



**Magyar Agrár – és Élettudományi Egyetem**

***A *Botrytis cinerea* által okozott  
nemesrothadásos folyamatok vizsgálata***

DOI: 10.54598/002220

**Hegyi-Kaló Júlia**

Budapest

2021

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** **Simonné Prof. Dr. Sarkadi Livia**

Egyetemi tanár, DSc.

Magyar Agrár – és Élettudományi Egyetem

Élelmiszertudományi Intézet

Élelmiszerkémiai és Táplálkozástudományi Tanszék

**Témavezetők:** **Dr. Váczy Kálmán Zoltán**

Tudományos főmunkatárs

Eszterházy Károly Katolikus Egyetem

Kutatási és Fejlesztési Központ

Élelmiszertudományi és Borászati Tudásközpont

**Dr. Pomázi Andrea**

Egyetemi docens

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élelmiszertudományi Intézet

Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

**A doktori iskola- és a témavezetők jóváhagyó aláírása:**

A jelölt a Magyar Agrár – és Élettudományi Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárására bocsátható.

.....

Az iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

## TARTALOM

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	6
<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	7
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	9
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	10
3.1. A <i>Botrytis cinerea</i> biológiája.....	10
3.1.1. A <i>B. cinerea</i> életciklusa .....	10
3.1.2. A <i>B. cinerea</i> taxonómiája, identifikálása, variabilitása.....	12
3.1.3. A környezeti tényezők, a <i>B. cinerea</i> morfológiája és a nemesrothadás kapcsolatrendszere .....	14
3.1.4. A <i>B. cinerea</i> patogenitása .....	15
3.2. A botritisz szőlészeti, borászati jelentősége .....	16
3.2.1. A szürkerothadás .....	17
3.2.2. A nemesrothadás .....	19
3.2.3. Botritiszes borok a világban.....	22
3.3. A szőlőbogyó fizikai tulajdonságai .....	24
3.4. Az aszúbogyó kémiai sajátosságai.....	25
3.5. Az ép és aszúbogyó mikrobiotája .....	27
<b>4. ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	29
4.1. Mintagyűjtés .....	29
4.1.1. Mintagyűjtés területei .....	29
4.1.1.1. Egri borvidék.....	29
4.1.1.2. Tokaji borvidék .....	30
4.1.2. A mintagyűjtés módszerei.....	31
4.2. A szőlőbogyók fizikai tulajdonságainak mérése .....	33
4.3. A szőlőbogyók kémiai tulajdonságainak vizsgálata .....	34
4.4. Szőlőbogyók mikrobiológiai vizsgálata .....	35
4.4.1. Törzsgyűjtemény kialakítása.....	35

4.4.2. Morfológiai vizsgálatok .....	36
4.4.2.1. <i>B. cinerea</i> növekedési profil vizsgálat és morfológiai csoportok meghatározása .....	36
4.4.2.2. Élesztőgombák morfológiája.....	37
4.4.2.3. Összes élesztő- és penészs szám vizsgálata .....	37
4.4.3. Gombák molekuláris azonosítása.....	38
4.4.3.1. DNS kivonás és rDNS amplifikáció.....	38
4.4.3.2. Szekvenálás, szekvencia elemzések .....	39
4.5. Statisztikai módszerek .....	39
4.5.1. <i>B. cinerea</i> növekedési profil és morfológia eredményeinek statisztikai elemzése .....	39
4.5.2. A botritizálódási stádiumok fizikai-kémiai-mikrobiológiai összefüggéseinek statisztikai elemzése .....	40
<b>5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....</b>	<b>45</b>
5.1. Mikroorganizmusok törzsgyűjteménye .....	45
5.2. Környezeti tényezők hatása a <i>B. cinerea</i> fejlődésére .....	47
5.3. Környezeti tényezők hatása a <i>B. cinerea</i> morfológiai típusaira .....	52
5.4. A szőlőbogyó fizikai tulajdonságainak változása a nemesrothadás során.....	58
5.5. A szőlőbogyó kémiai tulajdonságainak változása a nemesrothadás során.....	61
5.6. A szőlőbogyó mikrobiótájának változása a nemesrothadás során.....	65
5.6.1. Az élesztőgombák morfológiája és az összes élesztő- és penészs szám meghatározásának eredményei .....	65
5.6.2. Molekuláris azonosítás eredményei .....	67
5.7. A fizikai-kémiai-mikrobiológiai változók és a nemesrothadás közötti kapcsolat feltárása.....	71
<b>6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....</b>	<b>79</b>
<b>7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>81</b>
<b>8. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>83</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>86</b>

<b>10. MELLÉKLETEK</b> .....	88
<b>Irodalomjegyzék</b> .....	88
<b>További melléletek</b> .....	100
<b>Fontosabb publikációk</b> .....	103
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	105

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	Angol megfelelő	Magyar megfelelő
AIC cwt	Akaike Information Criterion contribution weight	Akaike információs kritériumok
ANOVA	Analyses of Variance	Varianciaanalízis
BH	Berry hardness	Bogyókeménység
C	Cultivar	Szőlőfajta
Ct	Collection time	Szüretidőpont
Esk	Elastic modulus (Young's modulus)	Rugalmassági tényező
F	<i>Furmint</i>	<i>Furmint</i>
FD	Frequency distribution	Eloszlási gyakoriság
Fsk	Berry skin break force	Bogyóhéj keménység
H	<i>Hárslevelű</i>	<i>Hárslevelű</i>
LSD	Least Significant Difference	Legkisebb szignifikáns különbség
M	Mycelial	Micéliális
NMDS	Non-metric multidimensional scaling	Nem metrikus többváltozós skálázás
Or	<i>Olaszrizling</i>	<i>Olaszrizling</i>
OTU	Operational Taxonomic Unit	Taxonómiai egységek
PCA	Principal Component analyses	Főkomponens analízis
PCR	Polymerase Chain Reaction	Polimeráz-lánreakció
permANOVA	Permutational Analyses of Variance	Permutációs többváltozós varianciaanalízis
Ph	Phase	Aszúsodási fázis
S	Sclerotial	Szkleróciális
Tu	<i>Turán</i>	<i>Turán</i>
Tukey HSD	Tukey's honestly significant difference	Tukey teszt
Wsk	Berry skin break energy	Bogyóhéj átszakításához szükséges munka
$\beta$ diversity	Beta diversity	Béta diverzitás

# 1. BEVEZETÉS

A *Botrytis cinerea* egy jól ismert növénypatogén gomba, több mint kétszáz különböző gazdanövényt képes fertőzni, ezért jeletős gazdasági károkat okozhat a mezőgazdaságban. A szőlőnövény esetében kétarcú gombaként is emlegetik, hiszen egyik oldalról kórokozó, ha a szürkerothadás megjelenik egy ültetvényben, a másik oldalról viszont áldásos tevékenységének köszönhetően jön létre a nemesrothadás, melynek eredményeként készülhet el az Európai oltalom alatt álló Tokaji aszúbor, valamint számos más ország borvidékeiről származó nemesrothadással érintett szőlőből készülő természetes édes borkülönlegességek.

A Tokaji aszúbor egyediségét a szemenként válogatott aszúszemek szüreteléséből készülő magas minőségű aszútészta adja. Hazánkban aszúszemnek a teljesen töppedt, ugyanakkor húsos textúrájú, lilás színű, a bogyófelszínen nem mutatkozó gombahifákkal átszótt szőlőszemeket nevezi a szőlészeti-borászati gyakorlat, tudományos elemzésekre alapozott definíció azonban jelenleg nem áll rendelkezésre az aszúszemre vonatkozóan.

A Tokaji borvidéken jelenleg érvényben lévő szabályozás szerint tokaji aszúbor hat helyi termesztésű szőlőfajtából készülhet: *Furmint*, *Hárslevelű*, *Kabar*, *Kövérshőlő*, *Sárgamuskotály*, *Zéta*. A hat szőlőfajta közül a *Furmint* és *Hárslevelű* található meg a legnagyobb arányban, ezért ezen fajták aszúszemei adják a tokaji aszúborok gerincét.

A nemesrothadás folyamata természetesen nem csak a tokaji szőlőültetvényeken jöhet létre, a Kárpát-medence más szőlőtermő régiójában is, más szőlőfajtákon is kialakulhat, nem válogatva kék és fehér szőlőfajta között, ezért a botritizálódás következtében kialakuló nemesen rothadt szőlőszemek begyűjtése és a belőle való bor készítése csupán az ott tevékenykedő emberi felismerésen múlik. A Tokaji aszú esetében több évszázad tapasztalata áll rendelkezésre és mind a mai napig létező borpiaci termék, ugyanakkor a kék szőlőből történő botritiszes édes vörös borok (vörös aszú) készítése a XX. század közepén megszakadt. Még az 1900-as évek első feléből találhatunk bizonyítékokat arra, hogy a Kárpát-medencében általános volt a vörös aszú készítése. Ilyen volt például a Ménesi aszú, amit *Kadarkából* készítettek, és őriznek egy 1902-es címkét is Villányi Vörös Aszú felirattal a szegedi Móra Ferenc Múzeumban. Az Egri borvidéken is, a borosgazdák legféltettebb kincse volt a természetes édes vörösbor, amit mindig teljes- és túlérésben szüretelt kékszőlőikből (október közepe és november

vége között) készítettek (Kleb 1978). Az egri természetes édes vörös aszúbor készítéséről szintén találunk feljegyzéseket az egri Főegyházmegyei Könyvtárban (Kleb 1978, Bodnár 2001). A korábban hagyományosan vörös aszú készítésre használt, elsősorban *Kadarka* változatok mára eltűntek a természetéből (például az Egri borvidékről a „lúdtalpú” *Kadarka*), vagy pedig csak nagyon kis termőterületeken található meg, így új erre alkalmas szőlőfajták felkutatására volt szükség. Az Eszterházy Károly Katolikus Egyetem helyi borászatokkal közösen végzett kutatásai megerősítették, hogy nem csak a jelenleg használt fajták alkalmasak aszú borok előállításra, hanem egyéb fehér- és kék szőlőfajták is (pl. *Olaszrizling, Turán*) (Kaló 2006).

Elsősorban a *B. cinerea* működésének tulajdonított nemesrothadás folyamatát máig egy összetett jelenségnek tartják, hiszen a gomba jelenlétén kívül számos környezeti és szőlészeti-borászati eljárásbeli tényező (borvidéki hagyományok, generációkon átívelő gyakorlati szokások, művelésmód stb.) befolyásolhatja a folyamatot, de tudományos igényességgel eddig elősorban a *B. cinerea* populációgenetikai tulajdonságait vizsgálták a nemesrothadás során.

Jól látható, hogy a nemesrothadás folyamata még sok szempontból nem képezi tudományos kutatás tárgyát, ezért munkám során egy komplex vizsgálati modellt dolgoztam ki, ami az aszús szőlőbogyókról származó *B. cinerea* izolátumok fenotípusos tulajdonságain kívül kitér a nemesrothadás folyamatának leírására, a szőlőbogyót érintő fizikai, kémiai változásokra és feltárja az aszúsodás során, a szőlőbogyón azonosítható mikrobiális változásokat.



## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A *B. cinerea*, úgynevezett „kétarcú” gomba növénykórtani vonatkozásai már számos oldalról feltártak, azonban a nemesrothadásban betöltött szerepének vizsgálata még sok kihívást rejt magában, hiszen a jelenlegi szőlész-borász szakma előtt még ma is viszonyítási alapul szolgáló 1867-es Tokaj-Hegyaljai Album állításai, illetve a termékleírások is tartalmazzák mára elavultnak számító állításokat, a legtöbb megfogalmazásban csupán a cukortartalom, vagyis refrakció százalék alapján határozzák meg az aszúszemeket és utalnak az aszúsodás folyamatára. A termékleírásokban ugyan szerepel kiegészítés arra vonatkozóan, hogy milyen is a „jó” aszúszem, mely megfogalmazás elsősorban az aszúbogyó organoleptikus és texturális paramétereire utal - „külsőleg hamvas, csokoládébarna, belsejükben sárgásbarna, barna színűek”, valamint „húsállományuk zsíros tapintású” -, azonban ezen megállapítások ritkán alátámasztottak tudományos igényességgel. A fenti gondolatok alapján munkám céljait a következő kérdések határozzák meg:

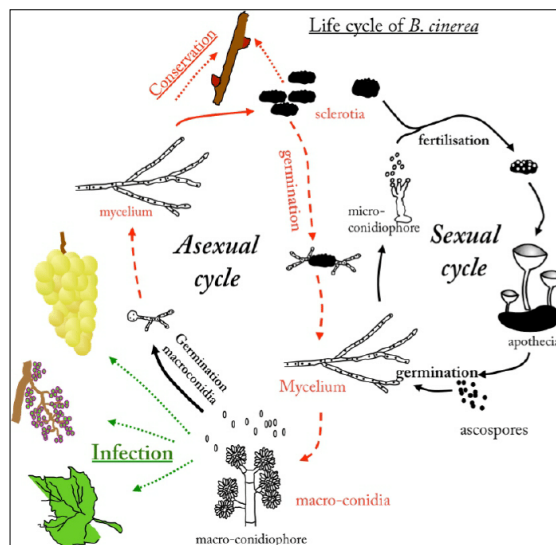
1. Kimutatható-e összefüggés a *B. cinerea* populáció összetétele és a környezeti paraméterek között (évjárat, szüretidőpont)?
2. A populáció homogenitását hogyan mutatják a morfológiai, élettani tényezők?
3. Hogyan változik a szőlőbogyók fizikai tulajdonsága a botritizálódás során?
4. Hogyan változik a szőlőbogyók kémiai tulajdonsága a botritizálódás során?
5. Hogyan változik a szőlőbogyók mikrobiótája a botritizálódás során?
6. Hogyan definiálható a „jó” aszúszem és a nemesrothadás folyamata a vizsgált változók közötti kapcsolatrendszer elemzésének eredményei alapján?

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A *Botrytis cinerea* biológiája

A *B. cinerea* (teleomorf: *Botryotinia fuckeliana*) egy aszkomikóta, nekrotrof növénypatogén gomba, amely több, mint 200 elsősorban mérsékeltövi gazdanövényt képes fertőzni világszerte (paradicsom, szőlő, kivi, eper, szeder stb.), ezért jelentős figyelemre tett szert a biológiai kutatásokban (Holz et al. 2007). A szőlőtermesztéshez kapcsolódóan kettős szerepben ismerjük, hiszen egyrészt az egyik legelterjedtebb növényi megbetegedés, a szürkerothadás kórokozója, a másik oldalról viszont az egyik legmagasabb minőségű borkülönlegesség – az aszúbor alapanyagának, az aszúszemnek – a létrejöttében vesz részt (Magyar 2011, Elad és Fillinger 2016).

##### 3.1.1. A *B. cinerea* életciklusa



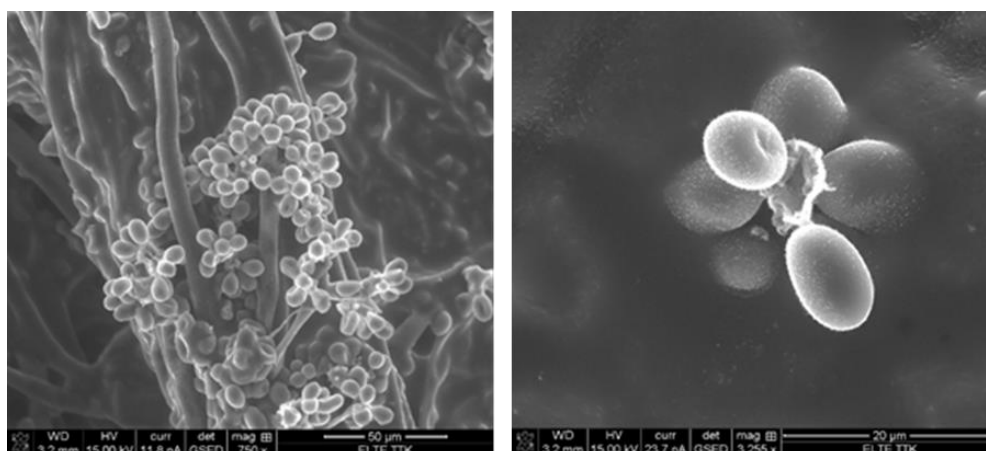
1. ábra: A *B. cinerea* életciklusa (Billard et al. 2011)

A *B. cinerea* életciklusa ivaros és ivartalan szakaszokra osztható (1. ábra). Az ivaros szakasz nem jellemző a természetben, laboratóriumi körülmények között indukálva azonban megfigyelhető. Ennek köszönhetően a 2013-ban Bari-ban megrendezésre kerülő *Botrytis* szimpóziumon megállapodás született, miszerint a kórokozó nemzetség nevéként a *Botrytis* nevet használjuk és nem pedig a *Botryotinia* (ivaros nemzetség név) nevet (Walker et al. 2011, 2015, Elad et al. 2016). Az ivaros és az

ivartalan életciklus szempontjából is a szkleróciumként elnevezett kitartóképletek a legfontosabbak, hiszen innen fejlődik ki a konidiumtartó (ivartalan) vagy az apotécium (ivaros) (Giraud et al. 1997, Giraud et al. 2006). A szklerócium külső, melanizált,  $\beta$ -glukánban gazdag fekete része a cortex, a belső, fehér része pedig a medulla. A szklerócium a belőle kifejlődni képes micéliumot hivatott megvédeni a kiszáradástól, UV sugárzástól és egyéb mikrobiális károsodástól. Az ivartalan életciklus során a szkleróciumból micélium fejlődik, majd a belőle kialakuló konidiumtartók először színtelenek, később szürkék, majd barnák és elágazók lesznek. A konidiumtartók végén egysejtű, ovális alakú makro-konidiospórák fűződnek le. (Williamson et al. 2007). Az ivaros szaporodási ciklusban a makro-konidiospórák helyett a keletkező mikro-konidiospórák (hím ivarú szaporítóképletek) termékenyítik meg a női ivarú szaporítóképletet, mely folyamatot aszkogámiának nevezünk. Az aszkogámia során aszkogén hifa alakul ki, melynek végén az aszkuszban aszkospórák találhatóak. Az aszkospórák tölcser alakú apotéciumban helyezkednek el, melyek sokaságából szklerócium jön létre. Az aszkuszban nyolc, egysejtű, ovális, színtelen aszkospóra található (Holz et al. 2007, Beaver és Weeds 2007).

A szaporítóképletek többféle módon is átvihetők az egyik gazdanövényről a másikra, például a maggal, ha a gomba a mag felületén vagy belsejében helyezkedik el, vegetatív úton szaporított fertőzött növényi részekkel vagy légmozgással, ami egyben a legfontosabb és leggyakoribb fertőzési mód is (Jarvis 1977, Wilcox 2007).

A *B. cinerea* jellegzetes szőlőfürt alakú konidiumtartói (Hennebert, 1973) jól felismerhetők az 2. ábrán lévő pásztázó elektronmikroszkópos felvételen. Ennek az egyedi karakternek köszönhetően könnyen megkülönböztethető.



2. ábra: *B. cinerea* konidiumtartók konidimokkal (saját felvétel)

### 3.1.2. A *B. cinerea* taxonómiája, identifikálása, variabilitása

A *Botrytis* P. Micheli („fürtöspenész”) nemzetségbe tartozó *B. cinerea* taxonómiai besorolását az 1. táblázat tartalmazza. A *Botrytis* nemzetséget először 1729-ben Pier Antonio Michelis írta le. A *Botrytis* fajok közül a leginkább ismert és vizsgált faj a *B. cinerea*, amely az újabb szakirodalomban fellelhető eredmények alapján inkább fajkomplexnek tekinthető, mint önálló fajnak, ami több filogenetikai fajt foglal magába (Williamson et al. 2007, Elad et al. 2007, Walker 2016).

1. táblázat: *B. cinerea* taxonómiai rendszerezése (Walker 2016)

Ország	<i>Fungi</i>
Divízió	<i>Ascomycota</i>
Osztály	<i>Leotiomycetes</i>
Rend	<i>Helotiales</i>
Család	<i>Sclerotiniaceae</i>
Génusz	<i>Botrytis</i>
Faj	<i>Botrytis cinerea</i>

A genetikai változékonyság megismerésének mélysége együtt változott az ehhez alkalmazott molekuláris biológiai módszerek fejlődésével. A *Botrytis* fajok elkülönítését először a fenotípusos jellemzőik és a gazdanövény specifitásuk alapján kezdték meg (Jarvis 1977, Grindle 1979, Baarlen et al. 2007, Lorenzini és Zapparoli 2014, Walker 2016). Mivel több faj is lehet fenotípusosan hasonló, és ráadásul a tenyésztési körülmények is befolyásolják a tulajdonságok kialakulását, így a fenotípus alapján történő faji elkülönítés nem tekinthetőek biztos módszereknek. A biológiai fajkonceptiók módszer alapja, hogy az ivaros és ivartalan szaporodási folyamatok alapján különítik el a fajokat. Az ivaros szaporodás *in vitro* formája azonban korlátozott, ezért ezt sem tekinthetjük biztos módszernek. A DNS szekvenálásával új, biztosabb eredményeket adó módszerek állnak rendelkezésünkre. Az identifikálásra (fajok elkülönítésére) alkalmas molekuláris módszerek közös jellemzője, hogy olyan szekvenciákat vizsgálnak, melyek az evolúció során alig változtak, vagy olyan tulajdonságot határoznak meg, melyek megléte adott fajra jellemző (Elad et al. 2016). Ilyen szekvenciák elsősorban az rDNS szakaszok, a gombáknál DNS barcod-ként alkalmazható ITS régió (Schoch et al. 2012). Giraud és munkatársai RFLP analízissel

vizsgálták a PCR reakcióval felszaporított rDNS lókuszt azonosítás céljából (1997), majd később sor került a *B. cinerea* transzpozon elemeinek azonosítására is (Boty és Flipper) (Levis et al. 1997, Ciliberti et al. 2015). A molekuláris módszerek fejlődésével RAPD és AFLP vizsgálatokat végeztek, majd a mikroszatellit lókuszt kezdték vizsgálni szekvenálással az erre tervezett primerekkel (Fournier et al. 2002, Moyano et al. 2003).

A *B. cinerea* változékonyságát általánosságban a heterokariózis és az aneuploidia jelenségének tulajdonítják, vizsgálatok szerint azonban a heterotallikus gomba két párosodási típusa mennyiségileg egyenlően oszlik meg. Ez egyértelmű bizonyítéka annak, hogy a *Botryotinia fuckeliana* szexuális reprodukcióra is képes a természetben. E tény a heterokariózisonál és az aneuploidianál valószínűleg sokkal jelentősebben hozzájárulhat a faj variabilitásához (Váczy et al. 2008).

A szexuális ciklus eredményeként létrejövő variabilitást az okozza, hogy a vegetatív fejlődési szakaszba úgy iktatódik be az ivaros rekombinációs szakasz, hogy csak idegen telepről származó hím és női ivarsejtek egyesülése eredményezhet megtermékenyülést. Az ivaros folyamatok során gaméta jellegű sejtek egyesülése játszódik le, azonban szomatikus gombasejtek között is bekövetkezhet hífaanasztomózis is. Az ivaros folyamat a különböző gombasejtek egyesülését engedi, míg az ivartalan kompatibilitási rendszerek az azonosságot részesítik előnyben, és védnek a kedvezőtlen genetikai hatásoktól. Az ilyen vegetatív kompatibilis csoportok (VCG) vizsgálatok is a genetikai változékonyságra kapunk választ. A VCG-k nagy száma és az ugyanabba a csoportba tartozó izolátumok limitált előfordulása jelzi, hogy a szexuális rekombináció fontos szerepet játszik a természetben előforduló *B. cinerea* populációk esetében (Beever and Weeds 2007, Walker 2016).

Az Egri borvidéken szőlőről gyűjtött izolátumok diverzitásának vizsgálata derített fényt arra, hogy a helyi populációk diverzek és képesek a szexuális reprodukcióra. Az alkalmazott markerek variabilitása ugyan alacsony volt, mégis nagy allélszámban és csak itt előforduló mutációs variációkban fordultak elő. A borvidéken belül a különböző termőhelyekről származó izolátumok populációi között földrajzi alapú elkülönülés nem volt tapasztalható, a szomszédos területek izolátumainak kivételével, melyek csekély mértékben ugyan, de eltértek a többi populációtól (Váczy et al. 2008).

### 3.1.3. A környezeti tényezők, a *B. cinerea* morfológiája és a nemesrothadás kapcsolatrendszer

Korábbi kutatások során több változó hatását vizsgálták már a *B. cinerea* populációk összetételére, mint például a gazdanövény, földrajzi elhelyezkedés, reprodukció típusa, mutációk jelenléte, transzpozon elemek jelenléte vagy hiánya (Ciliberti et al. 2015, Campia et al. 2017, Valero-Jiménez et al. 2019). Bokulich és munkatársai megállapították, hogy a nemesrothadás kialakulása igen összetett folyamat, hiszen a környezeti tényezők együttesen befolyásolják létrejöttét (2014). A környezeti tényezők között fontos a klimatikus elhelyezkedés, a szőlőfajta, az évszám, a kulturális hatások és maga a szőlőbogyó mikrobiótája is (Fournier et al. 2013, Blanco-Ulate et al. 2015), melyek együttesen hatnak a nemesrothadás folyamatára. A vizsgált környezeti hatások közül azonban a legdominánsabb a mikroklíma hatása, melynek a *B. cinerea* fenotípusára gyakorolt hatásáról a mai napig keveset tudunk (Martinez et al. 2003, 2005, Ribéreau-Gayon et al. 2006, Cantoral et al. 2011, Ciliberti et al. 2015 a,b, Elad és Fillinger 2016).

