helyeztük, fedőlemezzel lefedtük, és mikroszkóposan vizsgáltuk. Fluoreszcens festéshez a mintákat 100 µg/ml koncentrációjú akridin-narancs oldatba merítettük desztillált vízben 5 percig, majd 10 percig desztillált vízben öblítettük, tárgylemezre helyeztük, fedőlemezzel lefedtük, és vizsgáltuk. A gombával inokulált szőlő faszöveteket kongóvörös festéssel kezeltük (8 mg/ml, 10 perc), desztillált vízben 10 percig mostuk, majd tárgylemezre helyeztük.

A mikroszkópos vizsgálatot Olympus BX53F2 (Olympus Corporation, Tokió, Japán) készülékkel végeztük DIC (differenciál interferencia kontraszt) és PC (fáziskontraszt) optikai tartozékokkal. A fluorofórokat LED-fényforrás ($\lambda = 360\text{--}665$ nm) gerjesztette. A különböző fluoreszcens festékekhez kongóvörös, akridin-narancs, valamint a szőlőfaszövet autofluoreszcenciájához illesztett szűrőkészleteket használtunk. A fényképeket és mikroszkópos felvételeket Adobe Photoshop CS6 segítségével dolgoztuk fel, a képelemzést Fiji szoftverrel végeztük (Schindelin és mtsai, 2012).

Gomba metabolitok mérése

A gombatörzseket élesztőkivonat–szukróz szilárd táptalajon tenyésztettük, majd a telepek közepéről kivágott agar-korongokat szobahőmérsékleten kétszer, egyenként 0,5 ml etil-acetáttal extraháltuk. A metabolitokat gázkromatográfiás–tömegspektrometriás (GC–MS) módszerrel mértük, autosamplerrel felszerelt Clarus 600 GC és Clarus 600T MS készüléken (PerkinElmer, Waltham, USA). A kromatográfiához polietilén-glikol oszlopot használtunk (VF-WAXms, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) split módban, hélium vivőgázzal, 1 ml/perc áramlási sebességgel. A hőprogram: 60 °C (2 perc), majd 10 °C/perc sebességgel 120 °C-ig, ezt követően 5 °C/perc sebességgel 240 °C-ig. Az ecetsav-tartalmat ecetsav-standard segítségével határoztuk meg; a mért értékeket az agar-korong térfogatára normalizáltuk.

A statisztikai elemzést és az adatok vizualizációját GraphPad Prism 5 szoftverrel végeztük, egyutas ANOVA és Tukey HSD utóteszt alkalmazásával.

4.2.3. Potenciális biokontoll ágensek vizsgálata

Gombák izolálása és azonosítása szőlőoltványokból

Egyéves, tünetmentes és igazoltan vírusmentes Cabernet Sauvignon oltványokat vizsgáltunk endofiton gombák izolálásához. Mintavételkor korongmintákat vettünk a szemzés helyéről, attól számított 2 cm-rel lejjebb eső szakaszból, valamint a tőke tövéről.

A korongok felszínét 70% (v/v) etanolban, majd 4% (v/v) aktív klórtartalmú nátrium-hipoklorit-oldatban sterilizáltuk, végül ismét 70% (v/v) etanolban inkubáltuk 2–2 percig. A sterilizált korongokat feldaraboltuk, és a baktériumnövekedés gátlására 10 µg/ml oxitettraciklinnel kiegészített burgonya-dextróz agar (PDA) táptalajra helyeztük; 25 °C-on, sötétben inkubáltuk. A kifejlődő micéliumokból egyspórás izolátumokat készítettünk.

A gombák azonosítása morfológiai bélyegek, valamint az internal transcribed spacer (ITS) régió PCR-amplifikációja és szekvenálása alapján történt, ITS1-F és ITS4 primerekkel. Szükség esetén további markerek szekvenálását is elvégeztük: az elongációs faktor 1-α (TEF1-α) részleges szakaszát EF-728F és EF-986R (Carbone és Kohn, 1999), illetve/vagy a γ-aktin gén részletét ACT-512F és ACT-783R primerekkel (Groenewald és mtsai, 2013).

***In vitro*, mikroszkópos és in planta konfrontációs vizsgálatok**

A *C. rosea* törzsek antagonista képességének vizsgálatára *in vitro* konfrontációs kísérleteket végeztünk tökebetegség-kórokozókkal. A patogén izolátumokat önállóan, illetve *C. rosea* törzsekkel közösen, 5 cm távolságra oltottuk burgonya-dextróz agarra (PDA). Az oltásokhoz a tenyészetek széléről kivágott agar-korongokat használtunk, a lemezeket 25 °C-on, sötétben inkubáltuk. Amikor a patogén telep a *C. rosea* teleptől mért 5 mm-re megközelítette a kontaktzónát (a leggyorsabban növő törzseknél 4–14 nap), minden kultúránál megmértük a kolóniák átmérőjét, és kiszámítottuk a radiális növekedésgátlás (RGI%) értékét (Rodríguez és mtsai, 2011). Amennyiben megfigyelhető volt, feljegyeztük a *C. rosea* túlburjánzását a kórokozókkal való interakciójukban.

A *C. rosea* mikoparazita viselkedésének közvetlen megfigyelésére *Botryosphaeria dothidea* és *Diaporthe spp.* esetében (ahol túlburjánzást észleltünk) 2% vízagaron, steril cellofánnal fedett közegben végeztünk kettős tenyésztést. PDA-ra 3 mm átmérőjű korongokat oltottunk a növekvő telepek széléről, majd 25 °C-on inkubáltuk a közvetlen kontaktus létrejöttéig. A kontaktzónát 5 mM MTT-oldattal (tiazolil-tetrazólium-bromid) festettük 1 órán át 25 °C-on. A cellofánból kivágott, festett szakaszokat tárgylemezre helyeztük és Alpha BIO-5f (OPTIKA, Olaszország) mikroszkóppal, Arctam-500MI digitális kamerával vizsgáltuk.

A *C. rosea* törzsek konídiumtermelését Viccini és mtsai (2007) módszerének módosított változatával határoztuk meg. Az izolátumokat konídiumszuszpenzióval oltottuk PDA-ra, három párhuzamos ismételtsben. A táptalajokat fluoreszcens megvilágítás mellett, 21 ± 2 °C-on 8 napig inkubáltuk. Ezt követően a telepek közepéből 6 mm átmérőjű agar-korongokat vágunk ki, és 1 ml 0,01% (v/v) Tween 80 oldatban szuszpendáltuk. A konídiumok számát Bürker-kamrával határoztuk meg, az értékeket a telepfelülethez normalizáltuk.

A Cabernet Sauvignon dugványokon fúróval sebeket ejtettünk, majd 3 mm átmérőjű, egyhetes PDA-n nevelt telepek széléről kivágott micéliumkorongokkal oltottuk be *E. lata*, *B. dothidea* és *P. chlamydospora* izolátumokkal; kontrollként steril agar-korongokat alkalmaztunk. Az egyik oltványcsoportot 10⁴ konídium g⁻¹ koncentrációjú *C. rosea*

szuszpenzióval kezelt talajba, a másikat kezeletlen talajba ültették. Minden talaj × kórokozó kombinációban öt dugványt használtunk. A növényeket üvegházi körülmények között, természetes fényviszonyok mellett neveltük. Kilencven nap elteltével a növényeket kiemeltük, a kérget eltávolítottuk, a hajtásokat hosszában kettévágtuk, és megmértük a kialakult nektrózisok hosszát. A *C. rosea* újraizolálását az inokulált talajból, valamint a kezelt dugványok három pontjáról (tő, internódium közepe, sebhely) végeztük. A talajmintákat steril desztillált vízben hígítottuk, majd PDA-ra vittük fel. A dugványokból történő izolálás megegyezett az oltványoknál leírt eljárással. Az izolátumokat 25 °C-on, sötétben tenyésztettük; a *C. rosea* telepeket morfológiai bélyegek alapján szelektáltuk, majd az ITS régió szekvenálásával azonosítottuk.

A *Bacillus velezensis* antagonista tulajdonságainak vizsgálata

Az endofiton baktériumok izolálását a xilémintákból (Adejoro és mtsai, 2023) módszerének kisebb módosításaival végeztük. A törzsekről eltávolított kéregfelületet és a fúrót 70% (v/v) etanollal fertőtlenítettük a keresztkontamináció elkerülése érdekében, majd a nyert faforgácsokat steril kémcsövekbe gyűjtöttük. A minták egy részét Luria–Bertani (LB) folyékony táptalajba oltottuk, és forgó rázón 48 órán át inkubáltuk. A tenyészetekből hígításokat készítettünk, majd szilárd LB-táptalajon tenyésztettük. A morfológiailag eltérő telepeket kiválogattuk, többszöri átoltással tiszta tenyészeteket nyertünk, amelyeket 50% (v/v) glicerinben, –80 °C-on tároltunk. A DNS-t kétrészes folyékony tenyészetekből (LB, 25 °C, 120 rpm) izoláltuk. A baktériumizolátumok azonosítására a 16S rDNS, valamint a *gyrA* és *gyrB* gének részleges szakaszait PCR-rel szaporítottuk (Wang és mtsai, 2022).

A baktériumizolátumok gombaellenes aktivitását a korábban élesztők „killer” aktivitásának vizsgálatára kidolgozott módszerrel szűrtük (Woods és Bevan, 1968). A szilárd élesztő kivonat–glükóz táptalajhoz 0,003% (m/v) metilénkéket adtunk, majd a Petri-csészéket tömegesen beoltottuk *P. chlamydospora* 10⁶ sejt/ml koncentrációjú konídiumszuszpenziójával és megszáritottuk. Ezt követően a baktériumizolátumokat a lemezek felszínére kb. 1 cm hosszú csíkban oltottuk, és a kultúrákat 25 °C-on 5 napig inkubáltuk. A vizsgálatban egy-egy *B. dothidea*, *E. lata*, *P. chlamydospora* és *Diaporthe ampelina* tőkebetegség-kórokozó gombatörzset alkalmaztunk. A burgonya-dextróz agar (PDA) táptalajon aktívan növekvő telepek széléről vágott micéliumkorongokat élesztő kivonat–glükóz táptalajra helyeztük. A micéliumnövekedést 2., 3., 4. és 9. napon mértük, majd kiszámítottuk a növekedési rátákat a kezelt (RGt) és a kontroll (RGc) Petri-csészéken. A kettős tenyészetekben a növekedés gátlásának mértékét (RGI%) az alábbi képlettel határoztuk meg:

$$RGI\% = \frac{(RGc - RGt)}{RGc} \times 100$$

A baktériumok által termelt extracelluláris metabolitok tőkebetegség kórokozókra gyakorolt hatásának vizsgálatához folyékony tenyészeteket készítettünk. Az élesztő kivonat–glükóz táptalajokat baktériumizolátumokkal beoltottuk, majd inkubáltuk.

Az erjesztési közegből centrifugálással, majd 0,22 µm pórusméretű membránon átszűrve steril szűrleteket kaptunk. A kétszeres koncentrációjú szilárd élesztőkivonat–glükóz táptalajt baktériumtenyészet-szűrlettel vagy kontrollként folyékony élesztőkivonat–glükóz táptalajjal 1:1 arányban elegyítettük. A vizsgált kórokozók aktívan növekvő micéliumát beoltottuk a táptalajokra, inkubáltuk, majd a micéliumnövekedést 2, 6, 8 és 9 dpi időpontban mértük; az RGI%-t az *in vitro* konfrontációs tesztekhez hasonlóan számítottuk.

A gombasejtek életképességét fluoreszcein-diacetáttal határoztuk meg (Gaspar és mtsai, 2001). A képződött fluoreszceint mikroszkóppal vagy fluorométerrel, a biotomacsa acetonos extrakciója után kvantitatívan mértük. A PDA-n tenyésztett gombatelepek széléről micéliumkorongokat vágunk ki, és 500 µl baktériumtenyészet-szűrletbe vagy kontrollként desztillált vízbe helyeztük, inkubáltuk, majd fluoreszcein-diacetát oldatot adtunk a mintákhoz, és további 1 órán át inkubáltuk. A reakciókat acetons hozzáadásával állítottuk le, 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, centrifugáltuk, majd a felső fázist eltávolítottuk, és a felszabadult fluoreszceint QFX fluorométerrel (DeNovix Inc., USA) FITC programmal mértük. A baktériumtenyészetek szűrletfrakcióit különböző eljárásokkal vizsgáltuk fungicid aktivitás szempontjából. A fehérjét ammónium-szulfát hozzáadásával, 4 °C-on, 16 órás inkubálással precipitáltuk (Wingfield, 1998). Centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk, a pelletet megszárítottuk. A tenyészet-szűrletet kétszer, egyenlő térfogatú kloroformmal vagy etil-acetáttal extraháltuk (Maung és mtsai, 2021). Az extraktumokat összevontuk, majd 60 °C-on 16 órán át szárítottuk. Az ammónium-szulfát csapadékokat és a szárított extraktumokat desztillált vízben oldottuk, és a fent leírt módon vizsgáltuk fungicid aktivitásukat, *B. dothidea* tesztorganizmus alkalmazásával.

A fitotoxicitási vizsgálatokat korábban leírt módszerünk kisebb módosításaival végeztük (Karácsony és mtsai, 2023). Cabernet Sauvignon dugványok fiatal leveleit leszedtük, steril desztillált vízzel átmostuk, majd 5 mm átmérőjű levélkorongokat vágunk. Öt levélkorongot helyeztünk Petri-csészékbe, amelyek tízszeres hígítású tenyészet-szűrletet vagy kontrollként desztillált vizet tartalmaztak. A korongokat szobahőmérsékleten, természetes fényviszonyok mellett inkubáltuk, majd fotóztuk. Az eredmények közötti szignifikáns különbségeket egyutas varianciaanalízissel (one-way ANOVA) határoztuk meg a GraphPad Prism 5 szoftverrel (GraphPad Software, San Diego, Kalifornia, USA).

4.2.4. A tőkebetegségek kórokozóinak fajgazdagság vizsgálata

Mintavétel, gombatörzsek izolálása és molekuláris azonosítása

2013 és 2015 között Magyarország öt borvidékén (Eger, Neszmély, Pécs, Szekszárd, Villány) számos fás szövetmintát gyűjtöttünk olyan szőlőtőkéről, amelyek a szőlő tőkebetegségeinek jellegzetes tüneteit mutatták. A mintavétel során a tünetmentes és a nekrotizált részekből, a kéreg eltávolítása után, 0,5–1 cm vastag korongokat vágunk. A

korongokat 1% klóramin-B oldatban öt percig felszíni sterilizáltuk, steril desztillált vízben öblítettük, majd steril körülmények között itatóspapíron szárítottuk.

A nekrozisos és az ép szövetek határáról steril tűvel apró faszövet-darabokat emeltünk ki, amelyeket burgonya-dextróz agarra (PDA) helyeztünk. A tenyészeteket szobahőmérsékleten legfeljebb négy hétig inkubáltuk, majd az egyes kolóniákat külön lemezekre vittük át tiszta tenyészetek előállításához. Morfológiai osztályozás után a liofilizált, nem sporuláló tenyészetekből DNeasy Plant Mini Kit segítségével (Qiagen, Németország) DNS-t izoláltunk.

Az izolátumok azonosításához első lépésben az ITS régiót vizsgáltuk az ITS1F/ITS4 primerpárral (White és mtsai, 1990). A pontos fajazonosításhoz több törzsnél további génszakaszokat is elemeztünk: *Kalmusia longispora* esetében az LSU (28S rDNS) és a β -tubulin (TUB) gének szakaszait (LR0R/LR5; Btub2Fd/Btub4Rd) (Karácsony és mtsai, 2021), a *Neofabraea sp.* izolátumok esetében az LSU, β -tubulin (TUB2; Bt-T2m-Up/Bt-LEV-Lo1) és RPB2 (RPB2-5F2/RPB2-7cr) gének szakaszait (Lengyel és mtsai, 2020), míg a *D. omnivora* esetében az elongációs faktor 1-alfa (EF1- α) gén hosszabb, >850 bp szakaszát (EF1-526F/EF1-1567R) (Váczy és mtsai, 2018).

A PCR-eket három párhuzamos reakcióban végeztük, majd a termékeket egyesítettük a polimerázhibák csökkentése érdekében (Kovács és mtsai, 2011). A szekvenciákat elektroferogramokból kézzel szerkesztettük (Staden Package; Staden és mtsai, 1999), a GenBank adatbázisban helyeztük el, az izolátumokat pedig a CBS-KNAW törzsgyűjteményben (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Hollandia) deponáltuk. A *K. longispora* vizsgálatába három törzset vontunk be: CBS 582.83 (ex-type), CBS 824.84 és a Magyarországról származó T15142.

A *Neofabraea kienholzii* vizsgálatába két törzs került: T15377 (13 éves Chardonnay, Neszmélyi borvidék) és T15671 (14 éves Kékfrankos, Egri borvidék). *D. omnivora* esetében szintén két törzset elemeztünk (M7, M38), amelyeket az Egri borvidéken, kb. 25 éves Szürkebarát és Csókaszó lő tőkékről izoláltunk.

Az ITS, LSU, TUB, EF1- α és RPB2 lókuszokat a GenBankból származó rokon fajok szekvenciáival MAFFT v7-tel (Katoh és Standley, 2013), illesztettük (E-INS-i és FFT-NS-i algoritmusok), az illesztéseket MEGA6/7-tel ellenőriztük és szerkesztettük (Kumar és mtsai, 2016; Tamura és mtsai, 2013).

Maximum likelihood (ML) elemzést raxmlGUI 1.3/1.5 környezetben végeztünk (GTR+G; 1000 bootstrap (Stamatakis 2014; Silvestro és Michalak 2012), Bayes-féle elemzést MrBayes 3.1.2-vel futtattunk (Ronquist és Huelsenbeck 2003), a konvergenciát AWTY-val ellenőriztük (Nylander és mtsai, 2008).

D. omnivora esetében az indel-motívumokat FastGap 1.2 segítségével bináris karakterként kódoltuk (Löytynoja és Goldman, 2008), és bevontuk a filogenetikai elemzésbe. A fákat MEGA7-ben és TreeGraph 2.13.0-ban vizualizáltuk (Stöver és Müller 2010).

Morfológiai és sporulációs vizsgálatok és patogenitási tesztek

A telepmorfológiát burgonya-dextróz, malátakivonat-, zabpehely- és vizes agar táptalajokon vizsgáltuk, minden izolátumnál négy ismétléssel. A lemezeket 23–25 °C-on inkubáltuk, a kolóniák átmérőjét 14 napon át naponta mértük. A sporuláció indukálására fenyőtűt tartalmazó vizes agart alkalmaztunk, amelyről ismert, hogy elősegíti a *Botryosphaeriaceae* fajok konídiumképződését (Crous és mtsai, 2006) A tenyészetek piknidiumképzését naponta ellenőriztük.

A konídiumok méretét az ImageJ szoftverrel határoztuk meg (Schneider és mtsai, 2012) törzsenként legalább 100 konídium méréssel.

A patogenitási teszteket fiatal hajtásokon, egyéves vesszőkön, valamint cserepes tőkék hajtásain végeztük Cabernet Sauvignon, Blauburger és Kékfrankos fajtákon. A kísérleteket több ismétléssel (3–5 növény/törzs, 2 kontroll) hajtottuk végre, egyes beállításokat megismételtünk. A tüneteket vizuálisan értékeltük, majd a kórokozót a fertőzési pont körüli edényszövetből visszaizoláltuk, és a visszaizolált törzseket ITS-szekvenciájuk alapján azonosítottuk.

A *Diaporthe* fajok diverzitását feltáró, európai együttműködésben megvalósuló vizsgálat sorozat laboratóriumi kísérletei a Westerdijk Fungal Biodiversity Institute laboratóriumaiban zajlottak (Guarnaccia és mtsai, 2018).

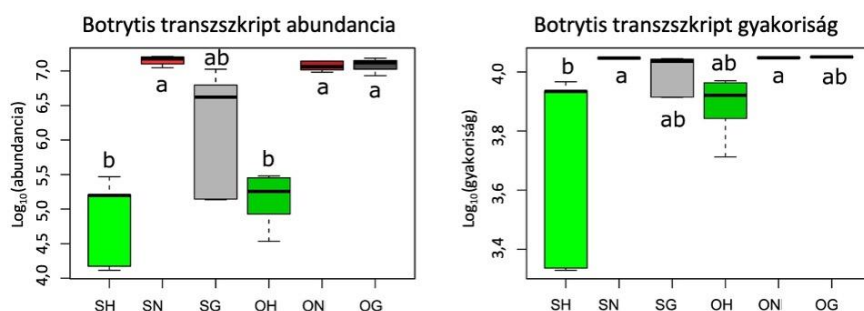
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. *Botrytis cinerea*: a Janus arcú gomba

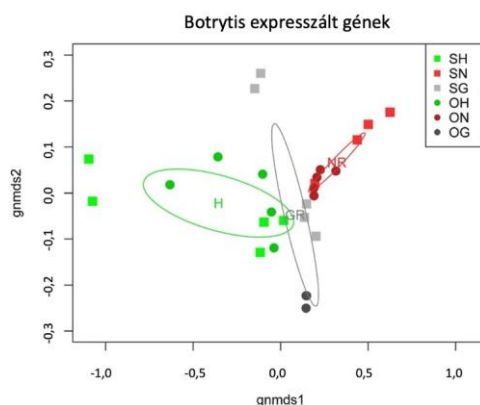
A *B. cinerea* a szürkerothadás kórokozójaként számos kultúrában – így a szőlőben is – jelentős gazdasági veszteségeket okoz, ugyanakkor kedvező mikroklimatikus feltételek mellett a szőlőbogyók nemesrothadását idézheti elő. Ez utóbbi olyan, a bogyó szerkezetét és anyagcseréjét érintő változásokat vált ki, amelyek alapvetőek a botritiszes borok kialakulásában. A két, egymással ellentétes kimenetel biokémiai hátterét meghatározó funkcionális gének szerepe azonban mindmáig csak részben feltárt. Vizsgálataink a szürke- és nemesrothadáshoz kapcsolódó génműködési mintázatok és folyamatok pontosabb azonosítása volt.

5.1.1. *A. B. cinerea* expressziós profiljának és metabolizmusának vizsgálata

Vizsgálataink egyértelműen igazolták, hogy a funkcionális gének (transzkriptumok) abundanciája a nemesrothadásos (NR) szőlőbogyókban a legnagyobb; ezt követi a szürkerothadásos (GR), míg mindkettő szignifikánsan meghaladja az egészséges (H) bogyók értékeit, szeptemberben és októberben egyaránt. Szeptemberben a *B. cinerea* transzkriptum-abundanciája szignifikánsan nőtt az egészségesről a nemesrothadásos állapotra való átmenet során (2. ábra).



2. ábra *A. B. cinerea* funkcionális gének abundanciájának és gyakoriságának összehasonlítása a bogyórothadás típusok között egészséges bogyó (H), nemesrothadású bogyó (N) és szürkerothadású bogyó (G) esetében szeptember (S) és október (O) hónapokban



3. ábra *A. B. cinerea* funkcionális génjeinek NMDS-elemzése egészséges (H), nemesrothadt (N) és szürkerothadt (G) bogyókban, szeptember (S) és október (O) hónapokban.

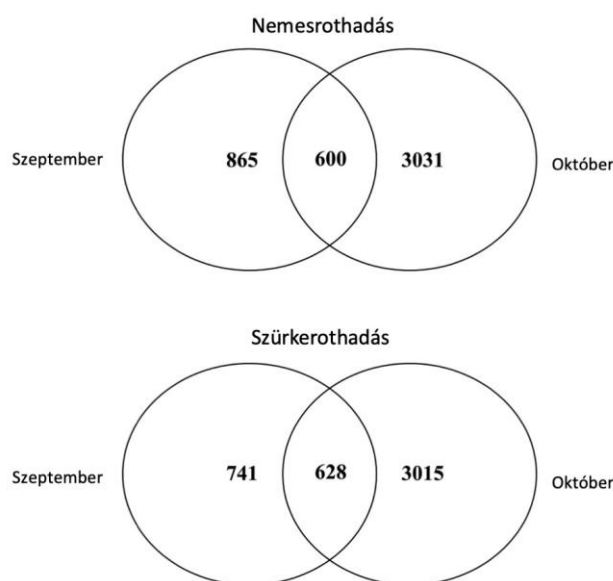
Az NMDS-ordináció világosan elkülönítette a rothadási típusokhoz (H, NR, GR) és a hónapokhoz (szeptember, október) tartozó funkcionális génexpressziós mintázatokat (3. ábra). A PERMANOVA-elemzés ezt megerősítette: a *B. cinerea* funkcionális génösszetételét mind a rothadási típus ($F = 8,8097$; $p < 0,01$; $r^2 = 0,42629$), mind a hónap ($F = 2,0978$; $p < 0,01$; $r^2 = 0,06518$) szignifikánsan befolyásolta.

Differenciált génexpresszió

A szeptemberi és októberi, nemes- és szürkerothadásos állapotok összehasonlítása alapján egy 600 génből álló közös, felfelé szabályozott génkészletet azonosítottunk, amely mindkét hónapban a nemesrothadás esetén mutatott erősebb expressziót. Emellett szeptemberben 865, októberben 3014 olyan gént találtunk, amelyek kifejezetten a nemesrothadásos állapotban voltak felfelé szabályozottak.

A szürkerothadásos állapotra vonatkozó, két időpontot együttesen értékelő elemzés 628 közös, felfelé szabályozott gént tárt fel; ezen túl szeptemberben 865, októberben 3031 gén mutatott kizárólagosan szürkerothadásban emelkedett expressziót.

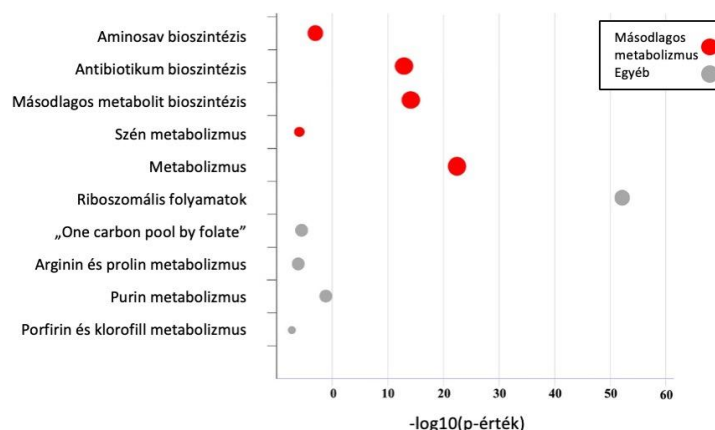
A szeptember-október összevetés összegzéseként mindkét rothadástípusban jóval több differenciálisan expresszálódó gén volt októberben, mint szeptemberben (4. ábra).



4. ábra VENN-diagram, amely a felfelé szabályozott *B. cinerea* gének számát mutatja a nemesrothadásos és a szürkerothadásos bogyókban szeptember és október hónapokban a differenciális expressziós elemzések szerint.

Génontológiai, útvonal-gazdagodási és virulencia elemzések

A nemesrothadás során felfelé szabályozott mag génkészletben több, szignifikánsan feldúsult biológiai útvonalat azonosítottunk, amelyek összhangban vannak a korábban bemutatott génontológiai kategóriákkal. A *B. cinerea* nemesrothadásos expressziós profiljában kiemelten „riboszóma”, „anyagcsere”, valamint „másodlagos metabolitok bioszintézise” útvonalak dúsultak (5. ábra). Ezzel szemben – a génontológiai eredményekhez hasonlóan – a szürkerothadásos állapot felfelé szabályozott génkészletében nem mutattunk ki szignifikánsan feldúsult útvonalakat.



5. ábra A nemesrothadás során differenciálisan szabályozott *B. cinerea* szeptember-októberi génkészletének funkcionális útvonal szintű feldúsulása.

A virulenciafaktorok BLAST-elemzése hat tényezőt tárt fel, amelyek a nemesrothadásos állapot felfelé szabályozott mag-génexpressziós profiljához kapcsolhatók, míg kilenc hasonló tényezőt azonosítottunk a szürkerothadásos mintákban domináns génprofil részeként. A nemesrothadáshoz köthető faktorok több, a szőlőbogyó héjának kolonizációját elősegítő mechanizmust támogatnak. A szürkerothadásos profilban az azonosított tényezők többsége oxidoreduktázokat kódoló génekhez kötődött, amelyek a gazdanövény védekezési reakcióinak semlegesítésében játszanak szerepet; emellett membrántranszporttal, sejtfalbontással, közvetlen szövetkárosítással és fitotoxinszintézissel összefüggő gének is felerősödtek.

A *B. cinerea* funkcionális transzkriptumainak elemzése

A *B. cinerea* funkcionális géntranszkriptumainak mennyisége (abundance) és – részben – diverzitása (richness) a három bogyórothadási típusban és két szüreti időpontban mért értékek alapján összefüggésbe hozható a későbbiekben tárgyalandó fizikai és kémiai változásokkal (Hegyi-Kaló és mtsai, 2020). Megfigyeléseink szerint a transzkriptumok mennyisége és gazdagsága magasabb volt a nemesrothadásos és a szürkerothadásos bogyókban, mint az egészségesekben. Ez arra utal, hogy a *B. cinerea*, mint alapvetően nekrotróf gomba, a tünetmentes, érett bogyókban többnyire inaktív marad – amit korábbi vizsgálatok is megerősítettek (Lovato és mtsai, 2019).

A nemesrothadás kialakulásakor a bogyók fizikai-kémiai jellemzőiben bekövetkező dinamikus változások – például a héj bomlása, a növényi védekezési mechanizmusok aktiválása és az érési folyamatok előrehaladása – összefüggésben állnak a *B. cinerea* fokozódó metabolikus aktivitásával. Érdekes módon a szürkerothadásos fertőzést is a funkcionális géntranszkriptumok többlete jellemzi, amit részben a *B. cinerea* nagyobb micéliumtömege magyarázhat ezekben a bogyókban (Dankó és mtsai, 2021).

Mind az ANOVA, mind az NMDS-elemzések alátámasztották a *B. cinerea* expresszált génprofiljainak mennyiségi és minőségi különbségeit az egészséges, a nemesrothadásos és a szürkerothadásos bogyók között, valamint ezek időbeli változásait. A Tokaji borvidéken a nemesrothadást támogató időjárási feltételek gyakrabban az ősz második

felében alakulnak ki (Magyar és Bene, 2006). Feltételezhető, hogy a *B. cinerea* kevésbé agresszív szaporodása hozzájárul az aszúsodási folyamat sikeresebb lefolyásához, és teret enged más, az aszúsodás során megjelenő gombafajok erőteljesebb felszaporodásának, ami együtt kedvezőbb metabolikus kimenetelt eredményezhet.

A *B. cinerea* génexpressziója az aszúsodás során

Vizsgálataink határozott összetételbeli különbségeket tártak fel a *B. cinerea* funkcionális génjeinek expressziójában a bogyórothadási típusok között. A mintavétel időpontja szintén szoros korrelációt mutatott a génexpressziós mintázattal minden rothadási típus esetében, jelezve, hogy a korai és a késő őszi szüret alapvetően befolyásolja a nemesrothadásos és szürkerothadásos bogyók élettani és biokémiai folyamatait. Míg a szürkerothadásnál az időbeli eltérések részben váratlanok voltak, addig a nemesrothadásos bogyók esetében összhangban álltak a kémiai különbségekkel (pl. cukortartalom, titrálható savtartalom; Hegyi-Kaló és mtsai, 2020).

A nemesrothadásos és szürkerothadásos bogyókon megfigyelt differenciálisan expresszált *B. cinerea*-gének dúsuló génontológiai- és útvonalprofiljai arra utalnak, hogy a nemesrothadás során a gomba metabolikusan jóval aktívabb. A nemesrothadás egyik kulcsa az aszúsodott bogyók jelentősen megnövekedett cukortartalma (Magyar, 2011; Hegyi-Kaló és mtsai, 2020), ami magyarázza a szénhidrátbontó enzimeket is tartalmazó glikolízishez és piruvát-anyagcseréhez kapcsolódó génútvonalak feldúsulását.

A poliszacharid-anyagcseréhez kötődő dúsuló útvonalak a bogyók fizikai jellemzőinek változásához is hozzájárulhatnak. A glikolízishez/piruvát-anyagcseréhez kapcsolódóan azonosított enzimek között szerepel az alkohol-dehidrogenáz (etanol → acetaldehid) és az aldehid-dehidrogenáz (acetaldehid → ecetsav) (Jelski és Szmítowski, 2008). Az így képződő acetaldehid a bor egyik legfontosabb karbonilvegyülete, a teljes aldehidtartalom >90%-át adja (Nykänen, 1986), és reakciókészsége révén jelentősen befolyásolja az aroma- és illatprofilokat (gyümölcsös, „érett almás” jegyek; Zea és mtsai, 2015). Ezen enzimek azonosítása alátámasztja azt a feltevést, hogy a nemesrothadás alatt zajló anyagcsere a bor érzékszervi tulajdonságainak alakulásához is hozzájárul – ugyanakkor ezek a hatások nem kizárólag az aszúborokra jellemzőek.

Az aszúsodás során különféle nitrogéntartalmú vegyületek (fehérjék, aminosavak, peptidek, ammónium-sók, nukleinsav-származékok) szabadulnak fel. A nemesrothadás során felfelé szabályozott *B. cinerea*-gének génontológiai profilja dúsulást mutatott a „fehérje-anyagcsere-folyamatok” és a „sejtszintű fehérje-anyagcsere-folyamatok” útvonalkategóriákban, valamint olyan specifikus útvonalakban, mint az „arginin- és prolin-anyagcsere”, „cisztein- és metionin-anyagcsere” és „glicin-, szerin- és treonin-anyagcsere”. Az aminosav-anyagcserében részt vevő enzimek közül lebontó szerepű például az argináz, amely az „arginin- és prolin-anyagcsere” útvonalban az arginint ornitinné és karbamiddá alakítja (Rath és mtsai, 2014).

A BLAST-analízisek a nemesrothadásban felfelé szabályozott génprofilban több, kolonizációt és fertőzést segítő virulenciafaktort is azonosítottak, köztük egy MAP-kináz fehérjét (gazdanövénybehatolás/kolonizáció), egy ubikvitin-szerű fehérjeaktiváló enzimet, egy peptidil–prolil cisz–transz izomerázt, valamint az elongátor komplex egyik fehérjét. A szuperoxid-dizmutáz jelenléte összhangban áll Blanco-Ulate és mtsai (2015) megfigyeléseivel: a reaktív oxigénformák metabolizmusának szabályozásán keresztül hozzájárulhat a gazdanövényi védekezés elkerüléséhez.

Az „antagonista metabolitok bioszintézise” útvonal feldúsulása a nemesrothadás során arra utal, hogy a *B. cinerea* aktív antagonista tevékenységet fejt ki más mikroorganizmusokkal szemben, elősegítve saját dominanciáját az aszús bogyókban. Ezzel szemben szürkerothadásban ez az útvonal nem dúsult, ami magyarázhatja, hogy ott más növénypatogén gombák nagyobb diverzitással és gyakran dominánsan jelennek meg (Barata és mtsai, 2012). Tehát a *B. cinerea* nemcsak biokémiai és fizikai értelemben járul hozzá az aszúsodáshoz, hanem aktív szerepet játszik a bogyók gombaközösségének szabályozásában is.

A szürkerothadás során felfelé szabályozott génprofilban oxidoreduktázokat azonosítottunk, amelyek a patogenitásban és a gazdanövényi védelem kijátszásában játszanak szerepet (Yu és mtsai, 2020). Kimutattuk a BCIN_15g03390 gént (növényi szövetek elpusztítása/lebontása; valamint a fitotoxinok bioszintézisében részt vevő BCIN_01g00060 (botcininsav) és BCIN_12g06380 (botridial) géneket is, összhangban Lovato és mtsai (2019). eredményeivel: ezeknek a géneknek az expressziója nemesrothadásban visszaszorul, míg szürkerothadásban a botcininsav-gének fel-, a botridial-gének pedig változatlanul expresszálódnak.

Összességében mind a nemes-, mind a szürkerothadásos fázisban találtunk felfelé szabályozott virulenciafaktorokat, de jellegük eltért: az antagonista aktivitáshoz köthető gének kizárólag nemesrothadásban, míg a kifejezetten fitotoxikus hatásúak kizárólag szürkerothadás során domináltak.

Következtetések

Vizsgálataink szerint a *B. cinerea* nemesrothadás során olyan géneket fejez ki, amelyek elősegítik a szőlőbogyó héjának kolonizációját és saját ökológiai dominanciáját, ebben a fázisban az anyagcsere-aktivitása a szürkerothadáshoz képest magasabb.

Azonosítottuk azokat a funkcionális géncsoportokat is, amelyek a nemesrothadáshoz társuló biokémiai változásokhoz járulnak hozzá: a cukor- és fehérjetartalom növekedéséhez, valamint aromaképző metabolitok (pl. acetaldehid) termelődéséhez, amelyek meghatározóak a botritiszes/aszúborok aromaprofiljának alakulásában.

Ezzel szemben szürkerothadásban a *B. cinerea* anyagcsere-aktivitása alacsonyabb, és főként olyan gének expressziója dominál, amelyek a gazdanövényi védekező válaszok kijátszását szolgálják, illetve fitotoxinok bioszintézisében vesznek részt.

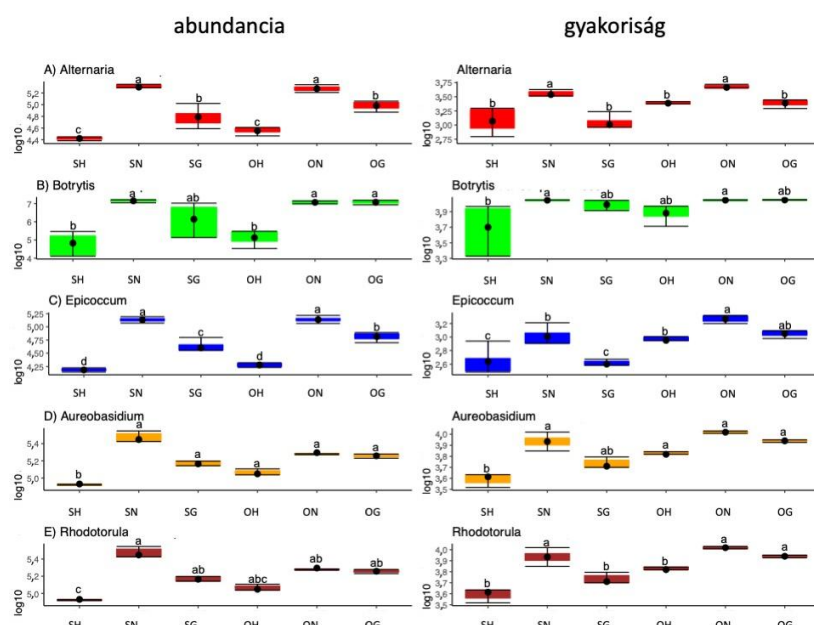
Gyakorlati szempontból nemcsak a rothadás típusa, hanem a szüreti időzítés (korai vs. késő őszi szüret) is meghatározó, mivel a génexpressziós mintázatok érdemben eltérnek. Eredményeink alátámasztják, hogy a nemesrothadásos bogyók gyűjtését olyan időszakra érdemes ütemezni, amikor az anyagcsere-útvonalak aktivitása kedvez a borászatilag kívánatos élettani és fizikai változásoknak.

5.1.2. A szürke és nemesrothadásos folyamatok további mikróbái

Mind nemes-, mind szürkerothadásban a *B. cinerea* más gombafajokkal társul, ezek funkcionális szerepe azonban mindmáig csak részben ismert. Metatranszkriptomikai vizsgálatainkban egészséges, nemesrothadásos és szürkerothadásos szőlőbogyókból származó RNS-szekvenálási adatokat elemeztünk, a szekvenciákat pedig a korábbi tenyésztési felmérésekben leggyakoribbnak talált fonalas és élesztőgombák referenciagenomjaihoz igazítottuk. Tudomásunk szerint ez az első munka, amely a *B. cinerea* mellett a társuló fonalas gombák és élesztők funkcionális génexpressziós profilját is értékeli mindkét rothadástípusban, és bemutatja feltételezett hozzájárulásukat a folyamatok élettani és kémiai alakulásához. Eredményeink új megvilágításba helyezik a domináns gombák közötti interakciók és a nemesrothadást kísérő szukcesszió dinamikáját.

A rothadási folyamatok transzkriptum abundancia és -gazdagság mintázatai

A transzkriptum-abundancia és -gazdagság változásait a következő fajoknál vizsgáltuk: a fonalas gombák közül *Alternaria alternata*, *B. cinerea* és *Epicoccum nigrum*, az élesztők közül *A. pullulans* és *Rhodotorula graminis*. Valamennyi faj esetében a transzkriptumok mennyisége és gazdagsága jellemzően szignifikánsan nőtt ($p < 0,05$) az egészséges bogyókhoz képest a nemesrothadásos mintákban, szeptemberben és októberben.

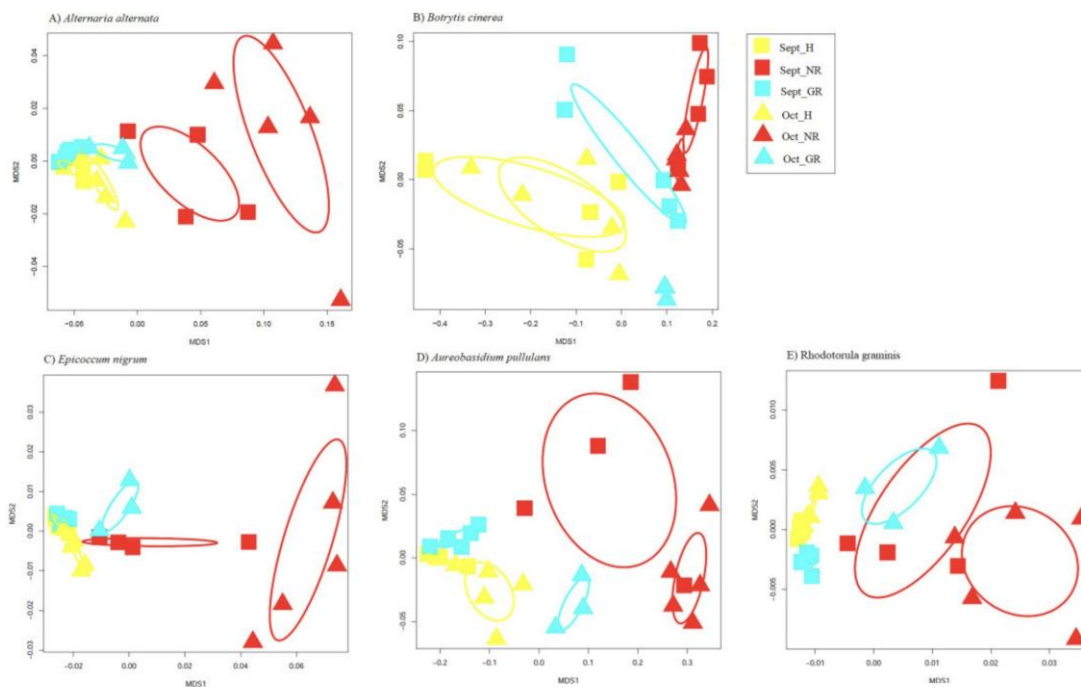


6. ábra A fonalas gombák A) *A. alternata*, B) *B. cinerea*, C) *E. nigrum* és az élesztőgombák D) *A. pullulans* és E) *R. graminis* transzkript abundancia és gyakoriság értékek összehasonlítása az egészséges bogyó (H), a nemesrothadt bogyó (NR) és a szürkerothadt bogyó (GR) típusai között szeptember (S) és október (O) hónapokban

A szürkerothadásos bogyókban mért transzkriptum-abundancia és -gazdagság általában szintén meghaladta az egészséges bogyók értékeit. Különösen az *A. alternata* és *E. nigrum* esetében volt a szürkerothadásos mintákban szignifikánsan magasabb az abundancia mindkét hónapban, míg *B. cinerea* esetében ez a különbség csak októberben bizonyult szignifikánsnak. Az élesztők közül *A. pullulans* és *R. graminis* transzkriptum-abundanciája szeptemberben volt szignifikánsan magasabb a szürkerothadásos bogyókban, *R. graminis* esetében pedig októberben a transzkriptum-gazdagság is szignifikánsan emelkedett (6. ábra).

Októberben egyedül a *B. cinerea* mutatott szignifikáns különbséget a nemesrothadásos és szürkerothadásos állapotok között a transzkriptum-abundanciában és -gazdagságban; minden más vizsgált fajnál e két rothadástípus között inkább csökkenést tapasztaltunk. Az abundancia csökkenése szignifikáns volt az *A. alternata* és *E. nigrum* esetében mindkét hónapban; a gazdagság csökkenése az *A. alternata*-nál mindkét hónapban, az *E. nigrum*-nál szeptemberben volt szignifikáns. Az élesztők közül csak a *R. graminis* esetében észleltünk szignifikáns csökkenést a transzkriptum-gazdagságban.

Az NMDS-elemzés (nem-metrikus többdimenziós skálázás) markáns különbségeket mutatott a rothadástípusokhoz tartozó funkcionális génkészletek között az *A. pullulans* esetében, és jól elkülönítette a rothadástípusokat és a mintavételi időpontokat az *A. alternata*, *B. cinerea*, *E. nigrum* és az *R. graminis* esetében is (7. ábra). Eredményeinket a PERMANOVA-teszt is megerősítette (2. táblázat).



7. ábra A fonalas gombák A) *A. alternata*, B) *B. cinerea* C) *E. nigrum* és az élesztőgombák D) *A. pullulans* és E) *R. graminis* genomjához annotált szeptemberi (S) és októberi (O) expressziós funkcionális génjeinek NMDS-analízise egészséges (H), nemesrothadó (N) és szürkerothadó (G) bogyókban.

2. táblázat Az *A. alternata*, *B. cinerea* és *E. nigrum* fonalas gombák, valamint az *A. pullulans* és *R. graminis* élesztőgombák referencia genomjához annotált egészséges, nemesrothadásos és szürkerothadásos funkcionális génkészleteinek permutációs többváltozós ANOVA-val számított *F* és *p*-értékei valamint *r*² értékei.

Gombafaj	Rothadás típusa szerint			Mintavétel időpontja szerint		
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>r</i> ²	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>r</i> ²
<i>Alternaria alternata</i>	5,4045	< 0,01	0,15301	5,9162	0,012	0,1675
<i>Botrytis cinerea</i>	8,8097	< 0,01	0,42629	2,0978	< 0,01	0,06518
<i>Epicoccum nigrum</i>	5,2547	0,01	0,14848	6,1353	< 0,01	0,17336
<i>Aureobasidium pullulans</i>	5,001	< 0,01	0,16001	2,2527	0,104	0,07208
<i>Rhodotorula graminis</i>	5,536	0,012	0,14364	9,0039	< 0,01	0,23363

A rothadási típusok differenciális génexpresszió elemzése

A szeptemberi és októberi nemesrothadás és szürkerothadás összehasonlító differenciális expressziós elemzése során minden vizsgált élesztő- és fonalas gombafajnál azonosítottunk olyan, kizárólag nemesrothadásra vagy kizárólag szürkerothadásra jellemző, felfelé szabályozott génkészleteket. Emellett fajonként meghatároztunk egy, a nemesrothadáshoz tartósan köthető, mind szeptemberben, mind októberben konzisztensen felfelé szabályozott „mag” génkészletet az alábbi fajoknál: *A. alternata*, *B. cinerea*, *E. nigrum*, *A. pullulans* és *R. graminis*.

3. táblázat Az *A. alternata*, *B. cinerea* és *E. nigrum* fonalas gombák, valamint az *A. pullulans* és *R. graminis* élesztőgombák genomjához annotált differenciális expressziós elemzési eredmények a nemesrothadás és a szürkerothadás között szeptemberre és októberre vonatkozóan, egyedi felfelé szabályozott géneket figyelembe véve

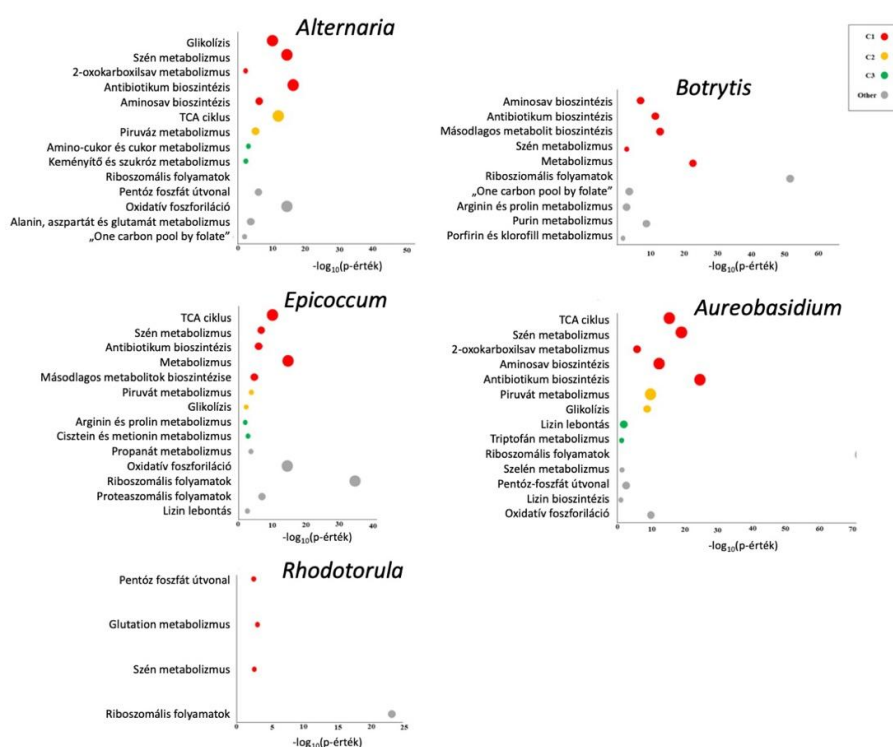
Fajok	Szeptember NR	Október GR	Mindkét hónap NR	Szeptember GR	Október GR	Mindkét hónap GR
<i>Alternaria alternata</i>	170	140	385	8	14	2
<i>Botrytis cinerea</i>	865	3031	600	741	3015	628
<i>Epicoccum nigrum</i>	24	110	222	29	19	3
<i>Aureobasidium pullulans</i>	408	212	261	8	64	7
<i>Rhodotorula graminis</i>	51	21	31	17	13	3

Génontológiai, útvonal-dúsulási és virulenciavizsgálatok

A nemesrothadáshoz kötődő, felfelé szabályozott „mag” génkészletek génontológiai dúsulásai mind a négy vizsgált fajban – *A. alternata*, *B. cinerea*, *E. nigrum* és *A. pullulans* – elsősorban sejtszintű proliferációhoz, transzportoz és anyagcseréhez kapcsolódtak,

és több ponton közvetlenül illeszkedtek a nemesrothadás folyamataihoz. A metabolikus kategóriákon belül hangsúlyosan jelent meg a nitrogén- és a zsírsav-anyagcsere.

Az *A. alternata* esetében hat dúsult kategóriát azonosítottunk; ezek közül öt a nitrogén-anyagcserehez (pl. „peptid-anyagcsere-folyamat”), egy pedig a sejtosztódáshoz köthető („transzláció”). a *B. cinerea*-nál tizenhét kategória dúsult: egy általános anyagcsere-funkciókat ír le („makromolekula-anyagcsere-folyamat”), négy kifejezetten a nitrogén-anyagcserehez sorolható („szerves nitrogéntartalmú vegyületek bioszintézise”, „fehérje-anyagcsere”, „peptid-bioszintézis”, „amid-bioszintézis”), a többi pedig túlnyomórészt sejt-funkciókat fed le, köztük proliferációs folyamatokat is (pl. „sejtosztódás”, „génexpresszió”). Az *E. nigrum* esetében három dúsult kategória jelent meg, amelyek elsődlegesen sejtszintű transzportfolyamatokra utalnak. Az *A. pullulans*-nál tizenkét kategória dúsult, többségük a zsírsav-anyagcserehez kapcsolódik (pl. „zsírsav-anyagcsere-folyamat”, „zsírsav-bioszintézis”, „monokarboxilát-anyagcsere-folyamat”).



8. ábra A KOBAS adatbázis alapján végzett funkcionális útvonalak feldúsulás-elemzése az A) *A. alternata*, B) *B. cinerea*, C) *E. nigrum* és az élesztőgombák D) *A. pullulans* és E) *R. graminis* nemesrothadáshoz kapcsolódó, felfelé szabályozott génjei. A buborékok egy-egy feldúsult funkciót jelölnek, méretük pedig a szignifikanciaszinttel arányos. A buborék színek biokémiai útvonal koexpressziós klasztereket jelölnek.

A KOBAS-adatbázison végzett útvonaldúsulási elemzések megerősítették a fenti génontológiai eredményeket: minden vizsgált fonalas gomba és élesztő nemesrothadáshoz társított génkészletében metabolikus és sejt-funkciókhoz kapcsolódó útvonalak dúsultak (8. ábra). Ide tartoztak a proliferációhoz, valamint a szénhidrát-, aminosav- és zsírsav-anyagcserehez köthető folyamatok.

Az *A. alternata* esetében a fehérje-feldolgozás az endoplazmatikus retikulumban és az RNS-transzport, a *B. cinerea* esetében a purin- és pirimidin-anyagcsere, a riboszóma-összeállítás, továbbá az RNS-polimeráz- és -transzport útvonalak jeleztek fokozott aktivitást. Az *E. nigrum* esetében a riboszóma-összeállítás és az RNS-transzport, míg az *A. pullulans* esetében szintén a fehérje-feldolgozás az endoplazmatikus retikulumban mutatott dúsulást.

A szénhidrát-anyagcsere a nemesrothadáshoz társuló anyagcsere-változások kulcseleme, ezzel összhangban több, szénhidrátforgalomhoz köthető útvonal is dúsult. Az aminosav-anyagcserében az *A. alternata* esetében az aminosav-bioszintézis és a cisztein-metionin-anyagcsere, a *B. cinerea* esetében az aminosav-bioszintézis mellett az arginin-prolin-, a cisztein-metionin-, valamint a glicin-szerin-treonin-anyagcsere, az *E. nigrum* esetében az aminosav-bioszintézis, a cisztein-metionin-anyagcsere, a lizin-bioszintézis és -lebontás, továbbá a triptofán-anyagcsere, míg az *A. pullulans* esetében az arginin-prolin-, a cisztein-metionin-anyagcsere és a lizinlebontás bizonyult dúsultnak.

A borok illatprofilját alapvetően meghatározó magasabbrendű alkoholok és zsírsavak (Styger és mtsai, 2011) szempontjából figyelemre méltó, hogy az *A. alternata* esetében a „Zsírsav-anyagcsere”, az *E. nigrum* esetében pedig ez, valamint a „Propionát-anyagcsere” útvonal is gazdagodott. Mindezeket túl valamennyi vizsgált fonalas gombánál, valamint az *A. pullulans* esetében is azonosítottuk a „mikroba-antagonista metabolitok bioszintézise” útvonal dúsulását, ami a mikrobák közötti és a mikroba-növény kölcsönhatásokban betöltött szerepükre utal.

A virulenciára irányuló BLAST-analízis tovább árnyalta a képet. Az *A. alternata* nemesrothadáshoz kapcsolódó, felfelé szabályozott központi génkészletében három, környezeti stresszre adott választ kódoló gént azonosítottunk. Az *E. nigrum* esetében szintén három ilyen gén jelent meg, ezek közül kettő a környezeti stresszhez köthető. A *R. graminis* esetében egy stresszválasz-gén volt kimutatható. A *B. cinerea* nemesrothadáshoz kapcsolódó felfelé szabályozott génkészlete hét további virulenciafaktort tartalmazott: egy a környezeti stresszre adott választ, három a mikroba-mikroba antagonisztikus kölcsönhatásokat, négy pedig a növény-mikroba antagonisztikus interakciókat kódolta. Ezzel szemben a *B. cinerea* szürkerothadáshoz kötődő felfelé szabályozott génkészletében hét mikroba-növény antagonisztikus gén volt azonosítható, míg a többi vizsgált faj szürkerothadáshoz kapcsolódó génkészletében virulenciával összefüggő géneket nem találtunk.

A fonalas gombák és élesztők transzkriptom mintázata

A vizsgált fonalas gombák és élesztők transzkriptom-mennyisége és -gazdagsága többnyire szignifikánsan nő az egészséges állapotról a nemesrothadásos, majd a szürkerothadásos állapot felé, ami arra utal, hogy ezek a mikroorganizmusok az ép, tünetmentes bogyókban jóval kevésbé aktívak. A nemesrothadás kezdetekor olyan funkcionális gének expressziója indul meg, amelyek fizikai-kémiai változásokat váltanak

ki; például a szénhidrát-anyagcseréhez kapcsolódó útvonalak aktiválása hozzájárul a bogyóhéj lebontásához, több biokémiai folyamat beindításához, és növényi védekezési mechanizmusokat is kiválthat (Agudelo-Romero és mtsai, 2015). A transzkriptumok mennyiségének és gazdagságának mérsékelt csökkenése a nemesrothadásról a szürkerothadásba történő átmenet során arra utal, hogy a korábban leírt, kiterjedt micéliumnövekedés (Barata és mtsai, 2012) nem tekinthető általános jelenségnek, illetve önmagában nem feltétlenül jár együtt a funkcionális gének magas szintű expressziójával.

Az ANOVA- és NMDS-elemzések feltárták, miként módosul a gombafajok génexpressziós profilja mennyiségi és minőségi értelemben a hónap és a rothadástípus függvényében. A rothadástípusok között minden vizsgált fonalas gombánál és élesztőnél markáns különbségek jelentkeztek, miközben a mintavétel időpontja szorosan korrelált a génexpressziós profillal. Ez arra utal, hogy a szüret időzítése (kora vagy késő őszi) érdemben befolyásolja a nemesrothadás – és kisebb mértékben a szürkerothadás – alatti biokémiai és fizikai folyamatokat, ami összhangban áll a bogyók kémiai paramétereiben (pl. cukortartalom, titrálható savtartalom) korábban leírt különbségekkel (Hegyi-Kaló és mtsai, 2020).

A *B. cinerea* esetében a nemesrothadásban azonosított 600, illetve a szürkerothadásban azonosított 628 differenciálisan expresszált gén egyaránt a faj meghatározó szerepét tükrözi mindkét rothadástípusban. Ugyanakkor a többi fonalas gomba és élesztő esetében a nemesrothadásakor lényegesen több (több mint 31), míg szürkerothadásakor jóval kevesebb (kevesebb mint 5) gén mutatott szignifikáns expresszióváltozást, ami arra utal, hogy ezek a fajok aktívabban járulnak hozzá a nemesrothadás kialakulásához, mint a szürkerothadáshoz.

A nemesrothadás és a szürkerothadás közötti koncepcionális kapcsolatok

Vizsgálataink jelentős minőségi és mennyiségi különbségeket tártak fel a fonalas gombák és élesztők génexpressziós profiljaiban a nemesrothadás és a szürkerothadás összevetésében. Az *A. alternata*, *B. cinerea*, *E. nigrum*, *A. pullulans* és az *R. graminis* esetében a génontológiai és útvonal-dúsulási elemzések a nemesrothadás során jóval aktívabb mintázatot jeleztek, különösen a nemesrothadáshoz kapcsolódó anyagcsere-folyamatok, valamint a sejtszintű transzport és proliferáció terén. Az *A. alternata* és a *B. cinerea* nemesrothadáshoz kapcsolódó, felfelé szabályozott génjei között a sejtosztódással összefüggő génontológiai (GO) kategóriák megjelenése összhangban van Blanco-Ulate és mtsai (2015) eredményeivel, akik „sejtnövekedéssel” összefüggő dúsult útvonalakat azonosítottak.

A nemesrothadás idején a szőlőbogyókban számos fizikai és biokémiai változás zajlik. Az *A. alternata* és a *B. cinerea* ilyenkor több, a szénhidrát-anyagcserében részt vevő gént expresszál (Hegyi és mtsai, 2022; Otto és mtsai, 2022). Ezek az útvonalak hozzájárulnak a bogyóhéj sejtfalának módosulásához is, amely jelentős mennyiségű szénhidrátot –

többek között glükózt, fruktózt, cellulózt, xilózt, xiloglükánt, arabinánt, arabinogalaktánokat, xilánt és mannánt – tartalmaz (Hegyi és mtsai, 2022).

A bogyók dehidratációja és a növekvő cukorkoncentráció fokozott környezeti stresszt jelent a gombák számára, amit a stressztűréshez kapcsolódó gének jelenléte is jelez. Ilyenek például a trihidroxinaftalin-reduktáz (UV-védelem), az autofágiában részt vevő gének, illetve a génregulációban szerepet játszó eIF4A-helikáz. E gének jelenléte a változó mikroklímához való alkalmazkodóképességet tükrözi.

Az *E. nigrum* esetében azonosított dihidrolipoamid-dehidrogenáz szerepet játszhat észterek szintézisében, amelyek gyümölcsös aromákat eredményeznek. A zsírsav-anyagcseréhez kapcsolódó alkohol-dehidrogenázok és zsírsav-szintázok olyan folyamatokat is táplálhatnak, amelyek propionsav-szintézishez vezetnek; ennek jelenléte szintén jellemző az aszúborokra.

A gombák közötti, valamint a gombák és a gazdanövény közötti kölcsönhatások

Az *A. alternata*, *E. nigrum*, *B. cinerea*, *A. pullulans* és *R. graminis* esetében a nemesrothadás során felfelé szabályozott, differenciálisan expresszált génkészletekben azonosított, virulenciához köthető gének jelenléte erősen valószínűsíti az antagonista kölcsönhatások fennállását. Ez arra utal, hogy ezek a gombák egymással és prokariótákkal is versengenek az élettérért és a tápanyagokért. A nemesrothadás különböző fázisai és a szürkerothadás alatti, változó mikroökológiai feltételek, továbbá a mikroba–mikroba kölcsönhatásokra utaló genetikai bizonyítékok feltehetően hozzájárulnak a mikrobiom szukcessziójához. Az „antagonista metabolitok bioszintézise” útvonal hiánya szürkerothadás során valamennyi vizsgált fonalas gombában és élesztőben részben magyarázhatja a Barata és mtsai (2012) által leírt dús micéliumnövekedést. Mindez arra utal, hogy nemesrothadás alatt a fonalas gombák és élesztők nemcsak a fizikai–kémiai változások előidézésében, hanem a mikrobaközösség szerkezetének alakításában is szerepet játszhatnak. Elemzéseink során azonosítottunk olyan enzimeket is, amelyek az antagonista metabolitok bioszintézisében vesznek részt, és kellemetlen szagú vegyületek – például kénhidrogén és más kénvegyületek (szulfidok) – képződéséhez vezethetnek. Míg a legtöbb fonalas gomba és élesztő kizárólag nemesrothadásban fejez ki antagonista géneket, a *B. cinerea* esetében ezek a gének mind nemesrothadás (útvonal-gazdagodás és virulenciagén-BLAST), mind szürkerothadás során (virulenciagén-BLAST) kimutathatók. Az antagonista metabolitok bioszintézisének jelenléte az összes vizsgált fonalas gombában és az *A. pullulans* nemesrothadás génkészletében alátámasztja a feltételezett, komplex kölcsönhatási hálózatot. Ez éles ellentétben áll a szürkerothadás helyzetével, ahol a *B. cinerea* felé irányuló külső antagonizmus hiánya – a kedvezőbb ozmotikus környezettel együtt – hozzájárulhat a *B. cinerea* túlsúlyához, amely káros élettani változásokat és termésvesztést idézhet elő. A *B. cinerea* szürkerothadás során felfelé szabályozott génkészletében azonosított, gazdanövény–kórokozó kölcsönhatásokban szereplő gének jelenléte arra utal, hogy a destruktív folyamat közvetlen kiváltó ágenséről lehet szó.

Következtetések

Vizsgálataink rámutattak, hogy a *B. cinerea* mellett más fonalas gombák és élesztők szerepe a nemesrothadás és a szürkerothadás kialakulásában jelentősebb lehet annál, mint korábban feltételezték. A metabolikus aktivitáshoz köthető génontológiai kategóriák és útvonalak széles körű dúsulása, amely az összes vizsgált fonalas gomba és élesztő nemesrothadás során felfelé szabályozott génkészletében megfigyelhető volt, arra utal, hogy ezek a mikroorganizmusok a nemesrothadás alatt a szürkerothadáshoz képest jóval aktívabb anyagcserét folytatnak. Ez a fokozott aktivitás nagy valószínűséggel hozzájárul a nemesrothadásra jellemző fizikai-kémiai változásokhoz – például aroma-prekúzorok és szerves savak felhalmozódásához, valamint olyan kedvező metabolitok termelődéséhez, amelyek a nemesrothadásos borok jellegzetes érzékszervi profilját formálják. Mindezek alapján valószínű, hogy a mikroba-mikroba kölcsönhatások és az ökológiai tényezők által meghatározott bogyó-mikrobiom-szukcesszió közvetetten is érdemben befolyásolja a nemesrothadás lefolyását.

Eredményeink nemcsak a vizsgált mikrobák fokozott anyagcsere-aktivitását tárják fel, hanem az *A. alternata*, *B. cinerea* és *E. nigrum*, illetve az *A. pullulans* és *R. graminis* nemesrothadásban megfigyelt funkcionális génkifejeződési mintázatai révén betekintést adnak azokba a kölcsönhatási mechanizmusokba is, amelyek a bogyó felszínén kialakuló komplex mikrobaközösség dinamikáját alakítják.

A *B. cinerea* szürkerothadásra jellemző génkifejeződési mintázatában kizárólagosan azonosított gazda-kórokozó kölcsönhatási gének – köztük több gazdaspecifikus interakciós gén – jelenléte arra utal, hogy a kórokozó a szürkerothadással járó kedvezőtlen élettani változások és a termésveszteség elsődleges kiváltó ágensének tekinthető.

5.1.3. A szőlőnövény *B. cinerea* fertőzésre adott válaszai

A nemesrothadás és a szürkerothadás jobb megértéséhez a szőlő funkcionális génkészletének változásai is adnak információkat. Kísérleteinkben megvizsgáltuk, milyen génexpressziós eltérések figyelhetők meg szürkerothadásban, nemesrothadásban, valamint a fejlődő rothadás korai stádiumában lévő szőlőbogyókban.

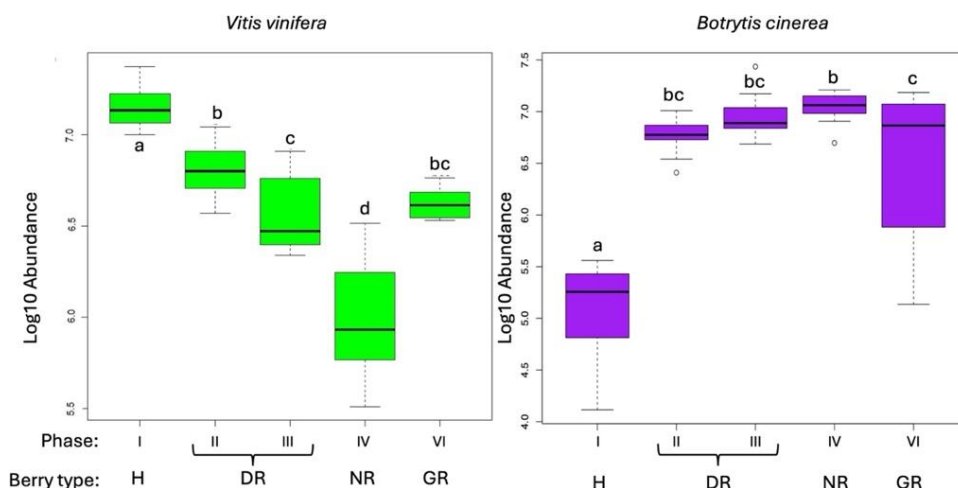
Lényegi kérdés, hogy kedvezőtlen külső körülmények között a nemesrothadás folyamata átfordul-e szürkerothadásba, vagy inkább arról van szó, hogy a fejlődő rothadás korai stádiuma a szürkerothadáshoz áll közelebb, és csak tartósan kedvező időjárási viszonyok mellett fejlődik tovább nemesrothadássá. Tekintettel a nemesrothadásos és a szürkerothadásos bogyók közötti egyértelmű fizikai és kémiai különbségekre, azt feltételezzük, hogy a két rothadásforma eltérő növényi szabályozási programokhoz kötődik, ami a szőlő által expresszált gének funkcionális különbségeiben is megnyilvánul.

Hipotézisünk szerint tartósan kedvező körülmények fennállásakor a nemesrothadásos állapot stabilizálódik, a bogyók hosszabb ideig megőrzik jellegzetes fizikai és kémiai tulajdonságaikat, miközben a növény a patogénekkal szemben mérsékeltbb védekezési

választ ad. Ezzel párhuzamosan más anyagcsere-folyamatok aktívan zajlanak a *B. cinerea* számottevő jelenléte ellenére is.

A *V. vinifera* génkészlet kvantitatív elemzése

A szőlő és a *B. cinerea* gének relatív abundanciájának összegét mintatípusonként egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze, hogy feltárjuk a szürkerothadás és a nemesrothadás fázisai közötti különbségeket. A 9. ábra a bogyótípusok teljes génabundancia-eloszlásának boxplotját mutatja.



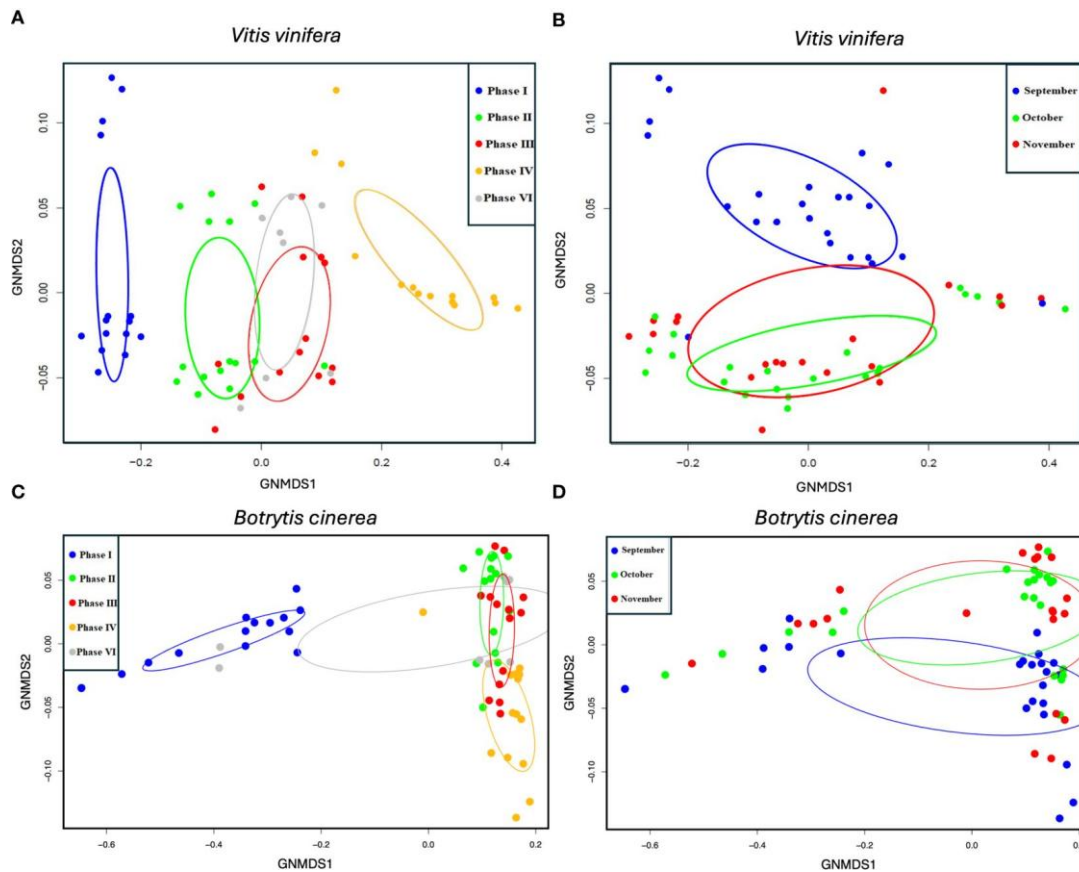
9. ábra A *V. vinifera* és a *B. cinerea* transzkriptumainak abundancia-eloszlását bemutató boxplot az összes vizsgált bogyótípusra vonatkozóan. A vízszintes tengelyen a fejlődési fázisok és a bogyó- vagy rothadástípusok szerepelnek. Az abundancia értékek tízes alapú logaritmusos transzformációval kerültek ábrázolásra.

A szőlő esetében a legnagyobb összesített génabundanciát az egészséges bogyókban (I fázis) mértük, ezt követte a II és III fázis, amelyek együtt a fejlődő rothadás állapotát jelzik. A nemesrothadás fázisában ezzel szemben az abundancia szignifikánsan alacsonyabb. A szürkerothadás fázisában mért eloszlás nem különbözött szignifikánsan a II–III fázis értékeitől.

A kvantitatív elemzés összességében azt mutatta, hogy a legmagasabb génabundancia az egészséges bogyókban, a legalacsonyabb a nemesrothadásban volt; a többi bogyótípus értékei e két szélső között helyezkedtek el, a fejlődő rothadás és a szürkerothadás hasonló nagyságrendet mutatott. Ez arra utal, hogy a vizsgált stádiumban a szőlőbogyó anyagcseréje a nemesrothadás során már lelassul, a növényi metabolikus aktivitás érdemben csökken.

A szőlő génjeinek funkcionális elemzése ugyanakkor eltérő képet mutatott: a nem metrikus többdimenziós skálázás (NMDS) szignifikánsan elkülönülő mintázatot adott a *V. vinifera* és a *B. cinerea* funkcionális génkészletei között a bogyófázisok függvényében (10. ábra).

Ezt a PERMANOVA is megerősítette: mind a szőlő funkcionális génkészlete és a bogyófázisok varianciaarányai között szignifikáns kapcsolat mutatkozott, mind a *B. cinerea* esetében szignifikáns fázisfüggő különbségek jelentek meg.



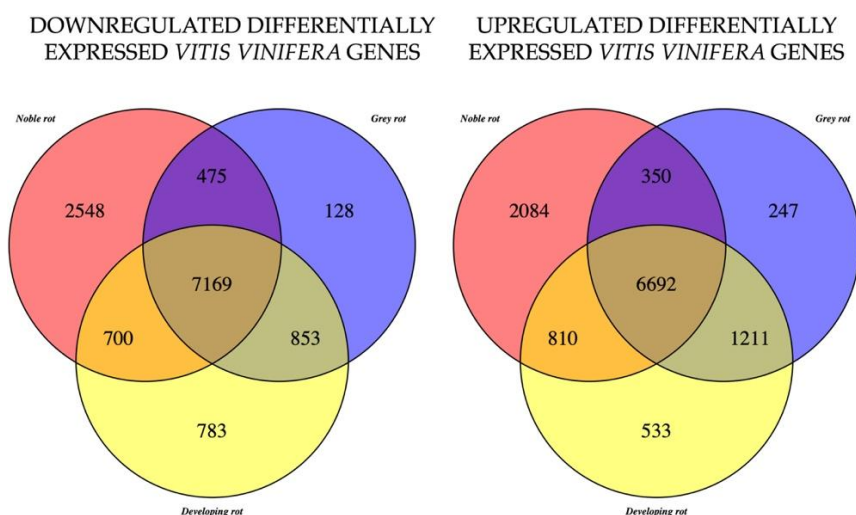
10. ábra NMDS többdimenziós skálázás eredményára a *V. vinifera* (A, B) és a *B. cinerea* (C, D) által annotált gének alapján. A minták különböző színnel történő jelölése a bogyótípusok (A, C), illetve a mintavétel hónapja (B, D) szerinti elkülönülést szemlélteti.

A mintavételi időpont szerinti bontás egyik esetben sem hozott szignifikáns eltérést. Az NMDS-ábrázolás azt jelzi, hogy az egészséges és a nemesrothadásos bogyók génkészlete elkülönül, míg a szürkerothadás és a fejlődő rothadás között részleges átfedés figyelhető meg. A szőlőgének esetében a szürkerothadás és a fejlődő rothadás nem fed át, ugyanakkor a *B. cinerea* génjeinél a szürkerothadásos minták részben átfednek az egészséges, a fejlődő rothadásos és a nemesrothadásos mintákkal.

A szőlő funkcionális génexpressziós abundanciájában megfigyelt enyhe időpontfüggő elkülönülés összhangban áll Pogány és mtsai (2022) megfigyeléseivel: a mintavételi időpont hat a nemesrothadás és a szürkerothadás alakulására, de ez a hatás elsősorban egyes géncsoportoknál, azaz a dúsulási elemzéssel azonosított géneknél mutatható ki.

A *V. vinifera* génkészlet funkcionális elemzése

A szőlő funkcionális génjeinek elemzését a korábban ismertetett bontásban, a bogyók rothadástípusai szerint végeztük: egészséges, fejlődő rothadásos, nemesrothadásos és szürkerothadásos minták összevetésével. Célunk az volt, hogy azonosítsuk azokat a géneket, amelyek a beteg bogyótípusokban differenciáltan expresszálódnak az egészséges mintákhoz képest. Az összefoglaló eredményeket a 11. ábra mutatja.



11. ábra Venn-diagram a *V. vinifera* génekre vonatkozóan, a lefelé szabályozott és a felfelé szabályozott gének esetében, nemesrothadás, fejlődő rothadás és szürkerothadás mintákra vonatkozóan. A differenciális expresszió-analízisek összehasonlítási alapját az egészséges bogyók génkészlete képezte.

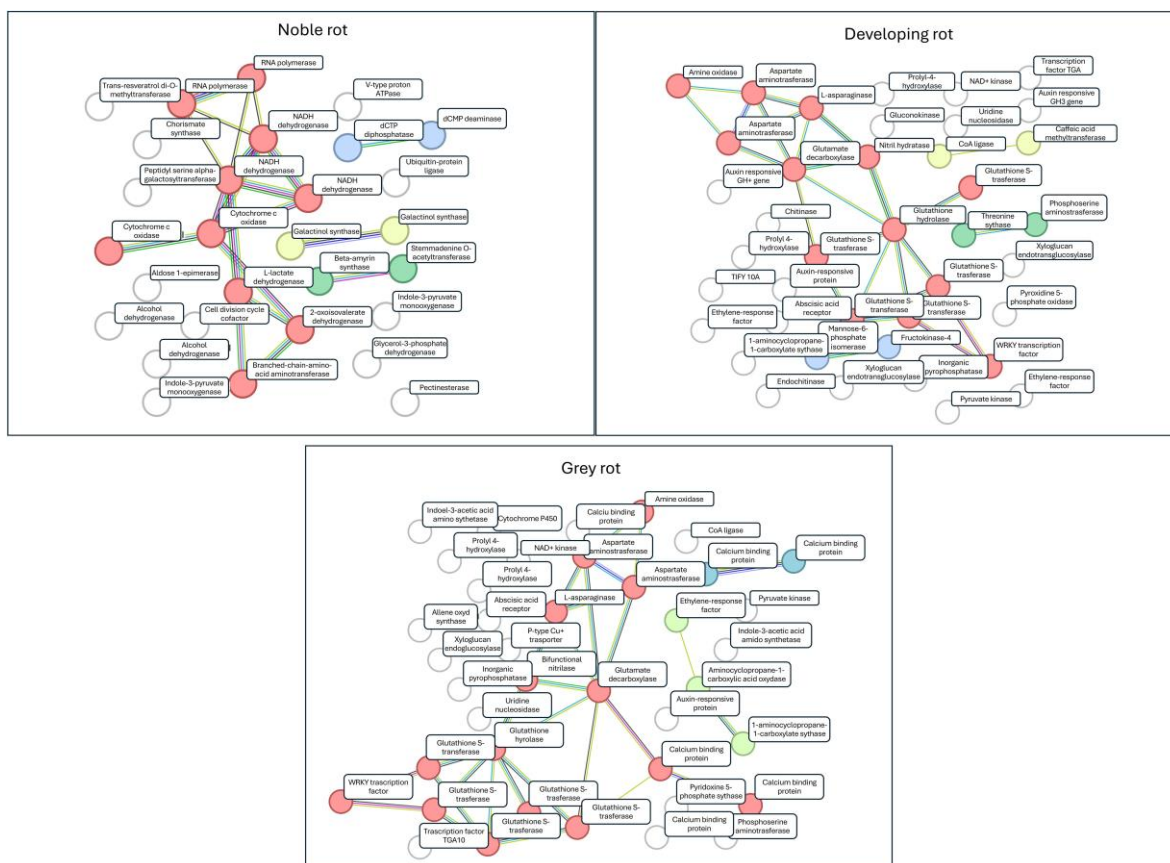
A szabályozott (felfelé vagy lefelé expresszáldó) gének nagy része a három rothadástípus közös génkészletében is azonosítható volt, ugyanakkor számottevő mennyiségben találtunk kizárólagos, bogyótípus-specifikus differenciálisan expresszált géneket is.

Az ábra alapján látható, hogy a fejlődő rothadás több közös, differenciáltan expresszáldó gént oszt meg a szürkerothadással, mint a nemesrothadással (felfelé szabályozott gének: 1211 vs. 810; lefelé szabályozott gének: 853 vs. 700). Noha a legalacsonyabb összesített génabundanciát a nemesrothadásos bogyókban mértük, a kizárólag a nemesrothadás fázisára jellemző differenciált gének száma kiemelkedő volt: 2084 gén felfelé, 2548 gén lefelé szabályozott.

Megvizsgáltuk a két rothadástípus ellentétes irányú szabályozottságát is. A nemesrothadás fázisában felfelé, míg a szürkerothadás fázisában lefelé szabályozott génekből mindössze kettőt azonosítottunk. Ezzel szemben a szürkerothadásban felfelé, a nemesrothadásban lefelé szabályozott gének száma 452 volt. Ennek megfelelően elemeztük, mely funkcionális útvonalak mutatnak fokozott aktivitást szürkerothadásban, miközben csökkentek nemesrothadásban.

Több ilyen útvonal nemcsak a két rothadástípus ellentétes összehasonlításában, hanem az egészséges és a szürkerothadásos minták közti kontrasztban is szignifikánsan dúsultnak bizonyult, és azonosítottunk újonnan felbukkanó, dúsuló útvonalakat is.

A különböző génkészletek funkcionális jellemzésére KOBAS útvonal-dúsulási elemzést végeztünk a nemesrothadásos, szürkerothadásos és fejlődő rothadásos bogyókban felfelé szabályozott génkészleteken, a szignifikánsan dúsuló útvonalak meghatározására. A három bogyótípusra jellemző, k-means klaszterezéssel létrehozott funkcionális hálózatokat a 12. ábra szemlélteti, a KEGG-adatbázisból származó génnevekkel annotálva.



12. ábra A nemesrothadásos, szürkerothadásos és fejlődő rothadásos transzkriptomokra jellemző génkészletek magklaszterei. A k-means klaszterezéssel kapott modulokat körökkel jelöltük; a gének megnevezése a KEGG-nomenklatúra szerint történt.

Különös jelentőséggel bírnak azok az útvonalak, amelyek szürkerothadásban felfelé, míg nemesrothadásban lefelé szabályozottak. Ezek közül több az egészséges-szürkerothadás összehasonlításban is szignifikánsan dúsult, jelezve, hogy a szürkerothadás sajátos funkcionális programja számos, a növény-kórokozó kölcsönhatásokban és az anyagcsere-átalakításokban kulcsszerepet játszó útvonal aktiválásával társul.

A nemesrothadásban lecsökkent, elkülönülő génkészlet

A szőlő génapundanciáinak rothadási szakaszok szerinti eloszlását a mintákból szekvenált és annotált *B. cinerea* gének abundanciájával vetettük össze. A vizsgált időszakban a gomba olyan fizikai és kémiai változásokon megy keresztül, amelyek a nemesrothadás folyamatához kapcsolódnak – például a bogyóhéj lebontása (Hegyi-Kaló és mtsai, 2020) és a cukortartalom növekedése (Blanco-Ulate és mtsai, 2015; Lovato és mtsai, 2019; Otto és mtsai, 2022). A nemesrothadás és a szürkerothadás közötti különbségekben megfigyelhető funkcionális transzkriptomnövekedés feltehetően a szőlő védekezési mechanizmusainak aktiválódását tükrözi. Mindez összhangban áll azzal a feltételezéssel, hogy a két rothadástípusban eltérő szőlőgének expresszálódnak (Pogány és mtsai, 2022).

Az NMDS eredményei alapján a szürkerothadásos és a fejlődő rothadásos állapotok a *V. vinifera* génkészletét tekintve hasonló expressziós profilt mutatnak. Ezt alátámasztja az a széles körben dokumentált jelenség is, hogy a nemesrothadás korai szakasza kedvezőtlen környezeti feltételek mellett szürkerothadássá alakulhat (Magyar, 2011). Eredményeink szerint a nemesrothadás kezdeti fázisa gyakorlatilag egybeesik a szürkerothadás korai mintázatával, és csak a kifejlett, érett nemesrothadási állapot tér el markánsan a szőlő génexpressziója alapján. Ez nem mond ellent annak a megfigyelésnek, hogy ugyanazon a fürtön, azonos időpontban egészséges, nemesrothadásos, szürkerothadásos és fejlődő rothadásos bogyók is előfordulhatnak (Fournier és mtsai, 2013).

Eltérő rothadástípusokhoz kapcsolódó metabolikus útvonalak azonosítása

A növény–kórokozó kölcsönhatások többsége nem pusztán a kórokozó által kiváltott immunválasz vagy az előre kialakított védelmi gátek következménye, hanem a növényi anyagcsere – elsősorban az aminosav-, szénhidrát- és zsírsav-anyagcsere – átalakulásával függ össze, amelynek során a védekezésben szerepet játszó másodlagos metabolitok képződnek (Proels és Hückelhoven, 2014). Az eredmények összhangban álltak a három bogyótípusra végzett NMDS-analízissel: mindhárom esetben egy domináns funkcionális génklaszter különült el (12. ábra). A szürkerothadás- és a fejlődőrothadás-klaszter elsősorban a patogénfertőzésre adott növényi válaszokkal hozható összefüggésbe, míg a nemesrothadás-klaszter olyan funkciókat tükröz, amelyek a növény normál működésére utalnak, patogén-interakciók látványos aktivációja nélkül.

A nemesrothadás fázisában megjelenő magklaszter génjei főként az általános érési folyamatokhoz kapcsolódnak; ezzel párhuzamosan a védekezési útvonalak szignifikáns dúsulása nem figyelhető meg. Ez két okból figyelemre méltó: a szakirodalom a bogyó ezen állapotát gyakran biológiailag inaktív, kvázi nyugalmi fázisként írja le (Elad és mtsai, 2016), amit jelen eredményeink – az azonosított funkcionális gének számossága alapján – határozottan cáfolnak (11. ábra), illetve további vizsgálataink szerint nemcsak a *B. cinerea*, hanem más gombafajok is aktív metabolikus tevékenységet folytatnak ezekben a bogyókban (Hegyi és mtsai, 2023). Mindez arra utal, hogy a vizsgált szőlőbogyó – jelentős gombakolonizáció mellett is – a növény–kórokozó kölcsönhatások szempontjából relatíve „csendes”, stabil állapotban maradhat, ami magyarázhatja, hogy az aszúsodott bogyók a tőkén akár tartós időjárási ingadozások mellett is fennmaradnak.

A fejlődőrothadás és a szürkerothadás esetében a transzkriptom-magklaszterek jelentős átfedést mutattak, ami arra utal, hogy e gének aktivációja leginkább stresszválasz-folyamatokhoz és a kórokozókkal szembeni védekezés egyes lépéseéhez köthető (AbuQamar és mtsai, 2016). Számos aminosav-anyagcseréhez tartozó útvonal mellett a „növény–kórokozó kölcsönhatás” génjei kizárólag a szürkerothadás magklaszterében jelentek meg, míg a fejlődőrothadás esetében nem. A klaszterbe nem sorolt, ám szignifikánsan dúsult gének célzott vizsgálata további olyan funkciók azonosítását teheti lehetővé, amelyek kulcsfontosságúak a kórokozó–növény interakciókban és a kapcsolódó jelátviteli mechanizmusokban.

A nemesrothadás során feldúsuló gének funkcionális szerepe

A nemesrothadásos bogyókban azonosított, transzkripcióval összefüggő gének jelenléte elsősorban arra utal, hogy a nemesrothadás és a fejlődő rothadás közötti átmenet során átfogó transzkripciós újraprogramozás zajlik. Ezek a transzkripciós faktorok kulcsszerepet játszanak a védekezéssel összefüggő gének és a különféle metabolitok bioszintézisét meghatározó útvonalak szabályozási „súlypontváltásában” (Howe és mtsai, 2014).

A vizsgálatok során azonosított WRKY transzkripciós faktor megjelenése nem meglepő: a szakirodalom gyakran leírja mint jellemző szabályozóelemet (Wang és mtsai, 2014), és ismert, hogy képes mind pozitív, mind negatív irányban befolyásolni a védekezési válaszokat. A szénhidrátok kiemelt szerepet töltenek be a növények biotikus és abiotikus stresszre adott válaszaiban; a sejtfal-átalakulásokon túl olyan cukrok, mint a fruktóz, a raffinóz és a trehalóz, a metabolikus érzékelés és a jelátvitel fontos komponensei (Morkunas és mtsai, 2005). Ezzel összhangban azonosítottunk raffinóz-szintázt is, amely a galaktinolt raffinózzá alakítja (Liu és mtsai, 2022).

Külön figyelmet érdemel a nemesrothadásos bogyók dúsult galaktóz-anyagcsere-útvonalában megjelenő, sejtfalhoz kötött apoplasztikus invertáz. Ez az enzim a szacharózt glükózzá és fruktózzá hidrolizálja, alapvetően befolyásolva a szénelosztást és a cukoranyagcserét (Ruan és mtsai, 2010). Szerepe kiterjed a cellulóz-bioszintézis szabályozására is, ami arra utal, hogy az abiotikus stresszel szembeni toleranciában szintén jelentős tényező lehet.

A szürkerothadás során feldúsuló gének funkcionális szerepe

A fejlődő rothadás és a szürkerothadás transzkriptomjai számos, klaszteren kívüli, magas dúsulási arányú gént tartalmaznak, ami megerősíti, hogy ezeket az útvonalakat is figyelembe kell venni az összefüggések átfogó megértéséhez. Két, aminosav-anyagcserehez köthető, szignifikánsan dúsult útvonalon – a fenilalanin- és a tirozin-anyagcsereben – egy tirozin-aminotranszferázt azonosítottunk, amelyet korábbi vizsgálatok a növényi növekedéssel és stresszválasszal hoznak összefüggésbe (Moya-Cuevas és mtsai, 2021). A glutamát-anyagcsere központi szerepet játszik az aminosav-anyagcsere szabályozásában és olyan alapvető metabolikus funkciókban, mint a növényi védekezés (Seifi és mtsai, 2013). A glutation-S-transzferáz enzimről ismert, hogy szerepet tölt be herbicidek – például az atrazin – detoxifikációjában; emellett egy glutaminszintetázt és egy glutamát-dehidrogenázt is azonosítottunk a szürkerothadásos bogyókban, amelyek kulcsszerepet játszanak a védekezési reakciók felismerési és jelátviteli folyamataiban (Datta és mtsai, 2015).