Magyarországon a nemesrothadás időszaka a szőlő éréséhez kapcsolódóan az őszi hónapokban jelenhet meg (szeptember, október november), hiszen a gomba ekkor tudja „megtámadni” a szőlőbogyókat anélkül, hogy megváltoztatná az ép bogyó héjszerkezetét. Ilyenkor a *B. cinerea* a már öregedő, cukor koncentrációjában jelentősen megváltozott szőlőbogyó szövetein belül terjed, (Meyer et al. 2000, Magyar 2011, Sanzani et al. 2012). Majd a valódi „rancos” héjszerkezetű, töppedt aszúszem kialakulásakor kívülről alig látható gombafonalak formájában van jelen a *B. cinerea*, melynek okai között említhető az aszúszem felületének alacsonyabb vízaktivitása. Rousseau és Doneche a vízaktivitás hatását vizsgálta a micélium és konidium növekedésre, megállapítva, hogy a *B. cinerea* növekedése erőteljesen lassul 0,93 vízaktivitási érték alatt (2001). Amennyiben elindul az aszúsodás folyamata, a nemesen rothadt szőlőszemek szüretelése jellemzően szeptember második felétől november végéig történik. Ezen időszak alatt különösen fontos szerepet játszanak az időjárási tényezők (hőmérséklet, csapadék, páratartalom) a botritizálódás folyamatában (Ribéreau-Gayon et al. 2006). A Tokaji borvidéken általában az őszi második felére alakulnak ki az aszúsodás számára ideális időjárási viszonyok, ezért a

később érésnek induló szőlőfajták jobb aszúsodási képességekkel rendelkeznek (például a *Furmint* és a *Hárslevelű*, de akár az *Olaszrizling* is).

Több tanulmány megerősítette, hogy a *B. cinerea* izolátumok fenotípusos tulajdonságai is változhatnak a szőlőfajta érettségi állapotától függően és az izolátumok fenotípusai is változhatnak az őszi hónapok függvényében (Martinez et al. 2003, 2005, Ciliberti et al. 2015 a, b). A *B. cinerea* izolátumok egyik alapvető fenotípusos tulajdonsága a micélium növekedésének sebessége (Youssef és Roberto 2014). Ha egy izolátum intenzív növekedést mutat, akkor az nagy valószínűséggel erősebb patogenitással rendelkezik, míg azok az izolátumok, melyek alacsonyabb patogenitást mutatnak, lassabb növekedési sebességgel rendelkeznek (Cantoral et al. 2011, Vallejo et al. 2003). Elsősorban francia borvidékeken aszúsodott szőlőbogyókról származó különböző *B. cinerea* törzsek fenotípusos tulajdonságait és morfológiai csoportjait már korábban leírták Martinez és munkatársai, illetve Lorenzini és munkatársa is (2003, 2014), miszerint az izolátumokat két fő morfológiai csoportra osztották, micéliálisokra és szkleróciálisokra.

#### 3.1.4. A *B. cinerea* patogenitása

A *B. cinerea* patogenitásának jelentőségét mutatja, hogy világszerte több, mint 200 gazdaságilag jelentős növényt tud megfertőzni (Williamson et al. 2007). A kórokozó elleni védekezés tervezhetősége nehéz folyamat, mivel a gomba fertőzési útvonala gazdanövényenként teljesen eltérő lehet, illetve micélium és/vagy szklerócium formájában hosszú ideig képes a túlélésre az elhalt növényi szöveteken. A patogén gomba a növény egyes részein, illetve szöveteiben telepszik meg, és a gazdanövény anyagcseretermékei segítik életműködését (Jakucs és Vajna 2003, Williamson et al. 2007). A behatolás a növényi szövetek sérülésein, gázcsere nyílásain vagy akár az ép szöveten keresztül is bekövetkezik. Leggyakrabban az elhalt növényi szövetekben képződő szkleróciumokból fejlődő konidiumok szóródása indítja el a fertőzést, ugyanakkor az érés folyamán a virágzás során kialakult „látens” fertőzések is aktiválódhatnak különböző mechanizmusok szerint, némely esetben jelentős rothadási folyamatokat eredményezve (Elmer és Michailides 2007).

A nemzetközi élelmiszer kereskedelem terjedésével még nagyobb jelentőség övezi a botritiszt, hiszen a hűtött tárolási és szállítási körülményeket elviselve is képes

fertőzni, ezzel jelentős gazdasági károkat okozva például a kivi, alma, körte, narancs nemzetközi kereskedelmében. Droby és Lichter a postharvest botritiszes rothadásban érintett termékek részletes listáját állította össze, melyen többek között szerepelnek virágok (pl.: rózsza, gerbera), gyökérzöldségek (pl.: sárgarépa, édes burgonya), zöldségek (pl.: káposzta, bab, brokkoli) és gyümölcsök is (pl.: szőlő, alma, körte, narancs, málna, eper, szeder) (2007).

A szőlő, mint gyümölcs esetében elsősorban a csemegeszőlő tárolása során szükséges védekezni a botritiszes rothadás ellen. A régóta bevált kéndioxid alkalmazását mára igyekeznek felváltani a természetes védekezés eszközeivel, mint amilyen például a kitozán és egyes élesztőgombák, mint biológiai ágensek (*Metschnikowia fructicola*, *Hanseniaspora uvarum*) kombinált alkalmazásával (Romanazzi et al. 2009, Karabulut et al. 2003), hiszen a kéndioxid a szőlőbogyók kifehéredését és a kocsány nagymértékű barnulását okozza, és nem utolsó sorban az emberi szervezetre is terhelést jelent, hiszen allergén anyag.

Egyes esetekben a szőlő tekintetében pozitív tulajdonságként is tekintenek a *B. cinerea* tárolás során való megjelenésére, sőt a botritizálódás indukálására is folynak kísérletek. Az olasz természetes édes vörösborok egy része ilyen módon készül. A botritizálódás folyamatát a töppedéshez szükséges hőmérséklet és relatív páratartalom megfelelő kombinációja során indukálják (Bellincontro et al. 2016, Barbanti et al. 2008). Az in vitro botritizálódás során patogén gombák is előfordulhatnak, - *Penicillium expansum* és *P. crustosum* - ezért Zapparoli és munkatársai tanulmányozták a szőlőbogyók mikrobiótáját és a jelen lévő mikroorganizmusok hatását a bor aroma összetételére, miszerint az ilyen borok magasabb illósav tartalommal és aldehides illatjegyekkel rendelkeznek (2018).

### 3.2. A botritisz szőlészeti, borászati jelentősége

A *B. cinerea* szőlészeti - borászati vonatkozásai a gyakorlatban is nagy jelentőségűek. Egyrészt, növényvédelmi szempontból igyekeznek kizárni a szürkerothadást okozó gomba jelenlétét, másrészt az aszúbor és botritiszes borok készítése során “mindent” megtennének, hogy valamilyen módon elő tudják segíteni a folyamatának indukálását, hogy a legmagasabb minőségű természetes édes bor alapanyagát állíthassák elő, mint ahogy ezt Kaliforniában botritisz spórák ültetvényre való kijuttatásával teszik



(Benson, 1977). Ezen kérdésekből kiindulva a szürkerothadás és nemesrohadás folyamatának pontosabb, részletesebb megismerése számos kutatás kérdéseit határozza meg.

A nemesrohadás folyamata a kórokozó jelenléte esetén, illetve kedvező környezeti körülmények között a legtöbb Kárpát-medencei borvidék szőlőültetvényeiben, a legkülönbözőbb szőlőfajták esetében is megfigyelhető (saját megfigyelés). Ezekből a szőlőkből kellő odafigyeléssel magas minőségű botritiszes, édes fehér- és vörös aszúborok készíthetők (Robinson et al. 2013). A botritizálódott aszúszemekből különleges technológiával készülő borok (aszú, szamorodni, másolás, fordítás), a világon egyedülálló, nagyon értékes, speciális termékminőséget jelentenek (Magyar 2011). Történelmi bizonyítékok vannak arra, hogy a Tokaji aszú készítése Tokaj-hegyalján már a 16. századtól folyik, valamint, hogy 1772-ben a világon elsőként a tokaji dűlőket osztályozták a királyi feljegyzések szerint (Balassa, 2012). A Tokaji aszút egészen a 18. századig a királyok számára elérhető, különleges borként tartották számon egész Európában (Nagy, 2014).

A fehér szőlőből készített aszúbor esetében több évszázad tapasztalata áll rendelkezésre, ugyanakkor a kék szőlőből történő botritiszes édes vörös borok (vörös aszú) készítésében ez a hagyomány megszakadt. Az Egri borvidéken is, a borosgazdák legföltettebb kincse volt a természetes édes vörösbor, amit mindig teljes- és túléérésben szüretelt kékszőlőikből (október közepe és november vége között) készítettek (saját adat). Az elmúlt 70 évben azonban sok elméleti és gyakorlati tapasztalat merült feledésbe.

### 3.2.1. A szürkerothadás

A *B. cinerea* a szőlő esetében annak minden zöld részét fertőzheti, de a virágzásban, majd az érésben lévő fürtök (3. ábra) teljes pusztulását is eredményezheti hűvös, csapadékos időben (medárdi csapadékhullám), melynek következtében súlyos termés kiesést okoz (Elmer és Michailides 2007). A szürkerothadásos fertőzés következtében létrejövő változások nagyon sokrétűek, melyek közül a leglátványosabb a cukortartalom nagymértékű csökkenése. Ezen kívül jelentős mértékben csökken a must nitrogén és vitamin tartalma - tiamin mennyisége 70-80%-al, piridoxin mennyisége 50%-al, miközben a borkősav oxidációja pedig erősen növekszik. A

gomba, jelentős pektinbontó aktivitással rendelkezik, így a botritiszes must pektin tartalma akár teljesen le is bomolhat, míg a galakturonsav mennyisége nő, ami az egészséges szőlőbogyó mustjára nem jellemző (Magyar 2010, 2011, Fedrizzi et al. 2011). A *B. cinerea* a bor kezelését és erjedést károsan befolyásoló poliszacharidok szintézisére is képes, az így keletkező glükán vegyületek lényegesen rontják a bor szűrhetőségét, a galaktózban és mannózban gazdag heteropoliszacharidok pedig az alkoholos erjedést gátolják és az ecetsav termelődést fokozzák az erjedés során. A szürkerothadás mégis talán legsúlyosabb következménye a gomba által termelt lakkáz enzim aktivitása, melynek következtében a bogyó fenolos vegyületei kinonokká oxidálódnak. Fehérborok esetében ez barnulást, barna törést, keserű ízanyagok megjelenését, vörösborokban a színanyagok lebomlását eredményezi (Magyar 2010). A szürkerothadást kísérő jelenségként a bogyóban a *B. cinerea*-án kívül számos más penészgomba (*Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*), élesztőgombák és ecetsavbaktériumok (*Gluconobacter*, *Acetobacter*) is fejlődésnek indulhatnak. Mindezek hozzájárulnak a bogyó értékes anyagainak lebomlásához, a kellemetlen íz- és illatanyagok kialakulásához. Ha a társult mikrobióta jelentősebb arányban vesz részt a fertőzés kialakulásában vegyes rothadásról beszélünk. Ennek eredményeként a fertőzött mustok jó minőségű borkészítésre nem használhatók (Ribéreau-Gayon et al. 2006, Magyar 2010, Barata et al. 2012).



3. ábra: Szürkerothadás tüneteit mutató szőlőfürt (saját felvétel)

### 3.2.2. A nemesrothadás

A nemesrothadás kialakulásához több feltételnek kell egyszerre teljesülnie, melyek közül a legfontosabbak, hogy az őszi páradús, nedves időjárás már teljes érésben érje a szőlőbogyót, a bogyók szemre épek legyenek, a nedves időszakokat száraz és meleg idő kövesse, illetve a szőlőfajta a nemesrothadás szempontjából megfelelő tulajdonságú legyen (Magyar és Soós 2016). Az időjárási körülmények kulcsfontosságú szerepén túl a szőlő művelésmódja, talaj összetétele, az évjárat sajátosságai és a szőlőtermő régió szőlészeti-borászati eljárásrendjeinek sajátosságai együttesen járulnak hozzá a nemesrothadás folyamatához (Fournier et al. 2013). Francia szőlőültetvényeken tapasztaltak szerint a szélesebb sorköz és magasabb törzs kialakítása csökkenti a nemesrothadás kialakulásának esélyét, illetve a botritiszes borok aromaprofiljában is eltérés mutatkozhat az összehasonlított művelésmódok között (Kallitsounakis és Catarino 2020). Jelenlegi ismereteink alapján a szürke- és nemesrothadás közötti különbségek a folyamat körülményeiben rejlenek, a nemesrothadást a gomba metabolizmusának biokémiai folyamatai és a szőlő töppedésének fizikai változásai együttesen eredményezik (Magyar 2011, Fournier et al. 2013, Blanco-Ulate et al. 2015). Az eddig megjelent tudományos eredmények alapján a biokémiai folyamatok alapvetően azonosak a szürkerothadáskor lejátszódó folyamatokkal, a legnagyobb különbséget az okozza, hogy a túlrejt szőlő fűrtkocsánya elfásodik, így nincs lehetőség a töppedő bogyóból elpárolgó víz szőlőnövény általi pótlására, ami a bogyó beltartalmának bekonzentrálódását eredményezi. Az érett szőlőben ekkor már kialakult a fajtára jellemző cukor- és savtartalom, a „zöld” ízt okozó fenolos anyagok pedig lebomlottak (Magyar 2011, Fournier et al. 2013). A koncentráció során egyre növekvő ozmotikus nyomás korlátozza a botritisz növekedését és metabolizmusát, és megváltoztatja az extracelluláris enzimek aktivitását (Cantu et al. 2008). A gombahifák az epidermisz alatti sejtrétegekben növekednek, a felületi légmicélium képzés ekkor már minimális vagy akár teljesen hiányzik (Walker et al. 2016). Ezt megfelelően ábrázolja a 4. ábrán látható valódi aszúszemeket tartalmazó *Furmint* szőlőfűrt. A termés össztömege és a must mennyisége töredékére csökken, de mindez rendkívül nagy minőségjavulással jár együtt. A koncentráció miatt jelentős cukorkoncentráció növekedés tapasztalható, amely 600 g/l fölé is emelkedhet (Magyar és Soós 2016, Kallitsounakis és Catarino 2020).

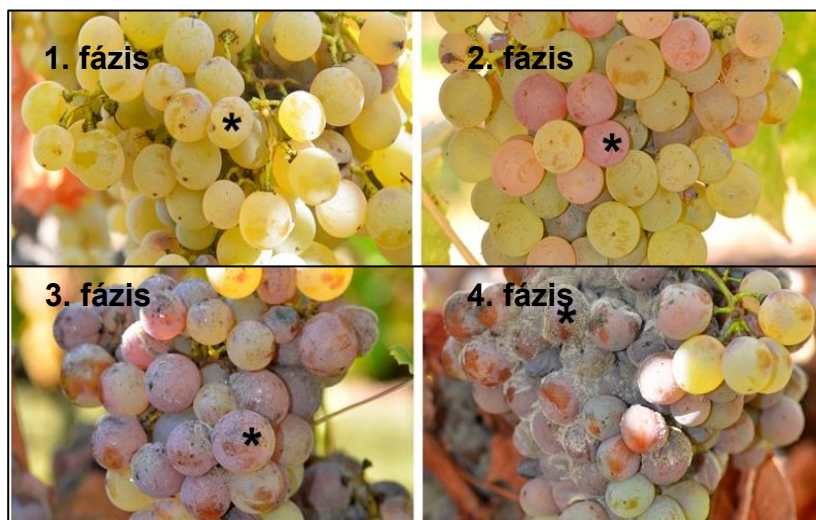


4. ábra: Aszús *Furmint* szőlőfürt (Szepsy borászat felvétele)

A nemesrothadás és szürkerothadás gyakran nem különböztethető meg az ősszel jelen lévő botritisz esetében, főleg a botritizálódás első, korai fázisaiban. Ezen szakaszokban még nem biztos a botritizálódás végérvényesen nemesrothadásban végződő kimenetele. Amíg a szőlőbogyók vízaktivitása magas és vegyes a jelenlévő kórokozó mikrobióta, nagyobb az esély a vegyes rothadásra (Barata et al. 2012). Azonban, ha a bogyók vízaktivitása csökken és ehhez társulva a növény már nem tudja a bogyókban lévő nedvességet visszapótolni, elindul a szőlőbogyók töppedése, ami a 4. ábrán látható (Rousseau és Donèche 2001). Korábbi tanulmányok a szürkerothadás és nemesrothadás során vizsgált *B. cinerea* törzsek populációgenetikai felépítésében nem találtak különbséget (Fournier et al. 2013), viszont a gomba metabolikus aktivitása eltérő a két folyamat során, valamint az expresszáldott gének között is mutatkozik különbség (Blanco-Ulate et al. 2015).

A szőlőfajták nemesrothadásra való fogékonysága eltérő, elsősorban a bogyóhéjon lévő viaszréteg vastagságától, a bogyóhéj vastagságától és a szőlőfajta érési tulajdonságaitól függ. A jelenlévő viaszréteg minél vastagabb, annál nagyobb a „rothadás” visszatartó ereje, bár ez nem minden esetben jelent hátrányt, hiszen például egy vastagabb viaszrétegű és héjú, de korai érésű szőlőfajta is jól aszúsodhat (Pezet et al. 2003, Ribéreau-Gayon et al. 2006, Kaló 2006, Magyar 2011, Köycü et al. 2014).

A nemesrothadás folyamatának stádiumait Fournier és munkatársai két fázisra osztották a francia gyakorlati tapasztalatok alapján (2013). Az első fázis - „marron purri plein” – során a gomba megjelenik a szőlőbogyókon, miközben a bogyóhéj változatlan marad, majd a gomba anyagcseretevékenységének köszönhetően vékonyabbá válik a bogyóhéj, melynek során könnyebben távozik a bogyó víztartalma, ezzel töppedést eredményezve, majd a növekvő cukortartalom megakadályozza a gomba további növekedését. Ez utóbbi fázist „marron roti” stádiumnak nevezik, ekkor kezdődik el a nemesen rothadt szőlőszemek, fűtrészek szüretelése (Fournier et al. 2013). Blanco-Ulate és munkatársai is a nemesrothadás folyamatának *Semillon* cv. szőlőfajtán tapasztalt fázisai alapján végezték kísérleteiket (5. ábra) (2015). Carbajal-Ida és munkatársai három stádiumra osztották a botritizálódás folyamatát, az első (0. szint) fázist úgy jellemezték, hogy a szőlőbogyón még nincs látható jele a gomba jelenlétének, csak a kocsány-szőlőbogyó érintkezésénél látható barnás elszíneződés. A második fázisú (1. szint) bogyók már lilás színűek, a gombafonalak láthatók, de nincs jele töppedésnek, a harmadik fázis (2. szint) esetében pedig a lilás színű bogyóknál már elindult a töppedés (2016). Jól látható, hogy a Fournier, Blanco-Ulate és Carbajal-Ida által leírt botritizálódási stádiumok (2013, 2015, 2016) hasonlóan megfigyelhetők a tokaji szőlőterületeken is, azonban eddig pontos leírás nem született a Tokajban valódi aszúszemnek nevezett és a tokaji aszúbor alapanyagaként szolgáló teljesen töppedt, textúrájában húsos, látens gombafonalakat tartalmazó aszúsodási stádiumnak.



5. ábra: A nemesrothadás stádiumai (Blanco-Ulate et al. 2015)

### 3.2.3. Botritiszes borok a világban

A Kárpát-medencén kívül a világ többi borvidékein is készítenek botritiszes édes borokat, Ausztriában, Németországban, Franciaországban, Olaszországban, illetve Európán kívül Új-Zélandon, Ausztráliába, Dél-Afrikában és az Egyesült Államokban is. A hazánkban termelt aszúbor jellegzetes karakterét az aszúsodott alapanyag szemenkénti szüretelése, az ültetvényeink egyedi talajtípusai, saját szőlőfajtáink és éghajlati adottságaink együttese adja, továbbá a Tokaji aszúbor elkészítésének és érlelésének módja is jelentős mértékben hozzájárul a magyar aszúbor karakter kialakulásához (Halliday 2007, Magyar 2011, Robinson és Harding 2015, Kallitsounakis és Catarino 2020).

Németországban egy legenda szerint az első német bor botritiszes szőlőből készült, melyet a Schloss Johannisberg ültetvényéről készítettek 1775-ben (Robinson and Harding, 2015). Ezt a különleges évjáratot tartják a német késői szüretelésű botritiszes borok születésének. A német botritiszes borok hazája Rheingau, de később elterjedt a Mosel-Saar-Ruwer borvidékre is. Az itt készülő botritiszes borok alapját adó szőlőfajta a *Rajnai rizling*. A vidék hűvös klímájának ellenére a völgyekben megülő magasabb páratartalom kedvez a *B. cinerea* szőlőbogyón való megjelenésének. A *Rizlingen* kívül Fűszeres *traminiből*, *Szürkebarátból*, *Scheurebe*-ből, *Silvaner*-ből és *Huxelrebe* szőlőfajtából is készítenek botritiszes borokat (Benson, 1977). Szabályozásuk szerint háromféle bortípus készíthető nemesen rothadt szőlőből: az *auslese*, ami teljes érésű botritiszes vagy csupán töppedt szőlőből is készülhet, lehet száraz és magas alkoholtartalmú, de inkább maradékcukorral készülő és alacsony alkoholtartalmú termék. A *berenauslese* (BA), ami túlérett szőlőből, a botritizálódás következtében magasabb cukortartalommal készül, a szokásos szüretidőponthoz képest később szüretelt, és általában édes borkategóriájú. A *trockenberenauslese* (TBA), ami a legmagasabb minőségi kategóriát képviseli a német botritiszes borok tekintetében. A német botritiszes borok néha túlzóan édes ízűek és alacsony alkoholtartalmúak (Magyar 2011, Robinson és Harding 2015, Brunke et al. n.a.).

Ausztriában is létezik egy borkategória a botritiszes szőlőszemekből készített borra, melyet *Ausbruch*-nak hívnak. Készítéséhez nem szükséges botritizálódott alapanyagot felhasználni, lehet csupán töppedt, késői szüretelésű szőlőfürtök, fütrészek szüretelésével készíteni. A leghíresebb ausztriai botritiszes bor a Ruszti Ausbruch, melyet Burgenland borrhíóiban készítenek, a közelben fekvő Fertő-tó biztosítja a

botritizálódáshoz megfelelő klimatikus viszonyokat. Az itt készülő borok jellegében a TBA borokhoz hasonlíthatók. Ruszton kívül Gumpoldskirchen falu szőlőültetvényeiről is készítenek botritiszes borokat, jellemzően inkább *Zierfandler* és *Rotgipfler* szőlőfajtákból (Robinson et al. 2013, Robinson és Harding 2015).

Sautern régió Franciaország Bordeaux-i borvidékén található, a Garonne folyó és annak mellékfolyója a Ciron találkozásánál terül el. Sautern a Bordeaux-i borvidék fehérbor termő régiója, Sautern városán kívül Barsac, Bommes, Fargues és Perignac városok szőlőültetvényei tartoznak ide. Négy fő szőlőfajtát termesztnek: *Sémillon*, *Sauvignon blanc*, *Sauvignon gris* és *Muscadelle*, melyek közül is a *Sémillon* a legalkalmasabb a botritiszes borok készítésére. Franciaország más borvidékein is készítenek botritiszes borokat, például Elzászban és Coteaux du Layon-ban is, ezért a botritiszes borokra egy külön borkategóriát alkottak, „Sélection de Grains Nobles” (SGN), melyet először Elzászban vezettek be (Robinson and Harding, 2015).

Olasz szőlőültetvényeken nem jellemző a nemesrothadás kialakulása, viszont a szüretet követően szárítókon vagy szalmán aszalás során készítenek töppedt szőlőből édes borokat, mint például az „Amorone” bortípust (Fedrizzi et al 2011, Tosi et al. 2012). Az aszalás során kívánatos, hogy a botritisz „megfertőzze” a szőlőszemeket, melynek köszönhetően egyedi ízanyagok jelennek meg a borban. Ilyen módon készül a Picolit szőlőből készülő Picolit borfajta is, melyet Friuliban, az észak-olasz borrégióban készítenek (Tofalo et al. 2012).

Európán kívüli országok borvidékein a francia sauterni stílushoz hasonló botritiszes borokat készítenek: Ausztráliában, Új-Zélandon, Kaliforniában és Dél-Afrikában.

Ausztráliában elsősorban *Sémillon* szőlőfajtából állítanak elő botritiszes bort New-South Wales Riverina vidékén. Az itt készült borok késői szüretelésű botritiszes és nem botritiszes töppedt szőlők együtt feldolgozásából készülnek. A *Sémillon* fajtán kívül *Sauvignon blanc*, *Riesling* és *Pinot gris* fajtákat is felhasználnak a borok készítéséhez.

Dél-Afrika botritiszes borait „Noble late harvest” elnevezéssel hozzák forgalomba. Western Cape régió Bredekloof völgyben a Badsberg hegység lábánál terülnek el azok az ültetvények, melyekről a botritiszes alapanyagok származnak. *Chenin blanc* és *Hanepoot* szőlőfajtákból készülnek a borok.

Új-Zélandon és Kaliforniában *Sauvignon blanc* és *Sémillon* szőlőfajtákból sauterni technológiával a nemesrothadt fürtökből készítenek borokat. Bár, Kalifornia éghajlata nem kedvez a botritisz előfordulásának, a szőlőfürtöket mesterségesen inokulálják botritisz spórával, így egy késői szüretelésű édes bor kategóriához hasonló terméket előállítva elő (Kerridge és Gackle 2004, Magyar 2011, Robinson et al. 2013, Robinson és Harding 2015).

### 3.3. A szőlőbogyó fizikai tulajdonságai

A szőlőbogyó fizikai tulajdonságait több tényező határozza meg. A bogyóhéj keménységének meghatározására szolgáló paraméterek:  $F_{sk}$  (bogyóhéj keménység),  $E_{sk}$  (Young modulus),  $W_{sk}$  (átszakítási munka), a bogyóhéj vastagságának paramétere ( $Sp_{sk}$ ). A mag keménységének paraméterei:  $F_s$  (magkeménység),  $E_s$  (Young modulus),  $W_s$  (magtörési munka) és a bogyó keménységét jellemző paraméterek: BH (a kívánt deformációhoz szükséges erő), BCo (bogyókohézió), BG (bogyónyúlósság), BS (bogyóruganyosság), BCh (bogyórághatóság), BR (bogyórugalmasság) (Letaief et al. 2008 a,b).