A zsírsavak szintén kiemelt jelentőségűek a növényi védekezés aktiválásában: jelátviteli modulokként és a sejthártyák (glikolipidek) komponenseiként működnek, energiatartalékot képeznek triacilglicerol (TAG) formájában, továbbá hozzájárulnak az extracelluláris gátek kialakításához és a stresszválaszok szabályozásához (He és Ding, 2020). A fejlődő és a szürkerothadás esetében egyaránt kimutatható volt a zsírsav-

bioszintézis enzimeinek jelenléte. A metil-jasmonát és szabad formája, a jasmonsav (JA) az α -linolénsav-anyagcsere dúsult útvonalán képződik, és a kórokozókkal szembeni védekezés egyik kulcsszereplője a felismerés és a jelátvitel szintjén (Kazan és Manners, 2008). A folyamatot több bioszintetikus enzim támogatja, köztük a jasmonsav-amidoszintetáz és a JAZ (Jasmonate ZIM-domain) fehérjecsalád tagjai. A fitohormon-bioszintézishez kapcsolódó további komponensek – az etilénszintézis útvonal elemei – szintén megjelentek. Nem meglepő módon az auxinra érzékeny SAUR fehérjecsalád is jelen van a dúsult növényi hormonjelátviteli útvonalban, mivel kulcsszerepet tulajdonítanak neki a nemesrothadás folyamatában (Stortenbeker és Bemer, 2019).

A fejlődő és szürkerothadásos minták dúsult útvonalai között olyan gének is azonosíthatók, amelyek az ozmotikus stresszre adott válaszokban vesznek részt. A környezeti stresszhez köthető gének közül több kettős funkciót lát el, és a redoxállapot, illetve a reaktív oxigénformák (ROS) szintjének szabályozásában is közreműködik. Ezek a komponensek a PAMP-függő immunitásban és az oxidatív stresszfolyamatokban töltenek be szerepet. A két rothadástípus transzkriptomjai a legmagasabb dúsulási arányokat a fenilpropanoid- és stilbén-bioszintézis, az izokinolin-, taurin- és ubikinon-anyagcsere, valamint az oxidatív foszforiláció útvonalain mutatták. E folyamatok hozzájárulnak a nem enzimatisz antioxiidáns készlethez, befolyásolva a szőlő redoxállapotát és így a védekezési státuszt.

Az ellentétesen szabályozott gének funkciói

A szürkerothadás során felfelé, míg a nemesrothadás során lefelé szabályozott génekhez köthetően szignifikánsan dúsult a glikolízis, a fruktóz- és mannóz-anyagcsere, a pentóz-foszfát útvonal és általában a szénhidrát-anyagcsere. E folyamatok mindegyikében olyan gének mutattak fokozott expressziót, amelyek az aerob respiráció korai lépéseit adják a fruktóz-6-foszfáttól a piroszőlősavig tartó útvonalon. Az általános aminosav-bioszintézis vizsgálatakor a fenilalanin-anyagcseréhez kapcsolódó gének dúsulását figyeltük meg nemesrothadásos bogyókban; maga a fenilalanin-anyagcsere-útvonal is dúsultként jelent meg, ahol az aszpartát-aminotranszferáz a fenilalanint fenil-piruváttá alakítja – ez utóbbi a borokban kellemetlen illatként megjelenő fenil-acetát és fenil-ecetsav prekursora (Campo és mtsai, 2012). A galaktóz-anyagcsere útvonalon felfelé szabályozott géneket azonosítottunk, amelyek a raffinóz és a tagatóz bioszintézisében vesznek részt (raffinóz-szintáz, illetve 6-foszfofruktokináz); az így képződő oligoszacharidok szerepet játszhatnak a hidegstresszre adott válaszokban (Sun és mtsai, 2018). A kéntranszfer rendszer szintén markánsan dúsult: a cisztein-dezulfaráz több lépésben is kulcsszereplőnek bizonyult. Feltételezhető, hogy ez az enzim különböző növényfajokban a H_2S -képződésben is részt vesz – a folyamat többféle növekedési és stresszállapottól függhet, mechanizmusa azonban még csak részben ismert (Vojtovič és mtsai, 2021). A nikotínát- és nikotinamid-anyagcseréhez kapcsolódóan több kulcsgént azonosítottunk, amelyek a nikotínát-D-ribonukleozid bioszintézisében játszanak szerepet; ez az

anyagcseretermék a növényi szövetek patogének általi lebontásakor keletkező potenciális metabolitként ismert (Qu és mtsai, 2022).

A szürke- és nemesrothadás összehasonlításában a növény-kórokozó kölcsönhatás útvonalának génjei is szignifikánsan dúsultak, ami segíti a két folyamat közötti alapvető különbségek megértését. Szürkerothadásban szignifikánsan nőtt – míg nemesrothadásban csökkent – a kalcium-dependens protein-kinázt, a WRKY transzkripciós faktort, a PTI1-szerű tirozin-kinázt, egy feltételezett betegséggel szembeni rezisztenciához kapcsolódó fehérjét (RPS2), valamint az SGT1 homológot kódoló génnek expressziója. Ezek a komponensek kulcsszerepet játszanak a hiperszenzitív válasz kialakításában, ideértve az effektor-indukált immunitást és a patogénnel asszociált molekuláris mintázat (PAMP) által kiváltott immunitást (Shang és mtsai, 2006). Ugyanakkor a folyamatban szintén központi RAR1 és HSP90 fehérjéket kódoló génnek nem jelentek meg a felfelé szabályozott génkészletben. Szürkerothadásban a gombás PAMP-felismerésre reagáló kalcium-jelátviteli génnek aktiválódnak, és ezzel a védekezéssel összefüggő génnek széles köre is bekapcsol. A patogének szekréciós effektorjaival kiváltott hiperszenzitív válaszra jellemző, hogy az effektor-indukált és a PAMP-alapú immunitás egymásra épülve biztosít védelmet (Ngou és mtsai, 2021).

Az ANOVA-tesztek a szőlő védekezési válaszában csökkenését jelezték a nemesrothadásos fázisban, amelyet a szürke- és a fejlődő rothadásos fázisokban növekedés követett. A szőlő génexpressziós profiljának funkcionális diverzitása a fejlődő és a szürkerothadásos mintákban szignifikánsan mérséklődött; ez összhangban áll Lovato és mtsai (2019) megállapításaival, akik a nemesrothadás során végbemenő specifikus transzkripciós újraprogramozást – különösen a védekezéssel összefüggő génnek lefelé szabályozását – emelik ki. A szürkerothadásban fokozódó védekező génexpresszió megfelel Haile és mtsai (2020) megfigyeléseinek is: a génnek aktív, ám hatástalanok, mivel a *B. cinerea* nekrotróf életmódot folytat, és fitotoxikus anyagokat – például botcininsavat és botridialsavat – termel (Lovato és mtsai, 2019; Otto és mtsai, 2022), amelyek a növényi szövetek elhalását idézik elő.

Következtetések

A *B. cinerea*-val fertőzött szőlőbogyók érése során a tartósan kedvező mikroklimatikus feltételek nemesrothadásos bogyók kialakulásához vezethetnek, míg a körülmények kedvezőtlen irányú változása szürkerothadásos, termésveszteséggel járó állapotot eredményez. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a nemesrothadás fejlődésének kezdeti szakasza nagyfokú hasonlóságot mutat a szürkerothadással, és csak a teljesen kifejlett nemesrothadás tér el markánsan a szőlő génexpressziója alapján. A köztes fázisok nem különülnek el egyértelműen, ami magyarázza, hogy a fejlődő rothadás bármely szakaszából szürkerothadás alakulhat ki, illetve ugyanazon tőkén, sőt fürtön belül is többféle bogyótípus fordulhat elő.

A nemesrothadás génexpressziós profilja kiterjedt másodlagos anyagcserét jelez, miközben a kórokozóra adott védekezési válaszok számottevően gyengébbek. Ez ellentmond annak a korábbi elképzelésnek, amely a nemesrothadásos bogyót biológiailag inaktív, kvázi nekrotikus állapotnak tekintette: eredményeink több aktív biológiai folyamat jelenlétét igazolják. Ezek a folyamatok ugyanakkor nem a védekezést, hanem az érési programot tükrözik. A szőlő védekezési mechanizmusainak komplex értékelése feltárta, hogy a legerősebb védekező válaszok szürkerothadás során jelentkeznek. E reakciók azonban nem bizonyulnak hatékonynak, mert a *B. cinerea* ebben a fázisban nekrotróf életmódot folytat, és olyan virulenciafaktorokat (pl. botcininsav, botridialsav) expresszál, amelyek a növényi szövetek elhalását okozzák. A biotróf és nekrotróf életmód közötti váltás a *B. cinerea* esetében is igazolt jelenség (Glazebrook, 2005). E kettős életmód megértése fontos támpontot adhat a növényvédelmi és szőlészeti beavatkozások időzítésének és hatékonyságának javításához.

5.2. Az aszúsodás folyamatának alapjai

5.2.1. A nemesrothadásos *B. cinerea* izolátumok jellegzetességei

Az aszúsodás folyamatának jobb megértése érdekében nemesrothadás tüneteit mutató szőlőfajtákról (Olaszrizling, Turán) származó *B. cinerea*-izolátumok fenotípusos tulajdonságait vizsgáltuk három éven át, három szüreti időpontból gyűjtött mintákon, három inkubációs hőmérsékleten. Célunk a nemesrothadás kialakulásának valószínűsége és a *B. cinerea* fenotípusos tulajdonságai közötti összefüggések feltárása.

A nemesrothadás előfordulásának valószínűsége és a micélium növekedés

A nemesrothadás kialakulásával kapcsolatban a varianciaanalízis szignifikáns különbségeket tárt fel az év, a hónap és a fajta tényezők mentén. A legmagasabb előfordulási arányt (78,7%) Turán esetében, 2015 novemberében mértük, a legalacsonyabbat (0,5%) pedig Olaszrizlingnél, 2013 szeptemberében. Turánnál novemberben minden vizsgált évben szignifikánsan magasabb volt a nemesrothadás aránya, míg szeptemberben következetesen alacsonyabb, mint novemberben (4. táblázat).

A micéliumnövekedés sebességére vonatkozó varianciaanalízis szignifikáns különbségeket mutatott az évek, a hónapok és az inkubációs hőmérsékletek között, a szőlőfajták között azonban nem, ezért a két fajta adatait átlagoltuk. A három év és a három mintavételi hónap adatai alapján a micéliumnövekedés sebessége 15 °C-on 59–79 mm, 20 °C-on 75–84 mm, 25 °C-on pedig 55–77 mm tartományban volt. A legmagasabb értéket (84 mm) 2014 szeptemberi izolátumoknál, 20 °C-on mértük, míg a legalacsonyabbat (55 mm) ugyanezen hónap izolátumainál, 25 °C-on. Az összesített átlagos növekedési ráta 2013-ban volt a legmagasabb (76 mm), 2014-ben és 2015-ben alacsonyabb értékeket kaptunk (65, illetve 69 mm) (5. táblázat).

4. táblázat A *B. cinerea* által okozott nemesrothadás előfordulása (%) Turán és Olaszrizling szőlőfajták esetében
^aLSD_{0,05} = Legkisebb szignifikáns különbség P = 0,05-nél ^bAz egyes oszlopok esetében a különböző kisbetűk P = 0,05-nél szignifikáns különbségeket jeleznek az évek, hónapok között. Minden sorban a különböző nagybetűk az adott hónapon belül a fajták közötti P = 0,05-nél nagyobb szignifikáns különbségeket jelzik. ^cns = nem szignifikáns

Év és hónap	Szőlőfajta		LSD _{0,05} ^a	Összesen
	Turán	Olaszrizling		
2013				
Szeptember	5.1 aA ^b	0.5 aB	3.7	2.6 a
Október	7.1 a	4.3 a	ns ^c	5.7 a
November	50.6 bA	28.4 bB	7.6	39.5 b
LSD _{0,05}	7.0	4.2		39.5 b
2014				
Szeptember	10.3 a	7.2 a	ns	8.8 a
Október	39.4 bA	24.3 bB	6.9	31.9 b
November	37.6 bA	26.5 bB	6.6	32.1 b
LSD _{0,05}	6.9	5.8		6.7
2015				
Szeptember	4.2 a	0.8 a	ns	2.5 a
Október	9.7 a	7.3 a	ns	8.5 a
November	78.7 bA	57.6 bB	8.9	68.2 b
LSD _{0,05}	11.5	7.4		9.5

5. táblázat A *B. cinerea* micélium növekedési sebessége (mm) négy napos inkubációt követően 15, 20 és 25°C-on három évben (2013, 2014, 2015) a nemesrothadás három hónapja (szeptember, október, november) alatt.

^aLSD_{0,05} = Legkisebb szignifikáns különbség P = 0,05-nél; ^bOverall Temp = a 15, 20 és 25 °C-os hőmérséklet-tartományok teljes hőmérséklete; ^cAz egyes oszlopok esetében a különböző kisbetűk P=0,05-nél szignifikáns különbségeket jeleznek az évek, hónapok között. Minden sorban a különböző nagybetűk P=0,05-nél szignifikáns különbségeket jeleznek a hőmérsékleti tartományok között. ^dns= nem szignifikáns

Év és hónap	Hőmérsékletek			LSD _{0,05} ^a	Overall Temp ^b
	15°C	20°C	25°C		
2013					
Szeptember	79 bB ^c	79 B	74 A	3.6	77
Október	76 ab	76	74	ns ^d	76
November	75 a	77	77	ns	76
LSD _{0,05}	3.4	ns	ns		ns
2014					
Szeptember	59 A	84 bB	55 A	7.5	66
Október	59 A	83 bB	56 A	7.4	66
November	61 A	75 aB	56 A	6.8	64
LSD _{0,05}	ns	3.6	ns		ns
2015					
Szeptember	61 A	75 B	67 aA	6.9	68
Október	62 A	76 B	71 abB	7.0	69
November	61 A	75 B	72 bB	7.3	69
LSD _{0,05}	ns	ns	4.2		ns
Hó összesen					
Szeptember	66 A	79 B	65 A	6.5	70
Október	66 A	78 B	67 A	7.4	71
November	65 A	76 B	68 A	7.1	70
LSD _{0,05}	ns	ns	ns		ns
Év összesen					
2013	77 b	77 ab	75 b	ns	76 b
2014	60 aA	81 bB	56 aA	7.9	65 a
2015	61 aA	75 aB	70 bB	7.6	69 a
LSD _{0,05}	6.6	5.8	7.3		6.4
Összesen					
Év és hónap	66 A	78 B	67 A	7.9	70

A morfológiai típusok gyakorisága

A morfológiai típusok gyakorisági eloszlását illetően a varianciaanalízis szignifikáns különbségeket jelzett az évek, a hónapok és a morfológiai csoportok között; a fajták között viszont nem mutatkozott szignifikáns eltérés. Ennek megfelelően az eloszlási adatokat a két szőlőfajtára összevontan értékeltük. A micéliumos típusok aránya minden évben és mindhárom mintavételi hónapban szignifikánsan meghaladta a szklerotikus típusokét. Általánosságban a leggyakoribb kategóriák az M I–III és az S IV típusok voltak. 2013 szeptemberében az M III típus bizonyult a leggyakoribbnak (58,3%).

6. táblázat A *B. cinerea* izolátumok gyakorisági megoszlása (%) a morfológiai típusok nyolc osztályában (M I–IV és S I–IV), három évben (2013, 2014, 2015) a nemesrothadás három hónapja (szeptember, október, november) alatt.

	Micéliális típus M ^a						Szklerociális típus S ^a					
	M I	M II	M III	M IV	LSD _{0.05}	Σ M-	S I	S II	S III	S IV	LSD _{0.05}	Σ S-
2013												
Szeptember	8.3 aA ^c	25.0 bB	58.3 cC	0.0 A	14.9	91.7 b	8.3 B	0.0 aA	0.0 A	0.0 aA	4.4	8.3 a
Október	12.5 aAB	20.0 abB	42.5 bC	0.0 A	13.8	75.0 a	2.5 A	2.5 aA	0.0 A	20.0 bB	5.3	25.0 b
November	42.2 bC	11.1 aA	24.4 aB	2.2 A	12.9	80.0 ab	4.4 A	11.1 bB	0.0 A	4.4 aA	5.1	20.0 b
LSD _{0.05}	13.3	11.7	15.2	ns		16.1	ns	5.8	ns	6.8		7.1
2014												
Szeptember	37.6 bD	12.8 B	25.4 aC	0.0 aA	12.1	75.0 b	0.0 aA	6.3 B	12.5 bC	6.3 aB	4.7	25.0 b
Október	30.8 bB	11.5 A	38.5 bB	0.0 aA	11.9	80.8 b	0.0 aA	3.8 A	3.8 aA	11.5 aB	4.4	19.2 b
November	16.9 aB	16.6 B	23.7 aB	3.4 bA	9.9	61.0 a	5.1 bA	5.1 A	6.8 aA	22.0 bB	4.8	39.0 c
LSD _{0.05}	13.7	ns	11.2	2.8		13.8	3.7	ns	4.8	6.3		7.6
2015												
Szeptember	5.7 aA	17.1 B	22.9 bB	5.7 aA	10.9	51.4 a	2.9 aA	17.1 cB	5.7 aA	22.9 bC	5.4	48.6 b
Október	29.4 bB	14.7 A	11.8 aA	5.9 aA	11.3	61.8 b	17.6 cC	5.9 bA	2.9 aA	11.8 aAB	5.0	38.2 a
November	9.7 aA	16.1 AB	12.9 abAB	19.4 bB	9.3	58.1 ab	9.7 bB	0.0 aA	12.9 bB	19.4 bC	5.4	41.9 ab
LSD _{0.05}	11.5	ns	10.8	9.4		10.2	5.0	5.1	4.4	5.8		8.3
Hó össz												
Szeptember	17.2 aB	18.2 B	35.4 bC	1.9 aA	12.1	72.7	3.7	7.8	6.1 b	9.7 a	ns	27.3
Október	24.2 bBC	15.4 B	30.9 abC	2.0 aA	11.6	72.5	6.7 A	4.1 A	2.3 aA	14.4 bB	4.5	27.5
November	22.9 abB	14.7 AB	20.4 aB	8.3 bA	10.8	66.4	6.4 A	5.4 A	6.6 bA	15.3 bB	4.8	33.6
LSD _{0.05}	6.9	ns	11.6	4.2		ns	ns	ns	3.7	4.3		ns
Év össz												
2013	21.0 abB	18.7 B	41.8 bC	0.7 aA	12.3	82.2 b	5.1 aB	4.5 B	0.0 aA	8.1 aB	3.8	17.8 a
2014	28.4 bC	13.7 B	29.1 bC	1.1 aA	9.3	72.3 ab	1.7 aA	5.1 AB	7.7 bB	13.3 abC	4.3	27.7 b
2015	14.9 a	16.0	15.8 a	10.3 b	ns	57.1 a	10.1 bA	7.7 A	7.2 bA	18.0 bB	4.7	42.9 c
LSD _{0.05}	9.2	ns	13.1	4.6		15.7	4.2	ns	3.6	5.3		8.5
Év és hónap	21.5 B	16.1 AB	28.9 B	4.1 A	15.6	70.5	5.6 A	5.8 A	5.0 A	13.1 B	4.2	29.5

A micéliumos izolátumok 2013-ban gyakoribbak voltak (82,2%), mint 2015-ben (57,1%). A mintavételi hónapok között 2013-ban az M I–III, S II és S IV típusoknál volt eltérés a korábbi (szeptember/október) és a későbbi (november) időpontok között; 2014-ben az M I, M III, M IV, S I, S III és S IV típusoknál; 2015-ben pedig az M I, M IV és S I–IV típusoknál (6. táblázat).

A hőmérséklet hatása a micélium növekedésre

A termikus optimum a kék- és fehérbogyójú fajtákból származó *B. cinerea* törzsek micéliumnövekedése esetében azonos volt, az ANOVA nem jelzett szignifikáns fajtahatást. A legnagyobb növekedési sebességet 20 °C-on mértük, míg 15 és 25 °C-on

csökkenést tapasztaltunk (5. táblázat). Eredményeink összhangban állnak Ciliberti és mtsai (2015) megfigyeléseivel, akik szintén 20 °C-on írtak le maximumot a micéliumnövekedésben, illetve a fertőzési erélyben. A hőmérséklet hatásának értelmezéséhez az évjárat különbségeket is figyelembe vettük. Damialis és mtsai (2015) az 1980-as évektől a 2000-es évekig terjedő időszak átlagos léghőmérsékletei és a *B. cinerea* micéliumnövekedési sebessége között szignifikáns összefüggést mutattak ki. Ezzel összhangban 2013 őszén a napi maximális hőmérséklet átlaga 22,7 °C volt, közelebb a ~20 °C-os optimális értékhez, mint 2014-ben (23,1 °C) vagy 2015-ben (24,0 °C). Ez megfelel a 2013-as izolátumok magasabb átlagos micéliumnövekedési sebességének és a micéliumos morfológiai típusok nagyobb gyakoriságának.

A polifenoltartalom hatása a micélium növekedésre

Korábban igazolták, hogy a fenolos vegyületek gátolják a *B. cinerea* növekedését (Köycü és mtsai, 2014) és ez a kék héjú fajták bogyóiban erőteljesebb, mint a fehér fajtákban. Vizsgálatunkban – jóllehet a Turán bogyóiban a polifenol-tartalom szignifikánsan magasabb (Balga és mtsai, 2014), mint Olaszrizlingben – a *B. cinerea* micéliumnövekedési sebességében és morfológiai típuseloszlásában nem találtunk különbséget. Mindez arra utal, hogy noha a növényi szövetben (*in planta*) a szürkerothadás gátlása megfigyelhető, *in vitro* az izolátumok növekedése és morfológiai jellemzői nem különböznek a fehér és a kék héjú fajtákból származó törzsek között.

Következtetések

Elsőként igazoltuk, hogy a szüreti hónapok befolyásolják a *B. cinerea* micélium növekedését és morfológiai típusait a nemesrothadás kialakulása során, és feltártuk e tényezők lehetséges kapcsolatát az ültetvényi előfordulásával. Noha korábban már leírták a *B. cinerea* morfológiai jellemzőit a Tokaji borvidéken, ezeket nem kapcsolták össze a szüreti hónapokkal (Magyar és Bene, 2006). Kimutattuk, hogy a szüreti hónap hatása kifejezettebb a *B. cinerea* izolátumok morfológiai típusösszetételére, mint a micéliumnövekedés ütemére, ami befolyásolhatja a botritizáció menetét a bogyók korai és késő őszi fejlődési szakaszaiban. Eredményeink megerősítik, hogy az évjárat és a szüreti hónap egyaránt hat a nemesrothadás előfordulására, különösen a nemesrothadásból izolált *B. cinerea* törzsek micéliumnövekedési ütemében és morfológiai típusspektrumában megfigyelt különbségeken keresztül.

5.2.2. A szőlőbogyók fizikai és kémiai változása a nemesrothadás során

Az aszúbogyó nem rendelkezik egzakt, tudományos igényességgel megfogalmazott definícióval. A bortörvény² és a Tokaji borvidéki termékleírás³ megfogalmazása empirikus, nem megalapozott, és a Tokaj-Hegyaljai Alumban közölt leírásra épül (Szabó, 1867).

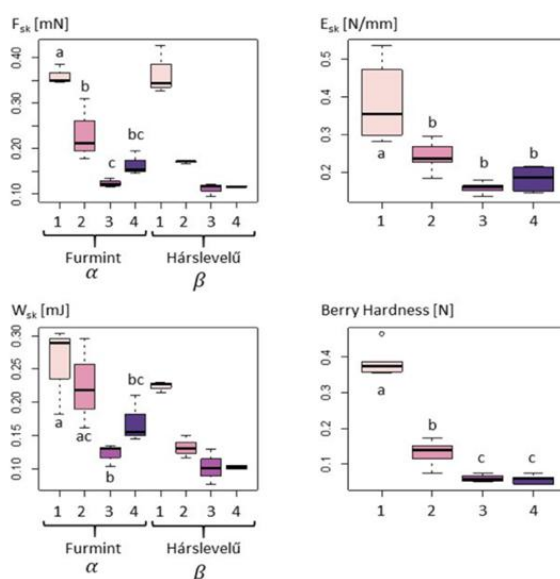
² 2020. évi CLXIII törvény a szőlészetről és borászatról: <https://njt.hu/jogszabaly/2020-163-00-00.1>

³ https://boraszat.kormany.hu/download/5/01/f2000/TOKAJ_termékleírás_2020%20kn.pdf

A nemesrothadás nem kizárólag a *B. cinerea* tevékenységének következménye: mikrobiológiailag diverz folyamat, amelyben a mikrobaközösségek és a környezeti tényezők együttesen alakítják a szőlőbogyók fizikai és kémiai paramétereit. Két, a Tokaji borvidékre jellemző fajta – a Furmint és a Hárslevelű – bogyóit vizsgáltuk különböző szüreti időpontokban (szeptember, október, november), több szempontból elemezve a nemesrothadás kialakulásának feltételeit és lefolyását.

A szőlőbogyó fizikai tulajdonságainak változása

Érésben lévő, majd nemesrothadásnak induló szőlőbogyókat gyűjtöttünk a korábban definiált négy érési fázis szerint. A bogyóhéj átszakításához szükséges erőt (F_{sk} , mN) és munkát (W_{sk} , mJ) vizsgáltuk; e két fizikai paraméter lefutása hasonló: a nemesrothadás előrehaladtával markánsan csökkennek egészen a III. fázisig, majd a IV. fázisban ismét emelkednek, összhangban az érés–túlérés–nemesrothadás–töppedés megfigyelt lefutásával (13. ábra). A Furmint és a Hárslevelű között a két jellemző (F_{sk} , W_{sk}) dinamikájában nem volt különbség, ugyanakkor az abszolút értékek szignifikánsan eltértek, ami a fajták héjkeménységének különbségeire utal. A bogyóhéj rugalmassági tényezője (E_{sk} , N/mm) és a bogyó keménysége (BH, N) hasonló trendet követett, itt a fajták között nem volt szignifikáns eltérés, míg a nemesrothadás fázisai között igen.



13. ábra A szőlőbogyó fizikai változói a nemesrothadás folyamata során, fázisok (1-4), mintagyűjtési hónapok (szeptember-november) és szőlőfajták (Furmint és Hárslevelű) szerint.

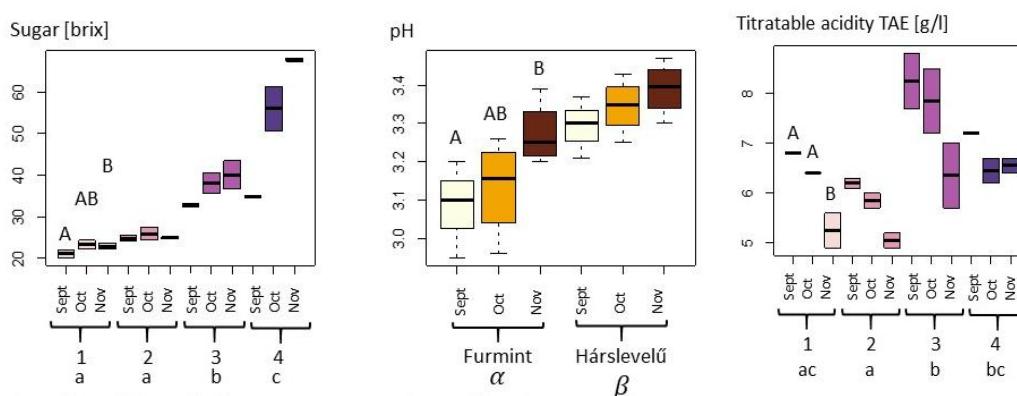
A vizsgálatok során a rugalmassági tényező értékei között hirtelen fellépő csökkenést az I és II fázis között *E-drop* pontnak neveztük el, amely megmutathatja, hogy mely az a szabad szemmel még nem látható, de vizsgálatokkal precízen kimutatható pont, amikor a szőlőbogyóban már érzékelhetők a mikrobiális eredetű változások, azaz lehetőség nyílik a botritizálódási folyamat elindulásának nagyon korai felismerésére.

A vizsgált paraméterek alapján a szőlőbogyók héja a nemesrothadás során egyre vékonyabbá, kevésbé rugalmassá és könnyebben átszakíthatóvá válik a bogyóhéj

sejtjeiben lévő cellulóz mikrobiális lebontásával (Doumouya és mtsai, 2014). E csökkenő tendencia alól egyedüli kivételt a Furmint képviseli: a III. és IV. fázis között a mért értékek növekedése figyelhető meg, ami valószínűleg az intenzív töppedés okozta kiszáradás következménye. Eredményeink arra utalnak, hogy a bogyóhéj fizikai paramétereit elsősorban a nemesrothadás stádiuma határozza meg, a szőlőfajta hatása mérsékelt, míg a szüreti időpont nem mutatott kimutatható befolyást a héj deformációs tulajdonságaira. Ennek megfelelően a korábban szemrevételezés alapján leírt I–IV. botritizációs fázisok texturális változókkal jól elkülöníthetők, és az E-dropként azonosított előrejelző pont a nemesrothadás (vagy más bogyóbetegségek) indulásának pontosabb meghatározásában adhat támpontot.

A szőlőbogyó kémiai tulajdonságainak változása

A vizsgált kémiai változók jóval összetettebb képet adnak a nemesrothadás menetéről, mint a fizikai paraméterek. A folyamat IV. fázisa felé – és természetesen a későbbi szüretidőpontok irányába – haladva mindkét szőlőfajtánál folyamatosan nő a cukortartalom, ezt a dinamikát a pH alakulása is követi (15. ábra). Alacsonyabb pH mellett az aszúbor erjedése egyenletesebb, az érlelés során kevésbé oxidálódik, az aromák frissebbek maradnak. A Furmint kedvezőbb paraméterei a fajta jobb alkalmazhatóságát jelzik az aszúbor-készítésben. A pH a savtartalommal ellentétesen változik: a savtartalom csökkenésével a pH emelkedik. Eredményeink szerint a pH-t elsődlegesen a szüret időpontja és a szőlőfajta befolyásolja, a nemesrothadás fázisai önmagukban nem határozzák meg; ez összhangban van azzal, hogy a fajta kulcsszerepet játszik a kialakuló savösszetételben (Kiss és Sass-Kiss, 2005). A titrálható savak mennyisége a mintagyűjtési hónapok előrehaladtával minden fázisban csökken (I–II. fázis), ugyanakkor a folyamat végén (III–IV. fázis) ismét növekszik, ami a magas cukortartalom mellett is biztosítja az aszúborokra jellemző harmonikus ízérzetet.



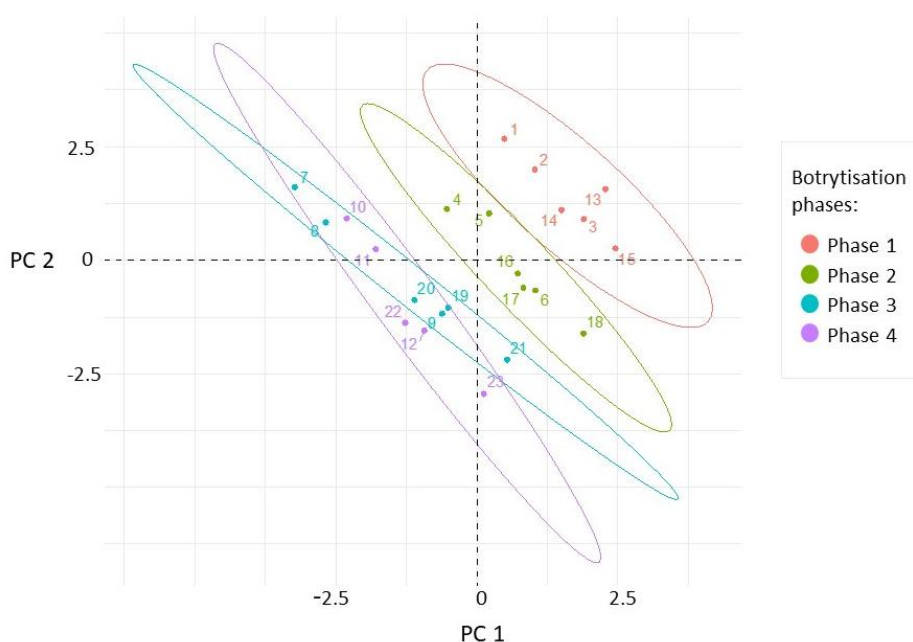
14. ábra A szőlőbogyó fizikai változói a nemesrothadás folyamata során, i fázisok (1-4), mintagyűjtési hónapok (szeptember-november) és szőlőfajták (Furmint és Hárslevelű) szerint.

Azonos fázisokba tartozó bogyók között a cukortartalom a szüret késői szakaszában – különösen a III. és IV. fázisban – éri el a legmagasabb értékeket, ami arra utal, hogy a legjobb minőségű aszúszemek begyűjtése októberben vagy novemberben a

legvalószínűbb. A nemesrothadás szempontjából tehát az tekinthető optimálisnak, ha az I. fázisú, egészséges bogyók októberben kezdenek aszúsodni, és novemberre már olyan magas cukortartalommal és kiegyensúlyozott savszerkezettel rendelkeznek, hogy IV. fázisú aszúszemekké váljanak. Eredményeink alátámasztják a minőségorientált borászati gyakorlatot: a magas cukortartalom önmagában nem elegendő, a savtartalom kiegyensúlyozottsága elengedhetetlen a kiemelkedő minőségű aszúbor előállításához.

Az aszúbogyó fizikai-kémiai-mikrobiológiai változói és a nemesrothadás

Többszörös statisztikai elemzésekkel vizsgáltuk a nemesrothadás fázisait (I–IV.), a szüreti időpontokat és a szőlőfajtákat (Furmint, Hárslevelű). A mintakategóriák szétválasztásának eredményei (16. ábra) arra utalnak, hogy a fázisok a mért változók alapján jól elkülönülnek: az első három teljesen elválik egymástól, míg a IV. fázis kisebb átfedést mutat a III. fázissal. További eredményeink szerint a minták sem a szüreti időpont, sem a szőlőfajta alapján nem különülnek el. Ezt az NMDS (nem metrikus többdimenziós skálázás) analízis is megerősítette, amely szintén a négy fázis elkülönülését támasztotta alá.



15. ábra Az első két főkomponens alapján ábrázolt minták csoportosulása a négy fizikai paraméter (F_{sk} , E_{sk} , W_{sk} , E_{sk}), három analitikai paraméter (cukortartalom, titrálható savtartalom, pH) és a gomba közösségek eloszlása alapján. A színnel jelölt csoportosítás

A főkomponens-analízis alapján a minták nem váltak szét sem a mintagyűjtés időpontja, sem a szőlőfajta szerint, ugyanakkor a PERMANOVA-analízis rávilágított, hogy a szüreti időpont szignifikánsan befolyásolja a fizikai változókat és a gombaközösség sokféleségét, míg a szőlőfajta szignifikáns hatást gyakorol a jelenlévő gombaközösség sokféleségére. A gombaközösségek szerkezete jól követhető a nemesrothadás fázisai és a szőlőfajták között is.

7. táblázat A nemesrothadás fázisaival, a szüretidőpontokkal és a szőlőfajtákkal korreláló variancia (%) eloszlása a vizsgált változók esetén a permANOVA elemzések alapján

	Nemesrothadás fázisai		Szüretidőpont		Szőlőfajta	
Változók	Var. (%)	<i>p</i>	Var. (%)	<i>p</i>	Var. (%)	<i>p</i>
Textúra paraméter	57	0.001	31	0.001	12	0.057
Kémiai paraméter	72	0.001	11	0.12	0	0.835
Gomba közösség	21	0.031	22	0.014	25	0.014

A szőlőbogyókon jelen lévő gombaközösség összetételének értékelése azt mutatta, hogy a nemesrothadás folyamata szignifikáns hatást fejt ki a közösségi összetételre, és további jellemzőket is előre jelezhet, például a bogyók fizikai és kémiai változásait (Letaief és mtsai, 2008a). A vizsgált fajtákon azonosított gombák sokféleségében és összetételében megfigyelt különbségek összhangban vannak korábbi eredményekkel, amelyek szerint a szőlőfajta hat a bogyók felületén kialakuló diverzitásra (Martins és mtsai, 2012; Bokulich és mtsai, 2013). A későbbi szüreti időpontokban észlelt, változatosabb gombaközösség-összetétel magyarázható a hűvösebb, páradús őszi mikroklímával, amely általánosan kedvez a szaporodásuknak.

Következtetések

Eredményeink egyértelműen jelzik, hogy a botritizáció stádiuma a szőlőbogyó fizikai állapotának elsődleges meghatározója: a héj texturális mutatói az I–III. fázisban következetesen csökkennek, majd a IV. fázisban – a töppedés és dehidratáció következtében – részben visszarendeződnek. Az I–II. fázishatárnál azonosított „E-drop” a mikrobiális eredetű sejtfal bomlás korai, makrotünetek előtti objektív jelzője, így a botritizáció indulásának előrejelzésére alkalmas döntéstámogató küszöbként értelmezhető. A többváltozós elemzések a fázisok robusztus elkülönülését támasztják alá, miközben a fajta és a szüreti időpont a fizikai jellemzőkre csak mérsékelten hat; ugyanakkor ezek – különösen a fajta – a gombaközösség összetételét és diverzitását szignifikánsan befolyásolják, amely közösségi mintázatok a fizikai-kémiai változások előrejelzésére is használhatók.

A kémiai paraméterek mintázata megerősíti, hogy a kiemelkedő aszúminőség feltétele nem a magas cukortartalom önmagában, hanem a cukor–sav egyensúly. A pH emelkedését ellensúlyozó, a III–IV. fázisban tapasztalt savtartalom-visszanövekedés kulcsfontosságú az érzékszervi harmóniához. Technológiai szempontból a Furmint kedvezőbb kémiai profilja az aszúbor-készítésre alkalmasabbá teszi, míg az optimális szüreti stratégia az októberben induló nemesrothadást és a novemberre kialakuló IV. fázisú aszúszemeket célozza, amikor a magas cukorfok kiegyensúlyozott savszerkezettel társul. A gyakorlatba ültethető következtetés szerint az E-drop terepi/gyorsmérési alkalmazása, valamint a cukor, pH és titrálható sav integrált monitorozása megalapozottabb szüretidőzítést és konzisztens minőséget tesz lehetővé.

.

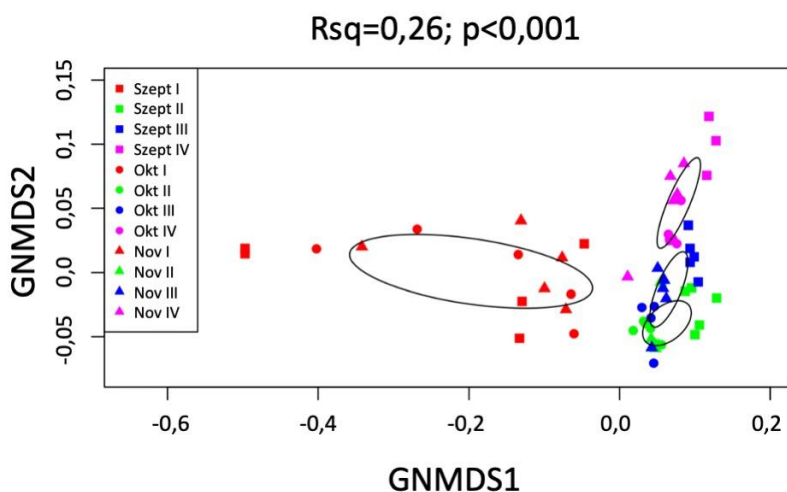
5.2.3. A *B. cinerea* génexpressziós profiljának változása a nemesrothadás során

Metatranszkriptomikai megközelítéssel vizsgáltuk a *B. cinerea* génexpressziós profiljának változását egészséges bogyókból, valamint a Tokaji borvidéken három őszi szüreti időpontban gyűjtött, a nemesrothadás négy fejlődési fázisát reprezentáló mintákból. A *B. cinerea* szerepének feltárásához – a nemesrothadás során végbemenő, elsősorban szöveti, kisebb mértékben biokémiai változások összefüggésében – differenciális génexpresszió-analízist, útvonal-gazdagodási vizsgálatokat és súlyozott génkoexpressziós hálózat-elemzést (WGCNA) végeztünk. A nemesrothadás teljes folyamatának jobb megértése érdekében az RNS-adatokat a *B. cinerea* referenciagenomjához illesztve elemeztük.

A nemesrothadás fázisai

A *B. cinerea* transzkriptumainak mennyiségi eloszlása és transzkriptum-gazdagsága szignifikáns növekedést mutatott az I. fázis (egészséges bogyók) és a nemesrothadás további fázisai (II., III., IV.) között, ugyanakkor a II.–IV. fázisok egymáshoz viszonyítva nem különböztek szignifikánsan. A transzkriptumok mennyisége és gazdagsága a mintavételi hónapok szerint sem mutatott szignifikáns eltérést (16. ábra).

Az NMDS (nem-metrikus többdimenziós skálázás) ordinációs eredményei markáns elkülönülést jeleztek a nemesrothadás fázisai között, míg a szüreti időpontok kisebb hatással bírtak a minták közötti variabilitásra; ezt a PERMANOVA is alátámasztotta.

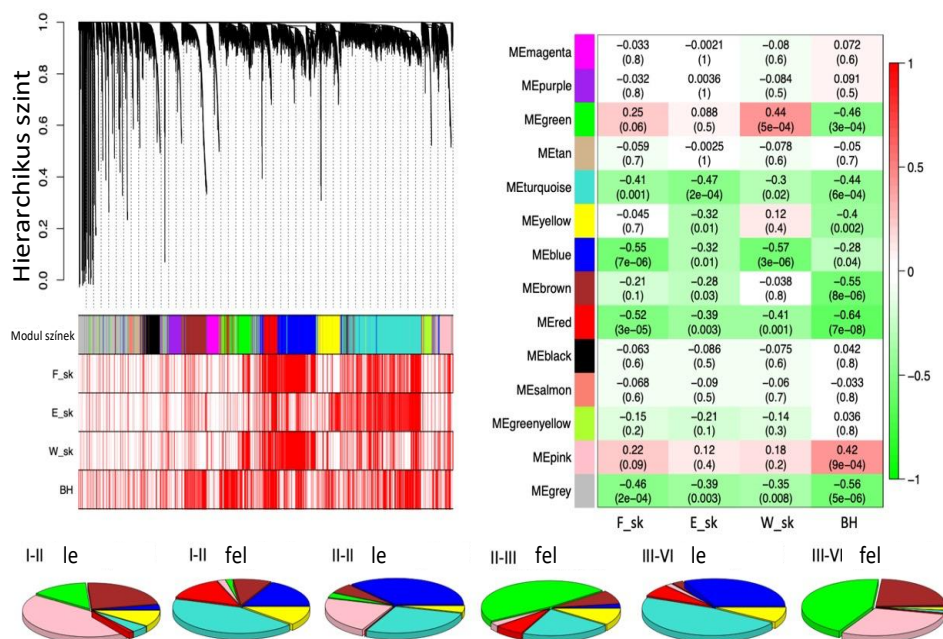


16. ábra Nem-metrikus többdimenziós skálázás (NMDS) eredményei a szeptember–október–novemberi minták alapján a *B. cinerea* kifejeződött funkcionális génjeinek elemzésére a nemesrothadás egyes fázisaiban

Az aszúsodás során expresszált *B. cinerea* gének koexpressziós hálózata

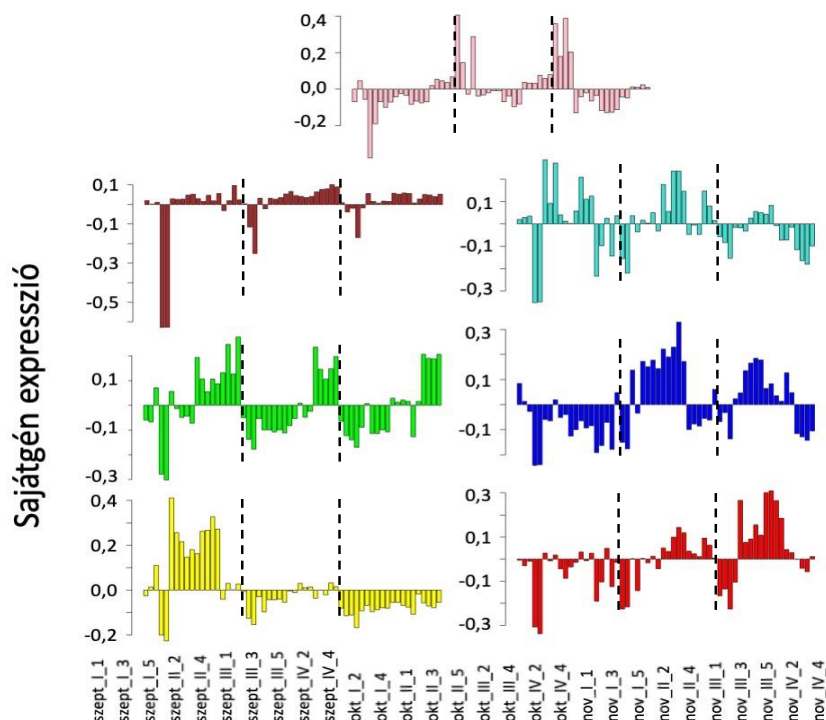
A nemesrothadás folyamatának jobb megismerését segíti az expresszált *B. cinerea*-génkből felépülő koexpressziós hálózat vizsgálata, összevetve a bogyók texturális paramétereivel. A hálózat belső szerkezetének feltárásához súlyozott gén-koexpressziós hálózatelemzést (WGCNA, Weighted Gene Co-expression Network Analysis) végeztünk,

amelyben a funkcionális gének együttes kifejeződését modulokba rendeztük. A klaszterezés 13 különböző, egyenként több mint 100 tagú koexpressziós modult azonosított (17. ábra).



17. ábra *A. B. cinerea* gének négy nemetrothadási fázisában kifejezett koexpressziós hálózatának elemzése

A modulok közül a *turquoise*, *blue brown* és *red* modulok mutatták a legjelentősebb negatív korrelációt a textúra paraméterekkel, amint azt a 17. ábra ún. „hőterképes” része mutatja.

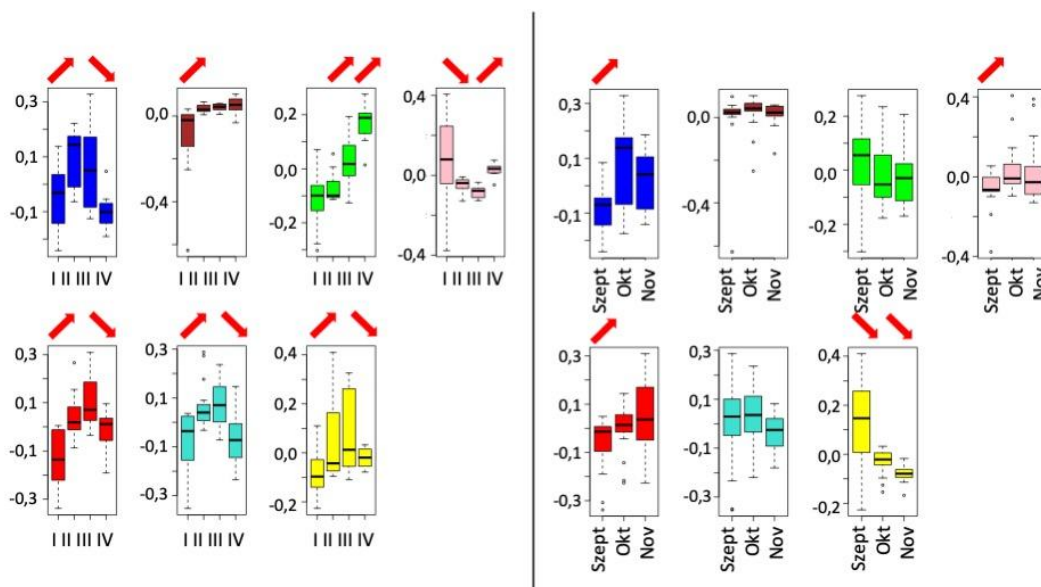


18. ábra *A. B. cinerea* génexpressziós hálózatban meghatározott NRCM modulok fentről lefelé, jobbról balra, rendre: pink, brown, turquoise, green, blue, yellow és red. A függőleges vonalak a mintavételi hónapokat választják el

A blue, brown, green, pink, red, yellow és turquoise modulok NRCM (Noble Rot Connected Modules) modulok, melyeknek sajátgén-expressziós profilja egyértelmű összefüggést mutatott a nemesrothadási fázisokkal vagy a mintagyűjtési hónapokkal (18. ábra), míg a fennmaradó hat modul profilja ettől elkülönült.

A 17. ábra bal felső részén látható hierarchikus klaszterfa génkorreláció alapján készült, alatta a funkcionális gének 13 modulja található. A texturális paraméterekhez tartozó piros sávok szignifikáns ($p < 0,05$) korrelációt jeleznek a funkcionális génekkel. Az ábra jobb oldali hőtérképén a 13 modul sajátgénje és a különböző texturális paraméterek közötti korreláció látható. A kördiagramok a differenciális génexpressziós eredményeket szemléltetik, vagyis azt, hogy a szomszédos fázisok között fel- vagy leszábadozott funkcionális gének milyen arányban oszlanak meg az egyes NRCM-modulok között.

Az NRCM-modulok sajátgén-expressziós szintjeit ANOVA-val és Tukey HSD-teszttel elemeztük, és meghatároztuk, mely fázisok vagy mintagyűjtési hónapok között emelkedett vagy csökkent szignifikánsan ez az érték. A változások a modulba tartozó gének összviselkedését írják le, ezért az érintett mintatípus-párokat differenciális génexpressziós és génontológiai módszerekkel is összevetettük. A19. ábrán a sajátgén-expresszió szignifikáns növekedéseit és csökkenéseit a dobozok fölötti piros nyilak jelölik.



19. ábra A modulokhoz tartozó sajátgének abundancia értékeinek eloszlása az aszúsodási-fázisok (balra) és a mintavételi időpontok (jobbra) között az NRCM modulok tekintetében egyirányú ANOVA-modellek alkalmazásával
Piros nyilak jelzik a szomszédos fázisok növekedését vagy csökkenését.

A *B. cinerea* gének differenciális expressziós tulajdonságainak elemzése

A nemesrothadás különböző fázisai között összesen 8089 olyan gént azonosítottunk, amelyek legalább egy fázispárban szignifikánsan eltérő abundanciával fejeződtek ki. Az I. és II. fázis között 1094 gén mutatott eltérő kifejeződést; ezek a gének a II. és III. fázis között nem változtak, viszont a II. és IV. fázis között lefelé szabályozódtak. Ezen felül az I. és II. fázis között 440 olyan differenciálisan expresszált gént találtunk, amelyek a további

fázispárokban nem mutattak szignifikáns különbséget. A II. és III., illetve a III. és IV. fázis között rendre 319 és 870 egyedi, felfelé szabályozott gént azonosítottunk. További 2932 gén kizárólag a III. és IV. fázis között szabályozódott lefelé. A nemesrothadás korai szakaszában (II.–III. fázis) 1126 gén esetében észleltünk lefelé szabályozódást, emellett 344 gén a korai szakaszokban lefelé, az utolsó szakaszban viszont felfelé szabályozott mintázatot mutatott.

Génontológia és a metabolikus útvonalak feldúsulása

Az NRCM-modulok (Noble Rot Connected Modules) jelentős fázisátmeneteiben következetesen tártunk fel dúsuló génkészleteket és útvonalakat, főként a szénhidrát- és fehérje-anyagcseréhez kapcsolódóan, amelyek kulcsszerepet játszanak a nemesrothadás során. A *brown* modul I.–II. fázisban felfelé szabályozott génjei közül több a szén-anyagcseréhez, a fruktóz- és mannóz-anyagcseréhez, a glikolízishez és a butanoát-anyagcseréhez kapcsolódott. A *red* modulban az I.–II. fázisban felfelé szabályozott gének kifejezett dúsulást mutattak a keményítő- és szacharóz-anyagcserében. A *turquoise* modul I.–II. fázisban felfelé szabályozott génjei a galaktóz-anyagcserében, a glikolízisben, az egyéb glikán-anyagcserében, valamint a keményítő- és szacharóz-anyagcserében dúsultak. A folyamat végéhez közeledve (III.–IV. fázis) a szén-anyagcsere ismét dúsult: a *green* modulban a felfelé szabályozott gének a szén-anyagcseréhez és a glikolízishez, a *pink* modulban pedig a szén- és a piruvát-anyagcseréhez tartoztak.

A *green* modulban több, fehérje-anyagcseréhez kapcsolódó útvonal is dúsult (alanin- és aszpartát-, béta-alanin-, cisztein- és metionin-, valamint glicin-, szerin- és treonin-anyagcsere), amelyek a nemesrothadás későbbi, III.–IV. fázisaiban váltak hangsúlyossá. A szénhidrát- és fehérje-anyagcserén túl számos modulban azonosítottunk másodlagos metabolitok képződéséhez kötődő útvonalakat is, amelyek az aromaképződésben és az antimikrobiális hatásokban egyaránt szerepet játszhatnak. Összességében a nemesrothadás szöveti és biokémiai változásai jól körülírható génmodulokon keresztül zajlanak, aktivációjuk pedig összhangban áll a bogyók texturális tulajdonságainak alakulásával.

A *B. cinerea* funkcionális génjeinek expressziós dinamikája

A *B. cinerea* funkcionális génátiratainak mennyisége és gazdagsága az I. → II. fázis átmenetben szignifikánsan megnőtt, ezt követően azonban nem változott számottevően. Ez arra utal, hogy a nemesrothadás kezdetén kifejezett fiziológiai váltás történik, amelyet a metabolikus aktivitás erőteljes megugrása jellemez. A funkcionális génkészlet egészségről nemesrothadt bogyókra történő növekedése összhangban áll a szüret utáni, mesterséges fertőzést vizsgáló tanulmányokkal (Lovato és mtsai, 2019). Vizsgálataink ugyanakkor azt is kimutatták, hogy a kifejezett funkcionális gének számának emelkedése már a folyamat legkorábbi szakaszában bekövetkezik. A korai fázisban észlelt, széles körű felszabályozottság megerősíti, a *B. cinerea* az érett, de egészséges

bogyókban többnyire inaktív, a nemesrothadás elindulásakor azonban – feltehetően környezeti jelzésekre reagálva – gyorsan aktiválódik. Ennek része a proliferációhoz, valamint a szőlő sejtszintű struktúráit módosító folyamatokhoz kapcsolódó gének expressziója, amelyek közvetve a bogyóhéj lebomlását is előidézik (Hegyi-Kaló és mtsai, 2020). A nemesrothadás génexpressziós profilja a vizsgált hónapokban összességében stabilnak bizonyult, amit az NMDS-eredmények is alátámasztanak, az összes hónapot együtt értékelve a II., III. és IV. fázis egyértelműen elkülönült, ami előzetes feltevéseinket megerősíti és gyakorlati támpontot ad a borászati döntésekhez.

Következtetések

Eredményeink átfogó képet adnak a *B. cinerea* szerepéről a nemesrothadás négy egymást követő fázisában, különös tekintettel a bogyók texturális és transzkriptomikai változásaira. A kifejeződési mintázat fázisonként jól követhető, és a mintagyűjtés hónapja csak csekély mértékben befolyásolja. A súlyozott gén-koexpressziós hálózatelemzés (WGCNA) során feltárt modulok többsége a fehérje- és szénhidrát-anyagcseréhez kötődő útvonalakban dúsult, kiemelve ezek szerepét a bogyó szerkezeti integritásának alakításában. A modulok – amelyek sajátgén-kifejeződési profilja összefüggést mutat a nemesrothadási fázisokkal – arra utalnak, hogy a *B. cinerea* elsődlegesen a korai szakaszokban (I.–II.) járul hozzá a texturális változásokhoz, mivel a szénhidrátbontáshoz kapcsolódó dúsult útvonalak döntően ekkor aktívak. Azonosítottunk továbbá olyan *B. cinerea* géneket, amelyek a környezetben történő dominanciát erősíthetik – például a szulfáthasznosítás és antimikrobiális vegyületek termelése révén –, ami a faj ökológiai sikerességéhez és a mikrobiális versengésben betöltött szerepéhez is hozzájárulhat.

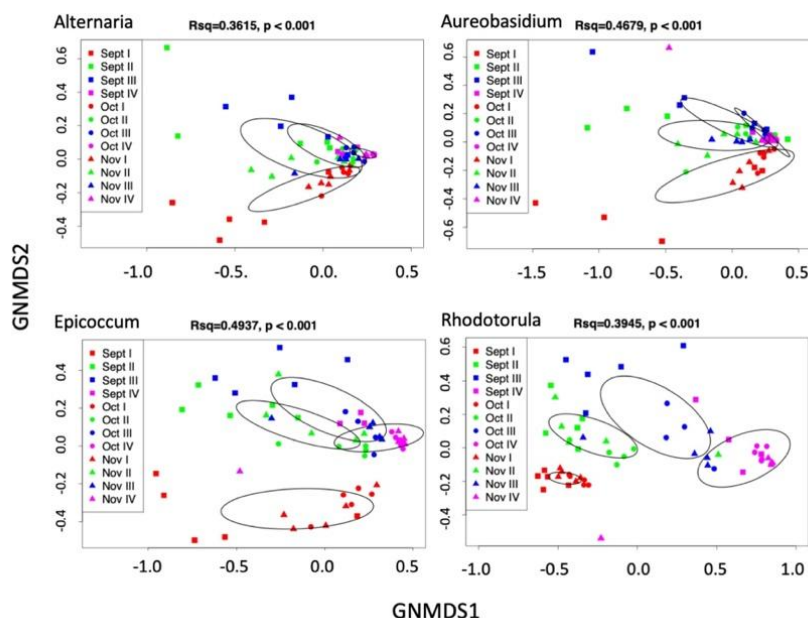
5.2.4. A gombaközösség szerepe az aszúbogyó aroma profiljának kialakulásában

A nemesrothadáshoz és a botritiszes borok aromaprofiljának kialakulásához a *B. cinerea* mellett más fonalas gombák is hozzájárulhatnak. Vizsgálataink célja az volt, hogy metatranszkriptomikai adatelemzések, valamint kapcsolódó statisztikai és dúsulási vizsgálatok segítségével tisztázzuk e gombák szerepét az aromaprofil formálásában. Ennek érdekében a legfontosabb biokémiai útvonalakat és génfunkciókat értékeltük. Az I.–IV. fázisokból származó mintákban azonosítottuk a vizsgálatra kiválasztott négy gombanemzetség (*Alternaria*, *Aureobasidium*, *Epicoccum*, *Rhodotorula*) génjeit, és referenciagenomjaikhoz annotáltuk őket.

A vizsgált mikroorganizmusok fejlődési dinamikája

Valamennyi vizsgált fonalas gomba és élesztő esetében szignifikáns növekedést tapasztaltunk a fázisok előrehaladtával, miközben a mintagyűjtés hónapja egyik fajnál sem befolyásolta a gének előfordulási gyakoriságát. A fonalas gombáknál különösen az I. és II. fázis közötti emelkedés volt kifejezett; a III.–IV. fázisban mind a fonalas gombák, mind az élesztők esetében a növekedés üteme meghatározó maradt. Az öt vizsgált nemzetség (*Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Epicoccum*, *Rhodotorula*)

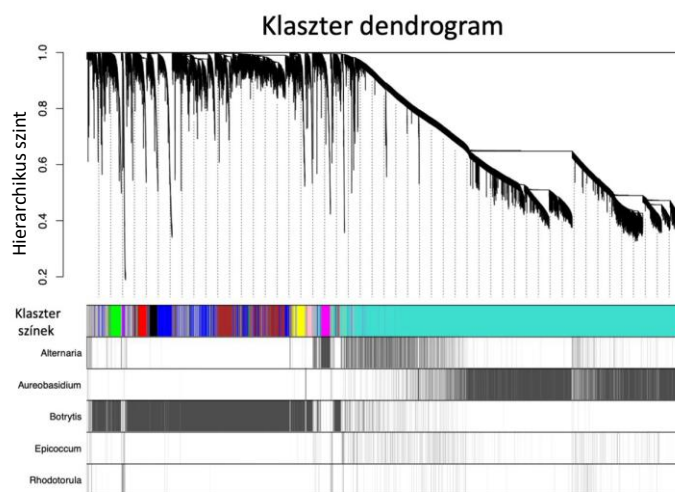
génexpressziós eloszlásai az ordinációs térben nemzetségenként szignifikánsan elkülönültek. Összhangban a varianciaanalízis eredményeivel, az ordinációs ábrákon is az látszik, hogy a szüret időpontja jóval kisebb mértékben befolyásolta a minták elkülönülését, mint a fázis (20. ábra). Az ANOVA-val konzisztensen az is megfigyelhető, hogy a nemesrothadás előrehaladása minden faj génexpressziós profilját jól elválasztja, míg a szüreti időpont hatása mérsékeltebb.



20. ábra A vizsgált nem *Botrytis* nemzetségek NMDS ordinációs ábrája. A színek a nemesrothadási fázisokat (I, II, III, IV) az alakzatok a mintavételi hónapokat (S – szeptember, O – október, N – november) jelölik

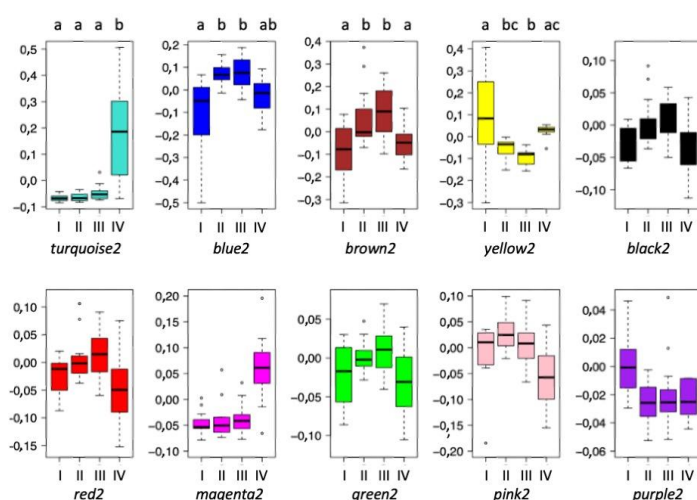
Súlyozott génkoexpressziós hálózatelemzés

A súlyozott gén-koexpressziós hálózatelemzéssel (Weighted Gene Co-Expression Analysis, WGCNA) tíz génmodul-klasztert azonosítottunk (21. ábra).



21. ábra A vizsgált fajok genomjához annotált gének WGCNA klaszter dendrogramja. A klaszterek színei a dendrogram alatt vannak feltüntetve, a szövegben erre a klaszterezésre a szín megnevezése után írt 2-es számmal hivatkozunk (pl: blue2). Az egyes nemzetségeknél azonosított géneket szürke vonalak jelzik.

A megkülönböztethetőség érdekében ebben az elemzésben a modulok neveit „2” végződéssel jelöljük (pl. *blue2*), így a *B. cinerea* esetében azonosított génklaszterek elkülöníthetők a kombinált elemzésben feltárt klaszterektől. A létrehozott koexpressziós modulok közül a *turquoise2*, *blue2*, *brown2* és *yellow2* a nemesrothadáshoz csatlakoztatható modulok (Noble Rot Connected Modules, NRCM): sajátgén-kifejeződési profiljuk a nemesrothadási fázisok mintázatával párhuzamos lefutást mutat. Ezzel szemben a *black2*, *red2*, *magenta2*, *green2*, *pink2* és *purple2* modulok sajátgén-kifejeződési profilja nem hozható összefüggésbe a nemesrothadással. A vizsgált fajokhoz tartozó NRCM-génkészletek közül a *turquoise2* és a *yellow2* modul hasonló expressziós gyakorisági mintázatot jelez (8. táblázat), ezért ezekre fókuszáltuk a további értékelést.



22. ábra A különböző génexpressziós modulok fáziseloszlása

A *turquoise2* modul sajátgénjeinek ANOVA-elemzése alapján a négy fázis között emelkedő trend volt megfigyelhető, de szignifikáns különbség csak a III. és IV. fázis között jelentkezett. A *yellow2* modulban az I. és II. fázis között szignifikáns csökkenés, majd további csökkenés a III. fázisig, végül emelkedés volt kimutatható a IV. fázisig (22. ábra).

8. táblázat Az egyes WGCNA-modulok kifejezett génjeinek megoszlása a megfigyelt nemzetségek között.

Modul	<i>Alternaria</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>red2</i>	1	0	520	0	1
<i>purple2</i>	22	7	42	25	57
<i>pink2</i>	0	0	452	0	0
<i>magenta2</i>	437	2	3	1	0
<i>black2</i>	1	0	484	0	0
<i>turquoise2</i>	3191	9914	1013	888	279
<i>green2</i>	14	1	592	1	0
<i>blue2</i>	4	0	2660	4	4
<i>brown2</i>	0	0	2148	1	2
<i>yellow2</i>	22	40	682	6	4

Differenciális génexpressziós és útvonal feldúsulás elemzések

A nemesrothadás négy fázisának vizsgálata során 1765, 348, 1599, illetve 293 differenciálisan expresszált gént azonosítottunk az *A. alternata*, *E. nigrum* fonalas gombák, valamint az *A. pullulans* és *R. graminis* élesztők esetében. Mivel a folyamatot döntően a *B. cinerea* határozza meg, ennél a fajnál lényegesen nagyobb számú, összesen 11 246 differenciálisan expresszált gén került azonosításra. A fázisok közötti differenciális expresszió alapján olyan gének is feltárhatók voltak, amelyek kizárólag egy adott fázisban mutattak fel- vagy le-szabályozottságot, illetve olyanok is, amelyek több fázisban közösek. A hónapok szerinti differenciális expresszió vizsgálata azt mutatta, hogy a kizárólag novemberben fel- vagy le-szabályozott gének aránya volt a legmagasabb a hónapokra jellemzően egyedi expressziót mutató gének között.

A *turquoise* modulban *A. alternata*, *B. cinerea*, *E. nigrum*, *A. pullulans* és *R. graminis* esetében is több gazdagon reprezentált útvonalat azonosítottunk. Ezek között számos olyan található, amely enzimeket kódol a bor stabilitásához és minőségéhez hozzájáruló vegyületek szintézisében, illetve az aromás komponensek kialakulásához szükséges elővegyületek képzésében, különös tekintettel az aminosav-anyagcserére (Callejón és mtsai, 2010), a szénhidrát-anyagcserére (Han és mtsai, 2020), valamint a lipidek és a szekunder metabolitok szintézisére. A *B. cinerea* kivételével – amelynél csak egy szekunder metabolit útvonalat azonosítottunk – az aminosav-anyagcseréhez kapcsolódó útvonalak voltak a leggyakoribbak: *A. alternata* esetében 11, *E. nigrum* esetében 14, *A. pullulans* esetében 6, míg *R. graminis* esetében 4 ilyen útvonalat találtunk. Ezt követték a szénhidrát-anyagcsere útvonalai (a fenti sorrendben: 4, 9, 5 és 6 útvonal). A szekunder metabolit útvonalak közül *A. alternata* esetében 4, *E. nigrum* esetében 3, *A. pullulans* esetében 2, *R. graminis* esetében pedig 1 útvonal került azonosításra. Az itt feltárt útvonalakból kiemeltük azokat a géneket, amelyek a bor érzékszervi és minőségi paramétereinek alakulásában játszanak szerepet; továbbá a WGCNA által képzett modulokból kivontuk a funkcionálisan hasonló, és szintén dúsult útvonalakhoz tartozó központi (hub) géneket.

A nemesrothadáshoz társuló fonalas és élesztőgombák szerepe

Vizsgálataink új megvilágításba helyezik a nemesrothadáshoz társuló fonalas és élesztőgombák szerepét, mivel funkcionális génexpressziós profiljaik érdemi változást mutatnak a nemesrothadás fázisai és a hónapok szerint. Mindkét csoportnál a transzkriptum-abundancia a folyamat előrehaladtával növekszik, ami ellentmond a korábbi adatoknak, amelyek szerint a fonalagombák főként a korai, az élesztők pedig inkább a késői szakaszokban dominálnak (Li és mtsai, 2021). A tapasztalt növekedés nagy valószínűséggel a funkcionális hozzájárulás erősödését tükrözi, különösen az aromák és aromakapcsolt prekursorok szintézisében. Ezt kvantitatív módon is alátámasztja a WGCNA által képzett *turquoise* modul expressziójának szignifikáns emelkedése a III. és IV. fázis között, valamint az, hogy valamennyi vizsgált fonalas és élesztő esetében a IV. fázisban jelent meg a legtöbb egyedileg felregulált gén.

A nem *B. cinerea* eredetű fonalas és élesztőgombáknál több, az aroma-képződésben részt vevő enzim azonosítása arra utal, hogy e fajok ebben a tekintetben érdemi szerepet tölthetnek be. Noha a *B. cinerea* valamennyi fázisban domináns, fő funkcionális hozzájárulása elsősorban a bogyóhéj szerkezeti módosulásaihoz köthető a korai szakaszokban (I.–II.), összhangban korábbi megfigyeléseinkkel (Hegyi és mtsai, 2022). A hónapok hatása a fonalas és élesztőgombák expressziós profiljára statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak, ami egybevág a *B. cinerea* funkcionális génexpressziójánál három hónap során kapott eredményekkel.

Az aromakapcsolt enzimrendszerek azonosítása

Az aromakapcsolt aminosav-anyagcserében szereplő azonosított enzimek túlnyomó része aminosav-bioszintézishez kötődik (köztük aromás aminosavakhoz és aminosav-származék-konjugátumokhoz). Ezek a vegyületek további lebomlása vagy metabolikus módosulása közvetlenül összefügg aromaanyagok keletkezésével (Ardö, 2006). Az *E. nigrum* esetében egy penta-funkciós AROM-komplexet azonosítottunk, amely az aromás aminosavak bioszintézisében vesz részt (Verasztó és mtsai, 2020), míg az *A. pullulans* esetében egy aromás aminosav-transzferáz volt kimutatható, amely az aromás aminosavak transzaminálását katalizálja a megfelelő alfa-ketosavak irányába. Kiemelendő továbbá az *A. alternata*-ból azonosított tirozin-fenil-piruvát aminotranszferáz, valamint az *A. pullulans*-ból származó aszpartát-aminotranszferáz, amelyek rendre a fenilalanin- és a tirozin-bioszintézisben játszanak szerepet. A fenilalanin a virágos tónusú 2-fenilacetát és a fenilpropanoidok előanyaga; utóbbi csoportban az *A. alternata* által termelt cinnamil-alkohol-dehidrogenáz közreműködésével képződő cinnamaldehyd édes, cseresznyeszerű aromát ad (Burdock, 2016). A tirozin lebontása során kellemes (pl. virágos), illetve kellemetlen (pl. „kémiai”) aromák egyaránt keletkezhetnek (Ardö, 2006). További említésre méltó enzimek a 3-izopropil-malát-dehidrogenáz és a szakkaropin-dehidrogenáz (*A. pullulans*), amelyek a leucin, illetve a lizin bioszintézisében vesznek részt. A szakkaropin-dehidrogenáz 2-oxoglutarátot képez, amely a bor egyik fő karbonilvegyülete (Herzan és mtsai, 2020).

Az *A. pullulans* és az *E. nigrum* génexpressziós profiljában kimutatható volt a glutation-hidroláz és a laktolilglutathion-liáz; előbbi a 3-merkaptophexan-1-ol trópusi, citrusos aromájához, utóbbi pedig a metil-butanal mérsékelten „amilos” (banános) illatához járul hozzá (Howell és mtsai, 2006). Az *A. pullulans* esetében antranilát-szintáz is azonosítottunk, amely az antranilát-anyagcserében vesz részt és a metil-antranilát képződését segíti, amely jellegzetes narancsvirág-illatot hoz létre a bor aromaprofiljában (Lin és mtsai, 2019).

A lipidanyagcseréhez kapcsolódó enzimek – a nitrogén-anyagcseréhez hasonlóan – aromaelőanyagok (zsírsavak, észterek, szterolok) szintézisében vesznek részt. Az *A. pullulans* esetében kimutatható a tiol-észter dehidratáz-izomeráz és a pantoténsav-kináz (észterképzés), valamint a karbonsav-észter-hidroláz (észterlebontás) (Pérez-Jiménez és mtsai, 2019). Az *A. alternata* és *A. pullulans* fajokban azonosított mevalonát-kináz a

szterol- és terpénszintézisben működik (Wedler és mtsai, 2015), az *A. pullulans* pedig további terpénszintézis-enzimekkel – például geranil-difoszfát-szintázzal – is rendelkezik. Tekintettel arra, hogy a terpének a boraroma fontos illékony komponensei (Parliment és Croteau, 1986), külön jelentős az ERG20 farnezil-difoszfát-szintáz, amely *A. pullulans*-ban a borsos jellegű rotundon képződéséhez kapcsolható (Siebert és mtsai, 2008)

A szénhidrát-anyagcseréhez tartozó enzimek közül több is aromaelőanyagok képzésében játszik szerepet. Az *A. pullulans* esetében glükózid-hidrolázt, piruvát-dekarboxilázt, piruvát-dehidrogenázt és prefenát-dehidratázt azonosítottunk, *E. nigrum* esetében pedig foszfoglükomutázt. A glükózid-hidroláz „rezerv” aromavegyületeket képez, a piruvát-dehidrogenáz és a piruvát-dekarboxiláz ecetsavat, illetve acetaldehidet állít elő (az utóbbi a bor aldehidtartalmának akár 90%-át adhatja, és gyümölcsös aromát kölcsönöz) (Neuser és mtsai, 2000). A prefenát-dehidratáz a 2-feniletanol virágos, mézes illatához járul hozzá. A foszfoglükomutáz a hexóz-anyagcsere kulcslépését katalizálja, amely illékony aromák előállításához vezethet (Reiter és mtsai, 2021). Ugyanakkor ezeknek a vegyületeknek a túlzott felhalmozódása kedvezőtlen, ecetes jegyeket is eredményezhet.

A szénhidrát-anyagcseréhez kapcsolódó aromaképző enzimek közül több a citrát-anyagcserében és a malolaktikus erjedésben is részt vesz, hozzájárulva a diacetil és származékai képződéséhez (vajás aroma) (Bartowsky és Henschke, 2004). Az organikus savak és karbonsavak anyagcsereje a bor sav-bázis egyensúlyát, pH-ját, alkoholtartalmát, színét és stabilitását is befolyásolja (Vicente és mtsai, 2022), továbbá antioxidáns tulajdonságai révén hat az aromakomponensek oxidációs veszteségére (Kamzolova és Morgunov, 2021).

Az *A. pullulans*-ból több, glutation-anyagcseréhez és antioxidáns tulajdonságokhoz kapcsolódó enzim került azonosításra, köztük a glutation-bioszintézis kulcslépését végző glutamát-cisztein ligáz, a metilglioxál detoxikációját segítő glioxaláz II és a glutation-katabolizmusban részt vevő gamma-glutamil-ciklotranszferáz. A glutation antioxidáns hatása alapvető a bor stabilitása és aromamegőrzése szempontjából képes mérsékelni több illékony vegyület (pl. izoamil-acetát, linalool) csökkenését (Papadopoulou és Roussis, 2008). Glutation-konjugátumok és lebontási termékeik a Sauvignon blanc borok jellegzetes aroma- és ízprofiljában is szerepet játszanak.

A bor alkoholtartalma befolyásolja stabilitását és érzékszervi tulajdonságait. Az *A. pullulans* esetében azonosított galaktóz-oxidáz primer alkoholokat alakít aldehidekké, ezzel hatva az alkoholtartalomra és az aroma kialakulására. Emellett az *A. alternata* glicerol-kináza és az *E. nigrum* 6-foszfoglukonolaktonáza a glicerol lebontásában vesz részt, ami kihat az erjedés és az aromaprofil dinamikájára (Wang és mtsai, 2020). Az aroma és íz stabilitásában a sejtes detoxifikáció is szerepet kap. Az *A. alternata*-ban és *E. nigrum*-ban azonosított S-formilglutation-hidroláz almás aromát adhat, miközben a formaldehidet formiáttá alakítja, csökkentve a toxikus terhelést (Schug, 2018). Az *A. pullulans* kinurenináz enzime viszont antranilsavat termel, amely „öregedési ízhez” köthető a borban (Hoenicke és mtsai, 2002).

Következtetések

A metatranszkriptomikai vizsgálat alapján megállapítható, hogy nemesrothadásos szőlőbogyók mikrobiomjában jelen lévő további fonalasgombák (*A. alternata*, *E. nigrum*) és élesztők (*A. pullulans*, *R. graminis*) jelentős mértékben hozzájárulnak nemcsak a bogyók szerkezeti átalakulásaihoz, hanem az aromatikusság és érzékszervi minőséget meghatározó folyamatokhoz is.

Vizsgálataink során számos olyan enzimet azonosítottunk, amelyek közvetlenül vagy közvetve részt vesznek aromaanyagok és azok prekursorainak, antioxidáns vegyületeknek, valamint detoxifikációs szempontból fontos anyagoknak a szintézisében. Az aromás aminosavak (pl. fenilalanin, tirozin) és származékaik kulcsszerepet játszanak a virágos, gyümölcsös és fűszeres illatprofil kialakulásában. Az aminosav-metabolizmus enzimeit, például az aromás aminosav-transzferázokat és dehidrogenázokat, olyan aromavegyületek keletkezéséhez járulnak hozzá, mint a 2-fenilacetát vagy a fahéjas jellegű cinnamaldehyd.

A glutation-eredetű vegyületek a citrusos, trópusi aromajegyek megjelenését segítik, míg a lipid-anyagcsere kulcsenzimeit – zsírsav-szintetázokat, észterázokat, terpénszintetázokat – a gyümölcsös és „vajás” illatok, valamint a borsos karakter kialakításában játszanak szerepet. A terpének (pl. limonén, linalool, rotundon) a borok illatprofiljának meghatározó komponensei.

A szénhidrát-anyagcsere folyamataiban azonosított enzimek (pl. piruvát-dekarboxiláz, preferát-dehidratáz) olyan illatanyagokhoz vezetnek, mint az acetaldehyd vagy a 2-feniletanol, amelyek a bor gyümölcsös és virágos karakteréhez járulnak hozzá. Az almasav- és citrátciklushoz kapcsolódó enzimek – például a citrát-szintáz, malát-dehidrogenáz, illetve a diacetil-képződésért felelős komponensek – a „vajás” jegyek kialakításában, továbbá a sav-bázis egyensúly, a színstabilitás és a pH befolyásolásában is meghatározók. A glutation-anyagcsere enzimeit antioxidáns hatásuk révén hozzájárulnak az aromakomponensek oxidáció elleni védelméhez, ezzel az aroma stabilitásához. Az alkoholkoncentrációt befolyásoló enzimek közvetve hatnak az etanoltartalomra és annak aromára gyakorolt következményeire. Végül azonosítottunk olyan detoxifikációs szerepű enzimeket is, mint az S-formilglutathion-hidroláz, amely a formaldehydet formiáttá alakítja (almás illat megjelenésével), illetve a kinurenináz, amely az idősebb borokra jellemző „öregedési” ízjegyeket modulálhatja.

Összességében megállapítható, hogy a botritiszes borok aroma-, antioxidáns- és érzékszervi profilja nem kizárólag a *B. cinerea* tevékenységéből fakad, hanem a szőlőn kialakuló mikrobiális közösség – különösen a nemesrothadás késői fázisaiban aktív fonalas gombák és élesztők – funkcionális génexpressziójának is számottevő szerepe van.

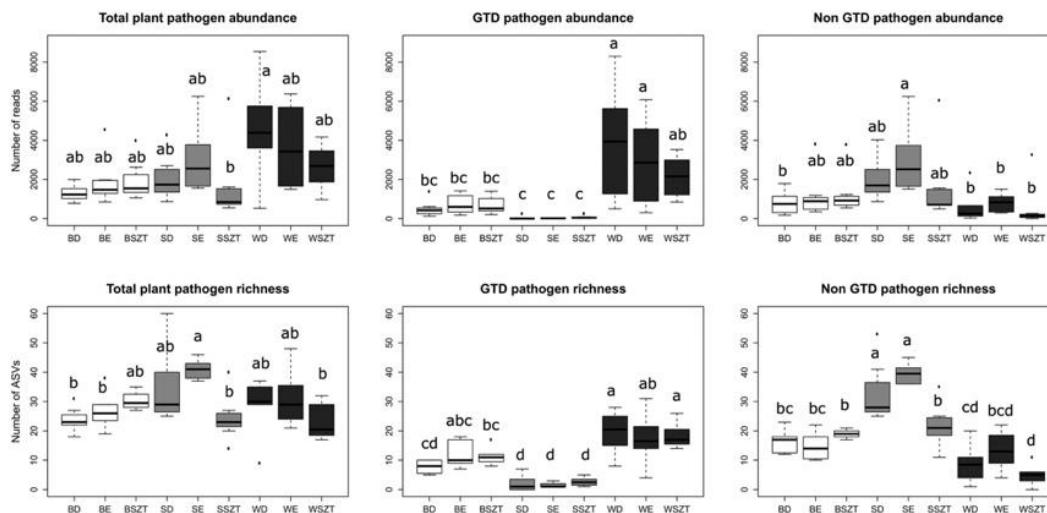
5.3. Az ESCA tőkebetegség kialakulásának jellegzetességei

5.3.1. Az egészséges és Esca tüneteket mutató szőlőnövények gomba közösségei

A növénykórokozó gombák diverzitásának, eloszlásának és közösségi összetételének mélyebb megértése érdekében a patogén gombaközösségeket a szőlő különböző mikroélőhelyein – a gyökérzónában, a kéregszövetben és az élő évelő farészben – vizsgáltuk, továbbá azt is feltártuk, hogy ezek a mikroélőhelyek milyen szerepet tölthetnek be potenciális inokulumforrásként. Vizsgálatainkban tünetmentes (egészséges) és tünetes (beteg), az Esca-betegségre jellemző levéltüneteket mutató szőlőtőkét hasonlítottunk össze, különös tekintettel azokra a tényezőkre, amelyek befolyásolhatják a tőkebetegségek kórokozóinak diverzitását és összetételét. Arra kerestünk választ, hogy a növényi patogén gombák – általánosságban –, valamint a tőkebetegségek kórokozóiban különösen a fajgazdagság, a gyakoriság és a közösségi összetétel eltérnek-e a különböző, föld alatti és föld feletti mintavételi helyszínek, illetve az egészséges és beteg szőlőtőkék között.

A fajgazdagság és abundancia vizsgálata

Az elemzésekben azonosított 579 növénypatogén ASV közül 119 tartozott 16 olyan gombanemzetséghez, amelyek kapcsolatba hozhatók a szőlő tőkebetegségeivel. Ezek a *Phaeomoniella*, *Fomitiporia*, *Phaeoacremonium*, *Diaporthe*, valamint *Diplodia* és *Seimatosporium* nemzetségek voltak. A nem tőkebetegség-eredetű nemzetségek közül a *Botrytis* volt a legváltozatosabb, majd a *Fusarium*, *Alternaria*, *Veronaea* és *Phaeosphaeriopsis* nemzetségek következtek.

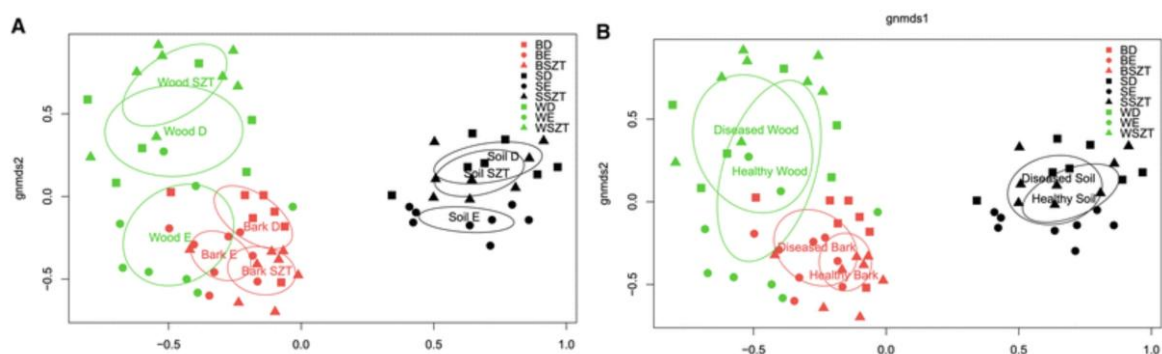


23. ábra A növénypatogén gombák abundanciája és fajgazdagsága különböző mintavételi forrásokban, a Tokaji borvidék eltérő dűlőiből származó szőlőtőkéken

A tőkebetegség- és nem tőkebetegség-eredetű, valamint az összes növénypatogén gomba abundanciája szignifikánsan különbözött a mintaforrások között, ugyanakkor a dűlők között nem volt szignifikáns eltérés. A patogén gombák teljes abundanciája az évelő

farészben volt a legnagyobb, ezt követte a talaj, majd a kéreg (23. ábra). A tőkebetegség-kórokozók szinte teljesen hiányoztak a talajmintákból, és döntően a növényi szövetekben voltak jelen, különösen az élő farészben, míg a nem tőkebetegség-eredetű kórokozók dominánsan a talajban fordultak elő. A növénypatogén gombák fajgazdagsága különbözött a mikroélőhelyek és a dűlők között és a két tényező között szignifikáns interakció is megfigyelhető volt. A nem tőkebetegség-eredetű kórokozók fajgazdagsága a talajban volt a legnagyobb, a tőkebetegség-kórokozók pedig a farészben mutatták a legnagyobb gazdagságot, ezt követte a kéreg, míg a talajmintákban a fajgazdagság rendkívül alacsony volt (23. ábra).

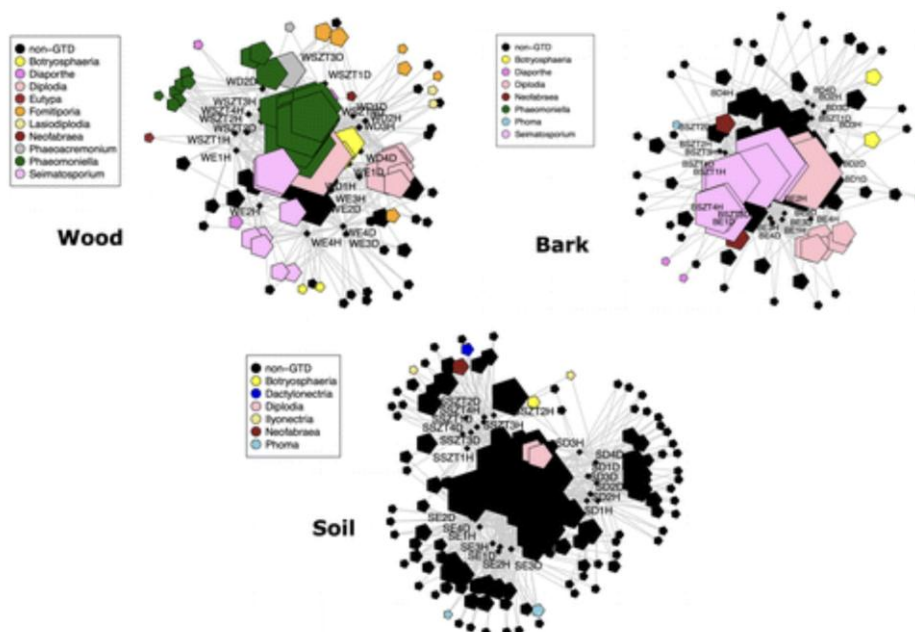
Az összes növénypatogén gombaközösség mellett külön elemeztük azokat a nemzetségeket, amelyek ismertén kapcsolatba hozhatók a szőlő tőkebetegségeivel, illetve a nem tőkebetegség-eredetű kórokozókat is, hogy kiemeljük az ökológiai különbségeket. A tünetmentes és az Esca-szindrómás tőkék összehasonlítása során nem találtunk szignifikáns különbséget az ASV-gazdagság vagy a kórokozó gombák abundanciája tekintetében, a *Diaporthe* kivételével: a farészben a tünetet mutató egyedek szignifikánsan magasabb ASV-gazdagságot mutattak. Az egyes mikroélőhelyek összevetése alapján a *Phaeomoniella* messze a legnagyobb bőséggel a farészben fordult elő, míg a *Diplodia* és a *Seimatosporium* dominánsan a kéregmintákban volt jelen. A fajgazdagság szempontjából a tőkebetegség-kórokozók közül a *Fomitiporia*, *Phaeomoniella* és *Phaeoacremonium* fajok mutatták a legnagyobb ASV-számot a farészben, a *Seimatosporium* és a *Diplodia* a kéregmintákban dominált, míg az *Ilyonectria* kizárólag talajmintákból volt kimutatható. A nem tőkebetegség-kórokozók esetében a 18 vizsgált gombanemzetség közül 13 a talajban mutatta a legnagyobb fajgazdagságot, míg három nemzetség (*Devriesia*, *Exobasidium* és *Catenulostroma*) a kéregmintákban fordult elő a legnagyobb ASV-számban. A növénykórokozó gombaközösségek szerkezetét kétdimenziós, nem-metrikus többdimenziós skálázással (NMDS) ábrázoltuk (24. ábra).



24. ábra A Tokaji borvidéken, különböző terroirokból és mikroélőhelyekről származó, betegség tünetes és tünetmentes szőlőkön élő növénypatogén gombaközösségek összetételének NMDS ordinációs ábrája. A mintanevek a mintaforrásra (S – talaj; B – kéreg; W – farész) és a Tokaji borvidék három dűlőjére (SZT – Szent Tamás; E – Nagy-Kopasz észak; D – Nagy-Kopasz dél) utalnak.

A PERMANOVA-analízis alapján a mintavételi forrás (mikroélőhely) bizonyult a legmeghatározóbb tényezőnek a gombaközösség struktúrájának alakításában (a

variancia 19,24%-a), ezt követte a dűlő hatása, majd a növények egészségi állapota. Az egyes mikroélőhelyek külön vizsgálatakor csak a kéregmintákban találtunk szignifikáns különbséget a tünetes és a tünetmentes növények között. A dűlők hatása legerősebben a talajban mutatkozott meg, ezt követte a kéreg, majd a farész. A hálózati ábrák megerősítették, hogy a tőkebetegségekkel összefüggő gombanemzetségek dominálnak a farészben és a kéregben, míg a nem tőkebetegség-kórokozók elsősorban a talajmintákban voltak túlsúlyban. A hálózati ábrák alátámasztották, hogy a tünetes és tünetmentes növények mikrobiomja között nem volt egyértelmű különbség. Azt is kimutatták, hogy a tőkebetegség kórokozók megoszlása eltér a kéreg- és farészminták között: míg a *Phaeomoniella*, *Diplodia*, *Phaeoacremonium* és *Fomitiporia* ASV-k csak a farészben voltak jelen, addig a *Seimatosporium*, *Diplodia* és *Neofabraea* nemzetségek domináltak a kéregmintákban, és ezen ASV-k döntő többsége csak néhány egyedi farészmintában fordult elő (25. ábra).



25. ábra A növénypatogén gombák amplikon szekvencia variánsainak eloszlása a különböző mintaforrások alapján, hálózatelemzés segítségével megjelenítve. A kis négyzetek a mintákat, a különböző méretű ötszögek az ASV-ket jelölik; a szürke vonalak az ASV-k és az őket tartalmazó minták közötti kapcsolatot mutatják. Az ötszögek mérete az előfordulási gyakoriságot tükrözi. A GTD-hoz köthető nemzetségek színes, míg a többi patogén ASV fekete jelölést kapott. A mintanevek tartalmazzák a dűlőt (SZT – Szent Tamás; E – Nagy-Kopasz észak; D – Nagy-Kopasz dél), a mintaforrást (S – talaj; B – kéreg; W – farész), az ismétlésszámot és az egészségi állapotot (H – tünetmentes; D – tünetes).

A legtöbb indikátorfaj a talajmintákban fordult elő, főként a *Fusarium*, *Pilidiella*, *Plectosphaerella*, *Didymella*, *Immersidiscosia*, *Setophoma*, *Laetisaria* és más nemzetségek. A kéregmintákban három, tőkebetegségekhez köthető nemzetség (*Phaeomoniella*, *Neofabraea*, *Seimatosporium*) és két, nem tőkebetegség-eredetű nemzetség (*Exobasidium*, *Devriesia*) bizonyult indikátornak. A farészben jellemzően tőkebetegség-kórokozókhoz tartozó nemzetségek szolgáltak indikátorként, így például a *Fomitiporia*, *Phaeoacremonium*, *Phaeomoniella* és *Seimatosporium*.