A szőlőbogyók textúráját leggyakrabban az étkezési szőlőfajták esetében vizsgálták, mivel az étkezés során fontos tulajdonságok (roppanósság, rukalmasság, rágósság stb.) itt kerülnek előtérbe (Mencarelli et al. 1994, Sato et al. 1997, Rolle et al. 2012). Letaief és Rolle több oldalról is vizsgálta a szőlőfajták közötti különbségeket a szőlőbogyók textúra és héj paraméterei alapján (2008 a,b). Eredményeik rámutattak, hogy a fizikai paraméterek alapján jól elkülöníthetők a szőlőfajták. A fizikai paraméterek vizsgálatát több tanulmányban is alkalmazzák a szőlőfajták érési stádiumának, szüretidőpontjának előrejelzésére és a szőlőhéjban lévő fenolos vegyületek mennyiségének becslésére is (Segade et al. 2008, Rolle et al. 2011). A még szélesebb körű alkalmazás kiterjedhet akár a klímaváltozás szőlőre gyakorolt hatásának vizsgálatára is, amikor a kevesebb vagy egyenetlenebb csapadék eloszlás erős változásokat okozhat a szőlőbogyók eddig megismert héj és textúra tulajdonságaira (Rolle et al. 2011, Teixeira et al. 2013, Zsófi et al. 2014).

Zsófi és munkatársai (2014) a szőlő vízhiánya esetén bekövetkező változásokat vizsgálták a szőlőbogyók textúra paramétereire és fenolos érettségére, illetve fontos szerepet tulajdonítottak a zsendülés folyamatában a kék szőlőfajták antocianin



összetétele és fizikai tulajdonságok kapcsolata közötti összefüggések feltárásának. Megállapították, hogy a vízhiány következtében több fenolos vegyület akkumulálódik a bogyóhéjban és a bogyóhéj keménysége növekszik. Carbajal-Ida és munkatársai a botritizálódott *Chenin Blanc* szőlőbogyók fizikai tulajdonságait vizsgálva igazolták, hogy mérhetően változik a szőlőbogyók textúrája a botritizálódás folyamata során és a szőlőfajta, évjárat és a szüretidőpont is befolyásolja a bogyók textúrájának változását (2016). Hasonló következtetésekre jutottak Rolle és munkatársai is, amikor a jégbor készítésének alapanyagát vizsgálták (2010), bár nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a botritizálódás következtében kialakuló természetesen édes szőlőalapanyag merőben különbözik a jégbor alapanyagául szolgáló szőlőtől (Magyar és Soós 2016, González-Álvarez et al. 2014), hiszen a jégbor készítése során a természetes úton megfagyott szőlőfürtöket préselik ki, a préselés során a jéggé dermedt víz nem tud távozni a szőlőbogyókból, így cukorban gazdag mustot kapunk (Ribéreau-Gayon et al. 2006, Cliff et al. 2002, Mencarelli és Tonutti 2013). Érzékszervi vizsgálatok során összehasonlították az botritizálódott alapanyagból készülő édes borokat a jégborokkal és teljesen eltérő érzékszervi profilt állítottak föl. A jégborok diszharmonikusabb édes ízérzetéről számoltak be, míg az aszús szőlőből készült borok sokkal egyensúlyosabbak voltak (Tofalo et al. 2009).

### 3.4. Az aszúbogyó kémiai sajátosságai

Az aszúbogyó érzékszervileg legfontosabb analitikai paraméterei a cukortartalom és savtartalom. A botritisz borkősav-felhasználása növekedhet a nemesrothadás során, illetve az almasav mennyisége is változik, növekedésnek indul a botritizálódás következtében (Magyar 2011, Kiss és Sass-Kiss 2005). Az aszús szőlőbogyó borkősav tartalma akár 85%-al is csökkenhet, az almasav-tartalom pedig 45%-al növekedhet a nemesrothadás következtében (Ribéreau-Gayon 1982, Kallitsounakis és Catarino 2020). A nemesrothadás során az ecetsav tartalom is általában növekszik, de ez a kísérő mikrobiótának köszönhető. Sass-Kiss és munkatársai a Tokaji aszú és a világ más botritiszes borainak összehasonlítását végezték el főkomponens analízis (PCA, principal component analysis) segítségével 2008-ban. Az eredmények azt mutatták, hogy a savprofilban a borkősav és az ecetsav mennyisége a legállandóbb, illetve nem mutat nagy különbségeket a külföldi botritiszes borok és Tokaji aszúk között. Az

almasav mennyisége szignifikánsan nagyobb volt a Tokaji aszúk esetében, mint a külföldi botritiszes borokban (Sass-Kiss et al. 2008).

A légmicélium hiánya miatt a gomba oxigén ellátottsága korlátozott, többek között erre vezethető vissza, hogy jelentősebb mennyiségű glicerin és glükonsav keletkezik a folyamat során. A glükonsav felhasználása a gomba növekedésének 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 található meg. A glicerin tartalom tovább növekszik az erjedés során, míg a glükonsav mennyisége tovább nem változik. Ezért ezek a vegyületek a kiejedt borokban is alkalmasak a nemesrohadás tényének megállapítására (Magyar 2010, Gump és Kupina 2012).

A botritiszes mustokra jellemző a kénessavat megkötő ketosavak nagy mennyisége. Ezek közül a piroszőlősav átlagosan másfélszerese, a 2-ketoglutársav pedig több mint kétszerese a közönséges mustokban mérhetőnek (Barbe et al. 2000, Magyar 2010). Az ilyen mustok erjedése során a tiaminhiány következtében a ketosavak mennyisége tovább növekszik, ezért a botritiszes borok kénessav megkötő képessége nagyon magas (Thuy et al. 1995, Sass-Kiss et al. 2008). A glükonsav mellett a botritisz kisebb mennyiségben glükuron- és galakturonsavat, valamint galaktársavat is termel (Magyar 2010).

A nagy cukortartalom mellett az egyedi íz-és zamatanyagok képezik az aszúsodott szőlőbogyó legfőbb értékeit, ezen aromavegyületek prekursorai közé tartoznak a terpén és tiol prekursor vegyületek (Genovese et al. 2007). Ezen kívül a kémiai összetételében jelentős szerepet játszik a furfurol, benzaldehid, fenilacetaldehid és benzilcianid (Magyar, 2010). A mézre, őszibarackra, egyéb gyümölcsökre emlékeztető illatban kulcsszerepe van a  $\delta$ -laktonoknak. Ezen kívül az aszú egyedi karakterét valószínűleg a  $\delta$  és  $\gamma$  laktonok határozzák meg (Miklósy és Kerényi 2004, Miklosy et al. 2004). Már korábban azonosították a szotolon nevű (3 hidroxil 4,5 dimetil 2 (5) furanon) laktont (Mashuda et al. 1984), ami mára már bizonyítottan marker vegyület a botritiszes borok vizsgálata során (Gaspar 2021).

A fenolos vegyületek mennyisége is változik a botritizálódás folyamata során. Legtöbbjük (fenol savak, stilbének, antocianinok, flavonoidok) a szőlőbogyó héjában található, a *B. cinerea* szerepet játszik a fent leírt vegyületek mennyiségének változásában (Blanco-Ulate et al, 2015), melynek köszönhetően átlagosan az összes

polifenol vegyületek mennyisége csökken, azonban a stilbén vegyületek közül a rezveratrol és a flavonoid vegyületek közül az epikatechin és katechin mennyisége növekszik (Ky et al. 2012, Blanco-Ulate et al. 2015, Carbajal-Ida et al. 2016).

### 3.5. Az ép és aszúbogyó mikrobiotája

A túlédett és töppedt szőlőbogyók mikrobiotája nagy változatosságot mutat, de általában nem a *B. cinerea* játsza a fő szerepet a szőlőszemek mikrobiológiai összetételében (Chen et al. 2020). A botritisz számottevően a nemesen rothadt szőlőszemek felületén jelenik meg és más mikroorganizmusokkal közösen járul hozzá az botritizálódás folyamatához (Bene és Magyar 2004, Cocolin et al. 2013).

Az ép szőlőbogyó felszínén számos élesztő-, fonalagomba és baktérium található, az előforduló mikroorganizmusok aránya és összetétele függ a szőlő érettségi állapotától és a bogyók tápanyagtartalmától. Zsendülés után elsősorban a bazidiomikóta (pl. *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Sporobolomyces* spp.) és az aszkomikóta *Aureobasidium* sp. gombák dominálnak a bogyófelszínen. A fent említett bazidiomikóta gombák ritkán vesznek részt az erjedésben, de fontos szerepet töltenek be az ép és jellemzően még éretlen szőlőbogyó mikrobiotájának kialakításában (Fleet 2003). Az erjesztésben szerepet játszóak közül először a gyengén erjesztő aszkomikóta élesztőgombák (amelyek szintén megtalálhatók a bogyófelszínen), mint a *Hanseniaspora* spp., *Metchnikowia* spp., *Pichia* spp. és *Candida* spp.), majd az erősebb erjesztőképességgel rendelkező fajok jelennek meg (*Zygosaccharomyces* spp., *Torulaspota* spp.) (Ribéreau-Gayon et al. 2006, Tofalo et al. 2009, Martins et al. 2012, Blanco-Ulate et al. 2015, Azzolini et al. 2013). Az erjesztésben legfőbb szerepet játszó élesztőgomba, a *Saccharomyces cerevisiae* csak nagyon ritkán található meg a szőlőbogyó felszínén, inkább a feldolgozás során jelenik meg a mustban. Sipiczki és munkatársai aszúborok erjedésének vizsgálata során azonosítottak a *S. cerevisiae*-nél cukortűrőbb élesztőgombát a *Candida zemplinina*-t (*Starmerella bacillaris*), ami olyan magas glükóz tartalmú közegben is képes növekedni, ahol a *S. cerevisiae* már nem (Sipiczki 2003, Magyar et al. 2008). Újabb vizsgálatok a *C. zemplinina*-t a természetes édes borok marker élesztőjeként mutatják be (Masneuf-Pomaredo et al. 2015).

Az élesztők mellett különböző ecetsav baktériumok jelenléte is megfigyelhető (*Gluconobacter* spp., *Acetobacter* spp.) a magas cukortartalmú szőlőbogyókon. A botritizálódott szőlőbogyók felületén jelen lévő ecetsav baktériumok a mustban is azonosíthatók, ezek közül elsősorban az *Acetobacter aceti* és *Acetobacter pasteurianus* dominanciája figyelhető meg, de szaporodásuk akár fokozódhat, ha az érlelés körülményei 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 a fent említett fonalgomba nemzetségek előfordulása csökken, és elsősorban a *B. cinerea* jelenléte válik meghatározóvá. Egyéb vizsgálatok rámutattak, hogy a „fertőzött” (botritiszes, lisztharmatos, ecetes és szürkerothadt) szőlőbogyók mikrobiótája változatosabb, mint az ép bogyóké. Ezen kívül vizsgálatok igazolták, hogy a terroir, a szőlőfajta és az évjárat is hatással van a szőlőbogyók mikrobiótájára (Bokulich et al. 2013). Mindezek ellenére a fent összefoglalt tudományos állítások bővíthetők, hiszen sok kérdés megválaszolatlan, ha a botritizálódás folyamatának fizikai, kémiai és mikrobiológiai komplexitására gondolunk.

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. Mintagyűjtés

A mintagyűjtés tervezése során fontos volt, hogy a kijelölt ültetvények jó aszúsodási képességgel rendelkezzenek, hiszen a vizsgált évjáratok során szükség volt detektálni a nemesrothadás tényét, hogy megfelelő mennyiségű és minőségű mintákat állítsak elő.

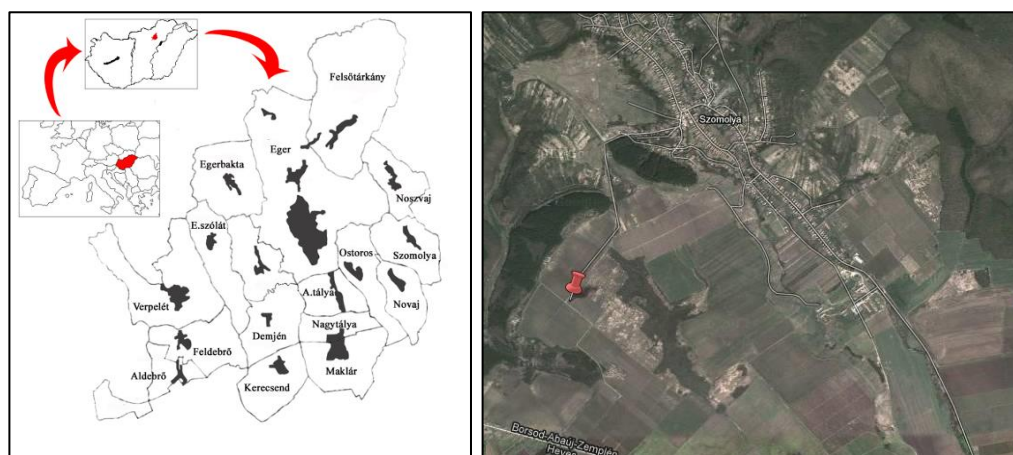
#### 4.1.1. Mintagyűjtés területei

A mintagyűjtéshez kijelölt ültetvények két borvidéken találhatók, az egyik terület az Egri borvidéken, a másik terület pedig a Tokaji borvidéken helyezkedik el. Mindkét ültetvényről gyakran szüretelhetők aszúszemek, az egri terület elsősorban a vörös aszú alapanyagát adja, míg a tokaji ültetvényről nemzetközi hírnévnek örvendő dűlős aszúborok születnek.

##### 4.1.1.1. Egri borvidék

A 2013-as, 2014-es és 2015-ös években az Egri borvidékhez tartozó szőlőterületekről gyűjtöttem a kísérletekhez szükséges aszús szőlőbogyó mintákat. A szőlőterületek Szomolya község határában helyezkedtek el (47° 54' 00" N; 20° 30' 00" E) (6. ábra). A kísérletbe két szőlőfajtát vontam be, egy fehér fajtát, az *Olaszrizlinget* és egy kék szőlőfajtát, a *Turánt*. A *Turán* szőlőfajta helyi kötődésű, az egri szőlészeti-borászati kutatóintézetben nemesítették, a kék szőlőfajták közül különösen fogékony a nemesrothadásra (Robinson et al. 2013), a belőle készíthető természetes édes vörösbor képes megtartani mély bíbor színárnyalatát a szőlőfajta festő tulajdonsága miatt. A szőlőültetvény talajtípusa: riolittufa alapkőzetten barna erdőtalaj. Az ültetvényt 1998-ban telepítették, melyben 2,9 m sortávolságot és 0,9 m tőke távolságot alkalmaztak, guyot művelésmódot állítottak be és az átlagos termésmennyiség 4 t/ha. Az ültetvényen alkalmazott növényvédelmi kezelések a mellékletek fejezet 1. táblázatában olvashatók (táblázat M1). A permetezéshez Lochmann RPS10/70 típusú

axiálventilátoros gépet használtak 1000 literes tartálykapacitással (Lochmann Plantatech, 10 Nalles, Olaszország). Rovarölőszereket egyik évben sem alkalmaztak, a gyomkezelést pedig mechanikai eszközökkel végezték, kapálással és kaszálással. Az ültetvényre vonatkozó időjárás adatokat (csapadékmennyiség, napi hőmérséklet) a Boreas (Boreas Kft., Érd, Hungary) agrometeorológiai állomás adatai alapján rögzítettem szeptember 15. és november 30. között mindhárom évjáratban. A mintagyűjtés időtartamát három egyhónapos periódusra bontottam (szeptember, október, november), mert ezek képviselték az aszúszem fejlődés fő stádiumait.



6. ábra Az Egri borvidék térképe a hegyközségekkel (Váczy 2009) és Szomolya műholdas térképe (Google Térkép 2021.03.28.) a mintavételi területtel. Piros jelölővel a *Turán* szőlőterület.

#### 4.1.1.2. Tokaji borvidék

A 2016-os és 2017-es évjáratban a vizsgálatokhoz felhasznált szőlőbogyókat a Tokaji borvidékhez tartozó Mád község határában található Betsek dűlő (7. ábra) ( $48^{\circ} 11' 18.6''$  N  $21^{\circ} 19' 01.8''$  E) *Furmint* és *Hárslevelű* szőlő ültetvényeiből gyűjtöttem. Az ültetvény alapkőzete sárga mészkő, a tetején puha, lágy fehér andezittufa réteggel. A szőlőtőkét 1984-ben telepítették, a sorok közötti távolság 2,7 m és a tőkék közötti távolság pedig 0,8 m, a művelésmód közép magas kordon, az átlagos termésmennyisége 4 t/ha. Az ültetvényen alkalmazott növényvédelmi kezelések a mellékletek fejezet 2. táblázatában olvashatók (táblázat M2). Rovarok ellen kétszer alkalmaztak vegyszeres kezelést, április és július hónapok második felében. Vegyszeres gyomirtást nem alkalmaztak, mechanikai eszközökkel (kapálás) végezték

a gyomszabályozást. A permetszerek kijuttatása itt is Lochmann RPS10/70 1000 literes tartályterfogatú permetezőgéppel történt (Lochmann Plantatech, 10 Nalles, Olaszország). Az ültetvényre vonatkozó időjárás adatokat (csapadékmennyiség, napi hőmérséklet, páratartalom, levélnedvesség) a BASF Defenso (BASF Hungaria Kft., Budapest, Hungary) agrometeorológiai állomás adatai alapján rögzítettem mindkét évjárat szeptember 1. és november 30. között. A mintagyűjtés időtartamát ebben az esetben is három egyhónapos periódusra bontottam (szeptember, október, november), az aszúszemek fejlődési stádiumait figyelembe véve.



7. ábra: Mád községhez tartozó szőlőterületek dűlői, kiemelve a mintagyűjtés dűlője, a Betsék (Mádi Kör, Google térkép 2021.03.28.).

#### 4.1.2. A mintagyűjtés módszerei

Az egri szőlőültetvényben a természetes nemesrohadás következtében kialakult aszúszemekből mintákat gyűjtöttem. Az aszúszemeket 100 darab szőlőtőkéről vételeztem, tőkénként minimum 20 bogyót a fent megadott évjáratok vizsgálati időszakának minden hónapjában mindkét szőlőfajtáról (*Olaszrizling* és *Turán*). A szőlőbogyó mintákat a fürtökről való leszedés után steril mintatartó dobozokba tettem, majd a laboratóriumba szállítottam és még a mintagyűjtés napján megkezdtem a *B. cinerea* izolálását.

A tokaji szőlőültetvényben a nemesrohadás folyamatának négy fő stádiumában (1. ép, teljes érettségű szőlőszem; 2. még nem töppedt, de barnás-lilás foltokkal tarkított szőlőszem; 3. már töppedésnek induló, botritiszes szőlőszem; 4. a lilás aszúszem,

látens gombafonalakkal) lévő szőlőbogyókat gyűjtöttem (8. ábra) a fent megadott évjáratok vizsgálati időszakának minden hónapjában mindkét szőlőfajtáról (*Furmint* és *Hárslevelű*). Ez azt jelentette, hogy összesen 500-600 szőlőbogyót gyűjtöttem random módon (100 db szőlőtőkéről fürtönként 5-6 bogyó) melyek reprezentálták a nemesrothadás meghatározott stádiumait. A vizsgálatok megfelelő kivitelezése céljából fontos volt, hogy a szőlőszemek teljesen sérülésmentesek legyenek, ezért a kocsánnyal együtt vágtam le ollóval a szőlőfütről a szőlőszemeket és óvatosan 50 ml-es műanyag steril centrifuga csövekbe helyeztem őket. Hűtött körülmények között szállítottam a laboratóriumba és a vizsgálatokat még a mintagyűjtés napján elkezdtem. A fizikai vizsgálatokhoz több, párhuzamosan gyűjtött szőlőbogyóra volt szükség, mivel a mechanikai sérülés egyáltalán nem megengedett a textúraelemzés során, mert a sérült bogyók esetében nem megfelelő nyomás-idő görbéket kaphatunk. A kémiai és mikrobiológiai vizsgálatokhoz laboratóriumi homogenizátor (IUL Masticator homogenizátor, IUL S.A., Spanyolország) segítségével roncsoltam a szőlőbogyó mintákat.



1. Aszúsodási fázis:

Teljesen ép, érett szőlőszem.

2. Aszúsodási fázis:

Világos barna bogyó, barnás-lilás elszíneződések jelennek meg.

3. Aszúsodási fázis:

Elindul a dehidratáció, a már teljesen barnás-lilás színű bogyók „aszalódni kezdenek”. Láthatóvá válhatnak a gombafonalak.

4. Aszúsodási fázis

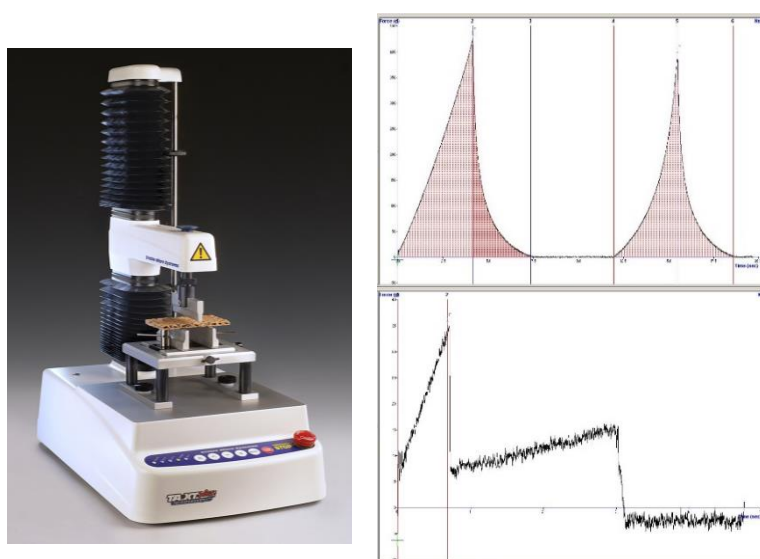
Valódi aszúszem. Barnás-lilás színű teljesen dehidratált szőlőbogyó. „Látens” gombafonalak formájában van jelen a *B. cinerea*.

8. ábra Az aszúsodás stádiumai (saját felvétel)



## 4.2. A szőlőbogyók fizikai tulajdonságainak mérése

A szőlőbogyók fizikai tulajdonságainak méréséhez a TAXT2i típusú (Stable Micro System, Surrey, Egyesült Királyság) textúraelemző készüléket használtam HDP 90-es platformmal és 30 kg-os maximális terheléssel. Az alkalmazott berendezést és a mérés során kapott görbék illusztrációját a 9. ábra mutatja be.



9. ábra: Textúra elemző készülék (Stable Micro System, Surrey, Egyesült Királyság)

Az adatok kiértékelését a Texture Expert Exceed szoftver csomaggal végeztem. A készülék technikailag alkalmazott beállításait az 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: A textúraelemzővel végzett mérések (Letaief et al. 2008/a)

Mérés típusa	Szonda	A szonda sebessége	Összenyomás	Mért fizikai paraméterek
Bogyóhéj keménysége	tű P/2N	1 mm s <sup>-1</sup>	3 mm	F <sub>sk</sub> : bogyóhéj keménység [N] W <sub>sk</sub> : átszakítási munka [mJ] E <sub>sk</sub> : Young's modulus (az anyag keménysége az alkalmazott nyomás ellenében) [N/mm]
Textúra profil (bogyó keménysége)	P/35	1 mm s <sup>-1</sup>	25% deformáció	BH: Bogyó keménység [N]

Minden paraméter mérése előtt sor került a kar magasságának, sebességének, maximális nyomóerejének kalibrálására, valamint a megfelelő szonda felhelyezésére. A bogyóhéj keménység vizsgálatához kocsánnyal együtt helyeztem a bogyókat a mintaasztalra mindig ugyanabban az irányban, így minden bogyó esetében azonos oldalon történt a mérés. A 2. és 3. botritizálódási fázisú bogyók esetében sokszor volt szükség a mérés ismétlésére, mivel ezen stádiumokban nagyon vékony a bogyó héj, így sok esetben már a mérés előtt roncsolódott a bogyó.

#### 4.3. A szőlőbogyók kémiai tulajdonságainak vizsgálata

Az alap analitikai paraméterek meghatározását WineScan (FOSS-analytic, Dánia) készülékkel végeztem (10. ábra). A nemesrothadás stádiumaiban minden szőlőfajta-hónap-év kombinációban a begyűjtött szőlőbogyókat laboratóriumi élelmiszer homogenizátor (IUL Masticator homogenizátor, IUL S.A., Spanyolország) segítségével roncsoltam, majd a kapott mustot leszűrtem, centrifugáltam és a tiszta must frakciót vizsgáltam a WineScan készülékkel. Az alábbi must analitikai paramétereket mértem: cukortartalom (Brix), titrálható savtartalom (TA) és pH.



10. ábra: A méréshez használt WineScan készülék (FOSS-analytic, Dánia)

## 4.4. Szőlőbogyók mikrobiológiai vizsgálata

### 4.4.1. Törzsgyűjtemény kialakítása

Az izolálás első lépéseként az *Olaszrizling* és *Turán* aszúsodott szőlőbogyókról *B. cinerea* konidiumokat vittem át bengál-rózsa-kloramfenikol szelektív táptalajra (RBC: Scharlau Chemie S.A. Spanyolország). A bengál-rózsa-kloramfenikol táptalajon csírázásnak indult konidiumokból sztereo-mikroszkóp alatt monokonidiális telepeket válogattam, majd agar darabkával kivágva áthelyeztem a növekedéshez szükséges burgonya-dextróz agar táptalajra (PDA: Scharlau Chemie S.A. Spanyolország). Az így létrehozott izolátumokat törzsgyűjteménybe rendeztem és évjárat, mintagyűjtés ideje és származási hely szerint burgonya dextróz agaron tartom fenn, illetve  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 50%-os glicerinben tárolom (5. táblázat).