Kórokozó és nem kórokozó gombaközösségek diverzitásának vizsgálata

Vizsgálataink új megvilágításba helyezték a szőlőhöz kapcsolódó gombaközösségek összetételének dinamikáját, különös tekintettel a növénypatogén gombák diverzitására, abundanciájára és eloszlására a különböző mikroélőhelyeken (kéreg, élő farész, talaj) tünetes (Esca-levéltüneteket mutató) és tünetmentes szőlőtőkékben. Eredményeink szerint egyazon szőlőtőkén belül jelentős összetételbeli eltérések figyelhetők meg a talaj és a föld feletti növényi részek patogén gombái között: a tőkebetegség-kórokozók alapvetően a farészben dominálnak, míg a nem tőkebetegség-eredetű kórokozók inkább a talajban. A tőkebetegség-kórokozók nemcsak taxonómiai, hanem genetikai diverzitásukat tekintve is hasonló mértékben vannak jelen a tünetmentes és az Esca-tünetes növényekben. A dűlőhöz köthető környezeti tényezők minden mikroélőhelyen szignifikánsan befolyásolják a kórokozó-közösségek összetételét, legerősebben a talajban.

A tünetes és tünetmentes növények közötti egyetlen kimutatható különbség a kéregminták gombaközösségében jelent meg, ami összhangban áll Nerva és mtsai (2019) megfigyeléseivel. A tőkebetegség-kórokozók tünetmentes növényekben való jelenléte korábban is ismert volt, feltételezik, hogy a látható tünetek megjelenése az abundancia erősödésének következménye lehet. Eredményeink elsőként igazolják, hogy sem a talajban található, sem a szőlőben élő patogén közösségek nem mutatnak lényegi különbséget tünetes és tünetmentes növények között a diverzitás, az abundancia vagy a közösségi struktúra tekintetében, ami rávilágít az Esca és más tőkebetegség kórokozó komplex természetére. Kivételt jelenthet a *P. chlamydospora*, amely indikátorként a tünetes növényekhez köthető. Eredményeink alapján a tőkebetegség kórokozók többsége feltehetően endofiton vagy látens szaprotróf életmódot folytat, és csak különböző stresszhatások (pl. metszés, szárazság, fagy) esetén válnak patogénné.

Következtetések

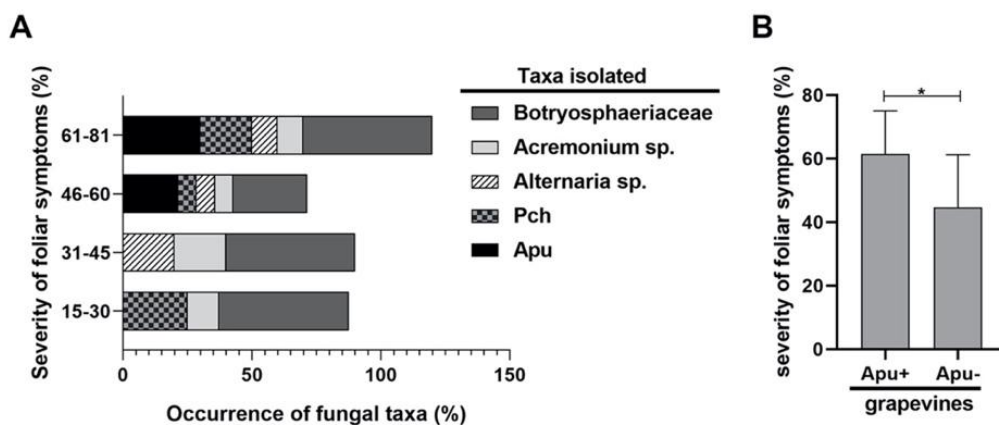
Az egyik legfontosabb megállapításunk, hogy a növénykórokozó gombák közösségi összetételében mutatkozó különbségek nagyobbak a szőlőtőke egyes növényi részei között, mint az egyedek vagy az egészségi állapotok között. Ezt a mintázatot az magyarázza, hogy a tőkebetegségekhez köthető gombák döntően a tőke föld feletti részeiben fordulnak elő, míg a nem tőkebetegség kórokozók túlnyomórészt a talajhoz kapcsolódnak, továbbá nem mutatható ki szignifikáns különbség a tünetmentes és az Esca-tünetes szőlőtőkék gombaközösségei között. Eredményeink arra utalnak, hogy az Esca-betegséggel összefüggésbe hozott gombák a szőlő „magmikrobiomjának” részét képezik, és feltehetően kommenszális endofiták és/vagy látens szaprotrófok, míg egyes fajok opportunista kórokozóként léphetnek fel stresszelt növényekben. Az abiotikus környezeti tényezők szerepe különösen jelentős lehet az Esca kialakulásában, ezért indokolt olyan vizsgálatok elvégzése is, amelyek ezen tényezők hatását tárják fel az Esca által érintett szőlőtőkék gombaközösségeinek dinamikájára.

5.3.2. *Aureobasidium pullulans* szerepe az Esca lombtüneteinek kialakulásában

Az *A. pullulans* biokontroll-agens tulajdonságain túl jól ismert tagja a szőlő mikrobiomjának, és korábban nem tulajdonítottak neki közvetlen káros hatást. Vizsgálataink során azonban jelenléte pozitívan korrelált az Esca-betegség levéltüneteinek előfordulási gyakoriságával, ezért feltételeztük, hogy potenciális kórképsúlyosító szerepe más kórokozókkal, különösen a *P. chlamydospora* és a *Ph. minimum* fajokkal való kölcsönhatásaiban keresendő. A fajok közötti interakciókat konfrontációs tesztekkel vizsgáltuk, amelyek kölcsönös növekedés-moduláló hatást jeleztek az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* között. E gombák lombtünetekre gyakorolt közvetlen és közvetett hatásait mesterséges fertőzési kísérletekben elemeztük. Az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* törzsek kombinált patogenitásában megfigyelt, törzsfüggő különbségek arra utalnak, hogy ezek a variációk összefüggésbe hozhatók a virulenciafaktorok – például exopoliszacharidok vagy extracelluláris fehérjék – termelési képességének eltéréseivel.

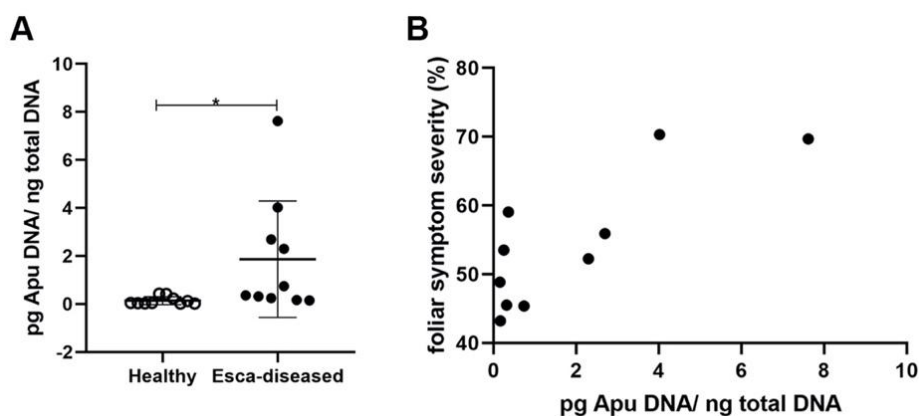
Az *A. pullulans* az endofiton mikrobiomban

Az Esca-tüneteket mutató szőlőkből történő izolálás során az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* izolálási gyakorisága rendre 16 %, illetve 14 % volt. Az *A. pullulans* jelenléte összefüggést mutatott a nagyobb (46–81 %) levéltünet-súlyossággal jellemezhető tőkékkel (26 A. ábra). Ezzel összhangban a szőlőtőkék, ahonnan *A. pullulans*-t izoláltunk szignifikánsan magasabb tüneti értékeket produkáltak (26 B. ábra).



26. ábra Az *A. pullulans* gyakorisága és az Esca-betegség lombtüneteinek súlyossága közötti összefüggés tenyésztésen alapuló vizsgálat alapján

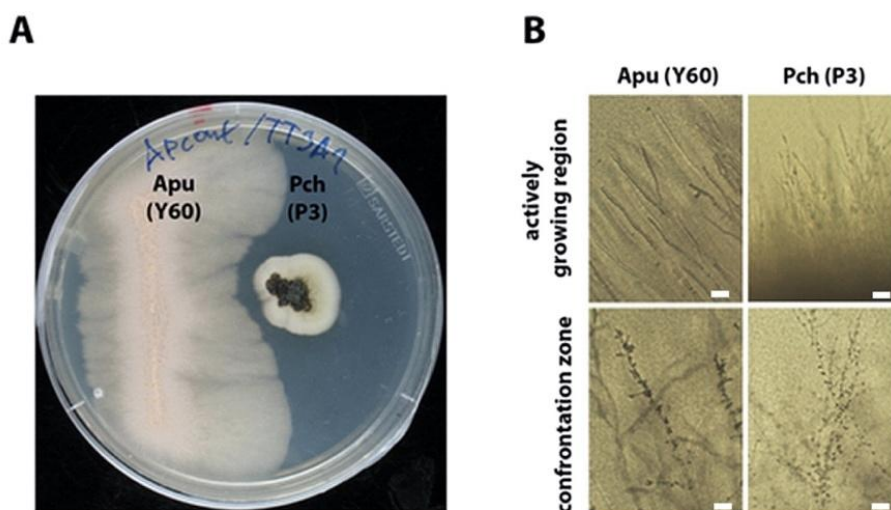
Valós idejű kvantitatív PCR-rel (qRT-PCR) végzett méréseink alapján az *A. pullulans* DNS-mennyisége szignifikánsan magasabbnak bizonyult a beteg növényekben (27 A. ábra). Ez a növekedés nem az összes Esca-tünetes növény általánosan emelkedett értékeiből, hanem néhány egyedben mért kimagasló értékekből adódott. A lombtünetek súlyossága és *A. pullulans* DNS-tartalma között szignifikáns korrelációt mutattunk ki (27 B. ábra).



27. ábra Az *A. pullulans* abundanciája egészséges és Esca beteg szőlőtőkékben, DNS-alapú kvantifikálás alapján

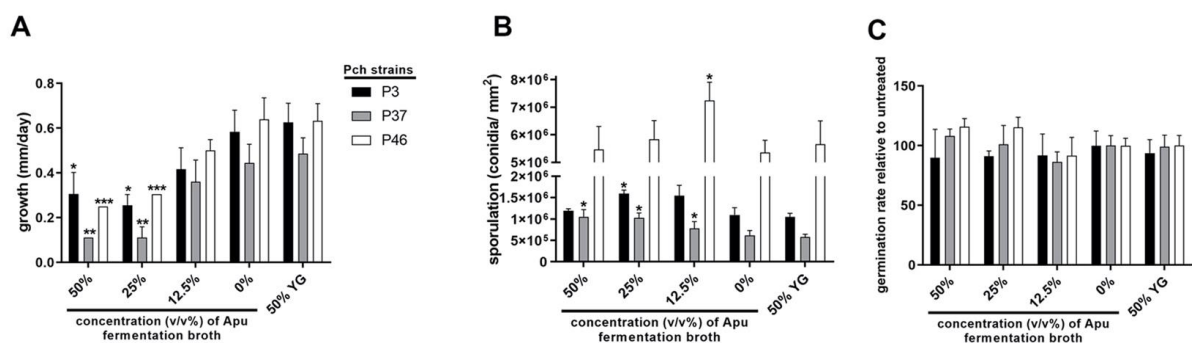
Az *A. pullulans* és a *Ph. minimum* közötti *in vitro* konfrontációs vizsgálatok antagonisztikus hatást jeleztek: miközben az *A. pullulans* serkentette a *Ph. minimum* izolátumok növekedését, az *A. pullulans* konfrontációs zónáiban sejtpusztulást, citoplazma-kondenzációt és citoplazma-kiáramlást figyeltünk meg. Mivel ez a *Ph. minimum* által kiváltott gátló hatás nem hozható összefüggésbe az *A. pullulans* feltételezett tüneterősítő hatásával, a két faj kölcsönhatását kizártuk a további vizsgálatokból.

Az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* közötti konfrontációs kísérletek során mindkét faj csökkenő növekedési rátát mutatott a kölcsönhatási zóna közelében (28 A. ábra). Mikroszkóposan sejtpusztulásra utaló jel nem volt észlelhető; ezzel szemben az összes vizsgált *A. pullulans* és *P. chlamydospora* törzs fokozott sporulációt mutatott a konfrontációs zónák környezetében (28 B. ábra).



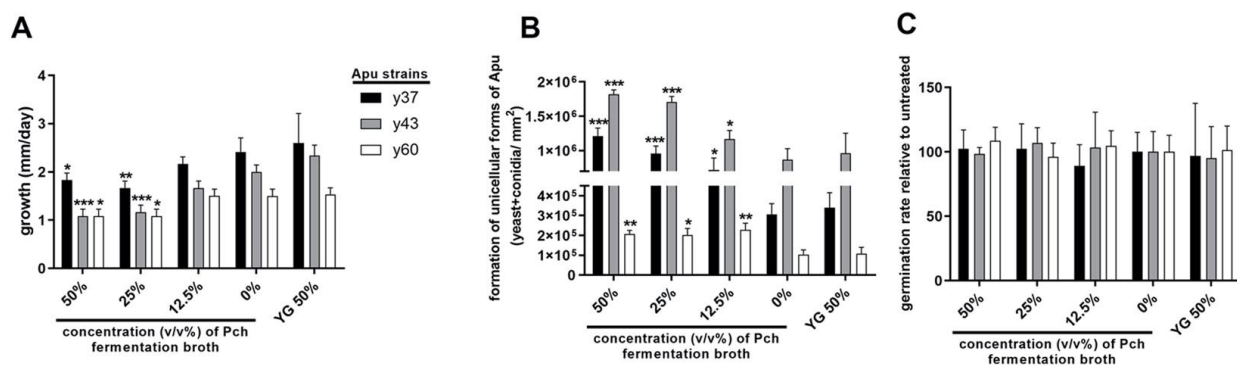
28. ábra Az *A. pullulans* (Y60) és *P. chlamydospora* (P3) *in vitro* konfrontációs tesztje

Az *A. pullulans* Y60 törzsének folyadékkultúrából származó filtrátuma csökkentette a vizsgált *P. chlamydospora* törzsek növekedési ütemét, ugyanakkor fokozta sporulációjukat, anélkül, hogy gátolta volna a konídiumok csírázását (29. ábra). Az *A. pullulans* filtrátum 12,5–50 % (v/v) közötti koncentrációtartományban a *P. chlamydospora* konídiumok száma szignifikánsan megnövekedett (29 B. ábra).



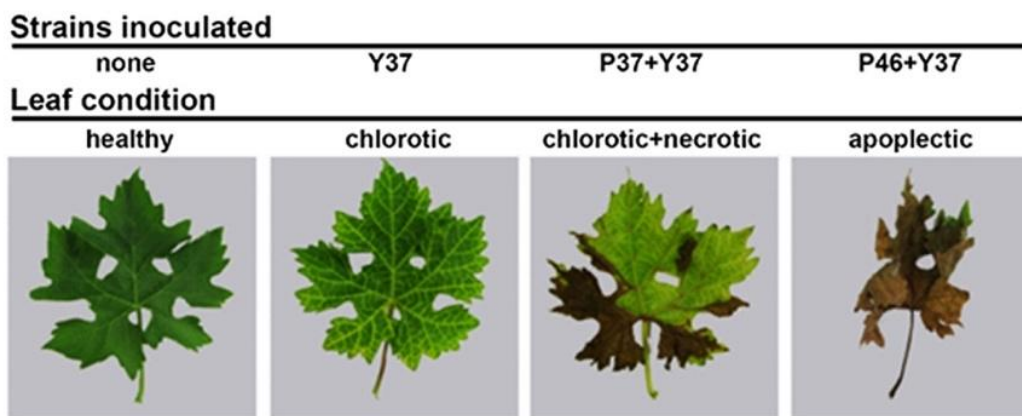
29. ábra Az *A. pullulans* által kiválasztott molekulák hatása a *P. chlamydospora* fejlődésére

Hasonló hatásokat figyeltünk meg, amikor a tápközeget a *P. chlamydospora* P3 törzsének filtrátumával egészítettük ki. Ez az *A. pullulans* csírázási rátáját nem befolyásolta (30 C. ábra), ugyanakkor a növekedés mértéke csökkent (30 A. ábra), míg a konídium- és élesztősejt-termelés fokozódott (31 B. ábra).

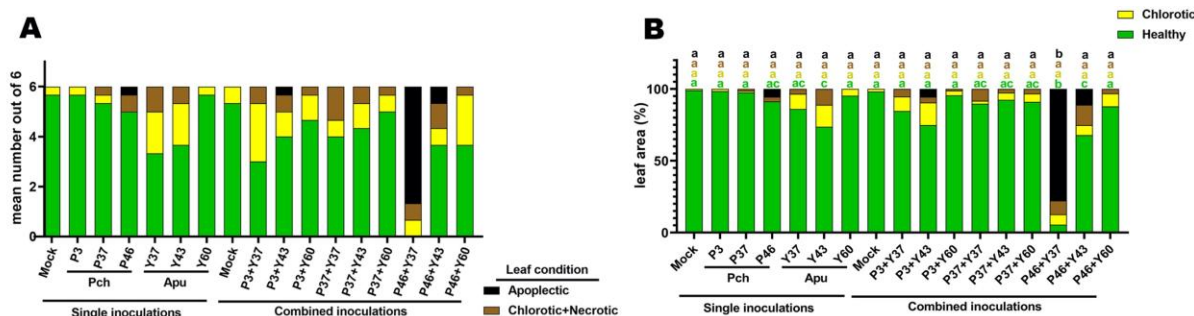


30. ábra A *P. chlamydospora* által kiválasztott molekulák hatása az *A. pullulans* fejlődésére

A mesterségesen fertőzött szőlőhajtások levelein az inokulációt követő 15. napon különböző mértékű és típusú levélkárosodások jelentkezték (31. ábra), amelyek súlyossága és megjelenési formája az alkalmazott törzstől függően eltért (33. ábra). A kontrollként kezelt (álinokulált) vesszőkön nem, vagy csak enyhe tünetek voltak megfigyelhetők; túlnyomó többségük tünetmentes maradt (32 A. ábra).

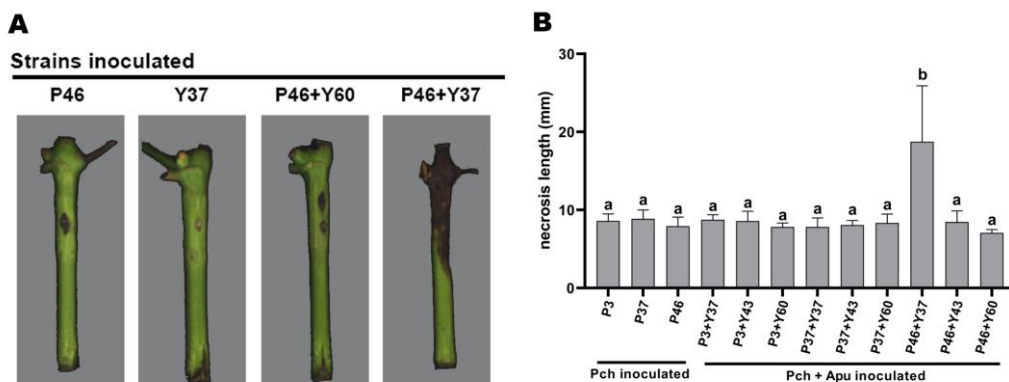


31. ábra A *P. chlamydospora* és/vagy *A. pullulans* törzsekkel inokulált hajtásokon megfigyelt levélkárosodások



32. ábra Az *A. pullulans* és *P. chlamydospora* hatása a levélkárosodásokra a vizsgálati körülményektől függően

A három *A. pullulans* törzs közül kettő (Y37, Y43) okozott levélkárosodást, az Y43 törzs esetében az egészséges levélfelület szignifikánsan csökkent (32 B. ábra). Az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* törzsekkel végzett együttes inokuláció során a levélkárosodás előfordulása és súlyossága törzsfüggő módon fokozódott. A legnagyobb tüneti súlyosságot az Y37 *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* P46 törzsek kombinált inokulációja eredményezte (32 B. ábra), amely a levelek többségének elhalásához vezetett.



33. ábra Az *A. pullulans* és *P. chlamydospora* törzsek hatása a nekrosis kialakulására zöld szőlővesszőkön

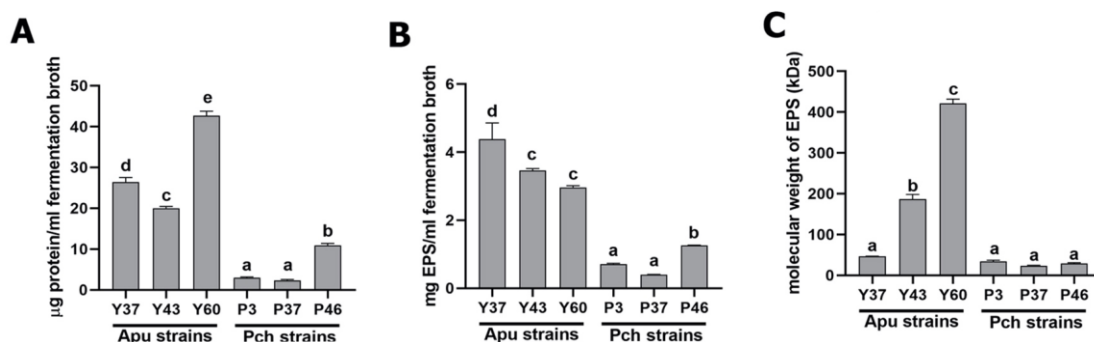
Az egyedileg inokulált hajtások közül csak a *P. chlamydospora* törzsek okoztak nekrozist az inokuláció helyén, az *A. pullulans* törzsek egyike sem váltott ki ilyen tünetet. Figyelemre méltó, hogy az Y37 *A. pullulans* és a P46 *P. chlamydospora* törzsek kombinált inokulációja során az apoplektikus leveles vesszőkben kiterjedt nekrozist figyeltünk meg (33 A. ábra), amely szignifikánsan nagyobb nekrozishosszúságot eredményezett, mint a többi kezelési csoportban (33 B. ábra).

A mesterséges fertőzések eredményei alátámasztják azt a hipotézist, miszerint az *A. pullulans* elősegítheti az Esca-betegség lombtüneteinek kialakulását, hozzájárulhat a helyi érszöveti nekrosis kialakulásához, kiemelve e kölcsönhatás törzsfüggő jellegét.

Az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* virulenciafaktorainak termelése

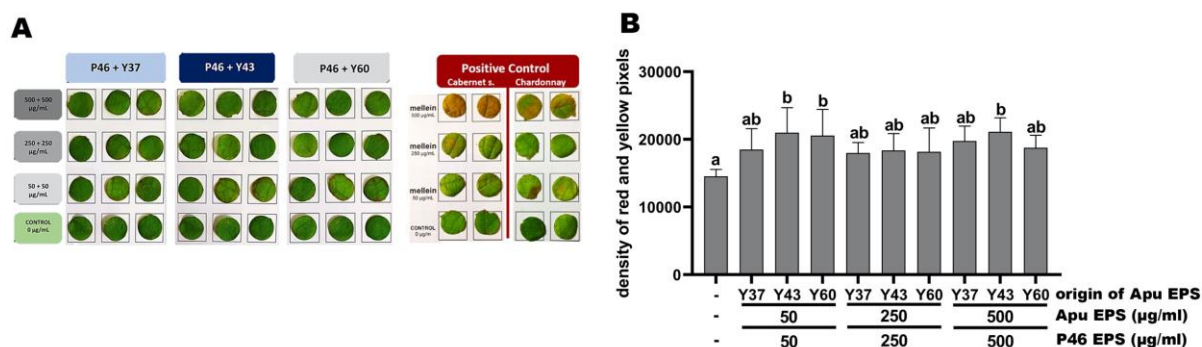
Az *A. pullulans* törzsek fehérjeszekréciója jelentős, törzsek közötti különbségeket mutatott (34 A. ábra). A törzsek által termelt exopoliszacharid (EPS) mennyisége meghaladta a *P. chlamydospora* törzsekét (34 B. ábra). Az egyes gombatörzsek által termelt exopoliszacharidok átlagos molekulatömegét a mért tömeg és a redukáló cukrok

glükózegyenértékben kifejezett molaritásának arányaként számítottuk; ebben a tekintetben is különbségek mutatkoztak a vizsgált törzsek között (34 C. ábra).



34. ábra Az *A. pullulans* és *P. chlamydospora* törzsek fehérje- és exopoliszacharid-szekréciójának összehasonlítása

A 96 órás kezelés után egyik, exopoliszachariddal kezelt levélkorongon sem észleltünk nekrotikus elváltozást. Ezzel szemben kombinációkban a P46 törzs az *A. pullulans* Y37, Y43 és Y60 törzseinek exopoliszacharidjaival 48 óra elteltével perem menti nekrozist váltott ki Cabernet Sauvignon levélkorongokon (35 A. ábra), míg Chardonnay esetében ilyen hatás nem volt megfigyelhető. A pozitív kontrollként alkalmazott, melleint tartalmazó oldat mindkét fajta esetében, minden vizsgált koncentrációnál nekrotikus területek kialakulását idézte elő.



35. ábra A *P. chlamydospora* és *A. pullulans* exopoliszacharidjainak fitotoxicitása szőlőlevél-korongokon

A levélkorongokról készült felvételek képelemzése alapján az exopoliszachariddal kezelt mintákban a vörös és sárga pixelek aránya nagyobb volt a kezeltlen kontrollhoz képest, ami a kezelés kedvezőtlen hatására utal. Ez a különbség statisztikailag szignifikánsnak bizonyult a vizsgált kombinációkban (35. ábra).

Az *A. pullulans* jelenléte és kölcsönhatásai az Esca tüneteinek kialakulásában

In vitro konfrontációs vizsgálataink során az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* kölcsönösen gátolták egymás növekedését, fokozott sporulációt mutattak, ugyanakkor nem termeltek egymás számára toxikus molekulákat. Ezt a megfigyelést a folyadékkultúra-szűrletes kísérletek is megerősítették. A növekedési sebesség, a sporuláció és a pigmentáció alapján a törzsek jelentős fenotípusos és genotípusos variabilitása állapítható meg. Eredményeink azt támasztják alá, hogy a két gombafaj fejlődése kölcsönösen módosulhat, vélhetően az ún. „quorum sensing” jelenség

következtében, amikor a sejtsűrűség változására a mikroorganizmusok anyagcseréje és fejlődési üteme módosul (Albuquerque és Casadevall, 2012).

Koinokulációk révén tanulmányoztuk az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* kölcsönhatásait az Esca-betegség tüneti kifejeződésével összefüggésben. A *P. chlamydospora* törzsek önmagukban csak az inokuláció helyén okoztak nekrózist, levéltüneteket nem idéztek elő. Az *A. pullulans* törzsek sem nekrózist, sem levéltüneteket nem okoztak, kivéve az Y37 és Y43 törzseket, amelyek enyhe klorózist és részleges nekrózist váltottak ki a kísérletek ~50%-ában, jelezve, hogy egyes *A. pullulans* törzsek önmagukban is képesek károsítást okozni.

A koinokulációk során további, törzsfüggő hatásokat figyeltünk meg. A Y43 és Y60 *A. pullulans* törzsek minden *P. chlamydospora*-kombinációban a saját, önálló inokulációjuknál tapasztaltakhoz hasonló tüneteket eredményeztek, kivéve a Y43/P46 kombinációt, amely alacsony, de szignifikáns levéllehalást váltott ki. A Y37/P46 kombinációban a megfertőzött hajtások ~80%-a apoplektikus tüneteket mutatott, jelentős levél- és hajtásnekrózissal. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* közötti kölcsönhatás törzsfüggő módon befolyásolja a betegség lefolyását.

Az exopoliszacharidokkal végzett fitotoxicitási vizsgálatok alapján a külön-külön alkalmazott exopoliszacharidok a vizsgált koncentrációkban nem okoztak nekrózist. Csak az *A. pullulans* és a *P. chlamydospora* poliszacharidjainak együttes alkalmazása eredményezett nekrózist a levélkorongokon. Ez a szinergista hatás megerősíti a pullulán potenciális szerepét az Esca tünettában, és magyarázatot adhat az *A. pullulans* közvetett szerepére a betegség kialakulásában (Bruno és mtsai, 2007).

Folyékony táptalajon vizsgáltuk az egyes törzsek exopoliszacharid- és fehérjetermelését is. Az *A. pullulans* Y37 törzs magas exopoliszacharid-termelése és annak alacsony molekulatömege kiemelkedett a vizsgált törzsek közül. Ez utóbbi tulajdonság elősegítheti az exopoliszacharidok fatestből levélbe történő transzportját, és ilyen módon a tünetek kialakulását. A *P. chlamydospora* törzsek közül a P46 produkálta a legtöbb extracelluláris fehérjét, ami összhangban áll a P46 törzs magas virulenciájával. Eredményeink arra utalnak, hogy az *A. pullulans* által termelt exopoliszacharidok és a *P. chlamydospora* fehérje-effektorai együttesen felelősek a súlyos levéltünetek kialakulásáért.

Következtetések

Vizsgálataink eredményei megerősítik, hogy olyan gombafajok, amelyeket általában a növényi mikrobiom hasznos tagjainak tekintenek, elősegíthetik egyes megbetegedések – jelen esetben az Esca-betegség – patogenezisét. Az *A. pullulans* egyes törzsei fokozzák a betegség kialakulását, feltehetően az általuk termelt poliszacharidok révén. A *P. chlamydospora* törzsek esetében megfigyelt patogenitás szintén törzsfüggőnek bizonyult, ami arra utal, hogy az általuk kiválasztott fehérjék is szerepet játszhatnak a tünetek kialakulásában.

A *P. chlamydospora* által termelt fehérjék és az *A. pullulans* poliszacharidjai közötti lehetséges szinergikus hatás mellett a két gombafaj közvetlen kölcsönhatása is hozzájárulhat az Esca-betegség kialakulásához és a levéltünetek intenzitásához.

5.4. A szőlő tőkebetegségek kórokozóinak lehetséges antagonistái

5.4.1. A *Clonostachys rosea* mikoparazita képességének és növekedésgátló hatása

A *C. rosea* *in vitro* konfrontációs vizsgálatai tőkebetegség kórokozó gombákkal

A Cabernet Sauvignon szőlőoltványok vaszkuláris mikrobiotájának vizsgálata során – a tőkebetegségekhez társított többféle gombafaj mellett – *C. rosea* izolátumokat is azonosítottunk egészséges, külső és belső tőkebetegség-tüneteket nem mutató növényekből.

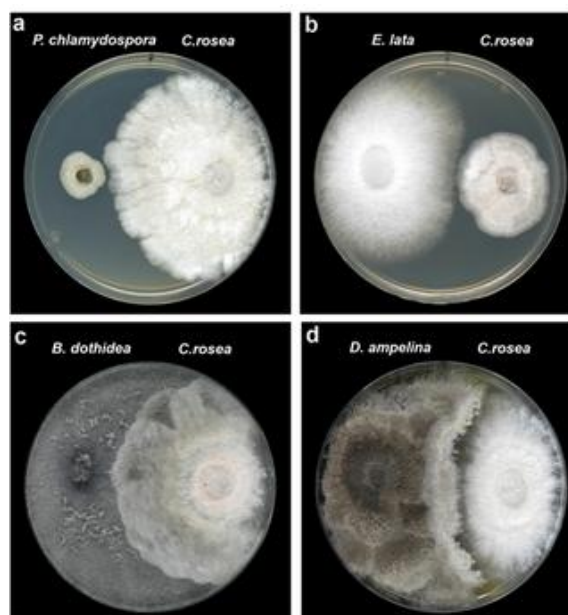
A *C. rosea* törzsek tőkebetegség-kórokozókkal szembeni növekedésgátló hatását *in vitro* konfrontációs kísérletekben teszteltük; a százalékos gátlási értékeket a 9. táblázat foglalja össze. A kísérletekben a tőkebetegségekhez köthető gombafajok növekedési ütemét hasonlítottuk össze *C. rosea* izolátumok jelenlétében és távollétében.

9. táblázat *C. rosea* izolátumok növekedésgátló hatása a tőkebetegség kórokozókkal szemben

GTD kórokozók	<i>Clonostachys rosea</i> izolátumok				
	19B/1	33C/1	89C/3	91C/2	100C/1
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	9.7 ± 9.7	8.8 ± 6.4	1.9 ± 1.6	-1.0 ± 5.0	12.9 ± 21.3
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	20.3 ± 15.7	8.1 ± 7.5	7.9 ± 7.3	7.1 ± 9.4	12.6 ± 14.7
<i>Diaporthe ampelina</i>	3.0 ± 1.4	2.0 ± 2.8	-10.0 ± 2.8	-6.0 ± 2.8	16.0 ± 5.7
<i>Diaporthe foenicula</i>	13.75 ± 8.8	22.5 ± 3.5	22.5 ± 3.5	18.8 ± 5.3	18.8 ± 1.8
<i>Diaporthe fukushii</i>	-14.0 ± 8.5	-14.0 ± 2.8	-22.0 ± 2.8	-18.0 ± 2.8	-18.0 ± 2.8
<i>Eutypa lata</i>	24.8 ± 7.0 ^{ab}	24.8 ± 1.4 ^{ab}	17.8 ± 2.2 ^a	19.2 ± 3.8 ^{ab}	29.0 ± 1.7 ^b
<i>Phaeoacremonium minimum</i>	-14.5 ± 8.2 ^a	3.7 ± 12.6 ^{ab}	11.4 ± 14.0 ^{ab}	-14.5 ± 13.5 ^a	29.8 ± 0.9 ^b
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	38.0 ± 5.6 ^{ab}	28.8 ± 9.4 ^a	47.1 ± 2.8 ^b	43.1 ± 9.4 ^{ab}	54.0 ± 2.0 ^b

Magas radiális növekedésgátlás (%) értékeket mértünk az *E. lata* (17,8–29%) és a *P. chlamydospora* (28,8–54%) esetében, valamennyi vizsgált *C. rosea* törzzsel szemben. Ezen kórokozók növekedésgátlása már azt megelőzően megfigyelhető volt, hogy a gombatelepek fizikailag érintkeztek volna a *C. rosea* izolátumokkal (36 A – B. ábra), ami ezen biológiai kontroll ágens antagonista aktivitására utal.

A *Botryosphaeria dothidea*, a *Cadophora luteo-olivacea* és a *Pheoacremonium minimum* esetében nagyon alacsony vagy nem kimutatható gátlást észleltünk (–14,5–29%). Érdekes módon, a három vizsgált *Diaporthe* faj eltérő válaszreakciót mutatott az *in vitro* konfrontáció során. Hosszabb inkubációt követően a *C. rosea* micéliumai túlnőttek a *B. dothidea* (42 C. ábra) és a *D. ampelina* (36 D. ábra) telepein.



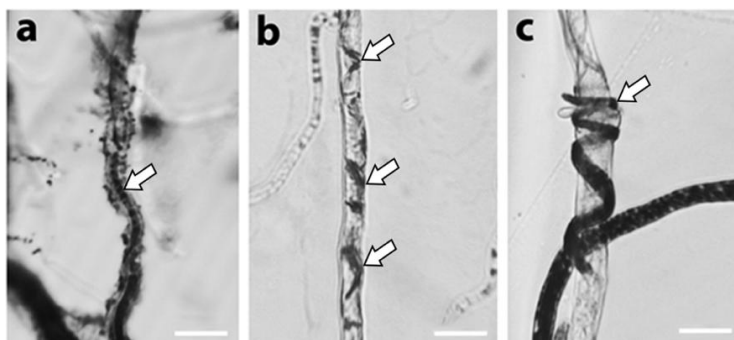
36. ábra A *C. rosea* 19B/1 törzs in vitro konfrontációs vizsgálata tőkebetegség kórokozókkal
(a) *P. chlamydospora*, 15 nappal inokuláció után (dpi); (b) *E. lata*, 8 dpi; (c) *B. dothidea*, 15 dpi; (d) *D. ampelina*, 15 dpi.

A túlnövés mértékét a 10. táblázatban összegeztük. A legnagyobb túlnövést *B. dothidea* esetében észleltük, de a *Diaporthe* fajok telepei fölött is markáns túlnövés volt megfigyelhető. Egyik kórokozócsoportnál sem mutatkozott szignifikáns különbség a vizsgált *C. rosea* törzsek között.

10. táblázat A *C. rosea* izolátumok mikoparazitizmusa tőkebetegség kórokozók telepeken.

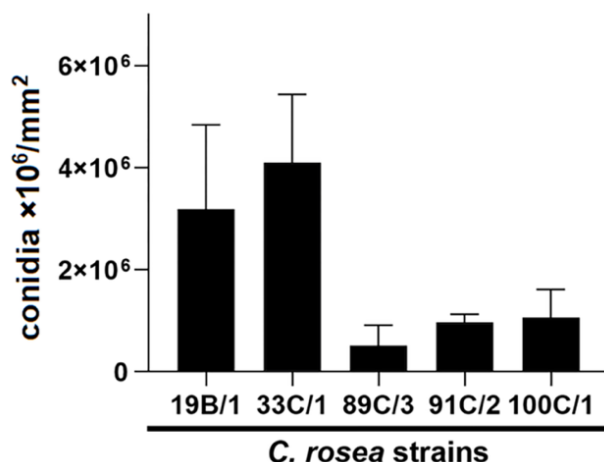
GTD kórokozók	Clonostachys rosea izolátumok				
	19B/1	33C/1	89C/3	91C/2	100C/1
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	17.2 ± 1.9	18.8 ± 0.8	17.3 ± 2.5	16.5 ± 2.6	16.2 ± 2.8
<i>Diaporthe ampelina</i>	6.5 ± 0.5	11.5 ± 0.7	12.0 ± 2.8	15.5 ± 2.1	13.3 ± 0.4
<i>Diaporthe foenicula</i>	17.2 ± 1.91	18.0 ± 1.4	10.5 ± 0.7	16.0 ± 1.4	18.5 ± 0.7
<i>Diaporthe fukushii</i>	10.5 ± 0.7	10.5 ± 0.7	5.5 ± 0.8	12.5 ± 0.7	14.3 ± 1.0

A vizsgált *C. rosea* törzsek azon képessége arra, hogy konfrontációs tenyészetekben kolonizáljanak egyes, tőkebetegségekhez kapcsolódó kórokozókat, mikoparazita aktivitásra utal. Ezt a jelenséget mikroszkópos vizsgálatokkal vizuálisan is igazoltuk *B. dothidea* és *Diaporthe* spp. izolátumok esetében (37. ábra).



37. ábra A *C. rosea* 100C/1 törzs és GTD-kórokozók közötti konfrontációs zónák mikroszkópos vizsgálata. A *C. rosea* növekedése *D. ampelina* (a) és *B. dothidea* (b, c) hifákon. A nyilak a *C. rosea* micéliumát jelölik. Méretarány 10 μm

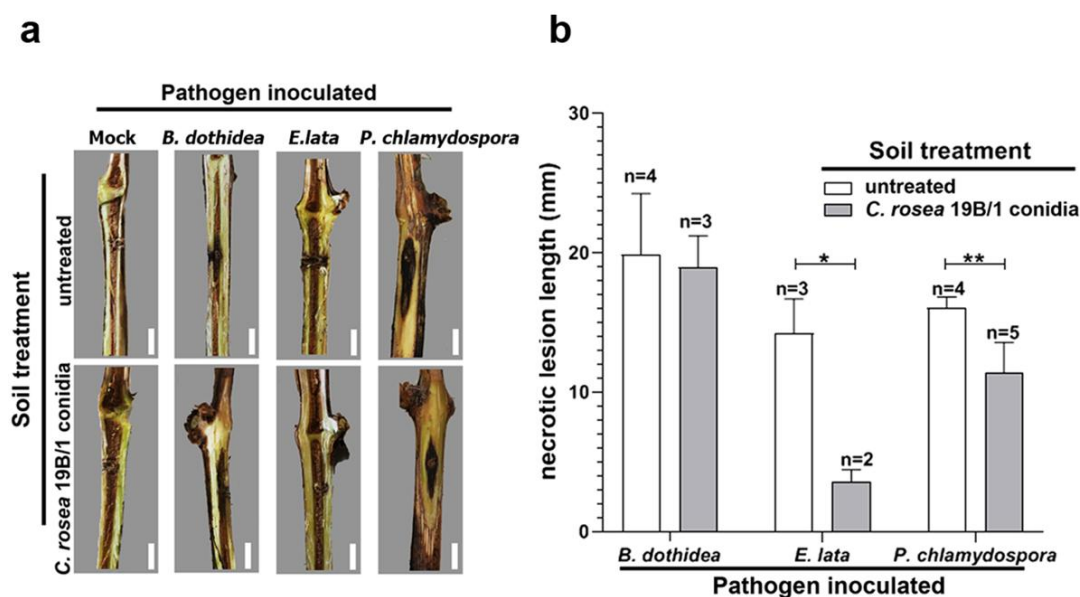
A vizsgált *C. rosea* törzsek mind a *Diaporthe* spp. (37 A. ábra), mind a *B. dothidea* (37 B. ábra) esetében intracelluláris növekedést tapasztaltunk, illetve megfigyeltük a *C. rosea* hifáinak csavarodását is a kórokozó gombák hifái körül (37 C. ábra).



38. ábra A *C. rosea* törzsek konídium termelésének összehasonlítása. A termelt konídiumok számát a telepfelülethez viszonyítva normalizáltuk.

In planta konfrontációs tesztek a *C. rosea* és tőkebetegség kórokozók között

A *C. rosea* hatását a tőkebetegség tüneteinek a kialakulására egyéves szőlődugványokon vizsgáltuk. A növényeket megsebeztük, majd inokuláltuk *B. dothidea*, *E. lata* és *P. chlamydospora* micéliumával, majd üvegházi körülmények között növesztettük őket kezeletlen, illetve *C. rosea* konídiumaival kezelt talajban. A tőkebetegséghez köthető kórokozók inokulált dugványokon nekrotizációs elváltozások jelentek meg (39 A. ábra), míg a kontroll növényeken ilyen tünetek nem alakultak ki.



39. ábra A *C. rosea* 19B/1 törzs hatása a tőkebetegség kórokozók által kiváltott vaszkuláris nekrotizis kialakulására. A) A nekrotizisokról készült fotók. A léptékvonalak 1 cm-nek felelnek meg. B) A nekrotizációs elváltozások átlagos hosszúsága és szórása, a kezeletlen és a *C. rosea*-val kezelt talajokon nevelt növények esetében. Az oszlopok fölötti számok a tünetet mutató növények számát mutatja. A csillagok a különbségek szignifikanciáját jelölik (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$).

A *B. dothidea* és az *E. lata* esetében a nekrózis mélyen a fás szövetekben alakult ki, míg a *P. chlamydospora* törzs elsősorban a kéreg alatti zónát károsította. Az *E. lata* és *P. chlamydospora* által okozott nekrózis hossza szignifikánsan alacsonyabb volt azoknak a dugványoknak az esetében, amelyeket *C. rosea*-val oltott talajba ültettünk. A *B. dothidea*-val történt fertőzés esetében a *C. rosea* kezelés nem gyakorolt hatást a betegség kialakulására (39 B. ábra).

Kórokozóval nem fertőzött dugványokból a *C. rosea* törzs visszaizolálása csökkenő tendenciát mutatott a gyökértől felfelé: az öt dugványból három esetében sikerült visszanyerni a törzset a dugvány aljából, csak egy esetben az internódium közepéből, míg a sebzési pontokból egyáltalán nem volt kimutatható. Figyelemre méltó, hogy a *C. rosea*-val kezelt talajban nevelt, de kórokozóval nem inokulált dugványokon semmilyen károsodás nem volt megfigyelhető.

A *C. rosea* biokontroll képességének elemzése

A vizsgált *C. rosea* törzsek határozottan erőteljes növekedésgátló hatást fejtettek ki a *P. chlamydospora*-ra és az *E. lata*-ra. A gátlás már azelőtt észlelhető volt, hogy fizikai kontaktus létesült volna a *C. rosea* és a patogén között, ami az antagonista izolátumok által termelt antibiotikus vegyületek jelenlétére utal. A *C. rosea* antagonizmusát *P. chlamydospora* ellen korábban már kimutatták Silva-Valderrama és mtsai, ugyanakkor antibiotikus hatásról abban a vizsgálatban nem esett szó (Silva-Valderrama és mtsai, 2021). Vizsgálatunk az első, amely a *C. rosea* *E. lata* elleni antagonisztikus hatását is igazolja.

A *P. chlamydospora* és *E. lata* növekedésének gátlása mellett, a *C. rosea* mikoparazita viselkedése a *B. dothidea* és a *Diaporthe* fajokkal szemben, melyet a kórokozók hifáira tekeredő, valamint azokon belül növekedő *C. rosea* hifák igazoltak, különböző antagonisztikus stratégiák jelenlétére utal. Míg a *C. rosea* mikoparazitizmusa jól dokumentált, és korábban tökebetegségekhez kapcsolódó kórokozók, például *D. seriata* és *N. parvum* esetében is kimutatták, vizsgálataink eredményeként elsőként írtuk le ezt a jelenséget *Diaporthe* fajokkal szemben.