A *Furmint* és *Hárslevelű* szőlőbogyók botritizálódási stádium-hónap-év kombinációjának élesztő- és fonalgomba összetétel vizsgálata során a mikroorganizmusok izolálásához általános és szelektív táptalajokat használtam. A szőlőbogyókat (10 g) 90 ml fiziológiás sóoldattal együtt laboratóriumi élelmiszer homogenizátor (IUL Masticator homogenizátor, IUL S.A., Spanyolország) segítségével roncsoltam, majd hígítási sort készítettem és táptalajokra szélesztettem. A gombák szelektálásához CGA (Chloramphenicol Glucose Agar, Scharlau Chemie S.A. Spanyolország), CD (Czapek Dox Agar, Merck KGaA, Germany), TGE (Trypton Glucose Extract, Scharlau Chemie S.A. Spanyolország) és DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol, Scharlau Chemie S.A. Spanyolország) tápközegeket használtam, majd a  $20\text{-}23\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on kifejlődött különböző gombatelepeket PDA (Potato Dextrose Agar, Scharlau Chemie S.A. Spanyolország) és YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose, Scharlau Chemie S.A. Spanyolország) agarokra oltottam. Az ily módon létrehozott izolátumokat törzsgyűjteménybe rendeztem botritizálódási fázis, szőlőfajta, szüretidőpont (hónap), évjárat szerint és  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 50%-os glicerinben tárolom (5. táblázat).

#### 4.4.2. Morfológiai vizsgálatok

##### 4.4.2.1. *B. cinerea* növekedési profil vizsgálat és morfológiai csoportok meghatározása

A *B. cinerea* izolátumok növekedési profil vizsgálatához a mintagyűjést követően frissen izolált, négy napja aktívan fejlődő gombatelep széléről kivágott 5 mm-es agar korongot helyeztem a PDA agarlemez közepére. A Petri-csészéket 20 °C-on (Martinez et al. 2003), 15 °C-on és 25 °C-on (Thomas et al. 1988) sötétkamrában inkubáltam. A micélium fejlődést négy napon keresztül naponta regisztráltam. A növekedési profil vizsgálatot háromszoros ismétlésben végeztem el. A *B. cinerea* morfológiai tulajdonságainak vizsgálatához mindhárom évjáratban (2013, 2014, 2015) ugyanazokat az izolátumokat vizsgáltam, friss, egyszer átoltott tenyészetekből a három különböző mintagyűjtési hónap és szőlőfajta (*Turán* és *Olaszrizling*) kombinációban. A kialakult morfológiai karaktereket a 20 °C-os optimális hőmérsékleten 21 napig tartó inkubáció után különítettem el. A 21 nap inkubáció után makroszkópiusan megállapítható tulajdonságok alapján –sporuláció, micélium és szklerócium fejlődés– négy micéliális (M I, M II, M III, M IV) és négy szkleróciális (S I, S II, S III, S IV) típust különítettem el (Martinez et al. 2003). Vizsgálataimat három ismétlésben végeztem el minden izolátum esetében.

Micéliális megjelenés alapján négy csoportot különítettem el. Ezek közül az elsőben – M I – a gyenge micélium képzés, a sporuláció hiánya és a nagyon ritka szklerócium képzés volt jellemző, a második csoportban – M II – a normál sporuláció és légmicélium képzés mellett a szklerócium képződést nem mutató izolátumokat soroltam, a harmadik csoportba – M III – a micélium csomókat alkotó izolátumokat soroltam, melyekre a nagyon gyenge sporuláció és a nagyon ritka szklerócium képződés volt jellemző, a negyedik micéliális csoportba – M IV – pedig azok az izolátumok tartoztak, melyek normál légmicéliumot képeztek, folyamatos sporuláció jellemezte őket és nagyon ritka szklerócium képzés is előfordult.

A szkleróciális csoportok száma megegyezik a micéliális csoportok számával (négy – S I, S II, S III, S IV). Az ide tartozó izolátumok különböző megjelenésűek és nagy fenotípusos variabilitást mutatnak. Mind a négy szkleróciális csoport esetében nagyon gyenge micélium képződés volt jellemző. Az S I csoportra a folyamatos sporuláció

mellett a méretben változatos, rendezetlen elhelyezkedésű szkleróciumok képződése volt jellemző, az S II csoportot is a folyamatos sporuláció, de a szkleróciumok körkörös megjelenése jellemezte. Az S III csoportnál a sporuláció ritka volt nagy és rendezetlenül elhelyezkedő szklerócium képződés mellett, az S IV csoport esetében pedig a szintén nagyon ritka sporuláció mellett a nagyon sok kisebb méretű szklerócium volt megfigyelhető szétszórtan elhelyezkedve.

#### 4.4.2.2. Élesztőgombák morfológiája

Az élesztőgombák azonosítása során (Kurtzman et al. 2011) a telepek makromorfológiai tulajdonságait vizsgáltam mikroszkóp segítségével (ALPHA BIO-5F típusú fluoreszcens mikroszkóp, 100x objektív). A felvételezéshez friss tenyészeteket használtam (1-3 nap), melyekből preparátumot készítettem a következő módon: a friss tenyészetből egy kacsnyi mennyiséget a tárgylemezen steril desztillált vízben szuszpendáltam és a mikroszkóp tárgyalasztalára helyeztem. A morfológiai tulajdonságok alapján csoportokba rendeztem az izolátumokat.

#### 4.4.2.3. Összes élesztő- és penészszám vizsgálata

A nemesrothadás folyamata során vizsgáltam a *Furmint* és *Hárslevelű* (minden mintagyűjtés és aszúsodási fázis) szőlőbogyók összes élesztő- és penészszámát a telepszámlálás módszerével. Az élesztő- és penészszám meghatározásához CD (Czapek Dox Agar, Merck KGaA, Germany) és CGA (Chloramphenicol Glucose Agar, Scharlau Chemie S.A. Spanyolország) táptalajt használtam, a szélesztés után 22 °C és 25 °C-on inkubáltam a tenyészeteket három napig, majd megszámláltam a kifejlődő telepek számát.

#### 4.4.3. Gombák molekuláris azonosítása

##### 4.4.3.1. DNS kivonás és rDNS amplifikáció

A szőlőbogyók felületéről a 2016-ban és 2017-ben izolált mikroorganizmusok pontos azonosítása érdekében az élesztőgombák és fonalgombák tiszta friss tenyészeiből DNS-t vontam ki (táblázat M3). A nukleinsav izoláláshoz NucleoSpin Plant II DNS kivonó kitet használtam (Macherey-Nagel, Németország) az élesztőgombák és fonalgombák esetében. A PCR reakciót MyTaq DNS polimerázzal (Bioline GmbH, Németország) végeztem el 50 µl végtérfogóban (4 µl 1,25 µM forward primer, 4 µl 1,25 µM reverse primer, 2 µl nukleinsav, 25 µl 2xMyTaq Mix és 15 µl steril nukleázmentes víz). A PCR program beállításait a 3. táblázat tartalmazza. A reakció során kapott terméket tisztítottam (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN, Németország) és mennyiségét Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) készülék alkalmazásával ellenőriztem, majd szekvenáltattam (BaseClear B.V, Hollandia). A molekuláris biológiai vizsgálatok során a következő DNS régiók alapján azonosítottam a mikroorganizmusokat: 26S rDNS D1/D2 régiója és az ITS1/5,8S rDNS/ITS2 régió. Az alkalmazott primerek fonalgombák esetén a következők voltak: ITS1-F (5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3') (Gardes és Bruns 1993) és ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al. 1990), élesztőgombák esetén NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) és NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (Peterson és Kurtzman 1991).

3. táblázat: A PCR reakció során alkalmazott primer párok és a reakció beállításai

Mikroorganizmus típusa	Primer Pár	rDNS régió	PCR reakció
Fonalgomba	ITS 1F/ITS 4	ITS1/5,8S rDNS/ITS2	denaturáció 94 °C 3 min, 94 °C 45 sec, anellálás 55 °C 1 min, extenzió 72 °C 2 min, 35 ciklus, 72 °C 10 min
Élesztőgomba	NL 1/NL 4	26S D1/D2	denaturáció 94 °C 3 min, 94 °C 45 sec, anellálás 53 °C 1 min, extenzió 72 °C 2 min, 35 ciklus, 72 °C 10 min

#### 4.4.3.2. Szekvenálás, szekvencia elemzések

A megbízás alapján elkészült (BaseClear B.V, Hollandia) élesztő – és fonalgomba szekvenciákat az NCBI adatbázisában BLAST kereső algoritmussal (Altschul et al. 1990) és referencia szekvenciák (Barata et al. 2012, Masneuf-Pomarede et al. 2016) alapján azonosítottam, majd elkülönítettem a különböző nemesrothadás fázisában lévő szőlőbogyókon megtalálható élesztőgomba és fonalgomba nemzetségeket. A nemzetségek azonosítása során a referencia szekvenciához való legnagyobb hasonlóságot vettem alapul.

A 2017-es évjáratban izolált élesztő - és fonalgomba telepek molekuláris azonosítása során kapott DNS szekvenciákat felhasználtam statisztikai vizsgálatokhoz, melynek során operational taxonomic units (OTUk) csoportokba rendeztem a szekvenciákat 97%-os hasonlóság alapján a USEARCH v. 11 szoftver program segítségével (Edgar, 2010). Az azonosított OTU csoportokat feltöltöttem az NCBI GenBank adatbázisába, melyek az alábbi azonosítószámokat kapták: MW349993-MW350005 a fonalgombák esetében és MW356913-MW356927 az élesztőgombák esetében.

#### 4.5. Statisztikai módszerek

##### 4.5.1. *B. cinerea* növekedési profil és morfológia eredményeinek statisztikai elemzése

A *B. cinerea* növekedési profil vizsgálat mérési adatait varianciaanalízissel elemeztem. A kísérlet és mintagyűjtés során faktor-paramétereket (évjárat, szüretidőpont, szőlőfajta) és a hőmérsékletet, mint ismert változót variáltam. Az analízis célja az volt, hogy megvizsgáljam, hogy a különböző változóknak (faktor típusúak és folytonosnak tekinthető) beállított eltérés megváltoztatja-e a mért adatok (gombatelepek növekedési sebessége) eloszlását.

A vizsgálat során a változók együttes hatását is figyelembe vettem (többváltozós varianciaelemzés). Az eloszlások átlagát LSD (Least Significant Difference) teszt (szignifikancia szint p-értékre  $\alpha = 5\%$ ) segítségével csoportosítottam. Az azonosított morfológiai típusok gyakoriságát (frequency distribution, FD%) az alábbi összefüggés szerint számoltam évjáratonként, szüretidőpontonként és szőlőfajtánként.

$FD\% = (\text{izolátum száma az adott morfológiai csoport esetében} / \text{összes izolátum szám}) * 100$

Az így kapott gyakoriságok eloszlását szintén varianciaanalízissel elemeztem, hogy feltárjam az évjárat, szőlőfajta, szüretidőpont, morfológiai tulajdonságok és ezek együttes hatásait. Az átlagokat ez esetben is LSD teszt segítségével csoportosítottam ( $\alpha = 0,05$ ).

Nem metrikus többváltozós skálázással (NMDS) ordinációs vizsgálatot végeztem a morfológiai csoportok évjárat és szüretidőpont szerinti eloszlásain. Meghatároztam az NMDS „stress” értékét is. Az ordinációban vizuálisan megfigyelt elkülönülés szignifikanciáját permANOVA (permutációs többváltozós varianciaanalízis) módszerrel határoztam meg.

#### 4.5.2. A botritizálódási stádiumok fizikai-kémiai-mikrobiológiai összefüggéseinek statisztikai elemzése

A fizikai-kémiai és mikrobiológiai vizsgálatok eredményeit egy komplex adatbázisba rendeztem, melynek vizualizációjához és értelmezéséhez az ilyen esetekben szokásos megközelítést alkalmaztam. Az adatok táblázatba rendezéséhez Microsoft Excel programot, míg a statisztikai elemzésekhez RStudio-t használtam (R-Studio 4.03 verzió) több statisztikai parancs-csomagot is felhasználva (Vegan, mixOmics és FactomineR) (Oksagen et al. 2012).

A módszer általános leírásához szükség van néhány fogalom bevezetésére, mégpedig szükséges megkülönböztetni azokat a változókat, amelyek a kísérlet során beállításra kerültek, valamint azokat, amelyeket mértem vagy számítottam. A kísérlet során beállított változókat - legyenek akár faktor típusúak, diszkrét vagy folytonosak - a továbbiakban külső változóknak nevezek, míg a mért vagy számított változókat belső változóknak.

Először az adatok (belső változók értékeinek) skálázását végeztem el, zéró átlagú, egységnyi szórású normál eloszlássá transzformálva a változók mért értékeit, majd elvégeztem a faktoriális és numerikus változók csoportosítását, valamint a különböző előre definiált összefüggések szerinti változók csoportosítást: fizikai, kémiai és biológiai változók.



A skálázás után a kiugró értékek szűrését végeztem el. A szűrésre az ún. Rosner-féle outlier tesztet használtam, amely nem túl szigorú, így mindössze 1-2 kiugró érték adódott bizonyos változók esetében.

A skálázás után létrehoztam a faktoriális változók numerikus megfelelőit, illetve létrehoztam a faktoriális paraméterek kombinációiból adódó változókat is (például: botritizálódási fázis és szüretidőpont kombinációja: (1, szeptember), (1, október), (1, november), (2, szeptember) stb.). Az így kapott sokváltozós eloszlást először a külső változókat figyelembe véve ábrázoltam az összes belső változó eloszlását doboz-diagramon. Az adatok így már vizuálisan is összehasonlíthatóvá váltak.

Annak eldöntésére, hogy a különböző belső változók azonos vagy különböző eloszlásba tartozhatnak-e (természetesen a megfelelő szignifikancia szint, 5% mellett) varianciaanalízist végeztem (ANOVA). A varianciaanalízist minden külső változóra egyenként (one-way) illetve a változók kombinációjára (two-way) és kölcsönhatása (interaction) esetében is elvégeztem.

A varianciaanalíziseket a következő külső változókra és azok kombinációjára végeztem: a botritizálódási fázisok (1-4), a szőlőfajták (*Furmint* és *Hárslevelű*) és a szüretidőpontok (szeptember, október, november). A belső változók, amelyek eloszlását összehasonlítottam a következők voltak:  $F_{sk}$ ,  $E_{sk}$ ,  $W_{sk}$ , BH, cukortartalom (Brix), pH, titrálható sav (TA) és mikroorganizmus (OTUk) összetétel.

A varianciaanalízisek egy adott belső változó esetén a külső változók minden kombinációjára meghatározták, hogy az adott független paraméter megfelelő „csoportosítását” adja-e.

A legjobb ANOVA modell kiválasztásához az Akaike information criterion (AICcwt: Akaike Information Criterion contribution weight) számot határoztam meg, melyeket a 4. táblázatban tüntettem fel. Ez az érték a modell lehetséges predikciós hibáját határozza meg ezáltal utalva az adott modell „jóságára”.

4. táblázat: A legjobban illeszkedő ANOVA modelleket ábrázolja a fizikai, kémiai és mikrobiológiai változók esetében az AIC kritérium alapján. Rövidítések Ph: fázisok, C: szőlőfajták, Ct: mintagyűjtési időpontok, a pluszjel jelöli a two-way ANOVA modellt, a csillag pedig az interaction modellt jelöli.

	Legjobban illeszkedő modell	AICcwt (%)	<i>p</i> -érték
F <sub>sk</sub>	Fázisok+Szőlőfajták	54	Ph: 2.16e <sup>-9</sup> C: 1.47e <sup>-1</sup>
E <sub>sk</sub>	Fázisok	75	Ph: 9.56e <sup>-6</sup>
W <sub>sk</sub>	Fázisok+Szőlőfajták	96	Ph: 1.43e <sup>-4</sup> C: 6.55e <sup>-3</sup>
BH	Fázisok	84	Ph: 4.95e <sup>-14</sup>
Cukortartalom	Fázisok+Szüretidőpontok	47	Ph: 1.74e <sup>-7</sup> Ct: 4.42e <sup>-2</sup>
pH	Szőlőfajták+Szüretidőpontok	70	C: 1.2e <sup>-4</sup> Ct: 2.07e <sup>-2</sup>
TA	Fázisok+Szüretidőpontok	100	Ph: 9.26e <sup>-5</sup> Ct: 3.44e <sup>-4</sup>
Gomba OTUK	Szőlőfajták*Szüretidőpontok	95	C: 3.62e <sup>-3</sup> Ct: 3.03e <sup>-3</sup> C*Ct: 5.02e <sup>-3</sup>

Az AIC teszt által kiválasztott, az adott eloszláshoz legjobban illeszkedő modell esetében Tukey HSD tesztet végeztem, amely azt teszteli, hogy az adott külső változó különböző értékei esetén a belső változók eloszlásai szignifikáns eltérést mutatnak-e. Ezek alapján el lehet végezni a külső változók szerinti csoportosítást, így világosan kiderül, hogy a mért paraméterek alapján elkülönülnek-e a kísérletek során beállított változók, azaz, hogy a botritizálódási fázis, a mintavétel időpontja és a szőlőfajta, valamint ezek bármilyen kombinációjának különböző értékei megkülönböztethetők-e a mért paraméterek ismeretében. A gondolatmenetet megfordítva: egy kívánt fizikai, kémiai vagy biológiai állapota a szőlőbogyónak a külső paraméterek mely kombinációja esetén áll fenn. Ilyen hipotézis lehet például az, hogy vajon a “tökéletes” aszúszem milyen fajtából és mikor szüretelve érhető el, és az ettől eltérő szüretidőpont vagy másik fajta esetében szignifikáns különbség mutatkozik-e a mért értékekben.

A Tukey HSD teszt által adott szignifikancia értékek alapján elvégeztem a belső változók eloszlásainak csoportosítását.

Miután ábrázoltam és számszerűen is meghatároztam a külső és belső változók közötti lehetséges összefüggéseket, érdemes a többváltozós eloszlást redukált térben

ábrázolni, ezáltal méginkább képet kaphatunk a kísérlet paramétereinek összefüggéseiről. A többváltozós eloszlások két- vagy többdimenziós ábrázolásának különböző módszerei léteznek úgy, mint főkomponens analízis, diszkriminancia analízis és más ordinációk. Munkám során főkomponens-analízist (Principal Component Analysis – PCA) használtam, hiszen ezzel a módszerrel csökkenthető a változók dimenziószáma, ám emellett az eloszlás varianciája a lehető legnagyobb marad. Az ortogonális transzformációt RStudio segítségével végeztem, majd az első két főkomponenst figyelembe véve 2 dimenzióban ábrázoltam a mért adatokat. Az ábrázolás mellett meghatároztam azt is, hogy az egyes mért változók milyen mértékben járulnak hozzá a főkomponensekhez, illetve a belső változóknak az első két főkomponens által meghatározott síkra való vetületét is ábrázoltam, hogy az egyes mért változók milyen viszonyban állnak egymással. Amennyiben közel párhuzamosak az azt jelenti, hogy ebben a 2D-s megközelítésben összefüggően változnak, viszont ha merőlegesek az azt feltételezi, hogy egymástól függetlenek.

A gombaközösségek esetén nem alkalmazható az Euklidészi metrika, ezért az ún. Bray-Curtis távolság határozandó meg, mely két minta esetén a közösen előforduló mikroorganizmusok és az összes mikroorganizmus számának hányadosából állítható elő:  $BC_{ij} = 1 - \frac{2C_{ij}}{S_i + S_j}$ , ahol BC a Bray-Curtis távolság,  $C_{ij}$  a két mintában azonosan előforduló mikroorganizmusok száma,  $S_i$  és  $S_j$  pedig a mintákban összesen előforduló mikroorganizmusok száma. Ezek alapján meghatároztam a különbözőségi- vagy távolságmátrixot és az eloszlást NMDS ordináció segítségével 2D-ban ábrázoltam (RStudio, Vegan csomag, metaMDS függvény). Meghatároztam a mintákban található gombaközösségek ún. lokális változatosságát ( $\beta$ -diversity) is, mely megadja, hogy egy adott minta ökológiai változatossága hogyan aránylik a teljes populáció ökológiai változatosságához, azaz egy adott minta mennyire mutatja a teljes populáció tulajdonságait. A mikrobák statisztikai elkülönítéséhez meghatároztam az ún. OTU-kat (Operational Taxonomic Unit), mely a mikrobák csoportokba sorolását jelenti. Egy OTU csoportba soroltam a mikrobákat, ha a vizsgált DNS szekvenciája leglább 97%-ban azonos volt.

A mért paramétereket változócsoportokba sorolva (textúra, analitika, mikrobiális közösség) meghatározható az, hogy figyelembe véve az adott csoportba tartozó változókat az ordináció ábrázolásán vizuálisan kirajzolódó fázisonkénti, szüretidőpontkénti vagy a szőlőfajtából adódó “elkülönülés” mennyire szignifikáns.

Ehhez a permutációs többváltozós varianciaanalízist használtam (Permutational Multivariate ANOVA – PerMANOVA, RStudio, Vegan csomag, Adonis függvény). Ezzel számszerűsíthető a vizuálisan érzékelhető eredmény, természetesen egy adott szignifikancia szinten. A változó csoportok korrelációját, azaz, hogy az adott csoportba tartozó változók együttes eloszlása mennyire korrelál egy másik változócsoporthoz tartozók eloszlásával, az ún. Mantel-teszt segítségével határoztam meg. Ez a módszer az egyváltozós Pearson-féle korrelációs együttható többváltozós esetre történő kiterjesztése lineáris algebrai eszközökkel. A Pearson-féle korreláció két változó vagy változócsoporthoz együttes varianciájának és a változók vagy csoportok saját varianciái szorzatának hányadosa, mely többváltozós esetben is definiálható, így két többdimenziós eloszlás korrelációja is vizsgálhatóvá válik.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Munkám során három évjáratban (2013, 2014, 2015) vizsgáltam az aszús szőlőbogyók felületén jelen lévő *B. cinerea* izolátumok növekedési profilját és morfológiai sajátosságait, majd további két évjáratban 2016-ban és 2017-ben pedig a nemesrothadás folyamatának fizikai, kémiai és mikrobiológiai sajátosságait tártam föl, melynek köszönhetően a minőségi aszúbogyóra vonatkozóan új számszerűsíthető paramétereket írtam le.

Minden vizsgált évjáratnak megvan a maga sajátossága, ami nemcsak a kutatás terén fontos akár a mintagyűjtések szempontjából, hanem a szőlész-borász gyakorlat számára is támpontot nyújt az elkészített termékek évjáratonkénti különbözőségének megismeréséhez.

### 5.1. Mikroorganizmusok törzsgyűjteménye

2013-ban, 2014-ben és 2015-ben a korábban ismertetett szomolyai szőlőültetvényen termő két szőlőfajtaról (*Olaszrizling, Turán*) aszús tüneteket mutató szőlőbogyó minták feldolgozása során 693 egyspórás *B. cinerea* izolátumot állítottam elő. A *Botrytis* nemzetségre utaló jellegzetes morfológiai kép az irodalmi áttekintésben szereplő saját pásztázó elektronmikroszkópos felvételen látható (1. ábra). Az izolátumokat szőlőfajták szerint a gyűjtés és izolálás sorrendjében kódoltam és dolgoztam fel, illetve készítettem elő tárolásra és további vizsgálatokra. Adataikat törzsgyűjteménybe rendeztem a további vizsgálatok megalapozásához (5. táblázat). A gyűjteményben szereplő izolátumokon végeztem el a növekedés profil és morfológiai vizsgálatokat, különös figyelmet fordítva a mintagyűjtési (szüreti) időpontok közötti különbségekre.

5. táblázat: Az egri és mádi mintagyűjtés éveiben izolált mikroorganizmusok számát és típusát tartalmazza.

Mintavétel ideje	Mintavétel helye	Szőlőfajta	Izolátum száma (db)	Izolátum típusa
<b>2013</b> szeptember- november	Eger/Ispánberki dűlő	<i>Turán,</i> <i>Olaszrizling</i>	152	<i>B. cinerea</i>
<b>2014</b> szeptember- november	Eger/Ispánberki dűlő	<i>Turán,</i> <i>Olaszrizling</i>	221	<i>B. cinerea</i>
<b>2015</b> szeptember- november	Eger/Ispánberki dűlő	<i>Turán,</i> <i>Olaszrizling</i>	320	<i>B. cinerea</i>
<b>2016</b> szeptember- november	Mád/Betsek dűlő	<i>Furmint,</i> <i>Hárslevelű</i>	147 (69 fonalaszgomba, 78 élesztőgomba)	Élesztő + Fonalas gomba
<b>2017</b> szeptember- november	Mád/Betsek dűlő	<i>Furmint,</i> <i>Hárslevelű</i>	198 (79 fonalaszgomba, 119 élesztőgomba)	Élesztő + Fonalas gomba

2016-ban és 2017-ben a mádi Betsek dűlőből *Furmint* és *Hárslevelű* szőlőfajtákról gyűjtött, négy botritizálódási stádiumból (1. ép, teljes érettségű szőlőszem; 2. még nem töppedt, de barnás-lilás foltokkal tarkított szőlőszem; 3. már töppedésnek induló, botritiszes szőlőszem; 4. a lilás aszúszem, látens gombafonalakkal) származó szőlőbogyók feldolgozása során összesen 345 izolátumot különítettem el (5. táblázat). Az élesztő- és fonalaszgombák törzsgyűjteménybe rendezése során első lépésként a telepek morfológiai tulajdonságait vettem alapul. Az izolátumokat szőlőfajta, botritizálódási stádium és mintagyűjtési időpont szerint csoportosítottam és adatbázisba rendeztem. A 6. táblázat tartalmazza a 2016 és 2017-es évjáratban izolált élesztő- és fonalaszgomba izolátumok számát fázisonként.