Tekintettel arra, hogy a tökebetegség kórokozók a szőlőtőkék fatestét kolonizálják, bármely biokontroll ágens alkalmazhatóságát nagymértékben meghatározza annak az a képessége, hogy növekedni tudjon a gazdanövénye szöveteiben. Eredményeink szerint az inkubációk után a *C. rosea* 19B/1 törzse sikeresen megtelepedett a talajban, sejtszámát kb. tízszeresére növelte, és hatékonyan kolonizálta a dugványok alsó részének fatestét, míg a felsőbb növényi részekből ritkábban volt visszaizolálható. Ez részben megmagyarázhatja, hogy az *in planta* kísérletek során a 19B/1 törzs miért volt hatékonyabb az *E. lata* és a *P. chlamydospora* ellen, míg a *B. dothidea* esetében nem tudta csökkenteni a tüneteket. A *B. dothidea* ugyan nem fogékony a *C. rosea* antibiózis hatására, ugyanakkor érzékeny a mikoparazitizmusra, amelyhez azonban fizikai kontaktus szükséges, ami a viszonylag lassú növekedésű *C. rosea* esetében nem valósult

meg a kísérlet időtartama alatt. Szabadföldi alkalmazás esetén, hosszabb időtávlatban a *C. rosea* kolonizálhatja a szőlőtőkék fatestét olyan mértékben, hogy a mikoparazitizmus is általános érvényesülhessen.

Következtetések

Eredményeink azt mutatják, hogy a *C. rosea* hatékony antagonista számos, szőlőtőke-elhalással összefüggésbe hozható patogén gombafaj esetében, amit a faj antibiotikus és mikoparazita képességei támasztanak alá. Az *in planta* konfrontációs kísérletek eredményei arra is rámutatnak, hogy a *C. rosea* talajba juttatása hatékonyan akadályozhatja meg a tőkebetegségekhez kapcsolódó tünetek kialakulását, és ezáltal hatékony biológiai védekezési ágens lehet a kapcsolódó patogén gombák széles spektrumával szemben. Az *in planta* és *in vitro* kísérletek során megfigyelt hasonló eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a gyakorlatban a *C. rosea* által termelt gombaellenes metabolitok fontosabb szerepet játszanak a biológiai védekezés eredményességében, mint maga a mikoparazitizmus. Ugyanakkor az utóbbi stratégia is ígéretes lehet hosszú távon, amennyiben a *C. rosea* szisztémikus módon képes kolonizálni a szőlőtőkék fatestét.

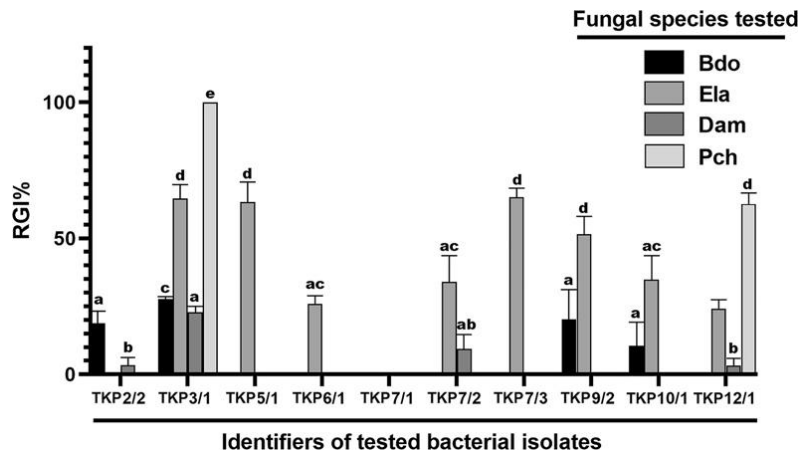
5.4.2. *Bacillus velezensis*, a szőlő tőkebetegségek bakteriális antagonistája

Vizsgálataink során egy potenciális biokontroll hatással rendelkező baktérium törzs jellemzését végeztük el, amelyet egy tünetmentes szőlőtőke fás szöveteiből izoláltuk, és a *P. chlamydospora* elleni gombaölő hatása alapján választottuk ki. A 16S rDNS, *gyrA* és *gyrB* génszekvenciák alapján az izolátum a *Bacillus velezensis* fajba tartozik. A baktériummal, illetve annak fermentációs szűrletéből származó mintákkal végzett konfrontációs tesztek további növekedésgátló és fungicid hatást mutattak ki a *B. dothidea*, *E. lata* és *D. ampelina* kórokozókkal szemben. A baktérium tenyészet szűrletének elemzése alapján az izolátum által termelt gombaellenes hatóanyagok főként lipoproteinek. A baktériumtörzsszel fitotoxicitási vizsgálatokat is végeztünk, amelyek során nem észleltünk káros hatást a szőlőlevél szövetein.

A *B. velezensis* biokontroll képességének elemzése

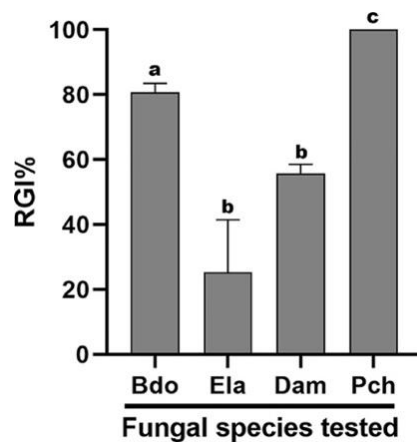
A 2022-ben tünetmentes szőlőtőkékről összesen 57 baktériumtörzset izoláltunk. Az izolátumok előzetes szűrése során 10 törzset választottunk ki, melyhez a *P. chlamydospora* fajt választottuk előszűrőként, mivel lassú növekedése alkalmassá teszi az antagonista hatás gyors felismerésére, továbbá mivel ez a faj az Esca-betegség komplex egyik legfontosabb és kórokozója (Bertsch és mtsai, 2013).

A kiválasztott 10 izolátumot *in vitro* konfrontációs teszteknek vetettük alá a legjelentősebb tőkebetegség gombák reprezentatív kórokozóival szemben (40. ábra), melyek közül a TKP3/1 törzs minden vizsgált gombafajjal szemben jelentős növekedésgátlást mutatott.



40. ábra A kettős tenyésztéses kísérletekben vizsgált baktériumtörzsek GTD-kórokozó gombákkal szembeni átlagos százalékos növekedésgátlási értékei és a hozzájuk tartozó szórások. A betűk a statisztikailag szignifikánsan eltérő adatcsoportokat jelölik ($P < 0,05$).

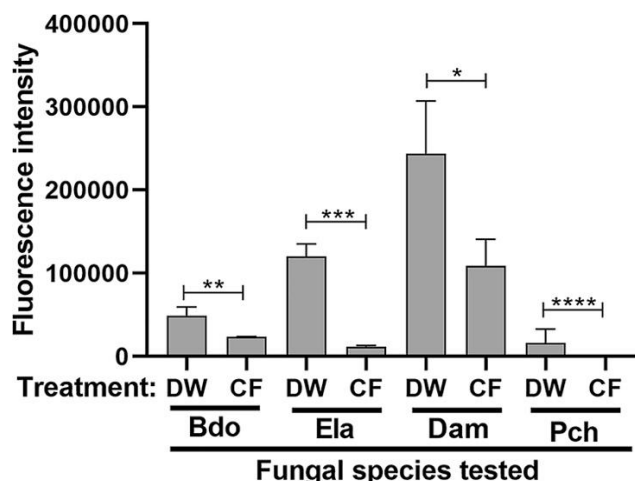
A kísérlet radiális növekedésgátlási értékei (RGI%) valamivel alacsonyabbak voltak a *B. dothidea* (28%) és a *D. ampelina* (23%) esetében, míg az *E. lata* és a *P. chlamydospora* egyedeinek növekedését a TKP3/1 *B. velezensis* jelentős mértékben gátolta (65%, illetve 100%). A faj tökebetegség kórokozókval szembeni antagonista hatását korábbi tanulmányok *in vitro* (Boiu-Sicuia és mtsai, 2023; Bustamante és mtsai, 2022) és *in planta* (Langa-Lomba és mtsai, 2023) kísérletekben is alátámasztották. Bár ezen vizsgálatok már beszámoltak a *B. velezensis*nek a *B. dothidea*, *E. lata* és *D. ampelina* fajokkal szembeni hatékonyságáról, tudomásunk szerint először vizsgáltuk a *P. chlamydospora* elleni antagonista aktivitását.



41. ábra A GTD-kórokozó gombafajok százalékos növekedésgátlási értékei a TKP3/1 törzs 50% v/v arányú tenyészetfiltrátumának (YG tápközeg, 25 °C, 120 rpm, 3 nap) jelenlétében. A betűk a statisztikailag szignifikánsan eltérő adatcsoportokat jelölik ($P < 0,05$).

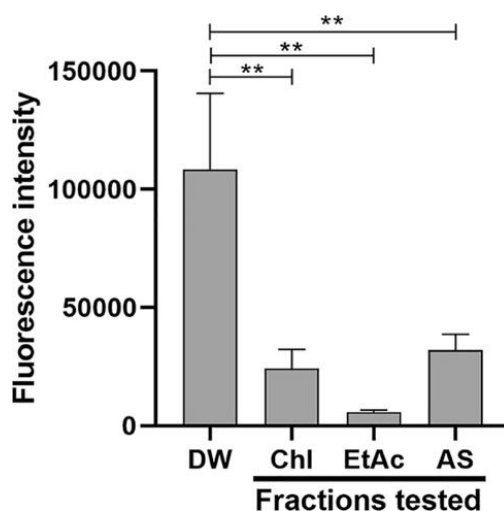
A *B. velezensis* tökebetegség kórokozókval szembeni antifungális hatása elsősorban az általa termelt és szekretált metabolitokon alapul (Bustamante és mtsai, 2022). Eredményeink, melyek a TKP3/1 izolátum tenyészetfiltrátumának tökebetegség kórokozókra gyakorolt hatását vizsgálták, melynek eredményeként TKP3/1 tenyészet 50% (v/v) arányú szűrletének jelenlétében végzett gombanövekedési tesztek (41. ábra) jelentős növekedésgátlást mutattak.

A tenyészetfiltrátumot a növekedésgátló hatásán túl fungicid aktivitás szempontjából is vizsgáltuk. Az eredmények azt mutatták, hogy valamennyi vizsgált gombafaj esetében jelentős mértékben csökkent a sejtek életképessége (42. ábra). Ez az eredmény arra utal, hogy a *B. velezensis* TKP3/1 törzs alkalmas lehet már fertőzött szőlőtőkék kezelésére is, tehát potenciális hatékonysága nem korlátozódik kizárólag megelőző jellegű védekezésre.



42. ábra A TKP3/1 törzs tenyészetfiltrátumával (CF: YG tápközeg, 25 °C, 120 rpm, 3 nap) vagy desztillált vízzel (DW) végzett 6 órás kezelés hatása a GTD kórokozók micéliumának fluoreszcín-diacetát hidrolizáló képességére. A csillagok a statisztikai különbségek szignifikanciáját jelölik (* $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** $P < 0,0005$, **** $P < 0,0001$).

A vizsgált törzs által termelt aktív gombaellenes anyagok pontosabb jellemzése érdekében a tenyészetfiltrátum frakcionálását, majd fungicid hatásvizsgálatát végeztük el, *B. dothidea* tesztorganizmus alkalmazásával (43. ábra).



43. ábra A TKP3/1 törzs tenyészetfiltrátumának különböző frakcióival (YG tápközeg, 25 °C, 120 rpm, 3 nap) vagy desztillált vízzel (DW) végzett 6 órás kezelés hatása a *B. dothidea* micélium fluoreszcein-diacetát hidrolizáló képességére. Chl: kloroform kivonat; EtAc: etil-acetát kivonat; AS: ammónium-szulfátos frakció. Csillagok jelzik a statisztikailag szignifikáns különbségeket (** $P < 0,005$).

A tenyészetfiltrátum gombaölő hatása megmaradt ammónium-szulfáttal történő kicsapás után, valamint a kloroform- és etil-acetát kivonatokban egyaránt. Az ammónium-szulfáttal történő kicsapás eredménye arra utal, hogy a hatóanyag(ok)

makromolekuláris természetűek, míg szerves oldószerekben való oldhatóságuk a molekulák hidrofób jellegre utal.

Kettős tenyészetes vizsgálatok korábban rámutattak arra, hogy a *B. velezensis* antagonista hatással rendelkezik a botryosphaeriás elhalásért felelős kórokozókkal szemben. A kórokozók ellen mért RGI%-értékek 30–75% között változtak, míg a jelen tanulmányban vizsgált TKP3/1 törzs 28%-os RGI-t mutatott *B. dothidea*-val szemben. A korábban közölt adatok szerint *B. velezensis* esetében *E. lata* ellen 75–80% RGI%-t mértek (Boiu-Sicuia és mtsai, 2023), ezzel szemben a TKP3/1 törzsnél ez az érték csupán 25% volt. Ugyanakkor a TKP3/1 törzs kiemelkedő hatékonyságot mutatott *D. ampelina* ellen (56% RGI%), míg egy korábban vizsgált törzs csak 20%-os gátlást eredményezett (Blundell és mtsai, 2021). *P. chlamydospora* elleni antagonista hatásról eddig nem állt rendelkezésre irodalmi adat; a vizsgált törzs 100%-os növekedésgátlást mutatott. A biológiai védekezésre alkalmazott ágensek alapvető követelménye, hogy ne okozzanak fitotoxikus károsodást a kezelt növényekben. Noha *B. velezensis*-t széles körben hatékony biológiai ágensként ismerik el, bizonyos gazdanövényeknél fitopatogén viselkedést is leírtak például őszibarack (Zeng és mtsai, 2022) esetében. Potenciális toxicitásának vizsgálatára a tenyészetfiltrátumot szőlő levélkorongokon teszteltük és 6 napos kezelés után sem észleltünk káros hatást.

Következtetések

Összegzőként elmondható, hogy a jelen tanulmányban bemutatott *B. velezensis* törzs tulajdonságai alapján gyakorlati szempontból egy ígéretes biológiai védekezési ágens a szőlőtőkék farészeit fertőző kórokozók ellen. Mivel a törzset ugyanabból az ökológiai fülkéből izoláltuk, mint a célzott kórokozókat, szabadföldi körülmények között is képes lehet elérni ezeket a gombákat. Az *in vitro* kettős tenyészetes és tenyészetfiltrátumra alapozott vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a törzs antagonisztikus aktivitása kis molekulatömegű, kiválasztott lipoproteideken alapul, amelyek feltehetően képesek a szőlő edénnyaláb-rendszerén keresztül szállítódni, ami lehetővé teszi, hogy a hatékony gátlás közvetlen fizikai kontaktus nélkül is megvalósuljon. A fitotoxicitási vizsgálatok alapján ezek a kiválasztott molekulák a szőlőre nem mutatnak káros hatást. Noha a cél kórokozók elleni hatékonyságát mutató előzetes eredmények biztatóak, a feltételezés megerősítéséhez további vizsgálatokra van szükség.

5.5. A tőkebetegségek újonnan leírt kórokozói

5.5.1. *Kalmusia longispora*

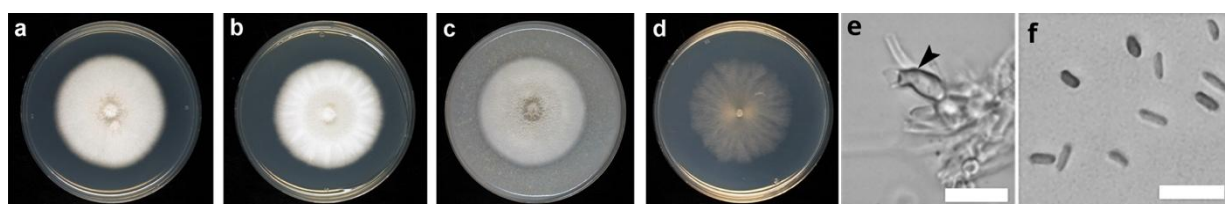
Az izolátum azonosítása és filogenetikai elemzése

Az egész Magyarországra kiterjedő mintagyűjtésünkéből, Kékfrankos szőlőfajtából származó izolátumok közül az egyik izolátum (T15142) ITS szekvenciája alapján nagyfokú hasonlóságot mutatott a *K. longispora* törzsekkel a GenBank BLAST keresése során. Az ITS, LSU és TUB szekvenciáinak filogenetikai elemzése alapján a T15142 izolátum a *Didymosphaeriaceae* család *Kalmusia* nemzetségébe sorolható és a legnagyobb

hasonlóságot a két *K. longispora* törzzsel mutatta. A molekuláris filogenetikai elemzés eredményei egyértelműen igazolják, hogy a T15142 izolátum a *K. longispora* fajként azonosítható.

Az izolátum morfológiai jellemzése

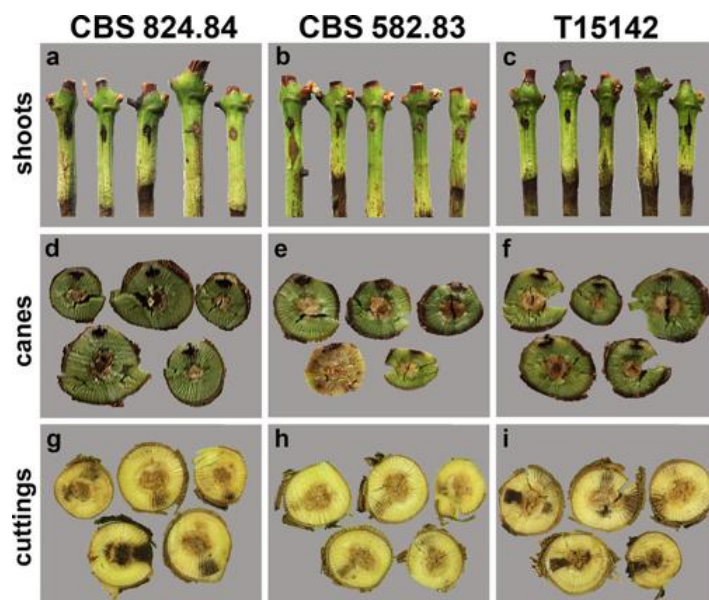
Az izolátum részletesebb jellemzésére mikro- és makromorfológiai vizsgálatokat végeztünk. Telepei burgonya-dextróz-agaron, malátakivonat-agaron és zabpehely-agaron fehérek voltak, ép széllel; vizes agaron halványbarna színt és hullámos peremet alakítottak ki. A T15142 konídiumai hengeres–ellipszoid alakúak, méretük $4,21 \pm 0,3 \times 1,74 \pm 0,72 \mu\text{m}$. A konídiumképző sejtek a felnyíló piknídiumokban is megfigyelhetők voltak (44. ábra).



44. ábra A *K. longispora* T15142 izolátum kéthetes kolóniái a) burgonyadextróz, b) malátakivonat, c) zabpehely és d) vizes agaron valamint e) konídiumképző sejtei és f) konídiumai

A *K. longispora* izolátumok patogenitási vizsgálatai szőlőn

A *K. longispora* törzsek patogenitását mesterséges fertőzésekkel vizsgáltuk szőlőn a CBS 824.84 és CBS 582.83 törzsek bevonásával a vizsgálatokba. Mindhárom tesztelt törzs különböző mértékű tüneteket okozott a hajtásokon.

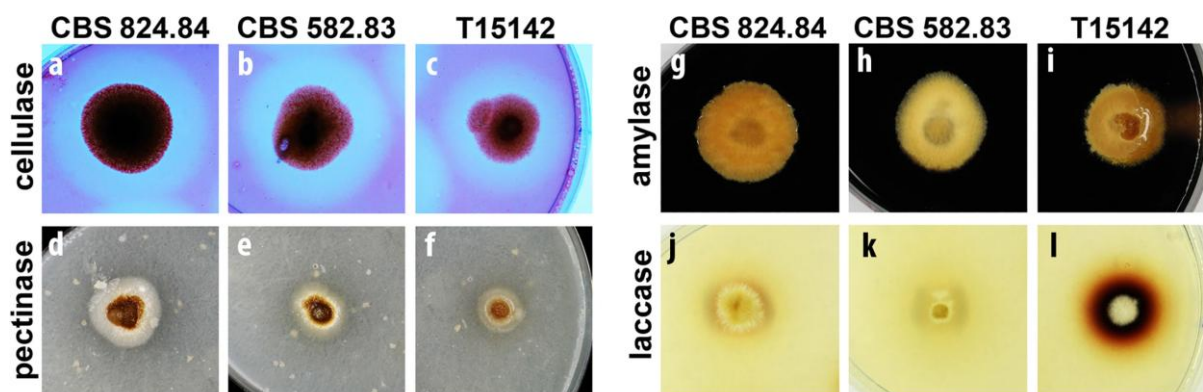


45. ábra *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon mesterséges fertőzése *K. longispora* izolátumokkal. (a–c) hajtások az inokulációt követő 21. napon, (d–f) vesszők keresztmetszete az inokulációt követő 90. napon (g–i) dugványok keresztmetszete az inokulációt követő 80. napon

Az összes fertőzött dugvány keresztmetszetében radiális nekrosis figyelhető meg (45 G – I. ábra). Ez a tünet sokkal kifejezettebb volt a CBS 824.84 (45 G. ábra) és a T15142 (45 I. ábra) esetében, míg a CBS 582.83 csak enyhe elszíneződést okozott (45 H. ábra). Az összes tesztelt törzset rendszeresen vissza tudtuk izolálni a különböző inokulált növényrészekből.

A *K. longispora* izolátumok exoenzim-termelése

Az emésztő exoenzimek vizsgálata különbségeket mutatott a vizsgált *K. longispora* törzsek között (46. ábra). Minden törzs hasonlóan nagy tisztulási zónát hozott létre a cellulózt jelző táptalajon. Pektináz-indikátor táptalajon minden törzs körül nagyon halvány hidrolitikus zóna volt látható. Keményítőt tartalmazó táptalaj Lugol-festése alapján egyik törzs sem termelt amilázt, amit a kolóniák körül hiányzó sárgás zóna jelzett. Guajakollal kiegészített táptalajon a T15142 izolátum széles vörösesbarna udvarral volt körülvéve, ami magas lakkázaktivásra utalt. Ez a zóna a CBS 824.84 esetében halvány és keskeny volt, míg a CBS 582.83 esetében teljesen hiányzott.



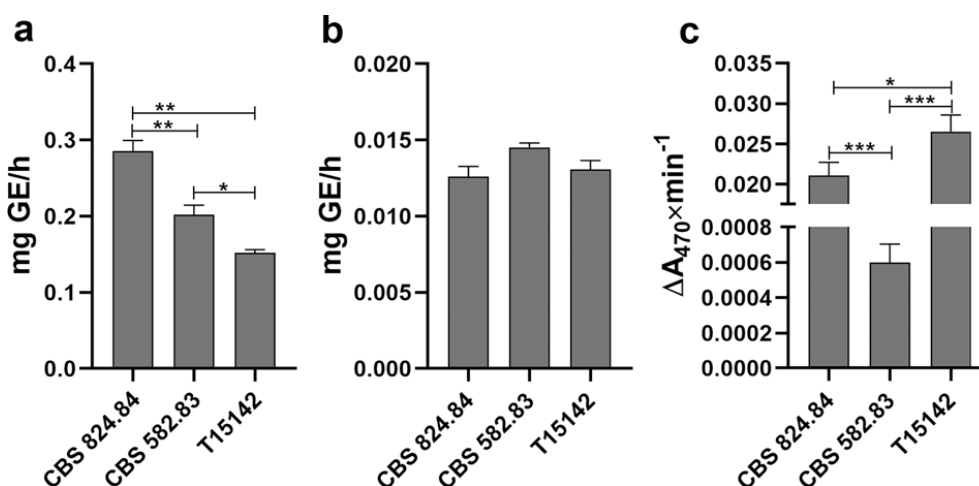
46. ábra A *K. longispora* izolátumok exoenzim-termelése indikátortáptalajokon.

A CBS 824.84 (a,d,g,j), CBS 582.83 (b,e,h,k) és T15142 (c,f,i,l) törzsek növekedése cellulázokat (a–c), pektinázokat (d–f), amilázokat (g–i) és lakkázokat (j–l) kimutató indikátortáptalajokon.

A felvételek az inkubációt követő 11. (a–i) vagy 6. napon (j–l), 25 °C-on készültek.

A folyadékkultúrákban, spektrofotometriás módszerekkel mért exoenzim-aktivitások összhangban voltak az indikátortáptalajokon kapott eredményekkel (47. ábra). A mért celluláz-aktivitás magasnak bizonyult, és a törzsek között kismértékű, de szignifikáns különbséget mutatott (47 A. ábra). A pektináz-aktivitások nagyon alacsonyak voltak, a vizsgált törzsek között nem mutatkozott különbség (47 B. ábra).

A legmagasabb lakkáz-aktivitást a T15142 törzs tenyészet-szűrletében mértük; ezt valamivel alacsonyabb érték követte a CBS 824.84 esetében. A CBS 582.83 által termelt lakkáz-aktivitás 45-ször alacsonyabb volt a T15142-höz, és 30-szor alacsonyabb a CBS 824.84-hez képest (47 C. ábra).



47. ábra A *K. longispora* izolátumok exoenzim-termelése folyadékkultúrákban.

A celluláz- (a), pektináz- (b) és lakkáz- (c) aktivitás a CBS 824.84, CBS 582.83 és T15142 törzsek esetében, amelyeket minimál folyadéktáptalajon tenyésztettünk 7 napon át, 25 °C-on, 180 rpm rázással.

GE: a felszabaduló redukáló cukrok glükóz-egyenértéke.

Következtetések

Három, filogenetikailag távoli gazdáról származó *K. longispora* törzset vizsgáltunk, ami arra utal, hogy a faj általános jelleggel társulhat növényekhez, ugyanakkor korábban nem volt bizonyított kapcsolata konkrét növénybetegséggel. Kísérleteinkben a gomba okozott tüneteket szőlőben, ugyanakkor törzsszinten erősen eltérő virulenciát mutatott. Az *in planta* növekedés a törzsek között hasonló volt és nem korrelált a virulenciával, ami gazdafüggő életmódra és eltérő virulenciafaktor-szintekre utal. Enzimaktivitásban mindhárom törzs erős celluláz-, gyenge pektináz- aktivitást mutatott, miközben a lakkáz szekréció törzsspecifikusan változott és összhangban állt a tünetekkel (T15142 magas, CBS 824.84 mérsékelt, CBS 582.83 minimális). Elsőként igazoltuk, hogy a *K. longispora* képes vaszkuláris nekrozist okozni a szőlőben, és rámutattunk a lakkázok lehetséges, tünetképződésben betöltött szerepére is.

5.5.2. *Neofabraea kienholzii*

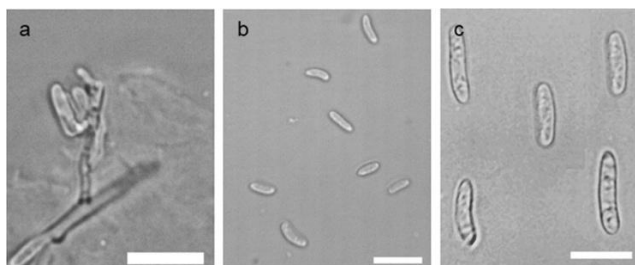
Az izolátumok azonosítása és filogenetikai elemzése

Az egész Magyarországra kiterjedő mintagyűjtésünkből két izolátumot emeltünk ki, amelyek telepmorfológiája hasonlított a *Neofabraea* fajokéhoz, olyan tőkebetegség tüneteket mutató szőlőkből, amelyekben levél-elszíneződés és fás szöveti nekrosis volt megfigyelhető. A T15377 törzset egy 13 éves Chardonnay tőkéről izoláltuk a Neszmélyi borvidékről és a T15671 törzset egy 14 éves Kékfrankos tőkéről izoláltuk az Egri borvidékről. Mindkét törzset a CBS-KNAW Törzsgyűjteményben (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Hollandia) helyeztük el.

A multilókuszos filogenetikai analízis alapján a két magyarországi izolátum (T15377 és T15671) a *Neofabraea* nemzetségbe tartozott, és jól alátámasztott kládot alkottak a *N. kienholzii* törzsekkel. A molekuláris filogenetikai analízisek eredményei egyértelműen igazolták, hogy a két izolátum a *N. kienholzii* fajhoz tartozik.

Az izolátumok morfológiai jellemzése

A tenyésztési kísérletek során a két törzs növekedési üteme több táptalajon szignifikánsan különbözött. A kolóniák színe és szerkezete táptalajtól függően változott, burgonya dextróz agron lazac- vagy krémszínű, fehér sugaras micéliummal borított telepek alakultak ki, középen szürkés légmicéliummal és hullámos szegéllyel, malátakivonat agaron hasonló morfológia volt megfigyelhető, de sima széllel, míg zabpehely agaron a kolóniák sárgás, viaszos megjelenésűek voltak, vizes agaron pedig krémszínűek, és mindkét esetben hiányzott a gyapjas micélium. Sporuláció csak zabpehely agaron indult meg, a 14. napon. A mikrospórák egysejtű, megnyúlt-ellipszoid alakú, enyhén vagy erősebben hajlott konídiumok voltak (48 B. ábra). Ezek kissé nagyobbak bizonyultak, mint amit korábbi vizsgálatok leírtak (Wenneker és mtsai, 2017). Ritkábban makrokonídiumok is képződtek, amelyek szintén egysejtűek, ellipszoid alakúak, néha gyengén hajlottak voltak (48 C. ábra). Az OA-n tenyésztett telepek konídiumtartó sejtjei jól láthatóan makrokonídiumokat hoztak létre (48 A. ábra).



48. ábra Makro- és mikrospórák képződése két *Neofabraea kienholzii* izolátumon, OA-n indukálva.

a) a T15377 törzs konídiumtartó sejtjei. b) A T15377 törzs mikrospórái.

c) Kompozit felvétel a T15377 és T15671 törzsek makrospóráiról. Méretarány: 10 µm.

Az izolátumok patogenitási vizsgálatai szőlőn

A patogenitási vizsgálatok alátámasztották a két izolátum virulenciáját. Fiatal hajtásokon fehér micéliumtömeg jelent meg (49. ábra), az egyéves vesszők keresztmetszetében barna szállítószövet-elszíneződés volt látható (49 B – D. ábra), a cserepes tőkékben pedig az inokuláció helye körül jelentkezett barna elszíneződés (49 C. ábra).



49. ábra *N. kienholzii* izolátumokkal inokulált szőlő. a) Fiatal hajtás fertőzése 14 nappal inokuláció után, fehér micéliumtömeggel. b, d) Egyéves vessző gyógyult sebei a micéliumkorong eltávolítása után, valamint keresztmetszetben látható barna szállítószövet-elszíneződés (nyilakkal jelölve). c) Cserepes szőlőtőke fertőzése. A tünetek sötét szállítószövet-elszíneződésként jelentkeztek az inokulációs pont körül. e) *N. kienholzii* izolátum szőlőfából, PDA táptalajon növekedve.

Az inokulált növényekből sikerült visszaizolálni a *N. kienholzii*-t (49 E. ábra), amely ITS-szekvenciája megegyezett a kiindulási törzsekével. A kontrollnövények ezzel szemben tünetmentesek maradtak.

A *Neofabraea* nemzetség patogén tulajdonságai

A *Neofabraea* nemzetség egy taxonómiai kihívást jelentő csoport, amely jelenleg nyolc fajt foglal magában, eltérő gazdanövény preferenciákkal. Az elsőként leírt faj a *N. malicorticis* az alma antraknózisának kórokozójaként került azonosításra (Jackson, 1913). 1939-ben *N. populi* (jelenlegi neve: *N. krawtzevii*; Verkley, 1999) izolálása és jellemzése történt nyárfáról származó rákos elváltozásokból, amelyet később Dél-Finnországban is kimutattak nyárfán (Kasanen és mtsai, 2002). Később más gombapatogének is leírásra kerültek, amelyek évelő rákot, valamint alma- és körteféléken „bull’s eye rot”-ot okoznak. Ezek a taxonok filogenetikai kapcsolatát De Jong és mtsai (2001) tisztázták először, és kimutatták a *N. malicorticis*, *N. perennans*, *N. alba* valamint egy meghatározatlan *Neofabraea* faj létezését.

A természetes élőhelyeket tekintve a *Neofabraea* fajokat talaj-DNS-szekvenciákban is kimutatták, trópusi erdőkben Vietnámban és Madagaszkáron (Tederloo és mtsai, 2014), valamint xerotherm tölgyesekben Magyarországon is (Geml, 2019), utóbbi éghajlati szempontból kedvező a szőlőtermesztéshez. Az Esca kórokozójának feltárását célzó vizsgálatban Hofstetter és mtsai (2012) négy *N. malicorticis* izolátumot mutattak ki egészséges szőlőtőkéből, bár a GTD-khez való kapcsolatot nem igazolták.

Mindeddig a *N. kienholzii*-ről ismert volt, hogy almán és körtén „bull’s eye rot”-ot és ágelhalással járó rákos elváltozásokat okoz (Wenneker és mtsai, 2017), és nemrégiben japán babéron (*Aucuba japonica*) is kimutatták (Chen és mtsai, 2016). Bár Baránek és mtsai (2018) egyetlen *N. kienholzii* izolátumról számoltak be szőlőből, ahhoz nem társult szekvenciaadat, és a tőkebetegségekhez való kapcsolódás sem volt igazolható.

Következtetések

Vizsgálataink bebizonyították, hogy a *N. kienholzii* képes megfertőzni a szőlőt, és barna szállítószövet-elszíneződést okoz a vesszőkben, ami tipikus tőkebetegség tünet. Ez az eredmény alátámasztja azt a hipotézist, miszerint az alma- és körtefák, amelyekben elhalásos tüneteket okozó gombák élnek, potenciális inokulumforrásai lehetnek a szőlő tőkebetegségeinek. Továbbá Gramaje és mtsai (2016) rámutattak, hogy a tőkebetegségekkel összefüggő gombák más fás növényeket is megfertőzhetnek, például almatermésűeket, csonthéjasokat, dióféléket és olajfát is.

Mivel a *N. kienholzii* már jelentős károkat okoz almán és körtén, idővel a szőlőtermesztésben is egyre nagyobb figyelmet kaphat. E gombanemzetség szőlőben történő első igazolt kórokozó előfordulásával vizsgálataink hozzájárulnak a tőkebetegségek összetett problémájának jobb megértéséhez.

5.5.3. *Dothiorella omnivora*

Az izolátumok azonosítása és filogenetikai elemzése

Kiterjedt mintagyűjtésünkől származó izolátumok feldolgozása során két izolátum ITS-szekvenciája teljes mértékben megegyezett a *D. omnivora* szekvenciáival. Mivel a *D. omnivora* egy viszonylag újonnan leírt faj, amelyet többek között mogoró, dió, kőris és más, nem közeli rokonságban álló fás növények kórokozójaként írtak le, és a világon mindössze egyetlen, szőlőből izolált törzsét ismerték korábban, amelyet Ausztráliában írtak le (Linaldeddu és mtsai, 2016), indokoltnak láttuk a két izolátum alaposabb vizsgálatát. A filogenetikai elemzés megerősítette az M7 és M38 törzsek azonosítását. A két törzs együtt jelent meg a *D. omnivora* ex-holotípusát képviselő CBS140349 törzsszel, amelyet mogoróból izoláltak, valamint az Ausztráliában szőlőből izolált DAR78991 törzsszel, amelyet később *D. omnivora*-ként azonosítottak (Linaldeddu és mtsai, 2016).

Az izolátumok morfológiai jellemzése

Mindkét törzs fertőzte a szőlőt (Kékfrankos) a patogenitási tesztek során. Az oltást követő három hét elteltével minden gombakultúrával oltott hajtáson 2–3,5 cm hosszú, a sebtől felfelé és lefelé egyaránt terjedő elváltozások jelentek meg. A kontroll növényeken nem jelentkezték tünetek. A kórokozót újra izoláltuk, és a három izolátumból meghatározott ITS-szekvenciák megegyeztek a korábban meghatározottakkal.

Következtetések

Tudomásunk szerint ez az első európai beszámoló *D. omnivora*-ról szőlőből, és tökébetegségekhez kapcsolódóan. Az ismert európai *D. omnivora* törzsek többsége több más fajból származik (Linaldeddu és mtsai, 2016). Eddig mindössze egyetlen *D. omnivora* törzset izoláltak szőlőből, Ausztráliában (Pitt és mtsai, 2010). Más, kiterjedt GTD-felmérések (Carlucci és mtsai, 2015) nem azonosították ezt a fajt szőlőültetvényekben. Ez arra utalhat, hogy a *D. omnivora* nem számít jelentős szőlőkórokozónak. Ugyanakkor ahogy az előzőekben is idéztük, több tökébetegség kórokozó mandula-, pisztácia-, dió- és más ültetvényekben is betegséget okoz; így feltételezhető, hogy ugyanazon gombafajok a szőlőültetvények, dióültetvények és más fás kultúrák termelékenységét is befolyásolhatják (Gramaje és mtsai, 2016). Bár még kevésbé tanulmányozott, a *D. omnivora* valószínűleg e fajok közé tartozik, amelyek széles gazdaspektrumú, különböző fás növénykultúrákban fordulnak elő.

5.5.4. *Diaporthe hungariae*

A vizsgálat célja

Több európai országban és Izraelben *Diaporthe* törzsek izolálására céljából szőlőminták kerültek begyűjtésre. A vizsgálat célja a törzsek teljes körű jellemzése volt, amelyet a modern taxonómiai elveknek megfelelően morfológiai bélyegek és többgénés filogenetikai elemzések kombinációjával került végrehajtásra. A vizsgálat célkitűzései közé tartozott a kiterjedt mintavétel szőlőültetvényekből, a gyűjtött *Diaporthe* izolátumok

laboratóriumi tenyésztése, valamint ezek DNS-szekvencia-analízise morfológiai vizsgálatokkal kiegészítve. További célkitűzés volt az eredmények összevetése a nemzetségre vonatkozó korábbi filogenetikai kutatások adataival, továbbá a *Diaporthe* törzsek patogenitásának értékelése.

Új tőkebetegséghez kapcsolódó faj leírása

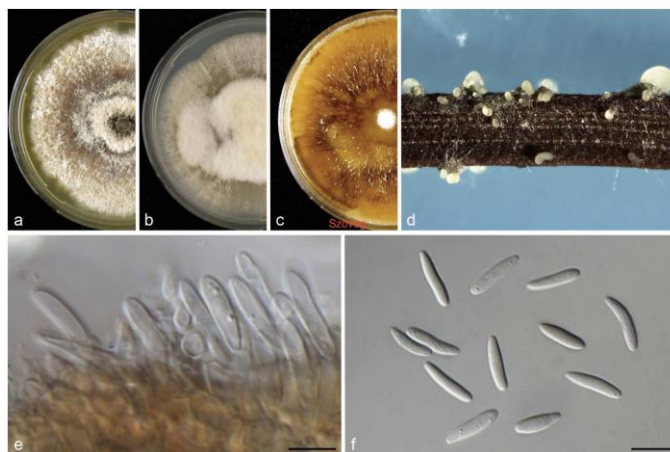
Diaporthe hungariae - Guarnaccia, Armengol & Váczy, sp. nov. MycoBank MB823247 (Guarnaccia és mtsai, 2018).

Etimológiája

A fajnév Magyarországra utal, ahonnan a típusizolátum származik (latinul: Hungaria).

Morfológiája

A tenyészetben képződő konídiumtartó termőtestek (konidiomák) piknidiumtípusúak, gömbölydedek vagy szabálytalan alakúak, magányosan vagy csoportosan helyezkednek el. Malátakivonat agaron (MEA), burgonya-dextróz agaron (PDA) és zabpehely agaron (OA) mélyen beágyazódnak, áttörik a felszínt, színük sötétbarna–fekete, átmérőjük 150–650 μm . Az ostiolumokon keresztül fehéresen áttetszőtől krémszínűig terjedő, nyálkás konídiumtömeget vagy cseppeket ürítenek. A konidióforok színtelenek, sima falúak, hegyes végűek, szeptum nélküliek; tömött telepekben álló, hengeres, egyenes struktúrák (5–25 $\times$ 1–3,5 μm). A konídiumtartó sejtek (fiálidok) színtelenek, terminális elhelyezkedésűek, hengerek, a csúcs felé enyhén elkeskenyedők (6–9 $\times$ 1–2 μm). Parafízisek nem figyelhetők meg. Az alfa-konídiumok rendszeresen képződnek; orsó alakúak, áttetszők, ritkán enyhén hajlottak, csúcsuk hegyesen lekerekített, alapjuk tompa vagy közel csonkolt, egy- vagy több olajcseppet tartalmaznak, szeptum nélküliek. Méretük 9,5–16 $\times$ 2–3,5 μm ; átlag $\pm$ szórás = 11,7 $\pm$ 1,4 $\times$ 2,6 $\pm$ 0,4 μm ; hosszúság/szélesség-arány: 4,5. béta- és gamma-konídiumok nem fordultak elő. A telepek burgonya-dextróz agaron (PDA), malátakivonat agaron (MEA) és zabpehely agaron (OA) fehérek, ép szélűek; vizes agaron (WA) halványbarna színt és hullámos peremet alakítanak ki.



50. ábra *Diaporthe hungariae* (CBS 143353 a–c. Telepek MEA-, PDA- és OA-táptalajon, sorrendben; d. konídiumtartó termőtestek sporulációja fenyőtűn; e. konídiumtartó sejtek. Méretarány = 10 μm).

Tenyészeti jellemzői

A telepek 21 °C-on 15 nap alatt teljesen befedik a táptalaj felszínét. A micélium a felszínen lapos, tömött, nemezes állományú. Malátakivonat agaron (MEA), burgonya-dextróz agaron (PDA) a telep kezdetben fehér, majd halványbarnától szürkéig változik. Zabpehely agaron (OA) krémszíntől sötétbarnáig terjed, szektoros megjelenésű, és bőséges konídiumtartó képződményeket hoz. A telepek fonákja malátakivonat agaron (MEA), burgonya-dextróz agaron (PDA) világosbarna–krémszínű, míg zabpehely táptalajon sötétbarna (50. ábra).

Származása

Magyarország, *V. vinifera* törzséből, 2014-ben gyűjtve, K.Z. Váczy (CBS H-23239 – holotípus; CBS 143353 = CPC 30130 – ex-típus kultúra); ugyanonnan, *V. vinifera* törzséből, 2014. augusztus 28-án, K.Z. Váczy (CBS 143354 = CPC 30142).

Patogenitási vizsgálatok eredményei

21 nap elteltével valamennyi *Diaporthe* izolátum nekrotizációs elváltozásokat idézett elő a beoltott szőlőhajtásokon, kivéve a *D. bohemiae* törzseket, és a gombák sikeresen visszaizolálhatók voltak. A beoltási helyeknek megfelelően kéregrákok és belső elszíneződések alakultak ki. A kontrollhajtásokon nem jelentkeztek tünetek. Előzetesen különbségek voltak megfigyelhetők az izolátumok agresszivitása, valamint a szőlő fogékonysága között: a *D. hispaniae* és a *D. hungariae* nagyobb kéregrákokat és nekrotizációs elváltozásokat okozott, mint a *D. baccae* és a *D. celeris*, míg a *D. bohemiae* esetében nem mutatkoztak tünetek.

Következtetések

A *D. hungariae* Magyarországon és Spanyolországban gyűjtött szőlő mintákból került izolálásra. A faj leírásához két magyar izolátumot használtunk fel. Összesen hat törzs képviseli ezt a taxont, amelyek egy jól támogatott kládba rendeződnek, és a *D. ampelina*-hoz állnak a legközelebb a tub2 gén szekvenciája alapján (93 % hasonlóság). Filogenetikailag közelebb áll, de jól elkülönül a *D. hispaniae*-től, amellyel a tub2 génben 53 fixált allélikus eltérés választja el. Morfológiailag a *D. hungariae* különbözik a *D. ampelina*-tól nagyobb konídiumtartó termőtesteivel, hosszabb alfa-konídiumaival, valamint a béta-konídiumok hiányával, amelyek rendszerint jelen vannak mind a *D. ampelina*, mind pedig a *D. hispaniae* esetében (Gomes és mtsai, 2013).

5.5.5. *Seimatosporium vitis*

A kiterjedt mintagyűjtésből származó izolátumok vizsgálata során négy *S. vitis* törzset sikerült azonosítani, amelyeket Magyarországon, Maklárán, 30 éves Pinot Gris szőlőtőkék törzséből nyertünk. E törzsek ITS-szekvenciái teljes mértékben megegyeztek az Olaszországban, *V. vinifera* elhalt hajtásaiból leírt *S. vitis* (GenBank: KR920363; Senanayake és mtsai, 2015), valamint az Iránban, *Vitis* sp. elhalt ágaiból izolált *Seimatosporium* sp. (KU162941) szekvenciájával, továbbá 99%-os hasonlóságot

mutattak több rokon faj ITS-szekvenciájával. Ennek alapján a négy magyarországi izolátumot előzetesen *S. vitis*-ként azonosítottuk. A sporuláció kiváltására a törzseket fenyőtű agar tartalmú táptalajra oltottuk, azonban konídiumképzés nem következett be.

A törzsek közül kettő patogenitását 1,5 éves cserepes szőlőtőkék 5 hónapos hajtásain vizsgáltuk. A beoltást követő három hét elteltével minden, *S. vitis*-szel fertőzött hajtáson 2–3,5 cm hosszúságú nekrosis alakult ki, amely a sebzés helyétől felfelé és lefelé egyaránt kiterjedt. A kórokozót a tünetes szövetből visszaizoláltuk, és a három izolátumból meghatározott ITS-szekvenciák azonosnak bizonyultak a korábban kapott adatokkal. Tudomásunk szerint ez az első közlés, amely patogén *S. vitis* törzsek szőlőből történő izolálását igazolja GTD-tünetekkel összefüggésben, nemcsak Magyarországon, hanem világszerte.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A *B. cinerea* a szürkerothadás kórokozójaként világszerte jelentős gazdasági veszteségeket okoz számos kultúrnövényben, köztük a szőlőben is, amelyet csekély mértékben, a nemesrothadás eredményezte aszúborok borászati jelentősége ellensúlyoz. A két rothadási forma mögött meghúzódó molekuláris és biokémiai mechanizmusok, valamint a folyamatokban részt vevő gének szerepe azonban mindeddig csak részben feltárt, a nemesrothadás biológiai háttere pedig szinte ismeretlen volt.