6. táblázat: Élesztőgomba és fonalásgomba izolátumok eloszlása aszúsodási fázisonként és évjáratonként.

Izolátumok száma (db)	Aszúsodási fázis (1-4)	2016 élesztőgomba	2016 fonalásgomba	2017 élesztőgomba	2017 fonalásgomba
Szeptember	1	10	4	14	12
	2	13	4	11	8
	3	9	1	8	3
	4	11	4	1	2
<b>Összesen</b>		<b>43</b>	<b>13</b>	<b>34</b>	<b>27</b>
Október	1	31	6	15	3
	2	17	12	13	5
	3	13	7	8	5
	4	13	6	2	5
<b>Összesen</b>		<b>74</b>	<b>31</b>	<b>38</b>	<b>18</b>
November	1	7	3	7	13
	2	10	6	7	10
	3	14	6	16	8
	4	20	10	17	7
<b>Összesen</b>		<b>51</b>	<b>25</b>	<b>47</b>	<b>38</b>

## 5.2. Környezeti tényezők hatása a *B. cinerea* fejlődésére

Az eddigi irodalmi adatok alapján a legnagyobb hatást a környezet (klíma, időjárás) gyakorolja a gomba megjelenésére és növekedésére (Ciliberti et al. 2015 a, b). A szürkerothadást vizsgálva Cantoral és munkatársai, illetve Vallejo és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy az erős fertőzőképességgel rendelkező botritisz törzsek gyorsabb növekedési profillal rendelkeznek (Vallejo et al. 2003, Cantoral et al. 2011). Munkám során a környezeti körülmények közül az évjárat, szőlőfajta és a szüretidőpont (mintagyűjtési hónap) hatását vizsgáltam a gomba micéliális növekedésére különböző inkubációs hőmérsékleteken.

Az összefüggések megértése szempontjából át kell tekinteni a vizsgált három évjárat (2013-2015) őszi időjárását, ami jelentősen hozzájárult a gomba fejlődéséhez. Az átlagos napi középhőmérséklet mindhárom évjáratban, szeptemberben volt a legmagasabb. A napi középhőmérséklet összesített átlag maximum értékei a következők: 22,7; 23,1 és 24,0 2013-tól 2015 felé haladva. Az összes csapadék mennyisége 2013 őszén volt a legkevesebb (112,5 mm) és 2015 őszén pedig a legtöbb

(199, 4 mm) (7. táblázat). A nemesrothadás kialakulása és fejlődése szempontjából 2013 őszi időjárása sokkal kedvezőbbnek bizonyult, mint a 2014-es és 2015-ös évjárat.

7. táblázat: Az ültetvényen mért napi középhőmérsékletek és csapadék mennyiségek a mintagyűjtés három hónapjában: szeptemberben, októberben, novemberben 2013-2015-ben.

Évjárat és hónap	Napi hőmérséklet adatok (°C)			Csapadék (mm)
	átlag	minimum	maximum	
2013				
Szeptember	15,4	8,8	28,0	27,4
Október	13,3	0,6	24,6	40,5
November	8,1	-4,0	15,5	44,6
összesítve*	12,3	0,8	22,7	112,5
2014				
Szeptember	17,9	6,8	28,4	91,8
Október	12,5	2,6	23,7	50,0
November	7,8	-1,9	17,2	11,6
összesítve*	12,7	2,5	23,1	153,4
2015				
Szeptember	18,7	9,2	34,8	54,8
Október	11,1	3,2	23,3	122,0
November	7,2	-2,2	13,8	22,6
összesítve*	12,3	3,4	24,0	199,4

\* Az őszi hónapokra összesített értékek a hőmérséklet adatok esetében az átlagokat jelentik, a csapadék adatok esetében pedig a három hónapban mért értékek összegét.

A kísérleti beállítás és mintagyűjtés során fennálló paramétereket (évjárat, szüretidőpont, szőlőfajta) és a hőmérsékletet, mint ismert változót variáltam. Az analízis célja az volt, hogy megvizsgáljam, hogy a különböző változóknál (évjárat, mintagyűjtési hónap, szőlőfajta, inkubációs hőmérséklet) való eltérés megváltoztatja-e a mért adatok (gombatelepek növekedési sebessége) eloszlását. A varianciaanalízis eredményei alapján szignifikáns különbségeket azonosítottam az évjárat, mintagyűjtési hónap és inkubációs hőmérsékletek között a micéliális fejlődést tekintve, de a szőlőfajta nem befolyásolta a gomba micéliális növekedését, ezért a szőlőfajta szerinti adatokat már összegezve kezeltem (8. táblázat). A vizsgálat során a változók együttes hatását is figyelembe vettem (többváltozós varianciaelemzés). Az eloszlások átlagát LSD (Least Significant Difference) teszt (szignifikancia szint  $p$ -értékre  $\alpha = 5\%$ ) segítségével csoportosítottam.



A három évjáratban a mintagyűjtési hónapokat is figyelembe véve a micéliális növekedés 59-79 mm, 75-84 mm és 55-77 mm értékek között változott 15, 20 és 25 °C-on (8. táblázat). A legnagyobb telepátmérő (84 mm) 20 °C-on mértem a 2014-es évjárat szeptemberben gyűjtött izolátumai esetében, míg a legkisebb növekedést (55 mm) 25 °C-on azonosítottam szintén a 2014-es évjárat szeptemberben gyűjtött izolátumai esetében. 15 és 25 °C-on nagyobb volt a micéliális növekedés 2013-ban, mint 2014-ben és 2015-ben, bár ha a 20 °C-os inkubációs hőmérsékleten mért növekedési értékeket különállóan vizsgálom, akkor 2014-ben magasabb értékeket mértem, mint 2013-ban és 2015-ben. Az átlagnövekedés értékeket vizsgálva elmondható, hogy a legnagyobb értéket 2013-ban mértem (76 mm), 2014-ben és 2015-ben is kisebb értékeket tapasztaltam (65 és 69 mm). A szeptemberi és novemberi mintagyűjtések izolátumainak növekedése között eltérés mutatkozott három esetben, 2013-ban 15 °C-on, 2014-ben 20 °C-on és 2015-ben 25 °C-on.

Az általam vizsgált fehér (*Olaszrizling*), illetve kék (*Turán*) szőlőfajtáról származó *B. cinerea* izolátumok növekedésének hőmérséklet optimuma nem tért el egymástól, a varianciaanalízis során nem azonosítottam szignifikáns különbséget. A legerőteljesebben 20 °C-on fejlődtek a *B. cinerea* izolátumok micéliumai, míg 15 és 25 °C-on a növekedés intenzitása csökkent (8. táblázat). Eredményeim összefüggésbe hozhatók a korábban publikált adatokkal (Martinez et al. 2003, Ciliberti et al. 2015 a, b), miszerint a különböző hőmérsékletek hasonlóan befolyásolták a *B. cinerea* izolátumok növekedését és optimális fejlődési hőmérsékletként a 20 °C-ot azonosították, míg az ennél alacsonyabb hőmérsékletek (5 °C és 15 °C) és a magasabb hőmérséklet (25 °C) az általuk végzett kísérletek alapján szintén csökkenést eredményezett a micélium fejlődésében. További kutatások igazolják a hőmérséklet ugyanezen hatását a *B. cinerea* fertőzési tulajdonságaira és a légmicélium fejlődésére szőlőbogyókon, ami azt jelenti, hogy 20 °C-hoz közeli hőmérsékleten növekszik a legjobban (Nair és Allen 1993, Thomas et al. 1988). Eredményeimet megerősíti az az előrejelzési modell is, amely a hőmérséklet tartományok és micéliális növekedés között fennálló összefüggéseken alapszik (Judet-Correia et al. 2010), és leírja, hogy fontos kapcsolat van a szőlőbogyókon előforduló fertőzés kialakulása és a hőmérséklet között (Broome et al. 1995).

A hőmérséklet micéliális növekedésre gyakorolt hatásán túl az évek micéliális növekedésre gyakorolt hatását Damialis és munkatársai vizsgálták (2015). A szerzők megállapították, hogy a *B. cinerea* micéliális fejlődését az 1980-as és 2000-es évek

között bekövetkező hőmérsékletváltozások szignifikánsan befolyásolták. Eredményeik alátámasztják az évjárat és növekedési profil összefüggésére vonatkozó eredményeimet, miszerint az általam vizsgált izolátumok növekedési profilja eltérést mutat a vizsgált évjáratok között.

A 2013-as évjáratban a napi maximum hőmérséklet 22,7 °C volt az őszi folyamán, ami közel áll a gomba növekedési optimumához, a 20 °C-hoz. Ezzel szemben 2014 és 2015 őszi a napi hőmérsékletek (23,1 és 24,0 °C) távolabb álltak az optimum hőmérséklettől, ami arra enged következtetni, hogy a lassabb növekedési profil és a micéliális csoportok alacsonyabb gyakorisági eloszlása volt jellemző 2014-ben és 2015-ben (8. és 10. táblázat).

A fent leírt eredmények igazolják azt a tényt, miszerint szőlészeti-borászati szempontból a 2013-as évjárat jó minőségű aszúszemek képződésére adott lehetőséget, hiszen az évjárat őszi optimális körülmények voltak jelen a *B. cinerea* növekedéséhez. A 2014-es évjárat gyakorlatban tapasztalt extrém csapadék eloszlásának (nem mennyiségének) köszönhetően a gomba növekedése nem az optimális ütemben haladt, illetve inkább az ősszel jelenlévő szürkerohadás tünetei jelentek meg a szőlőbogyókon, ezt igazolhatja az ebben az évjáratban mért legnagyobb növekedési ráta is. A 2015-ös évjárat őszi mért hőmérséklet adatai helyezkedtek el a legtávolabb az gomba növekedési optimumától, a gyakorlat oldaláról nézve az ősszel megjelenő botritizálódás szinte teljesen elmaradt ezen évjáratban.

8. táblázat: A *B. cinerea* telepátmérői (mm) négy napos inkubáció után 15, 20, 25 °C-on a három évjáratban (2013-2015) a három mintagyűjtési időpont alatt (szeptembertől-november) a szomolyai szőlőültetvényben.

Évjárat, Hónap	Hőmérséklet tartományok			<sup>a</sup> LSD <sub>0,05</sub>	<sup>b</sup> átlagos növekedés
	15 °C	20 °C	25 °C		
2013					
Szeptember	79 bB <sup>c</sup>	79 B	74 A	3,6	77
Október	76 ab	76	74	ns	76
November	75 a	77	77	ns	76
LSD <sub>0,05</sub>	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 <sub>0,05</sub>	na	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 <sub>0,05</sub>	ns	ns	4,2		ns
Összesen hónapoként					
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 <sub>0,05</sub>	ns	ns	ns		ns
Összesen évjáratonként					
2013	77 b	77 ab	75 b	ns	76 b
2014	60 aA	81 bB	56 ab	7,9	65 a
2015	61 aA	75 aB	70 bB	7,6	69 a
LSD <sub>0,05</sub>	6,6	5,8	7,3		6,4
Összesen évjárat és hónap szerint	66 A	78 B	67 A	7,9	70

<sup>a</sup>LSD<sub>0,05</sub> Least Significant Difference 5 % valószínűségi szinten.

<sup>b</sup> Összesített hőmérsékletek: A 15, 20 és 25 °C –on való növekedés.

<sup>c</sup>Minden oszlopban a kis betűk jelölik az évjáratok és hónapok közötti különbségeket 5 %-os szignifikancia szinten, a sorokban pedig a nagy betűk jelölik a szignifikáns különbségeket a hőmérséklettartományok között (p=0,05).

<sup>d</sup>ns=nem szignifikáns

### 5.3. Környezeti tényezők hatása a *B. cinerea* morfológiai típusaira

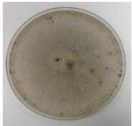
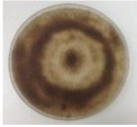
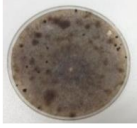
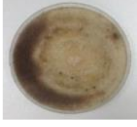
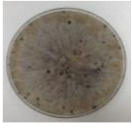
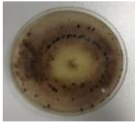

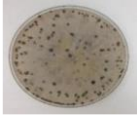
A gomba meghatározott növekedési optimum hőmérséklete alapján (20 °C-on) vizsgáltam a *B. cinerea* izolátumok morfológiáját, mely során a 9. táblázatban szereplő csoportokat azonosítottam (négy micéliális és négy szkleróciális) micéliumképzés, sporuláció és szklerócium képzés szempontjából.

A varianciaanalízis eredményei alapján szignifikáns különbségeket azonosítottam az évjárat, mintagyűjtési hónap és morfológiai csoportok gyakoriságának eloszlása között, azonban a szőlőfajta ezen esetben sem gyakorolt hatást a morfológiai csoportok gyakorisági eloszlására (10. táblázat). A vizsgált faktorok interakcióit tekintve nem azonosítottam szignifikáns különbségeket. Mivel a szőlőfajta nem játszik szerepet a morfológiai gyakoriságok eloszlásában, így a 10. táblázatban az eredményeimet évjárat, mintagyűjtési hónap és morfológiai típus szerint tüntettem föl. A három évjáratban és mindhárom mintagyűjtési hónapban a micéliális morfológiai csoportok gyakorisági eloszlása 51,4 és 91,7 % között alakult (átlag= 70,5 %), ami szignifikánsan magasabb volt a szkleróciális morfológiai csoportok gyakorisági eloszlásához képest. A szkleróciális morfológiai csoportok gyakoriságának eloszlása 8,3 és 48,6 % között helyezkedett el (átlag=29,5%) (10. táblázat). Általánosságban elmondható, hogy a leggyakrabban előforduló micéliális csoportok az M I, M II és M III és a leggyakrabban előforduló szkleróciális csoport pedig az S IV-es volt. A legmagasabb gyakorisági eloszlást (58,3 %) az M III csoport esetében azonosítottam a 2013-as szeptemberi izolátumoknál. A micéliális típusú izolátumok előfordulása sokkal gyakoribb volt a 2013-as évjáratban (gyakoriság 82,2 %), mint a 2015-ös évjáratban (gyakoriság 57,1 %). Ha a mintagyűjtési hónapok függvényében vizsgáltam a morfológiai csoportok előfordulási gyakoriságát, akkor szignifikáns különbségeket azonosítottam a korábbi (szeptember és/vagy október) és későbbi (november) szüretidőpontok között. 2013 őszén az M I-M III, S II és S IV típusok, 2014-ben az M I, M III, M IV, S I, S III és S IV típusok és 2015-ben pedig az M I, MIV és S I-S IV típusok fordultak elő (10. táblázat).

Korábbi tanulmányok igazolták, hogy a magasabb polifenol tartalommal rendelkező szőlőfajták esetében alacsonyabb volt a *B. cinerea* előfordulásának gyakorisága (Padgett és Morrison 1990, Deytieux-Belleau et al. 2009, Pezet et al. 2003, Köycü et. al. 2014), illetve a sötétebb héjjal rendelkező szőlőfajták esetében a *B. cinerea* növekedése lassabb volt, mint a világos/fehér héjjal rendelkező szőlőfajták esetében

az eltérő polifenol tartalomnak köszönhetően. Az általam vizsgált szőlőfajták közül a *Turán* egy festő szőlőfajta, ami azt jelenti, hogy nemcsak a szőlő héja tartalmaz színanyagot, hanem a húsa is, ennek köszönhetően még az átlagos kék szőlőfajtákhoz képest is magasabb polifenol tartalommal rendelkezik, mint az *Olaszrizling* (Balgá, 2015). Mindezek ellenére nem azonosítottam szignifikánsan eltérő gomba növekedési profilt a két vizsgált szőlőfajta között, illetve a morfológiai típusok gyakorisági eloszlása sem tért el szignifikánsan a kék és fehér héjú szőlőfajták között, ezért szőlőfajták szerint nem különítettem el a mért adatokat. Ezen eredmény arra enged következtetni, hogy a sötétebb héjú szőlőfajták esetében a szürkerothadás gátlása a növényi szövetekben történik, például a bogyóban, de ez nem okoz eltérést a már izolált gomba in vitro fejlődésében és a morfológiai csoportok eloszlásában sem a kék sem a fehér szőlőfajták esetében.

9. táblázat: Morfológiai csoportok kialakítása Martinez és munkatársai munkája nyomán (2003)

	Morfológiai típus	Micélium	Sporuláció <sup>a</sup>	Szklerócium <sup>b</sup>
	M I	gyenge	-	-
	M II	normál légmicélium	±	0
	M III	micélium csomók képződése	-	-
	M IV	normál légmicélium	±	-
	S I	nagyon gyenge	±	nagyobb és kisebb szkleróciumok, rendezetlenül
	S II	nagyon gyenge	±	körkörösén
	S III	nagyon gyenge	-	nagy szkleróciumok, rendezetlenül
	S IV	nagyon gyenge	-	sok kis szklerócium szétszórtan elhelyezkedve

<sup>a</sup>Sporuláció: - : nagyon ritka sporuláció, ± : folyamatos sporuláció

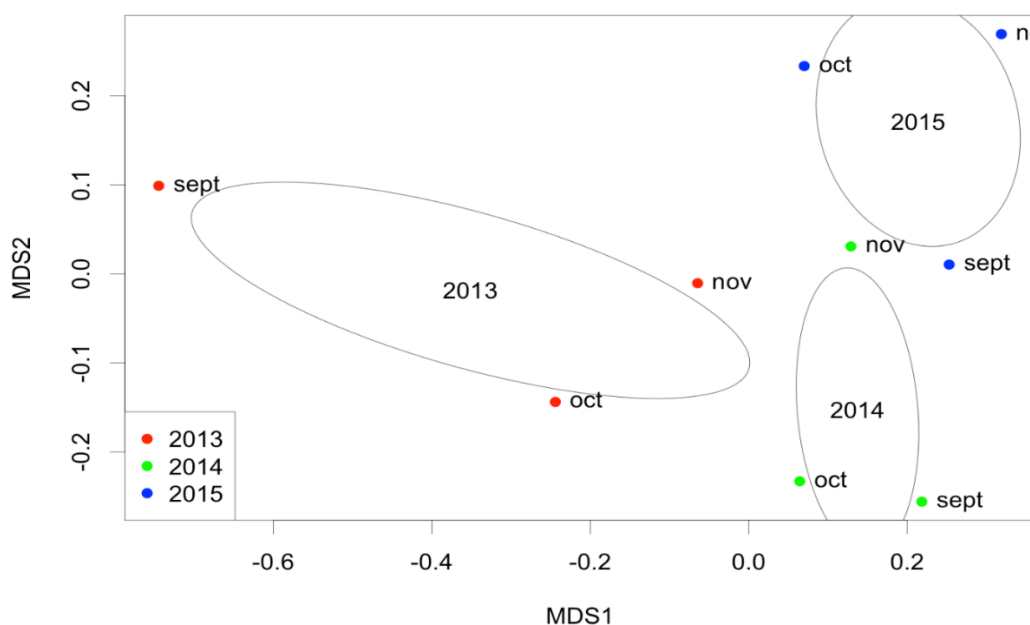
<sup>b</sup>Szklerócium: 0: nincs szklerócium, - : nagyon ritka szklerócium képzés

10. táblázat: *B. cinerea* izolátumok morfológiai típusainak gyakorisági eloszlásai %-ban kifejezve.

	Micéliális típusok (M típus) <sup>a</sup>				LSD 0,05	Σ M típus <sup>b</sup>	Szkleróciális típusok (S típus) <sup>a</sup>				LSD 0,05	Σ S típus <sup>b</sup>
	M I	M II	M III	M IV			S I	S II	S III	S IV		
<u>2013</u>												
Szeptember	8,3 aA <sup>c</sup>	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 <sub>0,05</sub>	13,3	11,7	15,2	ns		16,1	ns	5,8	ns	6,8		7,1
<u>2014</u>												
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 <sub>0,05</sub>	13,7	ns	11,2	2,8		13,8	3,7	ns	4,8	6,3		7,6
<u>2015</u>												
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 <sub>0,05</sub>	11,5	ns	10,8	9,4		10,2	5,0	5,1	4,4	5,8		8,3
<u>Össz.hónaponként</u>												
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 <sub>0,05</sub>	6,9	ns	11,6	4,2		ns	ns	ns	3,7	4,3		ns
<u>Össz.évjáratonként</u>												
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 <sub>0,05</sub>	9,2	ns	13,1	4,6		15,7	4,2	ns	3,6	5,3		8,5
<u>Össz.évjárat/hónap</u>	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

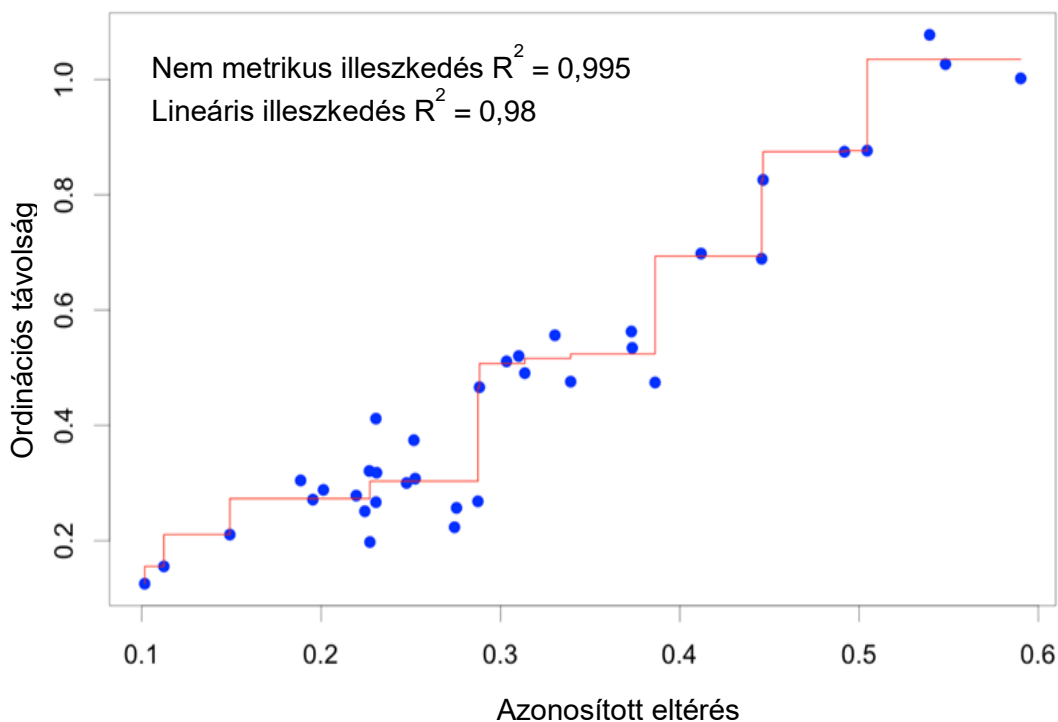
<sup>a</sup>Fenotípus csoportok: M I-M IV a micéliális csoportok, S I-S IV a szkleróciális csoportok <sup>b</sup>Σ M típus: a micéliális csoportok eloszlásának összege, Σ S típus: a szkleróciális csoportok eloszlásának összege <sup>c</sup>Minden oszlopban a különböző kis betűk az évjárat és mintagyűjtési hónap közötti szignifikáns különbségeket jelölik (p=0,05). Minden sorban a nagy betűk a morfológiai típusok (M vagy S) közötti szignifikáns különbséget jelölik (p=0,05)

NMDS ordináció segítségével (Non Metric Multidimensional Scaling) meghatároztam a különbözőségi- vagy távolságmátrixot a morfológiai csoportok gyakorisági eloszlása között az évjáratok és hónapok szerint, majd az eloszlást 2D-ban ábrázoltam (11. ábra). Az NMDS analízis a minták közötti távolság legjobb 2D-s reprezentációját mutatja meg. Az elemzés eredménye szerint a morfológiai csoportok az évjáratok alapján elkülönülnek. Az NMDS stress értéke kisebb, mint 0,1 (stress=0,0689), ezért a 11. ábra jól reprezentálja az eredeti eloszlást. A számolt különbözőség és az ordinációs távolság közötti illeszkedés pontosságát a 12. ábra mutatja meg, mely alapján pontosan állítható, hogy a morfológiai csoportok szignifikánsan eltérnek az évjárok szerint.



11. ábra: A minták (morfológiai csoportok) elkülönülésének ábrázolása NMDS (non-metric multidimensional scaling) ábrázolás szerint. A különböző színű pontok a három különböző évjáratot jelölik (piros-2013, zöld-2014, kék-2015).





12. ábra: A minták eloszlásának illeszkedését mutatja meg az NMDS stress érték szerinti ábrázolás (Shepard's plot).

Permutációs többváltozós varianciaanalízist (permANOVA) végeztem, annak érdekében, hogy a minták elkülönülése esetében megvizsgáljam, hogy az előző csoportosítás mennyire írja le az eredeti eloszlásokat. Az elemzés eredményei szerint a meghatározott morfológiai csoportok szignifikánsan nem különböznek egymástól a szüretidőpontok alapján, azonban az évjáratok szerint pontosan elkülöníthetők, mivel a permANOVA p értéke 0,048. A varianciaanalízis azt mutatja, hogy az évjáratok különbözősége a minták elkülönülésének 28%-át magyarázzák ( $R^2=0,28$ ).

Az 5.2. és 5.3. fejezetben leírt eredményeim elsőként világítanak rá az évjárat és szüretidőpont (mintagyűjtési hónap) fontosságára, hiszen az évjáratok és az őszi hónapok hatással vannak a *B. cinerea* fejlődésére és morfológiai típusainak gyakoriságára a nemesrothadás folyamata során (8. és 10. táblázat, 11. ábra). Korábban is vizsgálták az aszús szőlőszemekről származó *B. cinerea* izolátumok morfológiai tulajdonságait a Tokaji borvidékről származó minták esetében (Bene és Magyar 2004), azonban a kapott eredményeket nem hozták kapcsolatban a mintagyűjtés időpontjaival. Eredményeim rámutattak, hogy a szüretidőpontnak hatása van a *B. cinerea* morfológiájára, ami azt jelentheti, hogy az adott évjárat és a korábbi

(szeptember/október) és későbbi (november) szüretidőpont megválasztása jelentősen befolyásolhatja a szőlőbogyók botritizálódási folyamatát.