Eredményeink alapján a *B. cinerea* nemesrothadás során olyan génkészletet aktivál, amely egyaránt támogatja a bogyóhéj kolonizációjában és a gombával szembeni dominanciájában. A nemesrothadás specifikus génexpressziója magyarázza a cukor- és fehérjetartalom emelkedését, valamint az olyan aromatiszus metabolitok megjelenését, amelyek meghatározzák a botritiszes borok érzékszervi tulajdonságait. Ezzel szemben a szürkerothadás során alacsonyabb metabolikus aktivitás figyelhető meg, a génexpresszió pedig elsősorban a növényi védekezési válaszok kijátszását és a fitotoxin-termelést szolgálja. Kimutattuk, hogy a szüreti időpont befolyásolja a génexpressziós mintázatokat, ami gyakorlati szempontból a nemesrothadás optimális szüreti időpont választását segíti.

Elemzéseink megerősítették, hogy nem csupán a *B. cinerea*, hanem más fonalas gombák és élesztők is aktív részesei a nemesrothadás kialakulásának. Az *A. alternata*, *E. nigrum*, *A. pullulans* és *R. graminis* fajok génexpressziós profiljai arra utalnak, hogy ezek a mikroorganizmusok a nemesrothadás során jóval aktívabb metabolikus működést mutatnak, hozzájárulva a szőlőbogyók szerkezeti és biokémiai átalakulásaihoz, valamint az aroma- és savprofil kialakításához. Ez rámutat a mikrobaközösségek szerepére és a mikroba–mikroba interakcióknak a fontosságára, amelyek közvetett módon jelentős hatással vannak a borászatok számára oly értékes nemesrothadás folyamatára.

A funkcionális génkifejeződési mintázatok vizsgálata során feltártuk a mikrobák közötti kölcsönhatásokat is, amelyek a szőlőbogyó felszínén formálódó komplex közösségek dinamikáját alakítják. A *B. cinerea* szürkerothadásra jellemző gazdaspecifikus génjei egyértelműen alátámasztják, hogy a kórokozó a rothadási folyamat elsődleges kiváltó ágensének tekinthető. A nemesrothadás kezdeti fázisai bár nagymértékű hasonlóságot mutatnak a szürkerothadással, de a teljesen kifejlődött állapotában már egyértelműen elkülöníthetővé válik, amit a gyengébb védekezési válaszok és a szekunder metabolizmus intenzív működése jellemez. Ezzel cáfoltuk azt a korábbi elképzelést, miszerint a nemesrothadás biológiailag inaktív nekrotikus állapotot jelentene, hiszen számos aktív élettani folyamat kimutatható, amelyek azonban a bogyók éréséhez és nem a szőlő védekezéséhez kapcsolódnak.

A szőlő védekezési mechanizmusainak feltérképezése azt mutatta, hogy a legerőteljesebb válaszreakciók a szürkerothadás során lépnek fel, ugyanakkor ezek kis hatékonyságúak, mivel a gomba nekrotróf életmódjából fakadó virulenciafaktorok segítik a gomba térnyerését. Ez alátámasztja a *B. cinerea* kettős, biotróf és nekrotróf életmód

közötti váltakozását, amely új megközelítési lehetőségeket kínálva a gyakorlati növényvédelmi és a szőlészeti technológiák fejlesztése számára.

Kísérleteinkben először igazoltuk a szüreti hónapok hatását a *B. cinerea* micéliumnövekedésére és morfológiai változatosságára, amely szoros összefüggést mutatott a botritiszes fertőzés ütemével. Az évjárat hatások és a szüreti hónapok tehát közvetlenül befolyásolják a nemesrothadás előfordulását és minőségét. A botritizáció kezdetét szemmel látható textúraváltozások, későbbi fázisait pedig a borminőség szempontjából meghatározó kémiai átalakulások jellemzik. A transzkriptomikai elemzések szerint a *B. cinerea* génexpressziós mintázatai négy egymást követő nemesrothadásos fázisban jól nyomon követhetők, és főként a korai szakaszokban játszanak szerepet a szőlőbogyók texturális változásaiban.

A nemesrothadásos folyamatban a bogyóhéj lebomlása és a bogyókeménység csökkenése fontos minőségi indikátor. A gomba sikeressége részben annak köszönhető, hogy olyan géneket fejez ki, amelyek a környezeti dominanciát szolgálják, például a szulfát-hasznosítás képességét vagy antimikrobiális anyagok termelését. A metatranszkriptomikai vizsgálatok emellett rávilágítottak, hogy a *B. cinerea* mellett más fonalas gombák és élesztők is meghatározóak az aromaanyagok, prekursorok, antioxidánsok és detoxifikációs vegyületek szintézisében. Az aromás aminosavak és származékaik, a glutation-eredetű vegyületek, a lipidszármazékok, valamint a terpének mind központi szerepet játszanak a bor illat- és ízprofiljának kialakításában, míg a szénhidrát- és citrátciklushoz köthető enzimek a vajasságért, a sav-bázis egyensúlyért és a színstabilitásért felelnek. Eredményeink alapján az aszú és egyéb botritiszes borok jellegzetes érzékszervi tulajdonságai nem kizárólag a *B. cinerea* tevékenységéből, hanem a bogyón kialakuló mikrobiális közösség egészének funkcionális aktivitásából fakadnak. Kutatásaink másik nagyobb területét a szőlő tőkebetegségeivel összefüggésbe hozható kórokozók elemzése, közösségi összetételének és szerepének felderítése jelentette. Kimutattuk, hogy a tőke egyes részei között a mikrobiális különbségek nagyobbak, mint az egyedek között vagy egészségi állapotok alapján, valamint azt is, hogy a tünetmentes, és az Esca-tünetes szőlőtőkék gombaközösségei között nincs szignifikáns eltérés. Ez arra utal, hogy az Esca-kórokozók a „magmikrobiom” részét képezik, alapvetően látens endofitonok vagy szaprotrófok, amelyek opportunistá patogénként jelennek meg stressz hatás esetén. Az abiotikus tényezők, különösen a környezet hatásai döntő jelentőségűek a betegség kialakulásában.

Megállapítottuk továbbá, hogy olyan fajok, amelyeket korábban a mikrobiom hasznos tagjainak tartottak, elősegíthetik a betegség kialakulását. Az *A. pullulans* egyes törzsei poliszacharid-termelésük révén, míg a *P. chlamydospora* kórokozó volta mellett specifikus fehérjeexpressziója által járul hozzá az Esca tüneteinek kialakulásához. A két faj közötti szinergikus hatás és közvetlen kölcsönhatás tovább fokozhatja a betegség súlyosságát.

Biológiai védekezési lehetőségeink vizsgálata során a *C. rosea* hatékonyságát igazoltuk számos tőkebetegség kórokozóval szemben, amely antagonista tulajdonságait

antibiotikus metabolitok és mikoparazita képességek egyaránt biztosítják. Kísérleteink szerint talajba juttatása gátolhatja a tünetek kialakulását, így ígéretes biológiai védekezési ágens lehet. Hasonlóképpen a *B. velezensis* egyes törzsei is jelentős potenciállal bírnak, antagonisztikus aktivitásuk kis molekulatömegű lipoproteideken alapul, amelyek fitotoxikus hatást nem mutattak, és közvetlen érintkezés nélkül is képesek gátolni a kórokozók szaporodását.

Eredményeink között új kórokozó fajok azonosítása, kórokozó tulajdonságuk feltárása és új faj leírása is szerepel. Elsőként igazoltuk, hogy a *K. longispora* képes vaszkuláris nekrózist előidézni szőlőben, és rámutattunk a lakkáz enzimek tünetképződésben betöltött szerepére. Megállapítottuk, hogy a *N. kienholzii* képes fertőzni a szőlőt, szállítószövet elhalást okozva. Első alkalommal számoltunk be Európában a *D. omnivora* és a *S. vitis* jelenlétéről szőlőből, amelyek ugyanakkor jelenlegi ismereteink szerint nem domináns kórokozói a tőkebetegségeknek. Új fajként írtuk le a *D. hungariae*-t, amelyet a szőlő botrioszfériás betegségeihez kapcsolódó kórokozóként azonosítottunk.

Kutatásaink új megvilágításba helyezték elsősorban a nemesrothadás, de a szürkerothadás molekuláris és ökológiai hátterét és feltárták a mikrobaközösségek szerepét a borok egyedi érzékszervi profiljának kialakításában. A tőkebetegségek területén elért eredmények hozzájárulnak a betegségek etiológiájának jobb megértéséhez, az újonnan azonosított fajok és biológiai védekezési lehetőségek pedig alapot teremtenek a fenntarthatóbb szőlőtermesztési és növényvédelmi stratégiák kidolgozásához.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A *Botrytis cinerea* génexpressziós és metabolikus profiljának elemzésével elsőként mutattuk ki, hogy a szürke- és nemesrothadás folyamatai eltérőek. A nemesrothadás során a gomba metabolikusan aktívabb, a bogyóhéj kolonizációját és aromaképző folyamatokat támogató géneket fejez ki, míg szürkerothadásban főként a növényi védekezés kijátszását és fitotoxin-termelést szolgáló gének dominálnak.
2. Metatranszkriptomikai adatok alapján feltártuk, hogy a *Botrytis cinerea* mellett más fonalas gombák (*Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum*) és élesztők (*Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula graminis*) is aktív génexpressziós szereplői a nemesrothadásnak, hozzájárulva a bogyók fizikai-kémiai átalakulásaihoz, míg a szürkerothadásban főként a *B. cinerea* gazda-kórokozó kölcsönhatási génjei dominálnak.
3. Elsőként mutattuk ki, hogy a szőlő génexpressziós profilja eltér a nemesrothadás és a szürkerothadás során, mivel a nemesrothadás során a növényi védekezés génjei visszaszorulnak, és sokrétű anyagcsere-folyamatok dominálnak, míg a szürkerothadásban erőteljes, de hatástalan védekezési válaszok aktiválódnak a *Botrytis cinerea* nekrotróf életmódváltása következtében.
4. Hároméves adatsorunk igazolta, hogy a szüreti hónapok és az évjáráthatás jelentősen befolyásolják a *Botrytis cinerea* micéliumnövekedését és morfológiai típusainak eloszlását, amelyek szoros összefüggést mutatnak a nemesrothadás előfordulásával.
5. A nemesrothadás során a szőlőbogyók fizikai, kémiai és mikrobiális tulajdonságai jól meghatározható, fázisonként eltérő változásokon mennek keresztül. Meghatároztuk az aszúszem tudományos definícióját és javaslatot fogalmaztunk meg a szőlőfajta és a megfelelő szüreti időpont kiválasztására.
6. A *Botrytis cinerea* funkcionális génexpressziója a nemesrothadás korai szakaszában ugrásszerűen fokozódik, elsősorban a sejtfal-bontó enzimek, fehérje- és szénhidrát-anyagcsere, valamint kén- és másodlagos metabolit útvonalak aktiválása révén, amelyek közvetlenül hozzájárulnak a bogyók texturális és biokémiai átalakulásaihoz és a gomba dominanciájához.
7. Bizonyítottuk, hogy a *Botrytis cinerea* mellett a nemesrothadáshoz társuló további fonalas gombák és élesztők is aktívan hozzájárulnak az aroma- és aromaelővegyületek képződéséhez, különösen a nemesrothadás késői fázisaiban, és meghatározóak a botritiszes borok egyedi érzékszervi profiljának kialakulásában.
8. Igazoltuk, hogy a kórokozó gombák a szőlő „magmikrobiomjának” részét képezik, mivel a szőlőhöz társuló kórokozó gombaközösségek összetételbeli különbségei jóval nagyobbak a tőkén belüli különböző mikroélőhelyek (talaj, kéreg, évelő faanyag) között, mint az egészséges és Esca-tünetes növények között.

9. Az *Aureobasidium pullulans* jelenléte az Esca-tünetes növényekben pozitívan korrelál a tünetek súlyosságával, és bár önmagában nem okoz jelentős károsodást, a *Phaeomoniella chlamydospora*-val való, törzsfüggő kölcsönhatása szinergikus vagy kumulatív módon fokozza a levéltünetek kialakulását, ami rávilágít arra, hogy egy alapvetően nem patogén mikroorganizmus is fokozhatja a kórfolyamat intenzitását.
10. A *Clonostachys rosea* hatékony antagonista a szőlő tőkebetegségeinek kórokozóival szemben, különösen az *Eutypa lata* és a *Phaeomoniella chlamydospora* ellen, miközben *in planta* kísérletekben is szignifikánsan mérsékelte a nekrotikus tünetek kialakulását, ezzel ígéretes biológiai védekezési lehetőséget kínálva.
11. Igazoltuk, hogy mind a *Clonostachys rosea*, mind pedig a szőlőtőkéből izolált *Bacillus velezensis* hatékony antagonista a szőlő tőkebetegségeinek több jelentős kórokozójával szemben, mivel előbbi antibiózis és mikoparazitizmus, utóbbi pedig lipopeptidekhez köthető gombaellenes aktivitás révén szignifikánsan mérsékelte a tünetek kialakulását fitotoxikus hatás nélkül, ígéretes biokontroll lehetőséget kínálva a tőkebetegségekkel szemben.
12. Eredményeink elsőként igazolták, hogy a *Kalmusia longispora* a szőlő tőkebetegségeinek újonnan azonosított kórokozója, amelynek virulenciája a lakkáztermeléssel áll összefüggésben, míg a *Neofabraea kienholzii* szőlőhöz kötődő kórokozó szerepét patogenitási tesztekkel erősítettük meg, ezzel mindkét fajt újonnan a szőlő tőkebetegség-komplexhez társítva.
13. Elsőként mutattuk ki Európában a *Dothiorella omnivora*-t szőlőtőkéből és igazoltuk kórokozó szerepét, valamint világszinten elsőként bizonyítottuk a *Seimatosporium vitis* szőlőpatogén tulajdonságait és Európában való előfordulását. Ezáltal új, tőkebetegségeket okozó gombafajokat azonosítottunk.
14. A tudomány számára új fajként írtuk le a *Diaporthe hungariae* taxont, amelyet szőlőről származó, hazai izolátumok alapján azonosítottunk és patogenitási vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a szőlő tőkebetegségeinek egyik újonnan felismert kórokozója.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ez a dolgozat nem jöhetett volna létre mindazok támogatása nélkül, akik az elmúlt évtizedekben mellettem álltak és segítették a munkámat.

Köszönöm Kiss Leventének és Holb Imrének a gyakorlati útmutatásokat, a következetes visszajelzéseket, hogy megnyitották számomra a növénykórtan kapuját, és bevezettek a kihívásokkal teli, ugyanakkor izgalmas szakterületre.

Nagyon sok egykori és jelenlegi kollégám segítette munkámat közvetlenül vagy közvetve a Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetben, az Egerfood Tudásközpontban, az Eszterházy Károly Katolikus Egyetemen és a Kutatási és Fejlesztési Központban – köszönöm mindannyiuk hozzájárulását.

Közvetlen munkatársaim közül külön is köszönöm egykori PhD-hallgatóimnak, Hegyi-Kaló Júliának, Hegyi Ádámnak és Molnár Annának, posztdoktor kollégámnak, Karácsony Zoltánnak, továbbá Geml József és Zsófi Zsolt kollégáimnak az együttműködést. Hálás vagyok a Növénykórtani, a Környezeti-mikrobiom, a Szőlészeti-borászati, valamint a Környezetkutatás és Távérzékelés tématerületi kutatócsoportok valamennyi tagjának. A dolgozat alapját jelentő eredmények közös munkánk gyümölcsei, köszönöm elkötelezettségüket és támogatásukat.

Köszönöm minden kollégámnak, hazai és külföldi társszerzőmnek, közreműködőnek, kutatási partnernek, hogy szakmai tudásukkal és nyitottságukkal lehetővé tették közös cikkeink és publikációink megszületését.

Szüleim és nagyszüleim következetes, mértékadó példája tanított a munka szeretetére, a kitartásra és az alkotás örömére – nélkülük ma nem lennék itt.

A család feltétlen támogatása felbecsülhetetlen. Szeretteim, a feleségem és gyerekeim türelme, megértése és bátorítása erőt adott a legnehezebb időszakokban is.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abdullah, S., M. Al-Samarraie, és A. Al-Assie. 2015. „Fungi associated with grapevine (*Vitis vinifera* L) decline in middle of Iraq”. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G. Microbiology* 7 (1): 53–59.
2. Abed-Ashtiani, F., A. Narmani, és M.i Arzanlou. 2019. „Analysis of *Kalmusia variispora* associated with grapevine decline in Iran”. *European Journal Of Plant Pathology* 154 (3): 787–99.
3. Abou-Mansour, E., J-L. Débieux, M. Ramírez-Suero, és mtsai. 2015. „Phytotoxic metabolites from *Neofusicoccum parvum*, a pathogen of Botryosphaeria dieback of grapevine”. *Phytochemistry* 115 (7): 207–15.
4. AbuQamar, S. F., K. Moustafa, és L-S. P. Tran. 2016. „‘Omics’ and plant responses to Botrytis cinerea”. *Frontiers in Plant Science* 7 (11).
5. Adejor, J., E. Tumukunde, G. Li, és mtsai. 2025. „Stepping out of the dark: how metabolomics shedl light on fungal biology”. *Fems Microbiology Reviews* 49 (1): fuaf028.
6. Adejoro, D. O., E. E. Jones, H. J. Ridgway, D. C. Mundy, B. R. Vanga, és S. R. Bulman. 2023. „Grapevines escaping trunk diseases in New Zealand vineyards have a distinct microbiome structure”. *Frontiers In Microbiology* 14 (8): 1231832.
7. Agudelo-Romero, P., A. Erban, C. Rego, és mtsai. 2015. „Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*”. *Journal of Experimental Botany* 66 (7): 1769–85.
8. Akgül, D.S., és M. Ahioğlu. 2019. „Fungal pathogens associated with young grapevine decline in the Southern Turkey vineyards”. *BIO Web of Conferences* 15: 01027.
9. Albuquerque, P., és A. Casadevall. 2012. „Quorum sensing in fungi – a review”. *Medical Mycology* 50 (4): 337–45.
10. Amann, R. I., W. Ludwig, és K. H. Schleifer. 1995. „Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation”. *Microbiological Reviews* 59 (1): 143–69.
11. Andolfi, A., L. Mugnai, J. Luque, G. Surico, A. Cimmino, és A. Evidente. 2011. „Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases”. *Toxins* 3 (12): 1569–605.
12. Ansorge, W. J. 2009. „Next-Generation DNA sequencing techniques”. *New Biotechnology* 25 (4): 195–203.
13. Anwar, W., S. Ali, K. Nawaz, és mtsai. 2018. „Entomopathogenic fungus *Clonostachys Rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia Tabaci*)”. *Biocontrol Science and Technology* 28 (8): 750–60.
14. Ardö, Y. 2006. „Flavour formation by amino acid catabolism”. *Biotechnology Advances* 24 (2): 238–42.
15. Ariyawansa, H. A., K.i Tanaka, K. M. Thambugala, és mtsai. 2014. „A molecular phylogenetic reappraisal of the *Didymosphaeriaceae* (=Montagnulaceae)”. *Fungal Diversity* 68 (1): 69–104.
16. Arora Verasztó, H., M. Logotheti, R. Albrecht, A. Leitner, H. Zhu, és M. D. Hartmann. 2020. „Architecture and functional dynamics of the pentafunctional AROM complex”. *Nature Chemical Biology* 16 (9): 973–78.
17. Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, és mtsai. 2000. „Gene ontology: tool for the unification of biology”. *Nature Genetics* 25 (1): 25–29.
18. Atkinson, N. J., és P. E. Urwin. 2012. „The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field”. *Journal of Experimental Botany* 63 (10): 3523–43.
19. Atwell, S., J. A. Corwin, N. E. Soltis, A. Subedy, K. J. Denby, és D. J. Kliebenstein. 2015. „Whole genome resequencing of *Botrytis cinerea* isolates identifies high levels of standing diversity”. *Frontiers in Microbiology* 6 (9).

20. Azzolini, M., E. Tosi, S. Faccio, M. Lorenzini, S. Torriani, és G. Zapparoli. 2013. „Selection of *Botrytis cinerea* and *Saccharomyces cerevisiae* cultures for improving Passito wine quality”. *FEMS Yeast Research* 13 (6): 540–52.
21. Bailey, S. L., C. Morier-Gxoyiya, S. Puthanvila Surendrababu, és D. G. O. Saunders. 2024. „A history of strategies and a tapestry of triumphant tales in tackling plant fungal diseases”. *Plant Pathology* 73 (7): 1619–28.
22. Balga, I., A. Leskó, M. Ladányi, és M. Kállay. 2014. „Influence of ageing on changes in polyphenolic compounds in red wines”. *Czech Journal of Food Sciences* 32 (6): 563–69.
23. Baránek, M., J. Armengol, V. Holleínová, és mtsai. 2018. „Incidence of symptoms and fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in czech vineyards: first example from a North-Eastern European grape-growing region”. *Phytopathologia Mediterranea* 57 (3).
24. Barata, A., M. Malfeito-Ferreira, és V. Loureiro. 2012. „The microbial ecology of wine grape berries”. *International Journal of Food Microbiology* 153 (3): 243–59.
25. Bartowsky, E. J., és P. A. Henschke. 2004. „The ‘buttery’ attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond”. *International Journal of Food Microbiology* 96 (3): 235–52.
26. Bekris, F., S. Vasileiadis, E. Papadopoulou, és mtsai. 2021. „Grapevine wood microbiome analysis identifies key fungal pathogens and potential interactions with the bacterial community implicated in grapevine trunk disease appearance”. *Environmental Microbiome* 16 (1): 23.
27. Bene, Zs., és I. Magyar. 2004. „Characterization of yeast and mould biota of botrytized grapes in Tokaj wine region in the years 2000 and 2001”. *Acta Alimentaria* 33 (3): 259–67.
28. Beris, E., M. Selim, D. Kechagia, és A. Evangelou. 2023. „Overview of the Esca complex as an increasing threat in vineyards worldwide: climate change, control approaches and impact on grape and wine quality”. In *Recent Advances in Grapes and Wine Production - New Perspectives for Quality Improvement*, szerkesztette António M. Jordão, Renato Botelho, és Uroš Miljić. IntechOpen.
29. Bertsch, C., M. Ramírez-Suero, M. Magnin-Robert, és mtsai. 2013. „Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood”. *Plant Pathology* 62 (2): 243–65.
30. Bettenfeld, P., J. Cadena I Canals, L. Jacquens, és mtsai. 2022. „The microbiota of the grapevine holobiont: a key component of plant health”. *Journal of Advanced Research* 40 (9): 1–15.
31. Bettenfeld, P., F. Fontaine, S. Trouvelot, O. Fernandez, és P.-E. Courty. 2020. „Woody plant declines. What’s wrong with the microbiome?” *Trends in Plant Science* 25 (4): 381–94.
32. Bi, K., Y. Liang, T. Mengiste, és A. Sharon. 2023. „Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity”. *Trends in Plant Science* 28 (2): 211–22.
33. Billar De Almeida, A., J. Concas, M. D. Campos, és mtsai. 2020. „Endophytic fungi as potential biological control agents against grapevine trunk diseases in Alentejo region”. *Biology* 9 (12): 420.
34. Blanco-Ulate, B., K. C. H. Amrine, T. S. Collins, és mtsai. 2015. „Developmental and metabolic plasticity of white-skinned grape berries in response to *Botrytis cinerea* during noble rot”. *Plant Physiology* 169(4):2422-43.
35. Blundell, R., M. Arreguin, és A. Eskalen. 2021. „In vitro evaluation of grapevine endophytes, epiphytes and sap micro-organisms for potential use to control grapevine trunk disease pathogens”. *Phytopathologia Mediterranea* 60 (3): 535–48.
36. Boiu-Sicui, O.-A., R. C. Toma, C. F. Diguță, F. Matei, és C. Petruța Cornea. 2023. „In vitro evaluation of some endophytic bacillus to potentially inhibit grape and grapevine fungal pathogens”. *Plants* 12 (13): 2553.
37. Bokulich, N. A., M. Ohta, P. M. Richardson, és D. A. Mills. 2013. „Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota”. *PLoS ONE* 8 (6): e66437.

38. Bortolami, G., N. Ferrer, K. Baumgartner, és mtsai. 2023. „Esca grapevine disease involves leaf hydraulic failure and represents a unique premature senescence process”. *Tree Physiology* 43 (3): 441–51.
39. Brader, G., S. Compant, K. Vescio, és mtsai. 2017. „Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes”. *Annual Review of Phytopathology* 55 (1): 61–83.
40. Bruez, E., K. Baumgartner, S. Bastien, R. Travadon, L. Guérin-Dubrana, és P. Rey. 2016. „Various fungal communities colonise the functional wood tissues of old grapevines externally free from grapevine trunk disease symptoms: fungal microflora of GTD-Free old vines”. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 22 (2): 288–95.
41. Bruez, E., R. Haidar, M. T. Alou, és mtsai. 2015. „Bacteria in a wood fungal disease: characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines”. *Frontiers in Microbiology* 6 (október).
42. Bruez, E., J. Vallance, J. Gerbore, és mtsai. 2014. „Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of Esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines”. *PLoS ONE* 9 (5): e95928.
43. Bruno, G., és L. Sparapano. 2006. „Effects of three Esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: I. characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in Calli”. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69 (4–6): 209–23.
44. Bruno, G., L. Sparapano, és A. Graniti. 2007. „Effects of three Esca-associated Fungi on *Vitis vinifera* L.: IV. diffusion through the xylem of metabolites produced by two tracheiphilous fungi in the woody tissue of grapevine leads to Esca-like symptoms on leaves and berries”. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71 (1–3): 106–24.
45. Burdock, G. A. 2016. „Fenaroli’s handbook of flavor ingredients”. 6 kiad. CRC Press.
46. Burruano, S., S. Giambra, V. Mondello, és mtsai. 2016. „Naphthalenone polyketides Produced by *Neofusicoccum parvum*, a fungus associated with grapevine *Botryosphaeria dieback*”. *Phytopathologia Mediterranea* 55 (2).
47. Bustamante, M. I., K. Elfar, és A. Eskalen. 2022. „Evaluation of the antifungal activity of endophytic and rhizospheric bacteria against grapevine trunk pathogens”. *Microorganisms* 10 (10): 2035.
48. Butts, C. T. 2008. „Social network analysis with SNA”. *Journal of Statistical Software* 24 (6).
49. Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson, és Susan P Holmes. 2016. „DADA2: High-resolution sample inference from illumina amplicon data”. *Nature Methods* 13 (7): 581–83.
50. Callejón, R.M., A.M. Troncoso, és M.L. Morales. 2010. „Determination of amino acids in grape-derived products: a review”. *Talanta* 81 (4–5): 1143–52.
51. Calzarano, F., és S. Di Marco. 2018. „Further evidence that calcium, magnesium and seaweed mixtures reduce grapevine leaf stripe symptoms and increase grape yields”. *Phytopathologia Mediterranea* 57 (3).
52. Campia, P., G. Venturini, P. Moreno-Sanz, P. Casati, és S. L. Toffolatti. 2017. „Genetic structure and fungicide sensitivity of *Botrytis cinerea* populations isolated from grapevine in northern Italy”. *Plant Pathology* 66 (6): 890–99.
53. Campo, E., M.P. Saenz-Navajas, J. Cacho, és V. Ferreira. 2012. „Consumer rejection threshold of ethyl phenylacetate and phenylacetic acid, compounds responsible for the sweet-like off odour in wines made from sour rotten grapes: CRT of ethyl phenylacetate and phenylacetic acid”. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 18 (3): 280–86.
54. Canessa, P., és S. Ferrari. 2025. „Editorial: Molecular interactions and control strategies for *Botrytis cinerea* in crop production”. *Frontiers in Plant Science* 16 (5): 1624296.
55. Cantoral, J. M., és I. G. Collado. 2011. „Filamentous fungi (*Botrytis cinerea*)”. In *Molecular wine microbiology*. Elsevier.

56. Cantu, D., A. R. Vicente, J. M. Labavitch, A. B. Bennett, és A. L.T. Powell. 2008. „Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility”. *Trends in Plant Science* 13 (11): 610–17.
57. Carbajal-Ida, D., C. Maury, E. Salas, R. Siret, és E. Mehinagic. 2016. „Physico-chemical properties of botrytised Chenin blanc grapes to assess the extent of noble rot”. *European Food Research and Technology* 242 (1): 117–26.
58. Carbone, I., és L. M. Kohn. 1999. „A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes”. *Mycologia* 91 (3): 553–56.
59. Carlucci, A., F. Cibelli, F. Lops, és M. L. Raimondo. 2015. „Characterization of Botryosphaeriaceae species as causal agents of trunk diseases on grapevines”. *Plant Disease* 99 (12): 1678–88.
60. Castillo-Novales, D., P. Vega-Celedón, A. Larach, M. Seeger, és X. Besoain. 2025. „Native bacteria are effective biocontrol agents at a wide range of temperatures of *Neofusicoccum parvum*, associated with Botryosphaeria dieback on grapevine”. *Plants* 14 (7): 1043.
61. Chen, C., G. J. M. Verkley, G. Sun, J. Z. Groenewald, és P. W. Crous. 2016. „Redefining common endophytes and plant pathogens in *Neofabraea*, *Pezicula*, and related genera”. *Fungal Biology* 120 (11): 1291–322.
62. Chen, X., T. Long, S. Huang, és mtsai. 2024. „Metabolomics-based study of chemical compositions in cellulase additives derived from a tobacco-origin *Bacillus subtilis* and their impact on tobacco sensory attributes”. *Archives of Microbiology* 206 (4): 163.
63. Chen, Y., W. Zhang, H. Yi, és mtsai. 2020. „Microbial community composition and its role in volatile compound formation during the spontaneous fermentation of ice wine made from vidal grapes”. *Process Biochemistry* 92 (5): 365–77.
64. Chiarappa, L. 2000. „Esca (black measles) of grapevine. An overview”. *Phytopathol Mediterr*, 1st IWGTD - Special issue on Grapevine Trunk Diseases, köt. 39 (1): 11–15.
65. Choquer, M., E. Fournier, C. Kunz, és mtsai. 2007. „*Botrytis cinerea* virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen”. *FEMS Microbiology Letters* 277 (1): 1–10.
66. Christen, D., M. Tharin, S. Perrin-Cherieux, E. Abou-Mansour, R. Tabacchi, és G. Défago. 2005. „Transformation of Eutypa dieback and Esca disease pathogen toxins by antagonistic fungal strains reveals a second detoxification pathway not present in *Vitis vinifera*”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (18): 7043–51.
67. Ciliberti, N., M. Fermaud, J. Roudet, és V. Rossi. 2015. „Environmental conditions affect Botrytis cinerea infection of mature grape berries more than the strain or transposon genotype”. *Phytopathology* 105 (8): 1090–96.
68. Cloete, M., M. Fischer, L. Mostert, és F. Halleen. 2014. „A novel Fomitiporia species associated with Esca on grapevine in South Africa”. *Mycological Progress* 13 (2): 303–11.
69. Compant, S., G. Brader, S. Muzammil, A. Sessitsch, A. Lebrhi, és F. Mathieu. 2013. „Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases”. *BioControl* 58 (4): 435–55.
70. Cortois, R., és G. B. De Deyn. 2012. „The curse of the Black Box”. *Plant and Soil* 350 (1–2): 27–33.
71. Crous, P. W., B. Slippers, M. J. Wingfield, és mtsai. 2006. „Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae”. *Studies in Mycology* 55 (május): 235–53.
72. Crous, P. W., E. R. Osieck, Ž. Jurjevi, és mtsai. 2021. „Fungal planet description sheets: 1284–1382”. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 47 (1): 178–374.
73. Damialis, A., A. B. Mohammad, J. M. Halley, és A. C. Gange. 2015. „Fungi in a changing world: growth rates will be elevated, but spore production may decrease in future climates”. *International Journal of Biometeorology* 59 (9): 1157–67.

74. Dankó, T., M. Szelényi, T. Janda, B. P. Molnár, és M. Pogány. 2021. „Distinct volatile signatures of bunch rot and noble rot”. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 114 (április): 101626.
75. Datta, R., D. Kumar, A. Sultana, S. Hazra, D. Bhattacharyya, és S. Chattopadhyay. 2015. „Glutathione regulates ACC synthase transcription via WRKY33 and ACC oxidase by modulating mRNA stability to induce ethylene synthesis during stress”. *Plant Physiology*, október 13, pp.01543.2015.
76. De Andrade Carvalho, A. L., L. C. de Rezende, L. B. Costa, és mtsai. 2018. „Optimizing the mass production of *Clonostachys rosea* by liquid-state fermentation”. *Biological Control* 118 (3): 16–25.
77. De Cáceres, M., P. Legendre, és M. Moretti. 2010. „Improving indicator species analysis by combining groups of sites”. *Oikos* 119 (10): 1674–84.
78. De Jong, S. N., C. A. Lévesque, G. J. M. Verkley, E. C.A. Abeln, J. E. Rahe, és P. G. Braun. 2001. „Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene”. *Mycological Research* 105 (6): 658–69.
79. De la Fuente Lloreda, M., F. Fontaine, D. Gramaje, és mtsai. 2016. *Grapevine trunk diseases. A review*. 1 edition. OIV publications.
80. De Miccolis Angelini, R. M., C. Rotolo, M. Masiello, D. Gerin, S. Pollastro, és F. Faretra. 2014. „Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy”. *Pest Management Science* 70 (12): 1785–96.
81. Del Frari, G., A. Gobbi, M. R. Aggerbeck, H. Oliveira, L. H. Hansen, és R. Boavida Ferreira. 2019. „Characterization of the wood mycobiome of *Vitis vinifera* in a vineyard affected by Esca. Spatial distribution of fungal communities and their putative relation with leaf symptoms”. *Frontiers in Plant Science* 10 (7): 910.
82. Del Pilar Martínez-Diz, M., A. Eichmeier, M. Spetik, és mtsai. 2020. „Grapevine pruning time affects natural wound colonization by wood-invading fungi”. *Fungal Ecology* 48 (12): 100994.
83. Di Marco, S., E. G. Metruccio, S. Moretti, és mtsai. 2022. „Activity of *Trichoderma asperellum* strain ICC 012 and *Trichoderma gamsii* Strain ICC 080 toward diseases of Esca complex and associated pathogens”. *Frontiers in Microbiology* 12 (1): 813410.
84. Dissanayake, A. J., W. Purahong, T. Wubet, és mtsai. 2018. „Direct comparison of culture-dependent and culture-independent molecular approaches reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*)”. *Fungal Diversity* 90 (1): 85–107.
85. Doumouya, S., M. Lahaye, C. Maury, és R. Siret. 2014. „Physical and physiological heterogeneity within the grape bunch: impact on mechanical properties during maturation”. *American Journal of Enology and Viticulture* 65 (2): 170–78.
86. Dos Santos, P. J. C., D. C. Savi, R. R. Gomes, és mtsai. 2016. „*Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*”. *Microbiological Research* 186–187 (5): 153–60.
87. Duarte, F. L., N. H. Pimentel, A. Teixeira, és Á. Fonseca. 2012. „*Saccharomyces bacillaris* is not a synonym of *Candida stellata*: Reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. Nov.” *Antonie van Leeuwenhoek* 102 (4): 653–58.
88. Dufrêne, M., és P. Legendre. 1997. „Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach”. *Ecological Monographs* 67 (3): 345–66.
89. Edgar, R. C. 2010. „Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST”. *Bioinformatics* 26 (19): 2460–61.
90. Edgar, R. C. 2013. „UPARSE: Highly Accurate OTU sequences from microbial amplicon reads”. *Nature Methods* 10 (10): 996–98.

91. Eichmeier, A., J. Pečenka, E. Peňázová, és mtsai. 2018. „High-throughput amplicon sequencing-based analysis of active fungal communities inhabiting grapevine after hot-water treatments reveals unexpectedly high fungal diversity”. *Fungal Ecology* 36 (12): 26–38.
92. Elad, Y., I. Pertot, A. M. Cotes Prado, és A. Stewart. 2016. „Plant hosts of *Botrytis* spp.” In *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, szerkesztette Sabine Fillinger és Yigal Elad. Springer International Publishing.
93. Elena, G., E. Bruez, P. Rey, és J. Luque. 2018. „Microbiota of grapevine woody tissues with or without Esca-foliar symptoms in Northeast Spain”. *Phytopathologia Mediterranea* 57 (3).
94. Fillinger, S., és Y. Elad, szerk. 2016. *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Springer International Publishing.
95. Fischer, M. 2002. „A new wood-decaying *Basidiomycete* species associated with Esca of grapevine: *fomitiporia mediterranea* (*Hymenochaetales*)”. *Mycological Progress* 1 (3): 315–24.
96. Fischer, M., és S. Peighami-Ashnaei. 2019. „Grapevine, Esca complex, and environment: the disease triangle”. *Phytopathologia Mediterranea* 58 (1): 17–37.
97. Fleurat-Lessard, P., E. Luini, S. La Camera, F. Thibault, G. Roblin, és J.-M. Berjeaud. 2023. „Fungal wood-degrading enzymes in Esca-diseased grapevine and effects of carbohydrate environment on fungal development”. *Archives of Microbiology* 205 (5): 194.
98. Forabosco, A., G. Bruno, L. Sparapano, G. Liut, D. Marino, és F. Delben. 2006. „Pullulans produced by strains of *Cryphonectria parasitica*-i. production and characterisation of the exopolysaccharides”. *Carbohydrate Polymers* 63 (4): 535–44.
99. Fournier, E., P. Gladieux, és T. Giraud. 2013. „The ‘Dr Jekyll and Mr Hyde Fungus’: Noble rot versus gray mold symptoms of *Botrytis cinerea* on grapes”. *Evolutionary Applications* 6 (6): 960–69.
100. Frąc, M., S. E. Hannula, M. Bełka, és M. Jędryczka. 2018. „Fungal biodiversity and their role in soil health”. *Frontiers in Microbiology* 9 (4): 707.
101. Francioli, D., E. Schulz, F. Buscot, és T. Reitz. 2018. „Dynamics of soil bacterial communities over a vegetation season relate to both soil nutrient status and plant growth phenology”. *Microbial Ecology* 75 (1): 216–27.
102. Fussler, L., N. Kobes, F. Bertrand, M. Maumy, J. Grosman, és S. Savary. 2008. „A characterization of grapevine trunk diseases in France from data generated by the national grapevine wood diseases survey”. *Phytopathology* 98 (5): 571–79.
103. Galli, V., Y. Romboli, D. Barbato, és mtsai. 2021. „Indigenous *Aureobasidium pullulans* strains as biocontrol agents of *Botrytis cinerea* on grape berries”. *Sustainability* 13 (16): 9389.
104. Gardes, M., és T. D. Bruns. 1993. „ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts”. *Molecular Ecology* 2 (2): 113–18.
105. Garipey, T. D., J. E. Rahe, C. A. Lévesque, R. A. Spotts, D. L. Sugar, és J. L. Henriquez. 2005. „*Neofabraea* species associated with bull’s-eye rot and cankers of apple and pear in the Pacific Northwest”. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27 (1): 118–24.
106. Gaspar, M. L., M. N. Cabello, R. Pollero, és M. A. Aon. 2001. „Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of fungal biomass in soil”. *Current Microbiology* 42 (5): 339–44.
107. Geml, J. 2019. „Soil fungal communities reflect aspect-driven environmental structuring and vegetation types in a pannonian forest landscape”. *Fungal Ecology* 39 (6): 63–79.
108. Genovese, A., A. Gambuti, P. Piombino, és L. Moio. 2007. „Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine”. *Food Chemistry* 103 (4): 1228–36.
109. Ghobad-Nejhad, M., B. Asgari, és S. Chaharmiri Dokhaharani. 2017. „Notes on some endophytic fungi isolated from *Quercus brantii* in Dena, Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province”. *Mycologia Iranica* 4 (1).

110. Glazebrook, J. 2005. „Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens”. *Annual Review of Phytopathology* 43 (1): 205–27.
111. Gomes, R. R., C. Glienke, S. I. R. Videira, L. Lombard, J. Z. Groenewald, és P. W. Crous. 2013. „*Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi”. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 31 (1): 1–41.
112. Gramaje, D., K. Baumgartner, F. Halleen, és mtsai. 2016. „Fungal trunk diseases: a problem beyond grapevines?” *Plant Pathology* 65 (3): 355–56.
113. Gramaje, D., J. R. Úrbez-Torres, és M. R. Sosnowski. 2018. „Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects”. *Plant Disease* 102 (1): 12–39.
114. Groenewald, J.Z., C. Nakashima, J. Nishikawa, és mtsai. 2013. „Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses”. *Studies in Mycology* 75 (6): 115–70.
115. Guarnaccia, V., J.Z. Groenewald, J. Woodhall, és mtsai. 2018. „*Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe”. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 40 (1): 135–53.
116. Guerin-Dubrana, L., F. Fontaine, és L. Mugnai. 2019. „Grapevine trunk disease in european and mediterranean vineyards: occurrence, distribution and associated disease-affecting cultural factors”. *Phytopathologia Mediterranea* 58 (1): 49–71.
117. Guo, Q.-y., L. Cheng, H.-x. Zhu, és mtsai. 2020. „Herbicidal activity of *Aureobasidium pullulans* PA-2 on weeds and optimization of its solid-state fermentation conditions”. *Journal of Integrative Agriculture* 19 (1): 173–82.
118. Gupta, S., M. Schillaci, és U. Roessner. 2022. „Metabolomics as an emerging tool to study plant–microbe interactions”. *Emerging Topics in Life Sciences* 6 (2): 175–83.
119. Haidar, R., A. Deschamps, J. Roudet, és mtsai. 2016. „Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine”. *Biological Control* 92 (1): 55–65.
120. Haidar, R., A. Yacoub, J. Roudet, M. Fermoud, és P. Rey. 2021. „Application methods and modes of action of *Pantoea agglomerans* and *Paenibacillus* sp. to control the grapevine trunk disease-pathogen, *Neofusicoccum parvum*”. *OENO One* 55 (3): 1–16.
121. Haile, Z. M., G. Malacarne, S. Pilati, és mtsai. 2020. „Dual transcriptome and metabolic analysis of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir berry and *Botrytis cinerea* during quiescence and egressed infection”. *Frontiers in Plant Science* 10 (1): 1704.
122. Haile, Z. M., S. Pilati, P. Sonogo, és mtsai. 2017. „Molecular analysis of the early interaction between the grapevine flower and *Botrytis cinerea* reveals that prompt activation of specific host pathways leads to fungus quiescence”. *Plant, Cell & Environment* 40 (8): 1409–28.
123. Han, X., Q. Peng, H. Yang, B. Hu, C. Shen, és R. Tian. 2020. „Influence of different carbohydrate sources on physicochemical properties and metabolites of fermented greengage (*Prunus mume*) wines”. *LWT* 121 (3): 108929.
124. He, M., és N.-Z. Ding. 2020. „Plant unsaturated fatty acids: multiple roles in stress response”. *Frontiers in Plant Science* 11 (9): 562785.
125. Hegyi, Á. I., M. Otto, J. Geml, és mtsai. 2022. „Metatranscriptomic analyses reveal the functional role of *Botrytis cinerea* in biochemical and textural changes during noble rot of grapevines”. *Journal of Fungi* 8 (4): 378.
126. Hegyi, Á. I., M. Otto, J. Geml, és mtsai. 2023. „The origin of the particular aroma of noble rot wines: various fungi contribute to the development of the aroma profile of botrytised grape berries”. *OENO One* 57 (3): 165–76.
127. Hegyi-Kaló, J., Á. István Hegyi, J. Geml, Zs. Zsófi, X. Pálfi, és K. Z. Váczy. 2020. „Physico-chemical characteristics and culturable microbial communities of grape berries change strongly during noble rot development”. *Plants* 9 (12): 1809.
128. Herzan, J., K. Prokes, M. Baron, M. Kumsta, P. Pavlousek, és J. Sochor. 2020. „Study of carbonyl compounds in white wine production”. *Food Science & Nutrition* 8 (11): 5850–59.

129. Hoenicke, K., O. Borchert, K. Grüning, és T. J. Simat. 2002. „Untypical aging off-flavor” in wine: synthesis of potential degradation compounds of indole-3-acetic acid and kynurenine and their evaluation as precursors of 2-aminoacetophenone”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (15): 4303–9.
130. Hofstetter, V., B. Buyck, D. Croll, O. Viret, A. Couloux, és K. Gindro. 2012. „What if Esca disease of grapevine were not a fungal disease?” *Fungal Diversity* 54 (1): 51–67.
131. Howe, A. C., J. K. Jansson, S. A. Malfatti, S. G. Tringe, J. M. Tiedje, és C. T. Brown. 2014. „Tackling soil diversity with the assembly of large, complex metagenomes”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (13): 4904–9.
132. Howell, K. S., D. Cozzolino, E. J. Bartowsky, G. H. Fleet, és P. A. Henschke. 2006. „Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation”. *FEMS Yeast Research* 6 (1): 91–101.
133. Ihrmark, K., I. T. M. Bödeker, K. Cruz-Martinez, és mtsai. 2012. „New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities”. *FEMS Microbiology Ecology* 82 (3): 666–77.
134. Iznova, T., és J. Rukšėnienė. 2012. „Ascomycete species new to Lithuania”. *Botanica Lithuanica* 18 (1): 35–39.
135. Jackson, H. S. 1913. „*Neofabraea malicorticis* H.S. Jacks., the causal agent of apple anthracnose”. *Biennial Crop Pest and Horticulture Report of the Oregon Agricultural Experiment Station 1911–1912*, p.183.
136. Jelski, W., és M. Szmitkowski. 2008. „Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases”. *Clinica Chimica Acta* 395 (1–2): 1–5.
137. Kakeya, H., N. Takahashi-Ando, M. Kimura, R. Onose, I. Yamaguchi, és H. Osada. 2002. „Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non-estrogenic compound by a fungal strain of *Clonostachys sp.*” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66 (12): 2723–26.
138. Kallitsounakis, G., és S. Catarino. 2020. „An overview on botrytized wines”. *Ciência e Técnica Vitivinícola* 35 (2): 76–106.
139. Kamzolova, S. V., és I. G. Morgunov. 2021. „Effect of metabolic regulators and aeration on isocitric acid synthesis by *Yarrowia lipolytica* grown on ester-aldehyde fraction”. *Fermentation* 7 (4): 283.
140. Karácsony, Z., D. G. Knapp, Sz. Lengyel, G. M. Kovács, és K. Z. Váczy. 2021. „The fungus *Kalmusia longispora* is able to cause vascular necrosis on *Vitis vinifera*”. *PLOS ONE* 16 (10): e0258043.
141. Karácsony, Z., V. Mondello, F. Fontaine, és K. Z. Váczy. 2023. „The potential role of *Aureobasidium pullulans* in the development of foliar symptoms of Esca disease in grapevine”. *OENO One* 57 (3): 189–203.
142. Kasanen, R., J. Hantula, és T. Kurkela. 2002. „*Neofabraea populi* in hybrid aspen stands in Southern Finland”. *Scandinavian Journal of Forest Research* 17 (5): 391–97.
143. Katoh, K., és D. M. Standley. 2013. „MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability”. *Molecular Biology and Evolution* 30 (4): 772–80.
144. Kazan, K., és J. M. Manners. 2008. „Jasmonate signaling: toward an integrated view”. *Plant Physiology* 146 (4): 1459–68.
145. Kenfaoui, J., E. Dutilloy, S. Benchlih, R. Lahlali, E. Ait-Barka, és Q. Esmaeel. 2024. „*Bacillus velezensis*: a versatile ally in the battle against phytopathogens - insights and prospects”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 108 (1): 439.
146. Keshmirshekan, A., L. M. De Souza Mesquita, és S. P. M. Ventura. 2024. „Biocontrol Manufacturing and agricultural applications of *Bacillus velezensis*”. *Trends in Biotechnology* 42 (8): 986–1001.
147. Kim, Y. K. 2014. „First report of a new postharvest rot in sweet cherries caused by *Aureobasidium pullulans*”. *Plant Disease* 98 (3): 424–424.