#### 5.4. A szőlőbogyó fizikai tulajdonságainak változása a nemesrothadás során

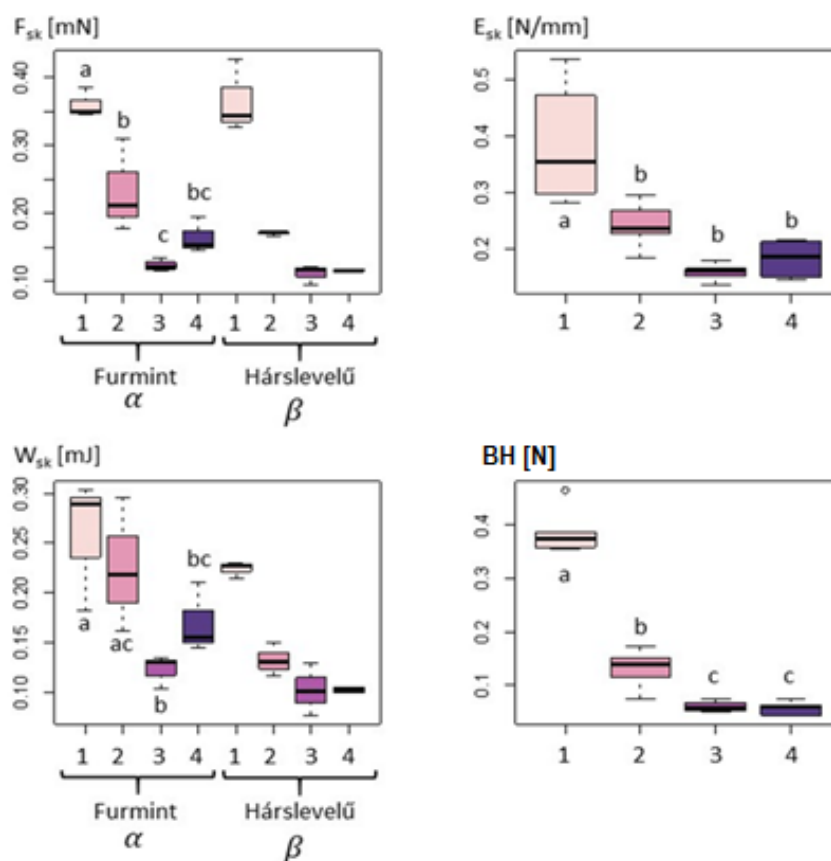
A nemesrothadás során igazolt, hogy a szőlőbogyó térfogata töredékére csökken, az ép szőlőbogyó textúrája megváltozik, ezzel jelentős termés mennyiség csökkenést eredményezve (Magyar 2011, Carbajal-Ida et al. 2016). E folyamattal párhuzamosan azonban egy magas minőségű termék – az aszúbor – elkészítésének lehetősége nyílik meg az által, hogy a nemesrothadás folyamata során létrejönnek az aszúszemek.

Az aszúbogyó hivatalos definíciója jelenleg a Tokaj borvidéki termékleírásokban lelhető fel, de a gyakorlatban jelen lévő szőlészeti-borászati szereplők véleménye szerint ezek a leírások mai napig hiányosnak tekinthetők (Szabó 1867, Geri 2021). A 2013-ban született, jelenleg érvényben levő rendtartás sem hozott jelentős változást az aszúszem definíciójában, ezen kívül a jelenlegi gyakorlat szerint a borászati hatóság helyszíni szemle során, ha kimegy a borászathoz és minősíti a már leszedett, feldolgozásra váró aszúszemeket, akkor csupán 1-2 bogyó esetében szűrőpróba szerűen mérnek cukorfokot, valamint szemrevételeznek. Ebből azonban hitelesen nem tudják megállapítani, hogy a ládáknak, kádaknak milyen az éretlen szőlőn kifejlődött szürkepenészes, illetve a tökéletes érettségben botritizálódott, klasszikus aszúszemek aránya (Szabó 1867, Geri 2021). Összefoglalva, nem létezik olyan tudományos definíció, ami a minőségi aszúszem pontos kritériumait megfogalmazza.

Vizsgálataim három alappillérre helyeződtek: fizikai, kémiai és mikrobiológiai oldalról kívántam feltárni a nemesrothadás folyamatát, illetve újabb információkat kívántam gyűjteni az aszúbogyó tulajdonságairól. A szőlőbogyókat három különböző szüretidőpontban (szeptember, október november), két szőlőfajtán (*Furmint* és *Hárslevelű*) és négy különböző botritizálódási stádiumban (4. és 5. ábra) vizsgáltam mindhárom szempontból (fizikai, kémiai, mikrobiológiai).

A mért fizikai paraméterek közül a szőlőbogyó héj átszakításához szükséges erő ( $F_{sk}$ , mN) erőteljes csökkenést mutat az aszúszem kialakulásának irányába, illetve a bogyóhéj átszakításához szükséges munka ( $W_{sk}$ , mJ) is hasonló lefutást ír le a nemesrothadás folyamata során. E meghatározó fizikai tulajdonságok a folyamat 3.

fázisáig csökkenek, majd a 4. fázis felé haladva újra növekedésnek indulnak, jól alátámasztva az érés, túlérés, botritizálódás és töppedés tapasztalati folyamatait (13. ábra). A szőlőfajták között nincs különbség az  $F_{sk}$  és  $W_{sk}$  lefutásában, viszont mindkét paraméter értékei szignifikánsan eltérnek a két szőlőfajta esetében, ami azt jelenti, hogy a szőlőfajták héj keménysége eltérő. A szőlőbogyó héjának rugalmassági tényezője ( $E_{sk}$ , N/mm) és a bogyó keménysége (BH, N) szintén hasonló trendet vesz fel mindkét esetben, azzal az eltéréssel, hogy a két szőlőfajta értékeiben nem mutatkozik szignifikáns különbség, csak a nemesrothadás fázisai között mért értékek térnek el szignifikánsan. A rugalmassági tényező mért értékei alapján meghatározott 1. és 2. fázis között fellépő csökkenést *E-drop*-nak neveztem el, ami megmutathatja, hogy mely az a szabad szemmel még nem látható, de vizsgálatokkal precízen kimutatható pont, amikor a nemesrothadás elindulhat. Az *E-drop* azonosításával lehetőség nyílik a botritizálódás elindulásának nagyon korai felismerésére, ami természetesen nem jelenti azt, hogy innen számítva csak pozitív kimenetele lehet a „fertőzésnek”.



13. ábra: A 2017-ben gyűjtött szőlőbogyók fizikai változói a nemesrothadás folyamata során, melyeket varianciaanalízis segítségével (ANOVA) vizsgáltam a botritizálódási fázisok (arab számokkal jelölve 1-4), mintagyűjtési hónapok (szeptember-november) és szőlőfajták (görög betűkkel jelölve *Furmint* és *Hárslevelű*) szerint. Az ábrán megjelenített betűk a post hoc Tukey HSD teszt ( $p < 0,05$ ) szerinti szignifikáns különbségeket jelölik, a kis betűk a fázisokra utalnak. A diagramokon kizárólag a szignifikánsan különböző eloszlásból származó csoportok vannak feltüntetve.

A szőlőbogyók héjáról általánosságban elmondható a vizsgált paraméterek alapján, hogy a nemesrothadás során egyre vékonyabbá, kevésbé rugalmassá és könnyebben átszakíthatóvá válik, ami annak köszönhető, hogy a bogyó héján jelenlévő gombák elbontják a bogyóhéj sejtfalában lévő cellulózt (Doumouya et al. 2014). Ezen csökkenő trend alól egyedüli kivétel, amikor a 3. és 4. fázis között növekedés tapasztalható a mért értékekben, elsősorban a *Furmint* szőlőfajta értékeinél, ami valószínű, hogy annak köszönhető, hogy az aszúszem kialakulásával egy erőteljes töppedés indul el a szőlőbogyóban.

Fontos eredmény, hogy a szőlőbogyó héjára vonatkozó fizikai paramétereket nagymértékben befolyásolja a nemesrothadás stádiuma, ugyanakkor a szőlőfajta csak mérsékelttel gyakorol hatást a fizikai paraméterekre és a szüretidőpont pedig egyáltalán nem befolyásolja a bogyók héjának deformációs tulajdonságait. Ezek alapján biztosan állítható, hogy a korábban szemrevételezés alapján felállított botritizálódási fázisok a fent leírt texturális tulajdonságok alapján pontosan elkülöníthetők. Ráadásul az *E-drop*-ként elnevezett előrejelzési pont detektálása a termelők segítségére lehet a nemesrothadás folyamatának pontosabb meghatározásában és nyomonkövetésében vagy akár kiterjeszhető más kórokozók jelenlétének feltárásában, hiszen más gombás megbetegedések is jelentős hatással vannak a szőlőbogyó héjának textúrájára.

### 5.5. A szőlőbogyó kémiai tulajdonságainak változása a nemesrothadás során

A vizsgált kémiai paraméterek esetében a cukortartalmat (Brix) erőteljesen befolyásolják a szüretidőpont és a botritizálódási fázisok között fennálló különbségek. Az általánosan tapasztalt trend, hogy a cukortartalom folyamatos növekedést mutat a nemesrothadás előrehaladtával ugyanúgy, mint a szüretidőpont előrehaladtával. Kiemelendő, hogy az 1. és 2. botritizálódási fázisban szeptembertől novemberig csak csekély mértékű a cukortartalom növekedése, azonban ez a folyamat megváltozik a 3. és 4. fázisban, amikor a szüret időpontja sokkal nagyobb hatást gyakorol a cukortartalom változására, jelen esetben novemberhez érve erőteljes növekedés észlelhető. A botritizálódási fázisokat tekintve az első fázisban nem azonosítottam szignifikáns különbséget a szeptemberi és októberi mintagyűjtés cukortartalma között, viszont a novemberi mintagyűjtési időpontban mért cukortartalom szignifikánsan különbözik a szeptemberi és októberi adatoktól. Ha önmagában nézzük a 4. fázist, azaz az aszúbogyókban kialakuló cukortartalmat, akkor azt látjuk, hogy a bogyók októberben eléri a cukor akkumulációjuk csúcsát, ami még enyhén növekszik novemberben is (14. ábra).

Összegezve elmondható, hogy a nemesrothadás folyamatának 4. fázisa – és természetesen az egyre későbbi szüretidőpontok – felé haladva mindkét szőlőfajta esetében folyamatosan nő a cukortartalom, melynek dinamikáját a pH változása is követi, azonban a *Furmint* bogyókban mért pH értékek minden esetben a *Hárslevelűé*

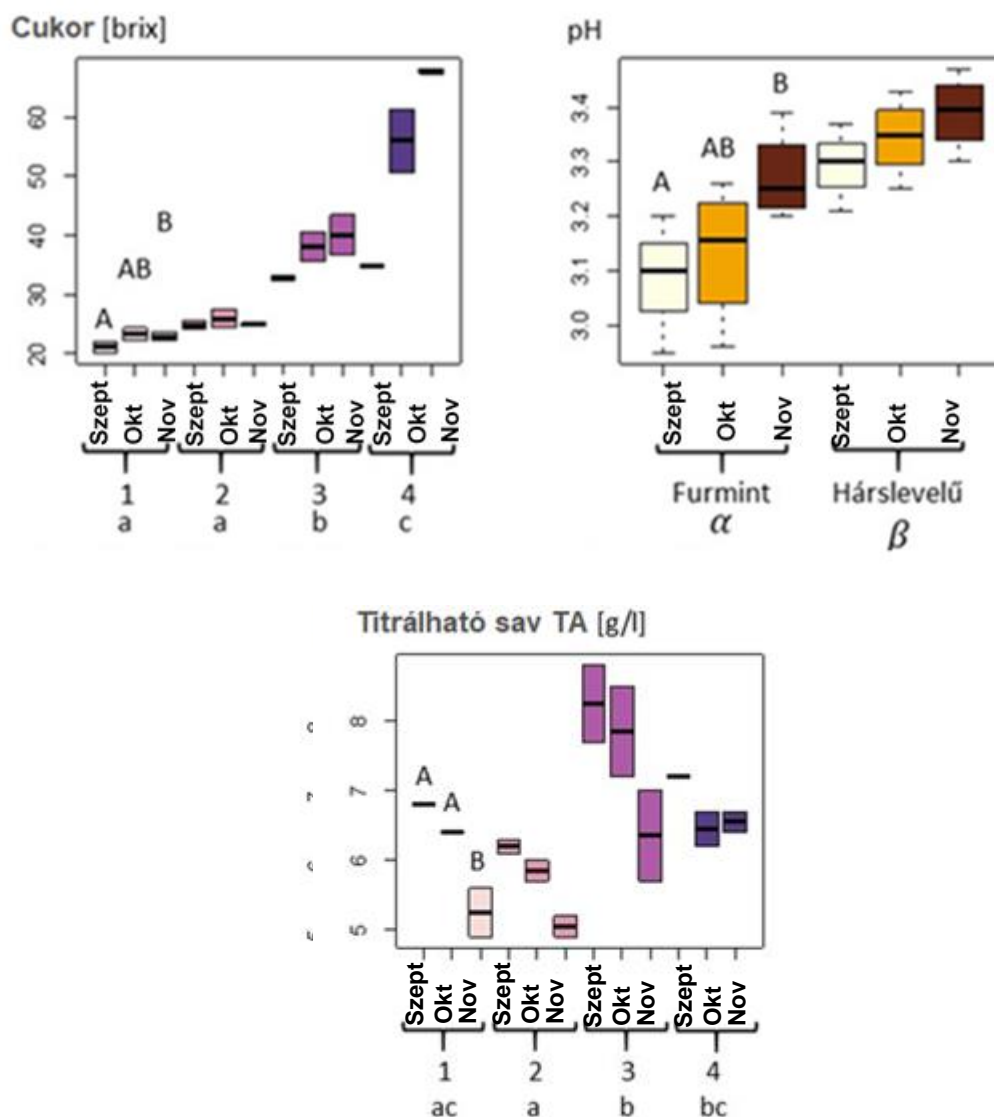
alatt maradtak (14. ábra). A pH változásában a nemesrothadás fázisai nem játszanak szerepet, közöttük nem azonosítottam szignifikáns eltérést. Az alacsonyabb pH esetében az aszúbor erjedése egyenletesebb, az érlelés során a környezet kevésbé oxidáló, az aromák frissebbek maradnak, jól láthatóan előnyösebb értékeket eredményezve a *Furmint* esetében.

A titrálható sav (TA) értékek „cikk-cakk” alakzatot vesznek föl a botritizálódás során: az 1. és 2. fázis között csökkenés tapasztalható, a következő lépésekben növekedés, majd ismét csökkenés, viszont a 4. fázisban mért értékek nagyon közel helyezkedtek el az 1. fázisban mértékekhez. A TA értékek mintagyűjtési hónapok előrehaladása szerinti csökkenése minden botritizálódási fázisban megmutatkozik, de legszembetűnőbben az 1. fázisban az ép szőlőbogyók esetében, amikor a szeptemberben és októberben mért TA szignifikánsan különbözik a novemberben mért TA értékektől. Annak ellenére, hogy a korán botritizálódott szőlőbogyók esetében magasabb TA értékeket mértem szeptemberben, a nemesrothadás kialakulásakor csökkenés tapasztalható, de a kialakult TA tartalom októberben és novemberben is hasonló az 1. fázisú szőlőbogyókban mért TA értékekhez. Összefoglalva, a savtartalom nem egyenletes növekedése az egyéb beltartalmi összetevők koncentrációja miatt következik be, viszont a folyamat végén (3-4. fázis) bekövetkező növekedés tudja biztosítani azt a harmonikus ízérzetet, amely a magas cukortartalom mellett a jól fogyaszthatósággal jellemzi az aszú borokat.

A vizsgált kémiai változók sokkal összetettebb képet mutatnak a nemesrothadás folyamatában, mint a fizikai paraméterek. A cukor- és savtartalom előre jelezhetően változik a botritizálódás folyamatában (Miklósy és Kerényi 2004, Pinar et al. 2016), először monoton növekedést mutatnak, míg a 3. fázisban elérnek egy úgynevezett csúcspontot, melyet aztán egy csökkenés követ a 4. fázisban, ezzel közelítőleg visszaérkezve a kezdeti paraméterekhez. Mindkét paramétert (cukortartalmat és savtartalmat) szignifikánsan befolyásolja a szüretidőpont. Vizsgálataim arra mutattak rá, hogy az azonos botritizálódási fázisokba tartó szőlőbogyók esetében a cukortartalom a késői szüret időszakában a legmagasabb, különösen a 3. és 4. fázisban, ami arra enged következtetni, hogy a legmagasabb minőségű aszúszemek szüretelése októberben vagy novemberben a legvalószínűbb. Ezt az is igazolja, hogy a 4. fázis szeptemberi szüretidőpontban a magas minőségű aszúszemekről elvárható cukortartalomhoz képest jóval alacsonyabb értékeket mértem (<40 brix).

A savtartalom eredmények értékelése során érdekes eredményt kaptam, hiszen egyértelműen azonosítottam egy általánosan megfigyelhető csökkenést az azonos botritizálódási fázisba tartozó szőlőbogyók különböző szüreti időpontjai között (Deytieux-Belleau et al. 2009), ugyanakkor, ha a nemesrothadás folyamatát vizsgáljuk, októberben és novemberben az 1. fázisban lévő szőlőbogyók 3. és 4. fázisba való átalakulása során a kialakuló savtartalom állandó marad. Az 1. fázisban lévő szőlőbogyók savtartalma sokkal alacsonyabb novemberben, mint szeptemberben és októberben, ezzel kevésbé alkalmas alapanyagot adva a magas minőségű aszúbor készítéséhez. Eredményeim alapján az optimális, ha az 1. fázis októbertől indul aszúsodni, azaz az októberben lévő ép szőlőbogyó érettségi állapota kezd el átalakulni a 4. stádiummá, amikor novemberre eléri a kellően magas cukortartalmat, ami egy egyensúlyos savtartalommal párosul, létrehozva a magas minőségű aszúborhoz szükséges aszúszemeket.

Eredményeim jól összhangban állnak azzal a gyakorlati elképzeléssel, miszerint az aszúszemek (4. fázis) szüretidőpontjának meghatározása egy igen összetett feladat, mert nem elegendő a szőlőszemek magas cukortartalmát elérni, hanem a kialakuló savtartalomnak is megfelelőnek kell lenni, ahhoz, hogy egy magas minőségű aszúbor tudjuk előállítani, tehát az lehet az optimális szüretidőpont amikor a cukortartalom már elég magas és ezzel párhuzamosan a savtartalom is elegendő a harmonikus aszúbor elkészítéséhez (Guild Somm, 2019). A szeptemberben kialakult 4. fázisú szőlőszemek cukortartalma még nem elegendő (Magyar 2011), bár a savtartalmuk elég magas. Szerencsére az őszi hónapok előrehaladtával a cukortartalom sokkal meredekebben növekszik, mint ahogy a savtartalom csökken a 4. fázisú szőlőbogyókban, ezzel lehetőséget teremtve egy késői szüretidőpontnak a magas minőségű aszúszemekhez. A pH természetesen a savtartalomnak megfelelően változik, hiszen amikor a savtartalom csökken, akkor a pH emelkedik. Az eredményeim alapján látszik, hogy a pH változása nem függ a botritizálódás fázisaitól, a szüretidőpont és a szőlőfajta gyakorol rá hatást, ami igazolhatja azt a tényt, hogy a szőlőfajták közötti különbségek okozzák a savösszetételben fellépő különbségeket (Kiss és Sass-Kiss 2005).



14. ábra: A 2017-ben gyűjtött szőlőbogyók kémiai változói a nemesrothadás folyamata során, melyeket varianciaanalízis segítségével (ANOVA) vizsgáltam a botritizálódási fázisok (arab számokkal jelölve 1-4), mintagyűjtési hónapok (szeptember-november) és szőlőfajták (görög betűkkel jelölve a *Furmint* és *Hárslevelű*) szerint. Az ábrán megjelenített betűk a post hoc Tukey HSD teszt ( $p < 0,05$ ) szerinti szignifikáns különbségeket jelölik, a kis betűk a fázisokra utalnak, a nagy betűk pedig a mintagyűjtés hónapjaira mutatnak. A diagramokon kizárólag a szignifikánsan különböző eloszlásból származó csoportok vannak feltüntetve.

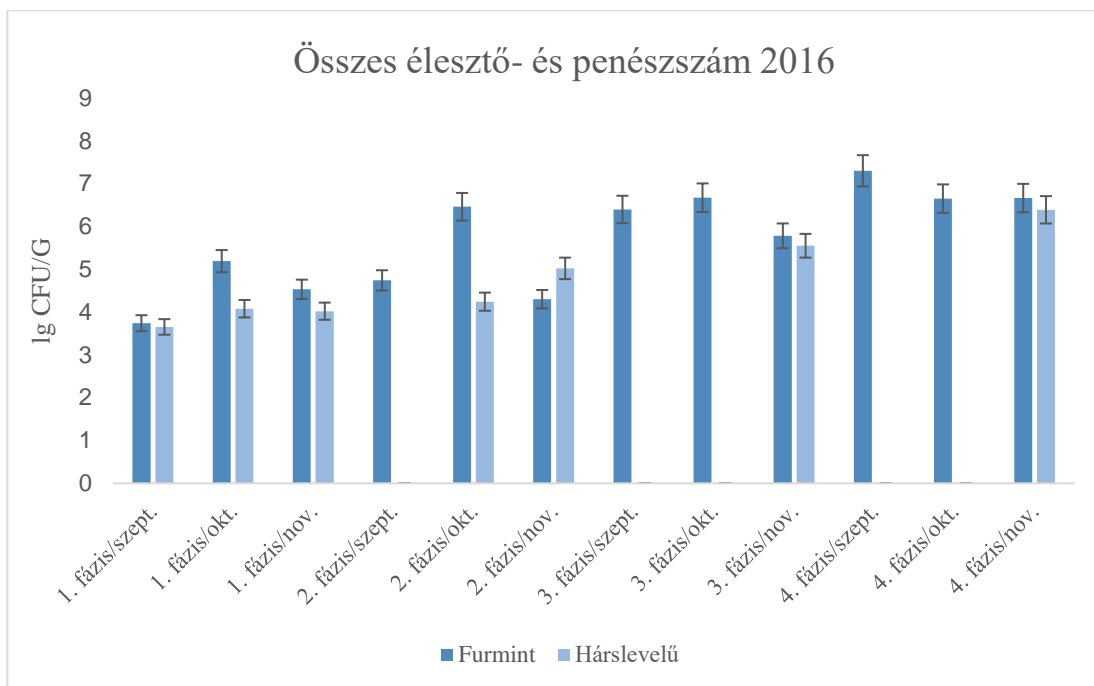


## 5.6. A szőlőbogyó mikrobiótájának változása a nemesrothadás során

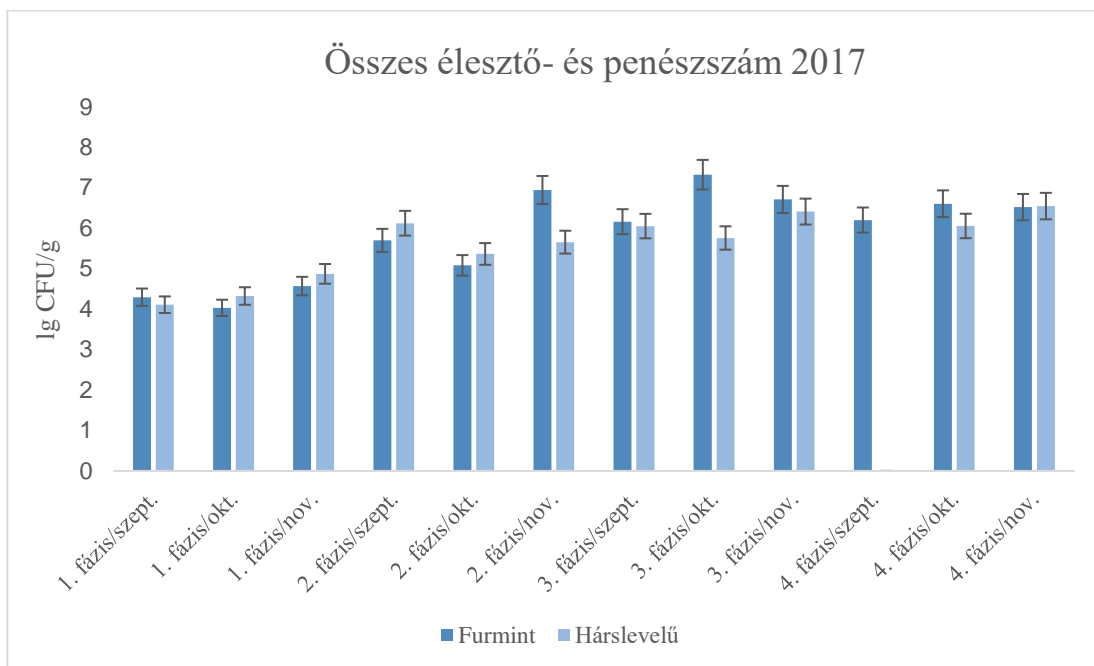
### 5.6.1. Az élesztőgombák morfológiája és az összes élesztő- és penészszám meghatározásának eredményei

Az összes élesztő- és penészszám meghatározást, illetve a molekuláris azonosítást is megelőzve a 2016-os évjáratban izolált élesztőgombák makromorfológiai vizsgálatát végeztem el, melynek segítségével csoportosítottam és redukáltam a szekvenálásra váró izolátumok számát, mivel nem volt lehetőségem az összes élesztőizolátum szekvenáltására.