148. Kiss, J., és A. Sass-Kiss. 2005. „Protection of originality of Tokaji aszú: amines and organic acids in botrytized wines by high-performance liquid chromatography”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (26): 10042–50.
149. Kiss, T., Z. Karácsony, A. Gomba-Tóth, és mtsai. 2024. „A modified CTAB method for the extraction of high-quality RNA from mono- and dicotyledonous plants rich in secondary metabolites”. *Plant Methods* 20 (1): 62.
150. Knapp, D. G., A. Lázár, A. Molnár, és mtsai. 2021. „Above-ground parts of white grapevine *Vitis vinifera* cv. Furmint share core members of the fungal microbiome”. *Environmental Microbiology Reports* 13 (4): 509–20.
151. Kõljalg, U., R. H. Nilsson, K. Abarenkov, és mtsai. 2013. „Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi”. *Molecular Ecology* 22 (21): 5271–77.
152. Kosinczky, V. 1936. „A szőlőtőke-visszaesés kérdéséről”. *Növényvédelem* 12 (5).
153. Kotze, C., J. Van Niekerk, L. Mostert, F. Halleen, és P. Fourie. 2011. „Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection”. *Phytopathol. Mediterr.*, Special issue from the 7th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases (IWGTD), köt. 50: S247–S263.
154. Kovács, Cs., P. Balling, Z. Bihari, A. Nagy, és E. Sándor. 2017. „Incidence of grapevine trunk diseases is influenced by soil, topology and vineyard age, but not by *Diplodia seriata* infection rate in the Tokaj wine region, Hungary”. *Phytoparasitica* 45 (1): 21–32.
155. Kovács, G. M., T. Jankovics, és L. Kiss. 2011. „Variation in the nrDNA ITS sequences of some powdery mildew species: do routine molecular identification procedures hide valuable information?” *European Journal of Plant Pathology* 131 (1): 135–41.
156. Köycü, N.D., N. Özer, D. Martignoni, és mtsai. 2014. „T-resveratrol accumulation and polygalacturonase inhibition during infection of grape berries by *Botrytis cinerea*”. *Journal of Plant Pathology* 1 (2).
157. Kumar, S., G. Stecher, és K. Tamura. 2016. „Mega7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets”. *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870–74.
158. Langa-Lomba, N., V. González-García, M. E. Venturini-Crespo, J. Casanova-Gascón, J. J. Barriuso-Vargas, és P. Martín-Ramos. 2023. „Comparison of the efficacy of *Trichoderma* and *Bacillus* strains and commercial biocontrol products against grapevine *Botryosphaeria dieback* pathogens”. *Agronomy* 13 (2): 533.
159. Langfelder, P., és S. Horvath. 2008. „WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis”. *BMC Bioinformatics* 9 (1): 559.
160. Larignon, P., F. Fontaine, S. Farine, C. Clément, és C. Bertsch. 2009. „Esca et Black Dead Arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne”. *Comptes Rendus. Biologies* 332 (9): 765–83.
161. Lawrence, M., W. Huber, H. Pagès, és mtsai. 2013. „Software for computing and annotating genomic ranges”. *PLoS Computational Biology* 9 (8): e1003118.
162. Lecomte, P., B. Diarra, Alain Carbonneau, P. Rey, és C. l. Chevrier. 2018. „Esca of grapevine and training practices in France: Results of a 10-Year survey”. *Phytopathologia Mediterranea* 57 (3).
163. Lee, D.-H., S.-E. Cho, J.-H. Park, S.-T. Seo, S.-H. Lee, és S. K. Lee. 2019. „First report of *Aureobasidium pullulans* causing anthracnose on paeonia suffruticosa in Korea”. *Journal of Plant Pathology* 101 (4): 1255–1255.
164. Lehoczky, J. 1972. „Dead-Arm disease of grapevine in Hungary”. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 7: 401–7.
165. Lehoczky, J. 1974. „Black Dead-Arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection”. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 9 (3/4): 319–27.
166. Lengyel, Sz., D. G. Knapp, Z. Karácsony, és mtsai. 2020. „*Neofabraea kienholzii*, a novel causal agent of grapevine trunk diseases in Hungary”. *European Journal of Plant Pathology* 157 (4): 975–84.

167. Letaief, H., L. Rolle, és V. Gerbi. 2008. „Mechanical behavior of winegrapes under compression tests”. *American Journal of Enology and Viticulture* 59 (3): 323–29.
168. Letaief, H., L. Rolle, G. Zeppa, és V. Gerbi. 2008a. „Assessment of grape skin hardness by a puncture test”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (9): 1567–75.
169. Letaief, H., L. Rolle, G. Zeppa, és V. Gerbi. 2008b. „Assessment of grape skin hardness by a puncture test”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (9):
170. Li, H., A. James, X. Shen, és Y. Wang. 2021. „Roles of microbiota in the formation of Botrytized grapes and wines”. *CyTA - Journal of Food* 19 (1): 656–67.
171. Li, Y., X. Li, W. Zhang, és mtsai. 2023. „Belowground microbiota analysis indicates that *Fusarium spp.* exacerbate grapevine trunk disease”. *Environmental Microbiome* 18 (1): 29.
172. Lin, J., M. Massonnet, és D. Cantu. 2019. „The genetic basis of grape and wine aroma”. *Horticulture Research* 6 (1): 81.
173. Linaldeddu, B. T., A. Deidda, B. Scanu, és mtsai. 2016. „Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae*, *Diatrypaceae* and *Gnomoniaceae* associated with branch diseases of hazelnut in Sardinia (Italy)”. *European Journal of Plant Pathology* 146 (2): 259–79.
174. Linhart Gy., és Mezey Gy. 1895. *Szőlőbetegségek*. Czéh Sándor-féle Könyvnyomda. <https://www.regikonyvek.hu/kiadas/szolobetegsegek-1895-akademiai-kiado>.
175. Liu, H.-N., M.-S. Pei, T.-L. Wei, Y.-H. Yu, és D.-L. Guo. 2022. „ROS scavenger hypotaurine delays postharvest softening of ‘Kyoho’ grape by regulating pectin and cell metabolism pathway”. *Postharvest Biology and Technology* 186 (4): 111833.
176. Lorenzini, M., és G. Zapparoli. 2014. „An isolate morphologically and phylogenetically distinct from *Botrytis cinerea* obtained from withered grapes possibly represents a new species of botrytis”. *Plant Pathology* 63 (6): 1326–35.
177. Lorenzini, M., és G. Zapparoli. 2015. „Occurrence and infection of *Cladosporium*, *Fusarium*, *Epicoccum* and *Aureobasidium* in withered rotten grapes during post-harvest dehydration”. *Antonie van Leeuwenhoek* 108 (5): 1171–80.
178. Lovato, A., S. Zenoni, G. Battista Torielli, T. Colombo, E. Vandelle, és A. Polverari. 2019. „Specific molecular interactions between *Vitis vinifera* and *Botrytis cinerea* are required for noble rot development in grape berries”. *Postharvest Biology and Technology* 156 (10): 110924.
179. Love, M. I., W. Huber, és S. Anders. 2014. „Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2”. *Genome Biology* 15 (12): 550.
180. Löytynoja, A., és N. Goldman. 2008. „Phylogeny-aware gap placement prevents errors in sequence alignment and evolutionary analysis”. *Science* 320 (5883): 1632–35.
181. Luini, E., P. Fleurat-Lessard, L. Rousseau, G. Roblin, és J.-M. Berjeaud. 2010. „Inhibitory effects of polypeptides secreted by the grapevine pathogens *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on plant cell activities”. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74 (5–6): 403–11.
182. Lysøe, E., M. W. Dees, és M. Bente Brurberg. 2017. „A three-way transcriptomic interaction study of a biocontrol agent (*Clonostachys rosea*), a fungal pathogen (*Helminthosporium solani*), and a potato host (*Solanum tuberosum*)”. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30 (8): 646–55.
183. Magyar, I. 2010. „Borászati mikrobiológia”. *Mezőgazda Kiadó, Budapest*.
184. Magyar, I., és Zs. Bene. 2006. „Morphological and taxonomic study on mycobiota of noble rotted grapes in the Tokaj wine district”. *Acta Alimentaria* 35 (2): 237–46.
185. Magyar, I. 2010. „Borászati mikrobiológia”. *Mezőgazda*.
186. Magyar, I. 2010. „Botrytized wines”. *Advances in Food and Nutrition Research* 63: 147–206.
187. Maher, N., J. Piot, S. Bastien, J. Vallance, P. Rey, és L. Guérin-Dubrana. 2012. „Wood necrosis in esca-affected vines: types, relationships and possible links with foliar symptom expression”. *OENO One* 46 (1): 15.

188. Martín, L., B. García-García, és M. Del Mar Alguacil. 2022. „Interactions of the fungal community in the complex patho-system of Esca, a grapevine trunk disease”. *International Journal of Molecular Sciences* 23 (23): 14726.
189. Martinez, F., D. Blancard, P. Lecomte, C. Levis, B. Dubos, és M. Fermaud. 2003. „Phenotypic differences between Vacuma and Transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*”. *European Journal of Plant Pathology* 109 (5): 479–88.
190. Martinez, F., B. Dubos, és M. Fermaud. 2005. „The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards”. *Phytopathology* 95 (6): 692–700.
191. Martini, M., R. Musetti, S. Grisan, és mtsai. 2009. „DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*”. *Plant Disease* 93 (10): 993–98.
192. Martins, G., C. Miot-Sertier, B. Lauga, és mtsai. 2012. „Grape berry bacterial microbiota: impact of the ripening process and the farming system”. *International Journal of Food Microbiology* 158 (2): 93–100.
193. Masneuf-Pomarede, I., E. Juquin, C. Miot-Sertier, és mtsai. 2015. „The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments”. *FEMS Yeast Research* 15 (5): fov045.
194. Masuda, M., E.I.C. Okawa, K.I.C. Nishimura, és H. Yunome. 1984. „Identification of 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2(5)-furanone (sotolon) and ethyl 9-hydroxynonanoate in botrytised wine and evaluation of the roles of compounds characteristic of it”. *Agricultural and Biological Chemistry* 48 (11): 2707–10.
195. Maung, C. E. H., H. G. Lee, J. Y. Cho, és K. Y. Kim. 2021. „Antifungal compound, methyl hippurate from *Bacillus velezensis* ce 100 and its inhibitory effect on growth of *Botrytis cinerea*”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37 (9): 159.
196. McGovern, P. E. 2019. *Ancient wine: the search for the origins of viniculture*. Princeton science library. Princeton University Press.
197. Mesguida, O., R. Haidar, A. Yacoub, és mtsai. 2023. „Microbial biological control of fungi associated with grapevine trunk diseases: a review of strain diversity, modes of action, and advantages and limits of current strategies”. *Journal of Fungi* 9 (6): 638.
198. Miklósy, É., Z. Kalmár, és Z. Kerényi. 2004. „Identification of some characteristic aroma compounds in noble rotted grape berries and aszú wines from Tokaj by Gc-MS”. *Acta Alimentaria* 33 (3): 215–26.
199. Mikulás, J. 2013. „A szőlővédelem gondjai és megoldási lehetőségei régen és ma”. In *Szőlő, bor, termelés, fogyasztás, társadalom: borkultúra és társadalom visszatekintve a 21. századi Magyarországról: [Csoma Zsigmond emlékkönyv]*. Agroinform.
200. Mondello, V., C. Lemaître-Guillier, P. Trotel-Aziz, és mtsai. 2022. „Assessment of a new copper-based formulation to control Esca disease in field and study of its impact on the vine microbiome, vine physiology and enological parameters of the juice”. *Journal of Fungi* 8 (2): 151.
201. Mondello, V., A. Songy, E. Battiston, és mtsai. 2018. „Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents”. *Plant Disease* 102 (7): 1189–217.
202. Moretti, S., A. Pacetti, R. Pierron, és mtsai. 2021. „*Fomitiporia mediterranea* M. Fisch., the historical Esca agent: a comprehensive review on the main grapevine wood rot agent in Europe”. *Phytopathologia Mediterranea* 60 (2): 351–79.
203. Morkunas, I., Ł. Marczak, J. Stachowiak, és M. Stobiecki. 2005. „Sucrose-induced lupine defense against *Fusarium oxysporum*”. *Plant Physiology and Biochemistry* 43 (4): 363–73.
204. Moya-Cuevas, J., M.-M. Pérez-Alonso, P. Ortiz-García, és S. Pollmann. 2021. „Beyond the usual suspects: physiological roles of the *Arabidopsis* amidase signature (AS) superfamily members in plant growth processes and stress responses”. *Biomolecules* 11 (8): 1207.
205. Mugnai, L., A. Graniti, és G. Surico. 1999. „Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines”. *Plant Disease* 83 (5): 404–18.

206. Muñoz-Hoyos, L., és R. Stam. 2023. „Metabolomics in plant pathogen defense: from single molecules to large-scale analysis”. *Phytopathology* 113 (5): 760–70.
207. Mutawila, C., P. Fourie, F. Halleen, és L. Mostert. 2011. „Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens”. *Phytopathol. Mediterr.* 50 (4): 264–76.
208. Nerva, L., A. Zanzotto, M. Gardiman, F. Gaiotti, és W. Chitarra. 2019. „Soil microbiome analysis in an Esca diseased vineyard”. *Soil Biology and Biochemistry* 135 (8): 60–70.
209. Nerva, L., M. Turina, A. Zanzotto, és mtsai. 2019. „Isolation, molecular characterization and virome analysis of culturable wood fungal endophytes in Esca symptomatic and asymptomatic grapevine plants”. *Environmental Microbiology* 21 (8): 2886–904.
210. Neuser, F., H. Zorn, és R. G. Berger. 2000. „Generation of odorous acyloins by yeast pyruvate decarboxylases and their occurrence in sherry and soy sauce”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (12): 6191–95.
211. Ngou, B. P. M., H.-K. Ahn, P. Ding, és J. D. G. Jones. 2021. „Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors”. *Nature* 592 (7852): 110–15.
212. Niem, J. M., R. Billones-Baaijens, B. Stodart, és S. Savocchia. 2020. „Diversity profiling of grapevine microbial endosphere and antagonistic potential of endophytic *Pseudomonas* against grapevine trunk diseases”. *Frontiers in Microbiology* 11 (3): 477.
213. Niessl, G. 1872. „Beiträge zur kenntniss der pilze: beschreibung neuer und wenig bekannter pilze.” *Verlag d. Vereines*.
214. Nilsson, R. H., S. Anslan, M. Bahram, Christian Wurzbacher, P. Baldrian, és L. Tedersoo. 2019. „Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi”. *Nature Reviews Microbiology* 17 (2): 95–109.
215. Nykänen, L. 1986. „formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages”. *American Journal of Enology and Viticulture* 37 (1): 84–96.
216. Nylander, J. A.A., J. C. Wilgenbusch, D. L. Warren, és D. L. Swofford. 2008. „AWTY (Are We There yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics”. *Bioinformatics* 24 (4): 581–83.
217. Oksanen, J., G. L. Simpson, F. G. Blanchet, és mtsai. 2001. „Vegan: community ecology package”. 09. 6.
218. Otto, M., J. Geml, Á. I. Hegyi, és mtsai. 2022. „*Botrytis cinerea* expression profile and metabolism differs between noble and grey rot of grapes”. *Food Microbiology* 106 (9): 104037.
219. Ozsolak, F., és P. M. Milos. 2011. „RNA sequencing: advances, challenges and opportunities”. *Nature Reviews Genetics* 12 (2): 87–98.
220. Panahi, B., és M. Amin Hejazi. 2021. „Weighted gene co-expression network analysis of the salt-responsive transcriptomes reveals novel hub genes in green halophytic microalgae *Dunaliella salina*”. *Scientific Reports* 11 (1): 1607.
221. Papadopoulou, D., és I. G. Roussis. 2008. „Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and *N*-acetylcysteine”. *International Journal of Food Science & Technology* 43 (6): 1053–57.
222. Parliment, T. H., és R. Croteau, szerk. 1986. *Biogenesis of aromas*. Köt. 317. ACS Symposium Series. American Chemical Society.
223. Patro, R., G. Duggal, M. I. Love, R. A. Irizarry, és C. Kingsford. 2017. „Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression”. *Nature Methods* 14 (4): 417–19.
224. Perez-Gonzalez, G., D. Sebestyen, E. Petit, és mtsai. 2022. „Oxygen radical-generating metabolites secreted by *Eutypa* and Esca fungal consortia: understanding the mechanisms behind grapevine wood deterioration and pathogenesis”. *Frontiers in Plant Science* 13 (7): 921961.
225. Peterson, S. W., és C. P. Kurtzman. 1991. „Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts”. *Systematic and Applied Microbiology* 14 (2): 124–29.

226. Pinto, C., V. Custódio, M. Nunes, és mtsai. 2018. „Understand the potential role of *Aureobasidium pullulans*, a resident microorganism from grapevine, to prevent the infection caused by *Diplodia seriata*”. *Frontiers in Microbiology* 9 (12): 3047.
227. Pitt, W. M., R. Huang, C. C. Steel, és S. Savocchia. 2010. „Identification, distribution and current taxonomy of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia”. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16 (1): 258–71.
228. Pogány, M., T. Dankó, J. Hegyi-Kaló, és mtsai. 2022. „Redox and hormonal changes in the transcriptome of grape (*Vitis vinifera*) berries during natural noble rot development”. *Plants* 11 (7): 864.
229. Prasongsuk, S., P. Lotrakul, I. Ali, W. Bankeeree, és H. Punnapayak. 2018. „The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology”. *Folia Microbiologica* 63 (2): 129–40.
230. Proels, R. K., és R. Hückelhoven. 2014. „Cell-wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defence responses”. *Molecular Plant Pathology* 15 (8): 858–64.
231. Qu, J.-Z., F. Liu, X.-X. Pan, és mtsai. 2022. „Coordinative changes in metabolites in grape cells exposed to endophytic fungi and their extracts”. *Molecules* 27 (17): 5566.
232. Rabbee, M. F., B.-S. Hwang, és K.-H. Baek. 2023. „*Bacillus velezensis*: a beneficial biocontrol agent or facultative phytopathogen for sustainable agriculture”. *Agronomy* 13 (3): 840.
233. Rath, M., I. Müller, P. Kropf, E. I. Closs, és M. Munder. 2014. „Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages”. *Frontiers in Immunology* 5 (10).
234. Rathnayake, R. M. S. P., S. Savocchia, L. M. Schmidtke, és C. C. Steel. 2018. „Characterisation of *Aureobasidium pullulans* isolates from *Vitis vinifera* and potential biocontrol activity for the management of bitter rot of grapes”. *European Journal of Plant Pathology* 151 (3): 593–611.
235. Reiter, T., R. Montpetit, S. Byer, és mtsai. 2021. „*Saccharomyces cerevisiae* gene expression during fermentation of pinot noir wines at an industrially relevant scale”. *Applied and Environmental Microbiology* 87 (11): e00036-21.
236. Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche, és A. Lonvaud. 2005. *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. 1. kiad. Wiley.
237. Rodríguez, M.A., G. Cabrera, F.C. Gozzo, M.N. Eberlin, és A. Godeas. 2011. „*Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent”. *Journal of Applied Microbiology* 110 (5): 1177–86.
238. Rolle, L., M. Giordano, S. Giacosa, és mtsai. 2012. „CIEL*a*b* parameters of white dehydrated grapes as quality markers according to chemical composition, volatile profile and mechanical properties”. *Analytica Chimica Acta* 732 (6): 105–13.
239. Ronquist, F., és J. P. Huelsenbeck. 2003. „MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models”. *Bioinformatics* 19 (12): 1572–74.
240. Rossman, A. Y., G. C. Adams, P. F. Cannon, és mtsai. 2015. „Recommendations of generic names in *Diaporthales* competing for protection or use”. *IMA Fungus* 6 (1): 145–54.
241. Rousseau, S., és B. Donèche. 2001. „Effects of water activity (aW) on the growth of some epiphytic micro-organisms isolated from grape berry”. *Vitis* 40 (2): 75–78.
242. Ruan, Y.-L., Y. Jin, Y.-J. Yang, G.-J. Li, és J. S. Boyer. 2010. „Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat”. *Molecular Plant* 3 (6): 942–55.
243. Rusjan, D., M. Persic, M. Likar, K. Biniari, és M. Mikulic-Petkovsek. 2017. „Phenolic responses to Esca-associated fungi in differently decayed grapevine woods from different trunk parts of ‘cabernet sauvignon’”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (31): 6615–24.

244. Santos, L., A. Alves, és R. Alves. 2017. „Evaluating multi-locus phylogenies for species boundaries determination in the genus *Diaporthe*”. *PeerJ* 5 (3): e3120.
245. Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, és mtsai. 2012. „Fiji: an open-source platform for biological-image analysis”. *Nature Methods* 9 (7): 676–82.
246. Schneider, C. A, W. S. Rasband, és K. W. Eliceiri. 2012. „NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis”. *Nature Methods* 9 (7): 671–75.
247. Schug, Z. T. 2018. „Formaldehyde detoxification creates a new wheel for the folate-driven one-carbon “Bi”-cycle”. *Biochemistry* 57 (6): 889–90.
248. Senanayake, I. C., S. S. N. Maharachchikumbura, K. D. Hyde, és mtsai. 2015. „Towards unraveling relationships in *Xylariomycetidae* (*Sordariomycetes*)”. *Fungal Diversity* 73 (1): 73–144.
249. Sham, A., A. Al-Azzawi, S. Al-Ameri, és mtsai. 2014. „Transcriptome analysis reveals genes commonly induced by *Botrytis cinerea* infection, cold, drought and oxidative stresses in *Arabidopsis*”. *PLoS ONE* 9 (11): e113718.
250. Shang, Y., X. Li, H. Cui, és mtsai. 2006. „RAR1, a central player in plant immunity, is targeted by *Pseudomonas syringae* effector AvrB”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (50): 19200–19205.
251. Siebert, T. E., C. Wood, G. M. Elsey, és A. P. Pollnitz. 2008. „Determination of rotundone, the pepper aroma impact compound, in grapes and wine”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (10): 3745–48.
252. Silva-Valderrama, I., D. Toapanta, M. A. Miccono, és mtsai. 2021. „Biocontrol potential of grapevine endophytic and rhizospheric fungi against trunk pathogens”. *Frontiers in Microbiology* 11 (1): 614620.
253. Silvestro, D., és I. Michalak. 2012. „raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML”. *Organisms Diversity & Evolution* 12 (4): 335–37.
254. Sipiczki, M. 2003. „*Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 (6): 2079–83.
255. Smith, J. E, B. Mengesha, H. Tang, T. Mengiste, és B. H. Bluhm. 2014. „Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* involves widespread transcriptional reprogramming”. *BMC Genomics* 15 (1): 334.
256. Songy, A., J. Vallet, M. Gantet, és mtsai. 2019. „Sodium arsenite effect on *Vitis vinifera* L. physiology”. *Journal of Plant Physiology* 238 (7): 72–79.
257. Sosnowski, M. R., R. Lardner, T. J. Wicks, és E. S. Scott. 2007. „The influence of grapevine cultivar and isolate of *Eutypa lata* on wood and foliar symptoms”. *Plant Disease* 91 (8): 924–31.
258. Staden, R., K. F. Beal, és J. K. Bonfield. 1999. „The Staden package, 1998”. In *Bioinformatics Methods and Protocols*, by Stephen Misener és Stephen A. Krawetz, köt. 132. Humana Press.
259. Stamatakis, A. 2014. „RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies”. *Bioinformatics* 30 (9): 1312–13.
260. Stortenbeker, N., és M. Bemer. 2019. „The SAUR gene family: the plant’s toolbox for adaptation of growth and development”. *Journal of Experimental Botany* 70 (1): 17–27.
261. Stöver, B. C., és K. F. Müller. 2010. „TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses”. *BMC Bioinformatics* 11 (1): 7.
262. Strobel, G. A., B. Knighton, K. Kluck, és mtsai. 2008. „The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072)”. *Microbiology* 154 (11): 3319–28.
263. Styger, G., B. Prior, és F. F. Bauer. 2011. „Wine flavor and aroma”. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38 (9): 1145–59.

264. Sun, X., J. T. Matus, D. C. J. Wong, és mtsai. 2018. „The GARP/MYB-related grape transcription factor AQUILLO Improves cold tolerance and promotes the accumulation of raffinose family oligosaccharides”. *Journal of Experimental Botany* 69(7): 1749–64.
265. Sun, Z.-B., S.-D. Li, Q. Ren, J.-L. Xu, X. Lu, és M.-H. Sun. 2020. „Biology and applications of *Clonostachys rosea*”. *Journal of Applied Microbiology* 129 (3): 486–95.
266. Szabó, József. 1867. *Tokaj-Hegyaljai Album*. Emich Gusztáv.
267. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, és S. Kumar. 2013. „MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0”. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12): 2725–29.
268. Tanaka, K., Y. Harada, és M. E. Barr. 2005. „Bambusicolous fungi in Japan (3): a new combination, *Kalmusia scabrispora*”. *Mycoscience* 46 (2): 110–13.
269. Tedersoo, L., M. Bahram, S. Põlme, és mtsai. 2014. „Global diversity and geography of soil fungi”. *Science* 346 (6213): 1256–88.
270. The UniProt Consortium. 2015. „UniProt: a hub for protein information”. *Nucleic Acids Research* 43 (D1): D204–12.
271. Thibon, C., S. Shinkaruk, M. Jourdes, B. Bennetau, D. Dubourdieu, és T. Tominaga. 2010. „Aromatic potential of botrytized white wine grapes: identification and quantification of new cysteine-S-conjugate flavor precursors”. *Analytica Chimica Acta* 660 (1–2): 190–96.
272. Torres-Vera, R., J. M. García, M. J. Pozo, és J. A. López-Ráez. 2014. „Do strigolactones contribute to plant defence?” *Molecular Plant Pathology* 15 (2): 211–16.
273. Trotel-Aziz, P., E. Abou-Mansour, B. Courteaux, és mtsai. 2019. „*Bacillus subtilis* PTA-271 counteracts botryosphaeria dieback in grapevine, triggering immune responses and detoxification of fungal phytotoxins”. *Frontiers in Plant Science* 10 (1): 25.
274. Ubrizsy, G. 1965. *Növénykórtan*. Második, átdolgozott és bővített kiadás. II. Akadémiai Kiadó.
275. Unwin, T. 2005. *Wine and the vine: an historical geography of viticulture and the wine trade*. Routledge.
276. Urbanek, A. K., W. Rymowicz, M. C. Strzelecki, W. Kociuba, Ł. Franczak, és A. M. Mirończuk. 2017. „Isolation and characterization of arctic microorganisms decomposing bioplastics”. *AMB Express* 7 (1): 148.
277. Úrbez-Torres, J. R., J. Hrycan, M. Hart, P. Bowen, és T. Forge. 2020. „Grapevine trunk disease fungi: their roles as latent pathogens and stress factors that favour disease development and symptom expression”. *Phytopathologia Mediterranea* 59 (3): 395–424.
278. Váczy, K. Z. 2017. „First report of *Seimatosporium vitis* associated with grapevine trunk disease symptoms in Hungary”. *Plant Disease* 101 (1): 253.
279. Váczy, K. Z., E. Sándor, L. Karaffa, és mtsai. 2008. „Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards”. *Phytopathology* 98 (12): 1312–19.
280. Váczy, K. Z., M. Z. Németh, A. Csikós, G. M. Kovács, és L. Kiss. 2018. „*Dothiorella omnivora* isolated from grapevine with trunk disease symptoms in Hungary”. *European Journal of Plant Pathology* 150 (3): 817–24.
281. Van Kan, J. A. L., J. H. M. Stassen, A. Mosbach, és mtsai. 2017. „A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*”. *Molecular Plant Pathology* 18 (1): 75–89.
282. Van Etten, H. D., J. W. Mansfield, J. A. Bailey, és E. E. Farmer. 1994. „Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus »phytoanticipins«”. *The Plant Cell*, szeptember 1, 1191–92.
283. Verkley, G. J. M., K. Dukik, R. Renfurm, M. Göker, és J. B. Stielow. 2014. „Novel genera and species of *Coniothyrium*-like fungi in *Montagnulaceae* (Ascomycota)”. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 32 (1): 25–51.
284. Viccini, G., M. Mannich, D. M. F. Capalbo, R. Valdebenito-Sanhueza, és D. A. Mitchell. 2007. „Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries”. *Process Biochemistry* 42 (2): 275–78.

285. Vicente, J., Y. Baran, E. Navascués, és mtsai. 2022. „Biological management of acidity in wine industry: a review”. *International Journal of Food Microbiology* 375 (8): 109726.
286. Vojtovič, D., L. Luhová, és M. Petřivalský. 2021. „Something smells bad to plant pathogens: production of hydrogen sulfide in plants and its role in plant defence responses”. *Journal of Advanced Research* 27 (1): 199–209.
287. Walker, A.-S. 2016. „Diversity within and between species of *Botrytis*”. In *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*, szerkesztette Sabine Fillinger és Yigal Elad. Springer International Publishing.
288. Walker, A.-S., P. Gladieux, V. Decognet, és mtsai. 2015. „Population structure and temporal maintenance of the multihost fungal pathogen *Botrytis cinerea*: causes and implications for disease management”. *Environmental Microbiology* 17 (4): 1261–74.
289. Wang, M., A. Vannozzi, G. Wang, és mtsai. 2014. „Genome and transcriptome analysis of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family”. *Horticulture Research* 1 (1): 14016.
290. Wang, S., H. Chen, X. Tang, és mtsai. 2020. „The role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in NADPH supply in the oleaginous filamentous fungus *Mortierella alpina*”. *Frontiers in Microbiology* 11 (4): 818.
291. Wang, W.-Y., W.-L. Kong, Y.-C.-Z. Liao, és L.-H. Zhu. 2022. „Identification of *Bacillus velezensis* SBB and its antifungal effects against *Verticillium dahliae*”. *Journal of Fungi* 8 (10): 1021.
292. Wedler, H., R. Pemberton, és D. Tantiello. 2015. „Carbocations and the complex flavor and bouquet of wine: mechanistic aspects of terpene biosynthesis in wine grapes”. *Molecules* 20 (6): 10781–92.
293. Wenneker, M., K. T. K. Pham, L. C. Boekhoudt, és mtsai. 2017. „First report of *Neofabraea kienholzii* causing bull’s eye rot on pear (*Pyrus Communis*) in the Netherlands”. *Plant Disease* 101 (4): 634.
294. White, T. J., T.D. Bruns, S.B. Lee, és J. W. Taylor. 1990. „Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”. In *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual*. Academic Press.
295. Wickham, H. 2016. *ggplot2*. Use R! Springer International Publishing.
296. Williamson, B., B. Tudzynski, P. Tudzynski, és J. A. L. Van Kan. 2007. „*Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease”. *Molecular Plant Pathology* 8 (5): 561–80.
297. Wingfield, P. 1998. „Protein precipitation using ammonium sulfate”. *Current Protocols in Protein Science* 13 (1).
298. Wockenfuss, A., K. Chan, J. G. Cooper, és mtsai. 2024. „A *Bacillus velezensis* strain shows antimicrobial activity against soilborne and foliar fungi and oomycetes”. *Frontiers in Fungal Biology* 5 (2): 1332755.
299. Woods, D. R., és E. A. Bevan. 1968. „Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*”. *Journal of General Microbiology* 51 (1): 115–26.
300. Xie, C., X. Mao, J. Huang, és mtsai. 2011. „KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases”. *Nucleic Acids Research* 39 (suppl_2): W316–22.
301. Xie, Y., L. Fang, X. Mao, J. Wu, L. Wang, és H. Wang. 2022. „First report of *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* causing spot blight of pear (*Pyrus pyrifolia*) in Zhejiang province of China”. *Plant Disease* 106 (8): 2259.
302. Yacoub, A., J. Gerbore, N. Magnin, és mtsai. 2016. „Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeomoniella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease”. *Biological Control* 92 (1): 7–16.
303. Yacoub, A., D. Renault, R. Haidar, és mtsai. 2024. „Impact of the biocontrol product, Esquive WP, on the indigenous grapevine wood microbiome after a 6-year application period”. *Journal of Fungi* 10 (8): 566.

304. Youssef, K., és S. R. Roberto. 2014. „Salt strategies to control botrytis mold of ‘Benitaka’ table grapes and to maintain fruit quality during storage”. *Postharvest Biology and Technology* 95 (9): 95–102.
305. Yu, J., M. Zhu, M. Bai, Y. Xu, S. Fan, és G. n Yang. 2020. „Effect of calcium on relieving berry cracking in grape (*Vitis vinifera* L.) ‘Xiangfei’”. *PeerJ* 8 (9): e9896.
306. Zañfaño, L., G. Carro-Huerga, Á. Rodríguez-González, és mtsai. 2025. „Biosolutions from native *Trichoderma* strains against grapevine trunk diseases”. *Agronomy* 15 (8): 1901.
307. Zorraonaindia, I., S. M. Owens, P. Weisenhorn, és mtsai. 2015. „The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota”. *mBio* 6 (2): e02527-14.
308. Zea, L., M. P. Serratos, J. Mérida, és L. Moyano. 2015. „Acetaldehyde as key compound for the authenticity of sherry wines: a study covering 5 decades”. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14 (6): 681–93.
309. Zeng, Y., Q. Yu, és S. Cheng. 2022. „Effects of *Bacillus velezensis* Zk1 on the physiology and metabolism of peaches”. *International Journal of Food Science & Technology* 57 (4): 2203–15.
310. Zenoni, S., M. Fasoli, F. Guzzo, és mtsai. 2016. „Disclosing the molecular basis of the postharvest life of berry in different grapevine genotypes”. *Plant Physiology* 172 (3): 1821–43.
311. Zhang, Y., J. Zhang, Z. Wang, és mtsai. 2014. „Neotypification and phylogeny of *Kalmusia*”. *Phytotaxa* 176 (1): 164.
312. Zhang, Y., X. Gao, J. Liu, és Y. Ge. 2015. „Pilot production of *Clonostachys rosea* conidia in a solid-state fermentor optimized using response surface methodology”. *Engineering in Life Sciences* 15 (8): 772–78.

10. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Otto, Margot; Geml, József; Hegyi, Ádám István; Hegyi-Kaló, Júlia; Pierneef, Rian; Pogány, Miklós; Kun, József; Gyenesei, Attila; **Váczy, Kálmán Zoltán**✉ (2022) *Botrytis cinerea* expression profile and metabolism differs between noble and grey rot of grapes. **FOOD MICROBIOLOGY** 106: 104037, 9 p.
2. Otto, Margot; Geml József; Hegyi, Ádám István; Hegyi-Kaló, Júlia; Kun, József; Gyenesei, Attila; **Váczy, Kálmán Zoltán**✉ (2023) Metatranscriptomic analyses of grapes reveal differences in expressed functional genes of filamentous and yeast fungi during noble rot and grey rot. **FUNGAL ECOLOGY** 65: 101277, 14 p.
3. **Váczy, Kálmán Zoltán**✉, Otto, Margot, Gomba-Tóth, Adrienn, Geiger, Adrienn, Golen, Richárd, Hegyi-Kaló, Júlia, Cels, Thomas, Geml, József, Zsófi, Zsolt, Hegyi, Ádám István (2024) *Botrytis cinerea* causes different plant responses in grape (*Vitis vinifera*) berries during noble and grey rot: diverse metabolism versus simple defence. **FRONTIERS IN PLANT SCIENCE** 15 p. 1433161, 15 p.
4. Hegyi-Kaló, Júlia; Holb, Imre; Lengyel, Szabina; Juhász, Ákos; **Váczy, Kálmán Zoltán** (2019) Effect of year, sampling month and grape cultivar on noble rot incidence, mycelial growth rate and morphological type of *Botrytis cinerea* during noble rot development. **EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY** 155: 339-348.
5. Hegyi-Kaló, Júlia; Hegyi, Ádám István; Geml, József; Zsófi, Zsolt; Pálfi, Xénia; **Váczy, Kálmán Zoltán**✉ (2020) Physico-chemical characteristics and culturable microbial communities of grape berries change strongly during noble rot development. **PLANTS-BASEL** 9: 1809, 12 p.
6. Hegyi, Ádám István; Otto, Margot; Geml, József; Hegyi-Kaló, Júlia; Kun, József; Gyenesei, Attila; Pierneef, Rian; **Váczy, Kálmán Zoltán**✉ (2022) Metatranscriptomic analyses reveal the functional role of *Botrytis cinerea* in biochemical and textural changes during noble rot of grapevines. **JOURNAL OF FUNGI** 8: 4 Paper: 378, 17 p.
7. Hegyi, Ádám István; Otto, Margot; Geml, József; Hegyi-Kaló, Júlia; Geiger, Adrienn; Golen, Richárd; Gomba-Tóth, Adrienn; **Váczy, Kálmán Zoltán**✉ (2023) The origin of the particular aroma of noble rot wines: various fungi contribute to the development of the aroma profile of botrytised grape berries. **OENO ONE** 57: 165-176.
8. Geiger, Adrienn; Karácsony, Zoltán; Golen, Richárd; **Váczy, Kálmán Zoltán**✉; Geml, József (2022) The compositional turnover of grapevine-associated plant pathogenic fungal communities are greater among intraindividual microhabitats and terroirs than among healthy and Esca-diseased plants. **PHYTOPATHOLOGY** 112: 1029-1035.

9. Karácsony, Zoltán; Mondello, Vincenzo; Fontaine, Florence; **Váczy, Kálmán Zoltán** (2023) The potential role of *Aureobasidium pullulans* in the development of foliar symptoms of Esca disease in grapevine. **OENO ONE** 57 :189-203.
10. Geiger, Adrienn; Karácsony, Zoltán; Geml, József; **Váczy, Kálmán Zoltán**✉ (2022) Mycoparasitism capability and growth inhibition activity of *Clonostachys rosea* isolates against fungal pathogens of grapevine trunk diseases suggest potential for biocontrol. **PLOS ONE** 17: 9 p. e0273985
11. Szabó, Dóra; Molnár, Nikolett; Geiger, Adrienn; Karácsony, Zoltán; Váczy, Kálmán Zoltán (2023) In vitro characterization of a *Bacillus velezensis* isolate as an antagonist of grapevine trunk disease pathogens. **ACTA PHYTOPATHOLOGICA ET ENTOMOLOGICA HUNGARICA** 58: 156-167.
12. Karácsony, Zoltán; Knapp, Dániel G.; Lengyel, Szabina; Kovács, Gábor M.; **Váczy, Kálmán Zoltán**✉ (2021) The fungus *Kalmusia longispora* is able to cause vascular necrosis on *Vitis vinifera*. **PLOS ONE** 16: 10 Paper: e0258043,
13. Lengyel, Szabina; Knapp, Dániel G; Karácsony, Zoltán; Geml, József; Tempfli, Balázs; Kovács, Gábor M.; **Váczy, Kálmán Zoltán**✉ (2020) *Neofabraea kienholzii*, a novel causal agent of grapevine trunk diseases in Hungary. **EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY** 158: 975-984.
14. **Váczy, Kálmán Zoltán**; Németh, Z. Márk; Csikós, Anett; Kovács, M. Gábor; Kiss, Levente (2018) *Dothiorella omnivora* isolated from grapevine with trunk disease symptoms in Hungary. **EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY** 150: 817-824.

Az értekezés témájához kapcsolódó további közlemények

1. **Váczy, Kálmán Zoltán**, Szabó Dóra, Molnár Nikolett, Kiss Tibor, Kiss Levente, Tan Yu Pei, Novák Ádám, Pálfi Xénia, Gomba-Tóth Adrienn, Karácsony Zoltán. (2025) *Microdochium majus* isolated from grapevine is a mycoparasite of *Botrytis cinerea*. **JOURNAL OF FUNGI** 11(1): 31. 13 pp.
2. Bene, Zsuzsanna; Hegyi, Ádám István; Weninger, Hannes; **Váczy, Kálmán Zoltán** (2025) *Metschnikowia pulcherrima* as a tool for sulphite reduction and enhanced volatile retention in noble rot wine fermentation **FERMENTATION** 11: 9 Paper: 491.
3. Kiss, Tibor; Karácsony, Zoltán; Gomba-Tóth, Adrienn; Szabadi, Krisztina Lilla; Spitzmüller, Zsolt; Hegyi-Kaló, Júlia; Cels, Thomas; Otto, Margot; Golen, Richárd; Hegyi, Ádám István; Geml, József; **Váczy, Kálmán Zoltán** (2024) A modified CTAB method for the extraction of high-quality RNA from mono and dicotyledonous plants rich in secondary metabolites. **PLANT METHODS** 20, 62. 7pp.
4. Hegyi-Kaló, Júlia; Golen, Richárd; Karácsony, Zoltán; Gomba-Tóth, Adrienn; Cels, Thomas; Hegyi, Ádám István; **Váczy, Kálmán Zoltán** ✉ (2024) Geospatial share of fungicide resistant *Botrytis cinerea* mutations in the Tokaj and Eger wine regions according to local pest management strategies **ACTA PHYTOPATHOLOGICA ET ENTOMOLOGICA HUNGARICA** 59: 4-16.

5. Karácsony, Zoltán; Molnár, Nikolett; Szabó, Dóra; Bakos-Barczi, Nóra; Lovas, Miklós; Pálfi, Xénia; **Váczy, Kálmán Zoltán** (2024) Biofilm formation by the fungus *Phaeomoniella chlamydospora*: a causal agent of esca disease of grapevine **MYCOLOGICAL PROGRESS** 23: 36.
6. Leal, Carla Mota; Geiger, Adrienn; Molnár, Anna; **Váczy, Kálmán Zoltán**; Kgobe, Glodia; Zsófi, Zsolt; Geml, József (2024) Disentangling the effects of terroir, season, and vintage on the grapevine fungal pathobiome **FRONTIERS IN MICROBIOLOGY** 14 Paper: 1322559
7. Pogány, Miklós; Dankó, Tamás; Hegyi-Kaló, Júlia; Kámán-Tóth, Evelin; Szám, Dorottya Réka; Hamow, Kamirán Áron; Kalapos, Balázs; Kiss, Levente; Fodor, József; Gullner, Gábor; **Váczy, Kálmán Zoltán**; Barba, Balázs (2022) Redox and hormonal changes in the transcriptome of grape (*Vitis vinifera*) berries during natural noble rot development **PLANTS-BASEL** 11: 7 Paper: 864.
8. Pálfi, Xénia; Lovas, Miklós; Zsófi, Zsolt; Kátai, János; Karácsony, Zoltán; **Váczy, Kálmán Zoltán** (2021) Paraffin oil induces resistance against powdery mildew in grapevine through salicylic acid signaling **PEST MANAGEMENT SCIENCE** 77: 10 pp. 4539-4544.
9. Knapp, Dánile; Lázár, Anna; Molnár, Anna; Vajna, Balázs; Karácsony, Zoltán; **Váczy, Kálmán Zoltán**; Kovács, M. Gábor. (2021) Above-ground parts of white grapevine *Vitis vinifera* cv. Furmint share core members of the fungal microbiome **ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY REPORTS** 13: 4 pp. 509-520.
10. Pálfi, Xénia; Karácsony, Zoltán; Csikós, Anett; Bencsik, Ottó; Szekeres, András; Zsófi, Zsolt; **Váczy, Kálmán Zoltán** (2020) The potential use of the culture filtrate of an *Aspergillus niger* strain in the management of fungal diseases of grapevine **JOURNAL OF CENTRAL EUROPEAN AGRICULTURE** 21: 4 pp. 839-850.
11. Mondello, Vincenzo; Larignon, Philippe; Armengol, Josep; Kortekamp, Andreas; **Váczy, Kálmán Zoltán**; Prezman, Fanny; Serrano, Eric; Rego, Cecilia; Mugnai, Laura; Fontaine, Florence (2018) Management of grapevine trunk diseases: knowledge transfer, current strategies and innovative strategies adopted in Europe **PHYTOPATHOLOGIA MEDITERRANEA** 57: 3 pp. 369-383.
12. Guarnaccia, Vladimiro; Groenewald, Johannes, Zacharias; Woodhall, James; Armengol, Joseph; Cinelli, Tamara; Eichmeier, Ales; Ezra, David; Fontaine, Florence; Gramaje, David; Gutierrez-Aguirregabiria, Ane; Kaliterna, Joško; Kiss, Levente; Larignon, Philippe; Luque, Jordi; Mugnai, Laura; Naor, Vered; Raposo, Rosa; Sándor, Erzsebet; **Váczy, Kálmán Zoltán**; Crous, Pedro Willem (2018) *Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe **PERSOONIA** 40: 135-153.