A különböző fázisú szőlőbogyók felszínén lévő összes élesztő- és penészszám változását mindkét évjáratban nyomonkövettem (15. 16. ábra). 2016-ban lassabb ütemben zajlott az aszúszemek kialakulása a *Hárslevelű* szőlőfajta esetében, ami kevesebb mintát eredményezett, ezért a 15. ábráról hiányoznak a 2. fázis/szeptember, 3. fázis/szeptember, október és a 4. fázis/szeptember, október adatai a *Hárslevelű* fajtánál. A 2017-es évjáratban bár kevésbé, de szintén később alakult ki mind a négy aszúsodási fázis minden mintagyűjtési hónapban a *Hárslevelű* fajtán, ezért a 16. ábráról hiányzik a 4. fázis/szeptember adata. Az összes élesztő- és penészszám vizsgálata során azt tapasztaltam, hogy az élesztő- és fonalagombák száma a 4. fázis felé haladva mennyiségileg növekszik mindkét évjáratban és mindkét szőlőfajtán.



5. ábra: Az összes élesztő-és penészszám alakulása a botritizásódás folyamata során 2016-ban (1-4 fázisok) a vizsgált szőlőfajták esetében.



16. ábra: Az összes élesztő-és penészszám alakulása a botritizásódás folyamata során 2017-ben (1-4 fázisok) a vizsgált szőlőfajták esetében.

## 5.6.2. Molekuláris azonosítás eredményei

A 2016-os évjáratban az élesztőizolatok közül makromorfológiai tulajdonságok alapján kiválasztott élesztőgombákat, illetve az összes izolált fonalagombát azonosítottam DNS szekvenálás (ITS 1F / ITS 4; NL 1 / NL 4) segítségével. A szekvenciákat BLAST keresőalgoritmussal nemzetségszinten azonosítottam. Eredményeim azt mutatták (10. táblázat), hogy a vizsgált szőlőbogyókon minden fázisban megtalálható volt az *Aureobasidium* sp., melyet „élesztőszerű” gombaként jegyeznek a szakirodalomban, míg a fonalagombák közül, nem meglepő módon a *Botrytis* sp. fordult elő a 2. 3. és 4. fázisban, hiszen a nemesrothadás organoleptikus jegyei a 2. fázistól lelhetők fel a szőlőbogyókon. Az élesztőgombák közül a *Hanseniaspora* sp. nemzetség az összes botritizálódási stádiumban azonosítható volt. Az 1. fázis mikroorganizmusai nagyobb változatosságot mutattak, a *Cryptococcus* nemzetség is megtalálható volt, melyek előfordulása eltérő volt a négy fázisban. A 4. fázist reprezentáló aszúbogyókon a *Botrytis* sp. mellett *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Curvibasidium* spp. és *Cladosporium* spp. fonalagombákat azonosítottam (10. táblázat). A 2017-es évjáratban hasonló gomba nemzetségek voltak megtalálhatók a szőlőbogyókon, mint 2016-ban, azonban a nagyobb szekvencia számnak köszönhetően más gomba nemzetségeket is azonosítottam: *Neoscochyta* sp., *Exophiala* sp., *Citeromyces* sp., *Torulaspora* sp., *Zygoascus* sp., *Cystobasidium* sp. és *Naganishia* sp. (11. táblázat). Ezen gomba nemzetségek csupán egy-egy aszúsodási fázisban egy-egy szőlőfaján fordultak elő. A 2016-os évjáratához hasonlóan 2017-ben is az *Aureobasidium* sp., *Hanseniaspora* sp., *Cryptococcus* sp. és *Metschnikowia* sp. nemzetségek fordultak elő a legtöbb aszúsodási fázisban mindkét szőlőfajta esetében. Mindkét évjáratban azonosított taxonok előfordulása összefüggésbe hozható a mádi területek különböző dűlőiből származó, a *Furmint* szőlő zöld részeinek gomba mikrobiomját vizsgáló kutatások nemrégiben publikált eredményével (Knapp et al. 2021), miszerint az *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* spp. és az *Alternaria alternata* fajkomplex dominanciája jellemzi a szőlő zöld növényi részeinek mikrobiomját és ugyanezen taxonok szintén megtalálhatók az aszúsodás folyamatát reprezentáló szőlőbogyókon.

Összefoglalva elmondható, hogy a különböző botritizálódási fázisokban gyűjtött bogyók élesztő- és fonalagomba összetételében eltéréseket tapasztaltam, amely összefüggésbe hozható a bogyók fázisonként eltérő fiziológiai állapotával. A fázisok

fejlődése során a 4. fázis felé haladva növekszik a bogyófelszínen található összes élesztő- és penészszám, ugyanakkor az előforduló élesztő- és fonalgomba nemzetségek diverzitása csökken. Eredményeim háttérben az állhat, hogy a töppedtséggel egyre ráncosabbá váló bogyófelszín alkalmasabb lehet a mikroorganizmusok megtelepedésére, de a növekvő cukortartalom csökkentheti az előforduló mikroorganizmusok sokféleségét. A régióra jellemző szőlőfajták - *Furmint* és *Hárslevelű* - bogyóin található élesztő- és fonalgomba közösségben eltérést azonosítottam.

10. táblázat: Azonosított gomba nemzetségek szőlőfajták (F=*Furmint*, H=*Hárslevelű*), botritizálódási fázisok (1-4) közötti eloszlásokban a 2016-os évjáratban.

2016	F 1	F 2	F 3	F 4	H 1	H 2	H 3	H 4
<i>Alternaria</i> sp.	+	+	+	+				
<i>Aureobasidium</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Asperigillus</i> sp.				+				
<i>Botrytis</i> sp.		+	+	+		+	+	+
<i>Ceriporia</i> sp.			+					
<i>Cladosporium</i> sp.	+			+				
<i>Curvibasidium</i> sp.				+				
<i>Cryptococcus</i> sp. 1.*				+	+	+		
<i>Cryptococcus</i> sp. 2.*	+							
<i>Cryptococcus</i> sp. 3.*	+	+	+					
<i>Cryptococcus</i> sp. 4.*		+	+					
<i>Epicoccum</i> sp.	+					+		
<i>Hanseniaspora</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Metschnikowia</i> sp.		+	+	+	+	+		
<i>Mucor</i> sp.	+				+			
<i>Penicillium</i> sp.		+		+				+
<i>Rhizopus</i> sp.	+				+			
<i>Rhodotorula</i> sp.	+							
<i>Sporobolomyces</i> sp.					+		+	+

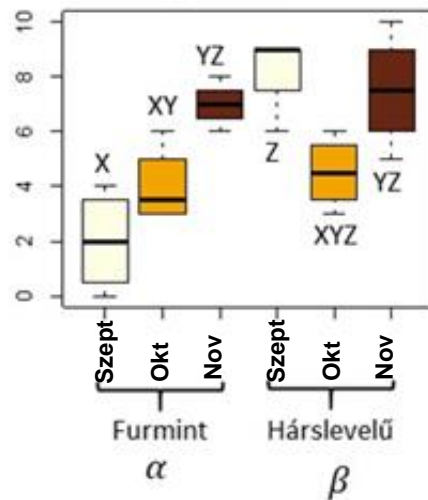
\* Az azonosított *Cryptococcus* nemzetségbe tartozó izolátumok szekvenciái eltértek egymástól az eltéréseket számokkal jelöltem.

11. táblázat: Azonosított gomba nemzetségek szőlőfajták (F=*Furmint*, H=*Hárslevelű*), botritizálódási fázisok (1-4) közötti eloszlásokban a 2017-es évjáratban.

2017	F 1	F 2	F 3	F 4	H 1	H 2	H 3	H 4
<i>Alternaria</i> sp.	+	+			+	+	+	+
<i>Aureobasidium</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Asperigillus</i> sp.						+	+	
<i>Botrytis</i> sp.	+		+	+	+	+	+	+
<i>Citeromyces</i> sp.								+
<i>Cladosporium</i> sp.	+	+		+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus</i> sp.	+	+	+		+	+	+	+
<i>Cystobasidium</i> sp.	+							
<i>Epicoccum</i> sp.	+				+	+	+	
<i>Exopiala</i> sp.	+							
<i>Hanseniaspora</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Metschnikowia</i> sp.	+	+	+			+	+	+
<i>Naganishia</i> sp.					+			
<i>Neoascochyta</i> sp.					+			
<i>Penicillium</i> sp.		+	+	+	+	+	+	+
<i>Pichia</i> sp.			+					
<i>Rhodotorula</i> sp.	+	+			+	+	+	+
<i>Torulasporea</i> sp.				+				
<i>Zygoascus</i> sp.								+

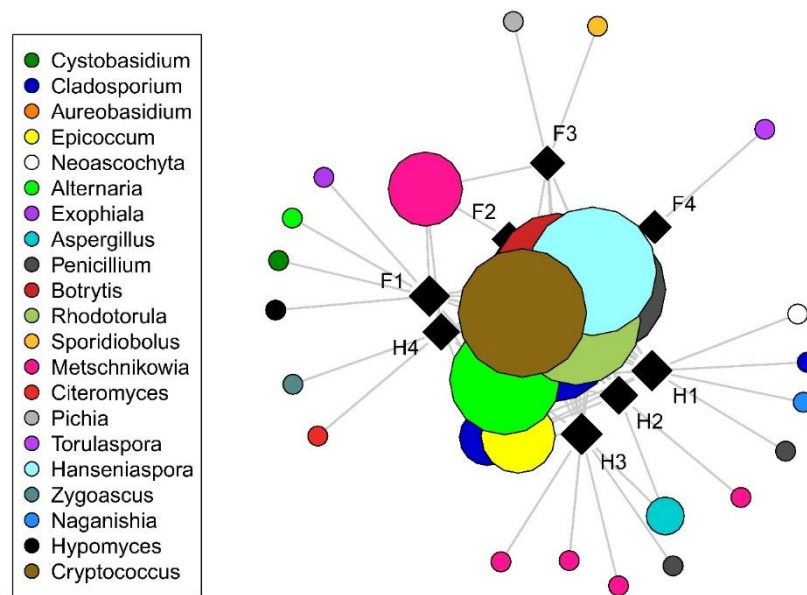
A 2017-es évjáratban gyűjtött szőlőbogyókon előforduló, tenyészthető élesztőgomba és fonalgomba izolátumokból (198 db) nyert szekvenciák tekintetében további elemzéseket végeztem. A kapott DNS szekvenciákat OTUK-ba (operational taxonomic units) soroltam, 26 OTU (12 fonalgomba, 14 élesztőgomba OTUK) reprezentálja a kapott 198 db szekvenciát, melyeket a gomba referencia szekvenciákhoz 97 %-nál nagyobb szekvencia hasonlóság és a statisztikai elemzések alapján határoztam meg. A 17. ábrán csak a szignifikáns eltéréseket mutató eredményeket tüntettem föl, melyből jól látható, hogy a gombák összetételét szignifikánsan befolyásolja a szőlőfajta és a szüret időpontja, azonban a botritizálódási fázis nem. A *Furmint* szőlőbogyókon szeptembertől novemberig folyamatosan növekszik a gomba OTUK száma, de novemberre kevésbé diverz gomba összetétel alakul ki, mint a *Hárslevelűn*. Ezen kívül a *Hárslevelűn* nem azonosítottam a gombák számában egyértelmű növekedését az ősz elejétől a végéig. Az eredmények alapján elmondható, hogy a botritizálódási fázis nincs szignifikáns hatással a gomba populációk előfordulására.

### Azonosított gomba OTUK



17. ábra: A szőlőbogyó mikrobiológiai változói a nemesrothadás folyamata során, melyeket varianciaanalízis segítségével (ANOVA) vizsgáltam a botritizálódási fázisok (arab számokkal jelölve 1-4) mintagyűjtési hónapok (szeptember-november) és szőlőfajták (görög betűkkel jelölve a *Furmint* és *Hárslevelű*) szerint. Az ábrán megjelenített betűk a post hoc Tukey HSD teszt ( $p < 0,05$ ) szerinti szignifikáns különbségeket jelölik, a görög betűk a szőlőfajtákra, a nagy betűk pedig a mintagyűjtés hónapjaira mutatnak. A diagramokon kizárólag a szignifikánsan különböző eloszlásból származó csoportok vannak feltüntetve.

Az azonosított gombaközösségek szőlőfajtánkénti és aszúsodási fázisonkénti eloszlásának vizualizációját bemutató ábrán (18. ábra) látható, hogy a szőlőbogyók mikrobiótája eltért a két szőlőfajta esetében. A legnagyobb arányban az *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Hanseniospora*, *Metchnikowia*, *Penicillium* és *Rhodotorula* nemzetségek fordultak elő.



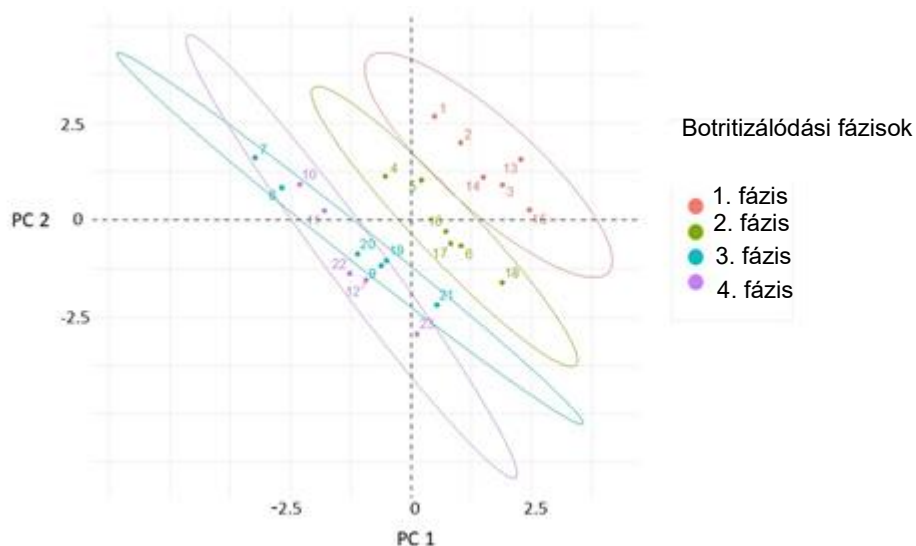
18. ábra: Gomba OTU-k eloszlása szőlőfajták és botritizálódási fázisok között. A körök mérete jelzi, hogy az előforduló gomba OTU-k milyen gyakorisággal fordultak elő, minél nagyobb a kör mérete, annál nagyobb számban fordult elő az adott gombanemzetség. Az „F” a *Furmint* szőlőfajtát a „H” a *Hárslevelű* szőlőfajtát jelöli, az arab számok (1-4) pedig a botritizálódási fázisokat.

### 5.7. A fizikai-kémiai-mikrobiológiai változók és a nemesrothadás közötti kapcsolat feltárása

Annak érdekében, hogy feltárjam a különbségeket a különböző botritizálódási fázisokban, különböző szüretidőpontokban és a két különböző szőlőfajtáról gyűjtött szőlőbogyók között, többváltozós statisztikai elemzéseket végeztem. Az elemzések során a nemesrothadás fázisait (1-4), szüretidőpontokat (a mintagyűjtés hónapjait) és a szőlőfajtákat (*Furmint* és *Hárslevelű*) faktor típusú paramétereknek tekintettem.

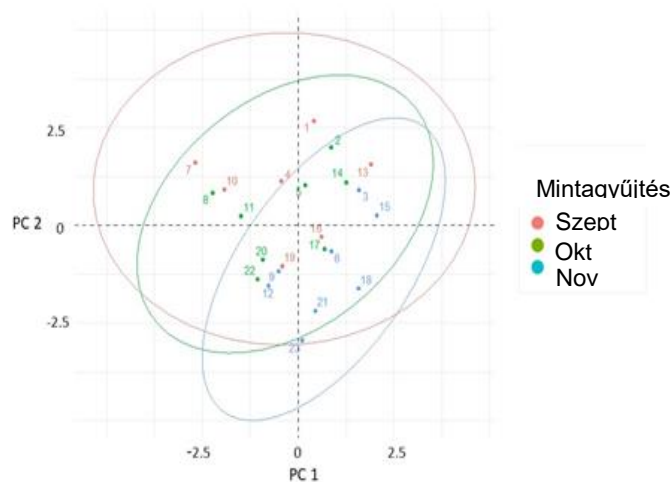
Főkomponens analízis segítségével jól ábrázolható, hogy a főkomponensek alapján hogyan különülnek el a fázisok, szüretidőpontok és szőlőfajták. Egynél nagyobb sajátértékkel három főkomponenst azonosítottam. A változók közül a PC1 (a teljes varianciának a 26,27%-a) a titrálható savtartalommal (TA), a bogyó keménységgel (BH) és a rugalmassági tényezővel ( $E_{sk}$ ) korrelált a legjobban. A bogyóhéj keménység ( $F_{sk}$ ), cukortartalom és  $W_{sk}$  pedig a PC2 tengely esetében domináltak. A minták vizuális ábrázolását a PC1 és PC2 tengely által meghatározott síkon mutatom be (19. 20. 21. ábra). A három ábrán a fázisok, szüretidőpontok, szőlőfajták szerint színekkel

jelöltem a minták csoportosulását. A minták különböző kategóriáinak szétválasztása a 19. ábra alapján arra enged következtetni, hogy a vizsgált botritizálódási fázisok jól elkülönültek a mért változók alapján, az első három botritizálódási fázis teljesen elvált egymástól, míg a 4. fázis kisebb átfedést mutat a 3. fázis mintáival.

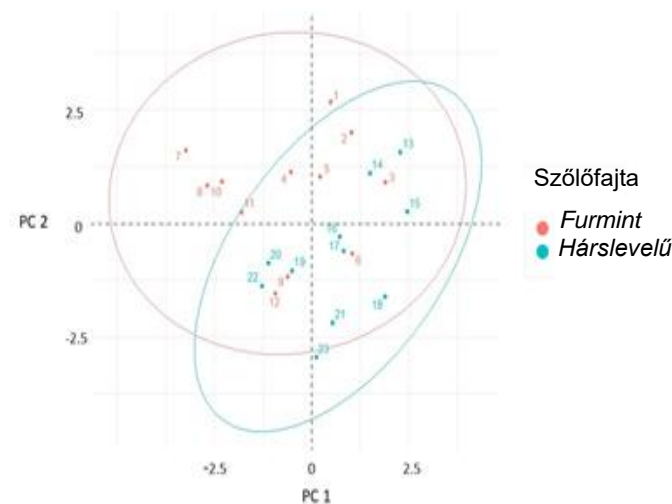


19. ábra: Az első két főkomponens alapján ábrázolt minták csoportosulása a négy fizikai paraméter ( $F_{sk}$ ,  $E_{sk}$ ,  $W_{sk}$ ,  $E_{sk}$ ), három analitikai paraméter (cukortartalom, titrálható savtartalom, pH) és a gomba közösségek eloszlása alapján. A színnel jelölt csoportosítás a minták adott fázisú állapotát jelöli: piros – 1. fázis; zöld – 2. fázis; kék – 3. fázis; lila – 4. fázis





20. 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 színezéssel jelölt csoportosítás a minták adott mintagyűjtési hónapját jelöli: piros – szeptember; zöld – október; kék – november.

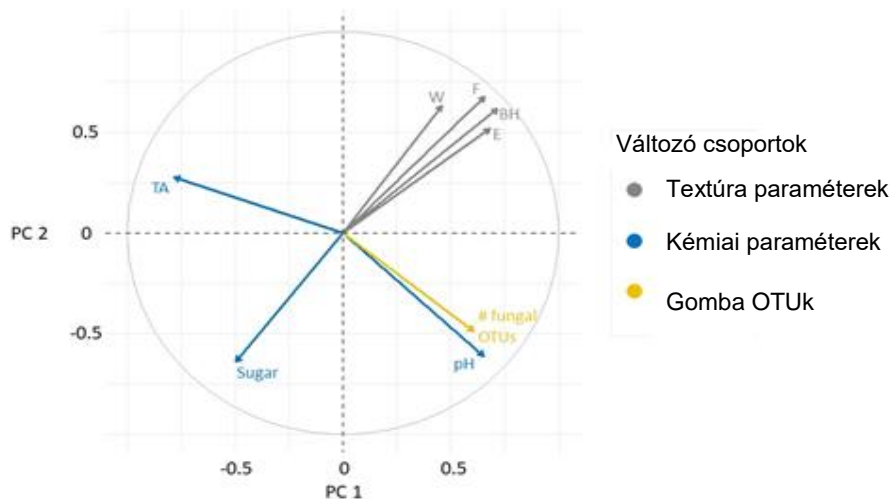


21. ábra: Az első két főkomponens alapján ábrázolt minták csoportosulása a négy fizikai paraméter ( $F_{sk}$ ,  $E_{sk}$ ,  $W_{sk}$ ,  $E_{sk}$ ), három analitikai paraméter (cukortartalom, titrálható savtartalom, pH) és a gomba közösségek eloszlása alapján. A színezéssel jelölt csoportosítás a minták szőlőfajta szerinti származását jelöli: piros – *Furmint*; kék – *Hárslevelű*.

A 20. és 21. ábrán a mintáim eloszlása látható a mintagyűjtési időpontok és szőlőfajta szerint, melyeken látható, hogy a piros, zöld és kék színű körök fedik egymást, tehát a

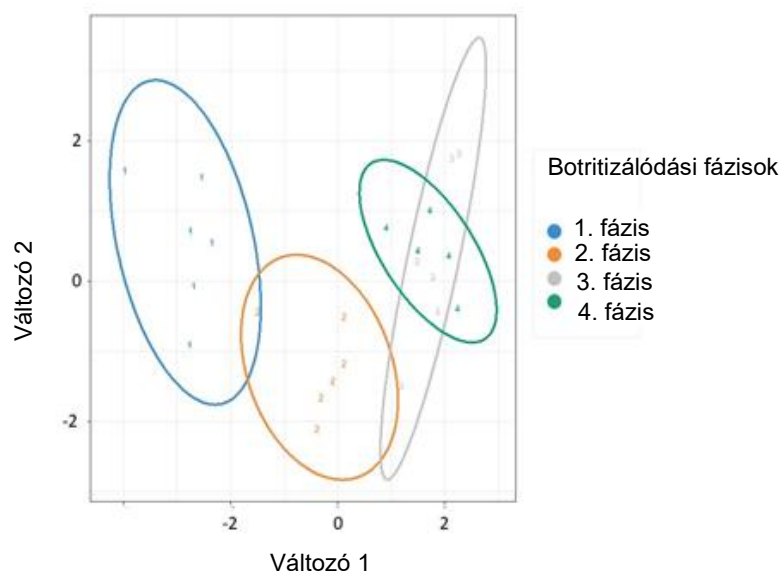
mért változó paraméterek alapján a minták nem különülnek el sem a mintagyűjtési időpont, sem pedig a szőlőfajták alapján a főkomponens analízis szerint.

A vizsgált változó csoportok korrelációs együtthatóját vizsgálva a kapott eredményeimet a 22. ábrán mutatom be, melyek közül a felső körnegyedben található azok a paraméterek, melyek pozitív korrelációt mutatnak. Ezek a  $W_{sk}$ ,  $F_{sk}$ ,  $E_{sk}$ , BH értékek, melyek együtt változnak és függenek egymástól. A TA is pozitív korrelációt mutat, de nem változik együtt a fizikai paraméterekkel. Az alsó körnegyedben lévő változók nem korrelálnak a felső körnegyedben lévő változókkal, a gomba OTUK nem korrelálnak a fizikai változókkal és a kémiai változók közül is csak a pH értékekkel, ez azt jelenti, hogy a szőlőbogyó pH-ja befolyásolja az ott jelenlévő mikrobaközösséget. A cukortartalom negatív korrelációt mutat a textúra paraméterekkel, míg a savtartalom nem korrelál egyik többi változóval sem.



22. ábra: A vizsgált változók ábrázolása a PC1-PC2 síkban. A szürke nyilak jelölik a fizikai változókat, kék nyilak a kémiai változókat és sárga nyil jelöli a gomba OTUK számát.

Az NMDS analízis segítségével a minták legjobb elkülönülését tudtam meghatározni, mivel ezen elemzési módszer szerint nemcsak a legnagyobb szórás értékek, hanem az átlag értékek is hozzájárulnak a minták elkülönüléséhez. Az elemzés eredménye szerint a mintáim legjobban a botritizálódási fázisok alapján különülnek el, az első három botritizálódási fázis teljesen elválik egymástól és a negyedik fázis pedig kis átfedést mutat a harmadikkal (23. ábra).



23. ábra: A minták elkülönülésének ábrázolása NMDS (non-metric multidimensional scaling) ábrázolás szerint. A különböző színű körök jelölik a botritizálódási fázisokat: kék – 1. fázis; piros – 2. fázis; szürke – 3. fázis; zöld – 4. fázis.

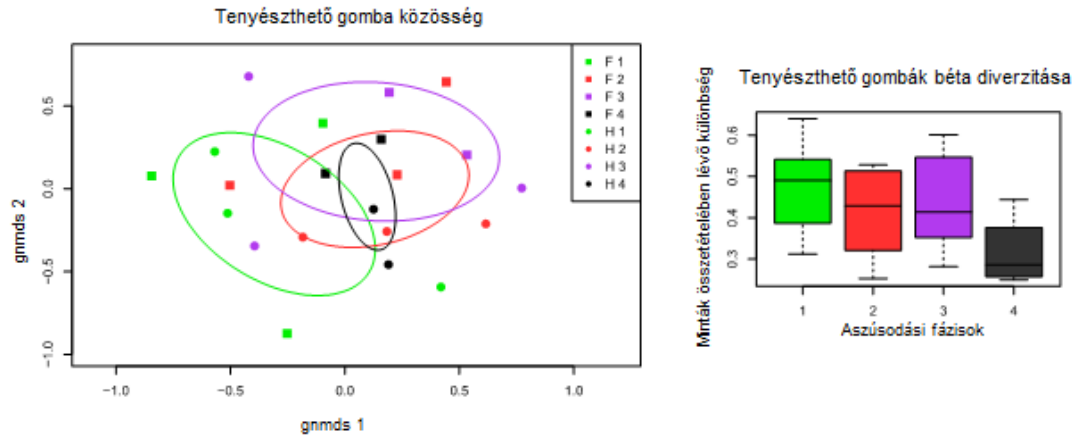
A főkomponens és NMDS elemzéseken kívül permutációs varianciaanalízist (permANOVA) végeztem, annak érdekében, hogy a minták elkülönülése esetében megvizsgáljam, hogy az előző csoportosítások mennyire írják le az eredeti eloszlásokat. Az elemzés eredményei szerint a textúra -, analitikai - és mikrobiológiai paraméterek szignifikánsan különböznek egymástól a botritizálódási fázisok eloszlásai alapján (12. táblázat). A textúra paramétereket 57%-ban ( $p=0,001$ ), a kémiai paramétereket 72%-ban ( $p=0,001$ ) és gomba közösséget 21%-ban ( $p=0,031$ ) befolyásolja a botritizálódási fázis. Ezen eredmény alátámasztja a korábban meghatározott botritizálódási fázisok elkülönítésének biztonságát. A főkomponens analízis szerint ugyan nem különültek el a mintagyűjtés időpontjai és a szőlőfajták szerint sem a minták, de a permANOVA analízis rávilágított, hogy a mintagyűjtési időpont szignifikánsan befolyásolja a fizikai változókat (31%,  $p=0,001$ ) és a gombaközösség diverzitását (22%,  $p=0,014$ ) is, a szőlőfajta pedig szignifikáns hatást gyakorol a jelenlévő gombaközösség diverzitására. Az azonosított gombaközösségek struktúrája jól követhető a nemesrothadás fázisai, illetve a szőlőfajták között is. A permANOVA szerint a nemesrothadás fázisai 21 % -ban ( $p= 0,031$ ), a mintagyűjtési időpont 22% - ban ( $p=0,014$ ) a szőlőfajta pedig 25% - ban ( $p = 0,014$ ) befolyásolja a szőlőbogyók gombaközösségét. Ugyanezen mintázat látható, amikor az azonosított gombanemzetségeket OTUk alapján csoportosítottam, miszerint a botritizálódási fázis

23,57 %-ban ( $p=0,015$ ) és a szőlőfajta 23,62 %-ban ( $p=0,008$ ) magyarázza az OTUk eloszlását. Meg kell jegyezni, hogy a permANOVA elemzés eredménye szerint ugyan a szüretidőpont (11 %,  $p=0,12$ ) nem gyakorol hatást a kémiai változókra, de a korábbi elemzés szerint (14. ábra) a mintagyűjtés időpontja fontos szerepet játszik a 4. fázisú, valódi aszúszem kémiai összetételében.

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

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

Az azonosított, gombaközöség fázisok szerinti elkülönülése bár nem látható az NMDS ordinációs ábrázolás alapján (24. ábra), a permutációs varianciaanalízis eredményei azonban azt mutatják, hogy a gombaközösség szignifikánsan elkülönül az aszúsodás fázisai szerint (12. táblázat) mely, ahogy már korábban említésre került, az elkülönülés 21%-át magyarázza. Az azonosított gombaközöség esetében fázisok szerint összehasonlítottam a gombaközöség diverzitását, a  $\beta$ -diverzitást. Ez alapján elmondható, hogy a 4. botritizálódási fázisban a gombák  $\beta$ -diverzitásának eloszlása szignifikánsan különböző, kisebb átlagértéket és kisebb szórást mutat, mint a többi fázisban (24. ábra). Ezen eredmény azt mutatja, hogy a valódi aszúszemen jelenlévő gombaközösség heterogenitása csökken a nemesrothadás előrehaladtával. Ezen eredmények összefüggést mutatnak a 2016-ban és 2017-ben végzett vizsgálataimmal, amikor az összes élesztő- és penészs szám (15. 16. ábra) növekedett a botritizálódás előrehaladtával, de a mikroorganizmusok heterogenitása pedig csökkent (10. 11. táblázat).



24. ábra: A szőlőbogyókon jelenlévő gomba közösség eloszlásának ábrázolása a botritizálódási fázisok (1-4) és szőlőfajták (F=*Furmint*, H=*Hárslevelű*) alapján NMDS analízis segítségével, illetve a gombaközösség dinamikájának változása (Béta diverzitás boxplot) a botritizálódási fázisok között.

Mantel-tesztet használtam a különböző változó csoportok közötti korreláció vizsgálatához. A fizikai és kémiai paraméterek esetében euklideszi eloszlást, a gombaközösség adataira vonatkozóan pedig Bray-Curtis eloszlás mátrixot használtam. Az eredmény alapján egyedül a gombaközösség összetétele és fizikai paraméterek között azonosítottam szignifikáns kapcsolatot (Mantel statisztika:  $R: 0,1624$ ,  $p=0,0429$ ), míg a kémiai paraméterek és gombaközösség összetétele, illetve a kémiai és fizikai paraméterek között nem azonosítottam szignifikáns korrelációt. Szemléletesebben kifejezve ez az eredmény azt jelenti, hogy ha a minták fizikai paraméterei eltérőek, akkor az ott jelenlévő gombaközösség összetétele is eltérő lesz, míg a kémiai változók függetlenül változnak a fizikai változóktól és a szőlőbogyón lévő mikroorganizmusoktól.

A szőlőbogyókon lévő gombaközösség összetételére vonatkozó eredményeket értékelve elmondható, hogy bár a vártnál kevesebb szignifikáns változást azonosítottam a gombák sokféleségére vonatkozóan a botritizálódás fázisai között, a gombák közösségének komplexitása összehasonlítható volt a nemesrothadás során. Mindazonáltal, hogy a nemesrothadás folyamata szignifikáns hatást gyakorolt a gombaközösség összetételére további karakterisztikákat is előre jelezhet például a szőlőbogyók fizikai és kémiai változásait is (Letaief et al. 2008 a). A vizsgált szőlőfajták esetében a gombák sokféleségében és összetételében azonosított különbségek összefüggésbe hozhatók korábbi eredményekkel, melyek szerint a szőlőfajták típusai szintén befolyásolhatják, bár nem botritizálódott szőlőbogyókon, a jelen lévő gomba diverzitást (Martins et al. 2012, Bokulich et al. 2013). A későbbi

szüretidőpontban jelenlévő változatosabb gombaösszetétel magyarázható a hidegebb, páradúsabb őszi időszaknak köszönhető időjárás adatokkal is, amely általánosan kedvezőbb feltételeket biztosít a gombák szaporodásához. Annak ellenére, hogy a gombák sokféleségében nem azonosítottam szignifikáns különbséget a botritizálódási fázisok között, a Mantel-teszt során azonosított szignifikáns korreláció a fizikai paraméterek és gombaösszetétel között arra enged következtetni, hogy az eltérő textúra paraméterekkel rendelkező szőlőbogyók gombaközösségében is eltérés mutatkozik. Blanco-Ulate és munkatársai leírták, hogy a *B. cinerea* sokféle poliszacharid-bontó enzimet termel, amelyek a növényi sejtfalet lebontását szolgálják, ezek közül a pektinben gazdag növényi sejtfalet lehet az egyik legfontosabb szubsztrátum, amely fontos szerepet játszik a botritisz gazdanövény specifikusságában (2015), illetve azt is megállapították, hogy a gomba és növényi enzimek együttesen vehetnek részt az összetett poliszacharidok lebontásában (2014). Ezen megállapítás összefüggésbe hozható az aszúsodás kezdetekor a bogyó fizikai paramétereinek megváltozásával. A szőlőbogyó textúrájában bekövetkező változások nemcsak a botritizálódás folyamatában figyelhetők meg, hanem egyéb gombás fertőzések is okozhatnak textúraváltozást a szőlőbogyókon, illetve akár az időjárás (jégverés) hatására bekövetkezett fizikai változás is eltérést okozhat a szőlőbogyók mikrobiótájában. A botritizálódás folyamata során a gombák béta diverzitásában azonosított csökkenő trend is arra enged következtetni, hogy akár a nemesrothadás egy előre jelezhető folyamat is lehet, hiszen a szőlőbogyókban fennálló, a gombákra erőteljes hatást gyakorló környezeti nyomás: magas cukorkoncentráció, alacsony víztartalom előre jelezheti a gombaközösség kisebb heterogenitását (Bokulich et al. 2014).

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az értekezésben bemutatott eredményeim alapján új elemeket tártam fel a nemesrothadás és *B. cinerea* között fennálló kapcsolatrendszerben.

Az aszúbor előállításában jártas szakemberek szerint a jó aszúszem, kellően magas cukor- és savtartalmú, megfelelő pH-jú, botritiszes ízű, textúrája töppedt, ugyanakkor puha és húsos bogyóként írható le. A tapasztalaton alapuló tudás mögött rejtőző, a szőlőszemekben bekövetkező fizikai-kémiai és biológiai változások hátterében álló folyamatok, ezek rendszere és együttese azonban eddig nem került feltárássra. Ezen kihívásokból kiindulva építettem fel a botritizálódás folyamatának összefüggéseit feltáró kísérleteimet, melyeknek eredményeiből kiderül, hogy az évjárat és szüretidőpont erősen befolyásolja a *B. cinerea* morfológiáját és azt is, hogy milyen szőlészeti körülmények között képes kifejlődni a valódi aszúszem.

Eredményeim rámutattak, hogy a *B. cinerea* micéliális növekedésére és a morfológiai típusok előfordulására az évjárat és szüretidőpont nagy hatással bír. A gomba tulajdonságain túlmutatva a szőlőbogyók aszúsodásának folyamatát kezdtem vizsgálni, melyben a *B. cinerea* fontos, de nem egyedüli szerepet játszik.

Többváltozós statisztikai módszerek segítségével elemeztem, hogy a mért textúraparaméterek, az analitikai értékek és a mikroorganizmus közösségek kombinált modellként kezelve, hogyan változnak az aszúsodás folyamata során. A modell legmeghatározóbb változói rendre a titrálható sav, bogyókeménység, a rugalmassági tényező, a bogyóhéj átszakításához szükséges munka és a cukortartalom értékek, melyek alapján jól meghatározható, hogy az aszúsodás négy különböző fázisa tökéletesen elhatárolódik és megkülönböztethető a vizsgált paraméterekből alkotott modell alapján.

Kísérleti eredményeimre alapozva az eddig csak „szállóigeként” emlegetett – milyen is egy jó aszúszem? – definíció tudományos alapokra helyeződött. A jó aszúszem (évjáratától függően) október végén vagy november elején szüretelhető optimális paraméterekkel, *Furmint* szőlőfajtából a 4. aszúsodási fázisban. Eredményeim nem egy technológiai eljárást adnak, amely alapján bármilyen körülmények között elkészíthető a legjobb aszúbor, hanem támpontokat, melyek segítenek a folyamat

megismerésében, illetve a tudatos szőlőtermesztés kialakításában az aszúbogyó termelés során.

Munkámat szeretném új módszerek bevezetésével folytatni. Az aszúsodás folyamatát reprezentáló fázisok szőlőbogyóinak mikrobaközösségét újgenerációs szekvenálás eszközeivel kívánom elemezni, mint a DNS metabarcoding és RNS transzkriptóma elemzés. További hálózatelemzési módszerek alkalmazásával kívánom a fizikai és kémiai paramétereket a génexpressziós vizsgálatokkal összevetni. Az analitikai vizsgálatokat folytatva az aszúsodás folyamata során a szőlőbogyókban jelenlévő aromakomponensekben és szerves savakban bekövetkező változásokat is szeretném feltárni.



## 7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Munkám során a nemesrothadás folyamatában legnagyobb jelentőséggel bíró fonalagomba, a *B. cinerea* biológiáját tanulmányoztam, majd vizsgáltam a szőlőbogyó botritizálódásának egyéb tulajdonságait fizikai, kémiai és mikrobiológiai szempontból megvilágítva a nemesrothadás folyamatát. Vizsgálataim rávilágítottak, hogy bár a nemesrothadás folyamatában a *B. cinerea* jelenléte alapvető, a szőlőbogyók aszúsodási folyamatának dinamikáját a fizikai-kémiai paraméter változások és a mikrobiális kapcsolatrendszer kölcsönhatásai határozzák meg. Kutatásaim alapján az alábbi új tudományos eredményeket állapítom meg:

### 1. tézis:

Kísérleteimmel elsőként mutattam ki, hogy az évjárat jellegzetességei hatással vannak a *B. cinerea* micéliális növekedési rátájának és morfológiájának változására a nemesrothadás során. A gomba optimális növekedési hőmérsékletétől eltérő hőmérsékleten a lassabb növekedési rátájú, illetve a szkleróciális morfológiai megjelenést mutató izolátumok dominálnak szemben az optimális hőmérsékleti értékhez közeli micéliális megjelenéssel rendelkező és gyorsabb növekedési rátájú izolátumokkal. A morfológiát tekintve a mintagyűjtések előrehaladtával a micéliális típusok előfordulási gyakorisága szignifikánsan csökken.

### 2. tézis:

Munkám során kimutattam, hogy a szőlőbogyók fizikai és kémiai paraméterei évjáratától és szőlőfajtától függetlenül azonos módon változnak a nemesrothadás során, melyből következtetni lehet az aszúsodási fokra (aszúsodási fázisra). A bogyóhéj rugalmassági tényezőjének ( $E_{sk}$ ) értékeihez köthetően meghatároztam az *E-drop*-nak elnevezett pontot, ami megmutatja, hogy mely az a szabad szemmel még nem látható, de a bogyóhéj textúra vizsgálatával kimutatható bogyóállapot, amikor a nemesrothadás folyamata elindul.

### 3. tézis:

Vizsgálataim rámutattak, hogy a *Furmint* és *Hárslevelű* szőlőfajták aszúsodási folyamatában a *Furmint* szőlőfajta esetében tapasztalható a magas minőséget prezentáló fizikai és kémiai értékek kialakulása, ahol – botritizálódás szempontjából megfelelő évjárat esetén - optimális állapotú és minőségű aszúszemet a negyedik aszúsodási fázisban, október végén vagy november elején lehet szüretelni.

### 4. tézis:

Vizsgálataim bizonyították, hogy a botritizálódás során, az egy adott időpontban előforduló aszúsodási fázisok szőlőbogyóinak mikrobiális összetétele hasonló, azonban a folyamat időbeli előrehaladása során a gombaközösség összetételében változások tapasztalhatók. Elmondható, hogy a gombaközösségek átlagosan változatosabbak a *Hárslevelűn*, ám a szüretidőpont előrehaladtával a mikróbaközösség diverzebb a *Furmint* szőlőfajta esetében.

### 5. tézis

A vizsgált változók közötti kapcsolatrendszer feltárása során igazoltam, hogy szoros összefüggés van a szőlőbogyó textúrája és a gomba közösségének összetétele között, mely arra enged következtetni, hogy az aszúsodási folyamat mikrobiális háttere jóval összetettebb az eddig feltételezettektől.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az irodalmi áttekintésben bemutatásra kerültek a *B. cinerea* biológiáján belül az életciklusára, fertőzési útvonalára vonatkozó jelenlegi ismeretek. Kitértem a rendszertani besorolására, miszerint inkább fajkomplexnek tekinthető, mint önálló fajnak, ami két filogenetikai fajt foglal magába. A variabilitására vonatkozó ismereteken keresztül világítottam rá, hogy mennyire diverzek lehetnek a *B. cinerea* populációk, akár borvidékek között is találhatunk eltéréseket a populációk összetételében. A patogenitására utaló fejezetben fontosnak tartottam bemutatni a gomba élelmiszeriparban betöltött szerepét, hiszen nemcsak termő ültetvényekben végez komoly kártételt, hanem a gyümölcsök, zöldségek tárolása, kereskedelme során is az egyik legfontosabb rothadást okozó „post harvest” kórokozónak számít.

A gomba fenotípusáról, morfológiai tulajdonságairól szóló tudományos irodalmat bemutató fejezet szorosan kapcsolódik a kutató munkámhoz, ahol a *B. cinerea* növekedésére és fenotípusos tulajdonságaira ható környezeti tényezőket tárgyalom. A gomba szőlészeti és borászati jelentőségét kettős szerepkörben jellemeztem, bemutattam a szürkerothadás kialakulásának körülményeit és szőlőfeldolgozásra gyakorolt hatásait, majd részletesen jellemeztem a nemesrothadás kialakulásának körülményeit, ami az értekezés alappillérenek tekinthető. A nemesrothadás kialakulását a gyakorlati szempontból meghatározó, a megfelelő aszúszem intuitív felismerését segítő fizikai kémiai és biológiai paraméterek alapján vizsgáltam. A nemesrothadás kialakulásának egyik fontos legfontosabb tényezője a bogyó textúrája ezért a szőlőbogyók reológiai változásait vizsgáló szakirodalmakat egy külön fejezet részben mutattam be. A *B. cinerea* anyagcsere tevékenységének köszönhetően sokféle kémiai változás megy végbe a szőlőbogyóban, mellyel egyediséget kölcsönöz az aszúboroknak. Ezen változásokat feltáró ismereteket mutattam be az aszúbogyó kémiai tulajdonságai című fejezet részben. Jól látható, hogy a szőlőbogyók nemesrothadása során nemcsak a *B. cinerea* gombáé a főszerep, hanem a bogyóban kialakuló fizikai-kémiai változások is nagy hatást gyakorolnak a gomba élettevékenységére, ilyen például a szőlőbogyóban kialakuló magas cukortartalom, ami letális hat a gomba működésére. A mikrobiális táptalajként is tekinthető szőlőbogyó kiváló közeg más gombák számára is, az alkoholos erjedésben szerepet

játszó élesztőgombák a szőlőbogyó mikrobiótájának fontos alkotóelemei. Rajtuk kívül számos más gomba is megtalálható a bogyókon, melyek diverzitását tanulmányoztam a nemesrothadás folyamata során.

Aszús szőlőbogyókról származó *B. cinerea* izolátumok fejlődését vizsgáltam különböző hőmérsékleten, több évjáraton keresztül, majd a gomba morfológiai változását követtem nyomon a különböző évjáratokban és szüretidőpontokban. Eredményeim alapján elmondható, hogy a szőlőfajta nem befolyásolja a gomba fejlődési profilját és morfológiáját, viszont mind az évjárat mind a szüretidőpont szignifikáns hatást gyakorol a *B. cinerea* fejlődésére és morfológiájára.

A nemesrothadás folyamatának négy fő fázisát definiáltam, majd a meghatározott állapotú szőlőbogyók fiziko-kémiai és mikrobiológiai tulajdonságait vizsgáltam. Elemzéseimet a szőlőbogyók különböző fizikai hatásokra adott reakcióinak vizsgálatával kezdtem, mely során fény derült arra, hogyan változik a bogyóhéj átszakításához szükséges erő ( $F_{sk}$ ) és munka ( $W_{sk}$ ). E meghatározó fizikai tulajdonságok a folyamat 3. fázisáig csökkennek, majd a 4. fázis felé haladva újra növekedésnek indulnak, jól alátámasztva az érés, túlérés, botritizálódás és töppedés tapasztalati folyamatait. A bogyó keménysége (BH) is folyamatos csökkenést mutat a 4. fázisig. A bogyóhéj rugalmassági tényezője, Young's modulusa ( $E_{sk}$ ) szintén csökkenésnek indul az aszúsodás kezdetekor (*E-drop*)

Az aszúsodási folyamat 4. fázisa – és természetesen az egyre későbbi szüretidőpontok – felé haladva mindkét szőlőfajta esetében folyamatosan nő a cukortartalom, melynek dinamikáját a pH változása is követi, azonban a *Furmint* bogyókban mért pH értékek minden esetben a *Hárslevelűé* alatt maradtak. A titrálható sav értékek némi csökkenés növekedés után az aszúsodási folyamat során a kiindulási ponthoz térnek vissza. Az alacsonyabb pH esetében az aszúbor erjedése egyenletesebb, az érlelés során a környezet kevésbé oxidáló, az aromák frissebbek maradnak, jól láthatóan előnyösebb értékeket eredményezve a *Furmint* esetében. A savtartalom nem egyenletes növekedése az egyéb beltartalmi összetevők koncentrációja miatt következik be, viszont a folyamat végén (3-4. fázis) bekövetkező növekedés tudja biztosítani azt a harmonikus ízérzetet, amely a magas cukortartalom mellett jó fogyaszthatósággal jellemzi az aszú borokat.

Tapasztalataim szerint a szőlőbogyók felszínén lévő gombaközösségek átlagosan változatosabbak a *Hárslevelűn*, ám a szüretidőpont előrehaladtával a mikrobaközösség

változatossága a *Furmint* esetében lesz magasabb. A bogyók gombaközösségének diverzitása a 4. fázis felé haladva csökken, míg az összes élesztő- és penészszám az aszúsodás előrehaladtával növekszik.

A többváltozós statisztikai módszerek segítségével elemeztem, hogy a mért textúra paraméterek, az analitikai értékek és a mikroorganizmus közösségek kombinált modellként kezelve, hogyan változnak az aszúsodás folyamata során. A modell legmeghatározóbb változói rendre a TA, BH és  $E_{sk}$ ,  $W_{sk}$  és a cukortartalom értékek, melyek alapján jól meghatározható, hogy az aszúsodás négy különböző fázisa tökéletesen modellezhető a vizsgált paraméterekkel.

A leírt eredmények hozzájárulnak a nemesrothadás folyamatának pontosabb megismeréséhez, támogatást nyújtva a termelőknek a minél magasabb minőségű aszúszemek felismeréséhez, illetve egy tudatosabb aszútermelési szemléletmód kialakításához.

## 9. SUMMARY

According to the references section the biology of *B. cinerea* (e. g. life-cycle, pathways of infection etc.) was detailed, addresses this section to the taxonomy of the fungi, thus *B. cinerea* can be described as a species complex rather than one specie. Progress in molecular genetics, and the development of relevant phylogenetic markers in particular, has resulted in the establishment of more than 30 species, a hybrid and a species complex.

Through the facts about the variability of the fungi the diversity of *B. cinerea* populations has been highlighted: each wine regions could have its own sub-population. In section dedicated to pathogenity the role of the fungi in agrifood-sector was detailed, since neither in cultural conditions nor in post-harvest situation (e. g.: storing, logistics) *B. cinerea* is one of the most relevant pathogen.

The chapter devoted to phenotypes, morphology and its references has high impact in my research describing the enviromental effects of the growth and infection. I characterised the fungi having twofold role: presented as grey rot and its effect on grape processing, in addition it was further particularised the process of noble rot which is the basic element of the thesis. The development, particularly physical, chemical and biological characteristics of noble rotted berries has been examine from the point of view of intuitive and practical experiences. One of the most important factor of noble rot is the texture, therefore the rheology of grape berries has been introduced in a key section. Due to the metabolic properies of *B. cinerea* several chemical transitions occuring in grape berries giving unique characteristic to aszú wine. Those changes have been detailed in the chapter about chemical characteristics.

It is well-known that beside *B. cinerea* many other microorganisms play role in noble rotting process, physico-chemical changes effecting the fungal microbiom such as high sugar content being lethal to the fungal life-cycle. Grape berry as microbial medium is appropriate for other fungi like fermenting yeasts etc. The microbial community of noble rot and fungal diversity has been characterised in this study.

Isolates selected from the so called *aszú* berries has been investigated regarding the fungal growth in various temperatures in different vintages, since morphological

changes have been determined in separate collecting times. As result it was clearly seen that the grape cultivar has no influence on the fungal growth rate and morphology type, however both the vintage and collecting time has significant effect on *B. cinerea* phenotypic properties.

Four stage of phases of the noble rot process has been defined, where the physico-chemical and microbiological characteristics were investigated. Analysis of responses to different mechanical exposures were made from which, it was cleared out that how the berry skin break force ( $F_{sk}$ ) and energy ( $W_{sk}$ ) changes. Thees texture parameters show decreasing trend from phase 1 to 3 and increasing to phase 4, proofing the practical experiences of the process such as mature, over-mature, botrytising, wither. Berry hardness (BH) play a continuous decreasing role, the elastic modulus ( $E_{sk}$ ) shows a drop like effect (*E-drop*) between phase 1 and phase 2.

Four stages of noble rot and later harvesting times both investigated cultivars show increasing sugar content paralelly to the growth in pH values, but cv. *Furmint* show significantly lower pH values in all stages. Titratable acidity (TA) fluctuates during noble rot process, but seems to be same level of acity in stage 1 and 4. The fermentation of *aszú* wines can be more stable in lower pH media, shows less oxidation during aging, primer aromas can be preserved so cv. *Furmint* could be more favourable in *aszú* making. The non-consistent changing in TA is coming from the different ratios of other soluted components, but the slight increasement between phase 3 and 4 can give the sensory balance of sweet wine resulting good drinkability despite of high residual sugar content.

I found greater diversity in fungal community in case of cv. *Hárslevelű*, but the richness of the fungal microbiome become higher over withering in cv *Furmint*. However the fungal diversity is decreasing during the noble rotting process the total number colony forming unit of yeast and mold increases.

The measured physico-chemical and mircobial parameter were analysed by multivariate statistic modelling to describe significant changes in noble rotting process. The highly contributing variables (TA, BH,  $E_{sk}$ ,  $W_{sk}$ , sugar content) give a high quality model to separate noble rotting pahses.

The studies described below assist to the better understanding of noble rotting process, helping producers to enhance quality of *aszú* berries and giving perspectives to establish a conscious *aszú* production.

## 10. MELLÉKLETEK

### Irodalomjegyzék

Altschul, S. F. et al. (1990): Basic local alignment search tool, In: *Journal of molecular biology*, 215 (3), pp. 403–410.

Azzolini, M. et al. (2013): Selection of *Botrytis cinerea* and *Saccharomyces cerevisiae* strains for the improvement and valorization of Italian passito style wines, In: *FEMS Yeast Research*, 16 (6), pp. 540-552.

Balassa I., (2012): Tokaj-Hegyalja történelmének fő vonásai, *Zempléni Múzsza* XII., 2. évfolyam, 46. szám

Balga, I. (2015): Technológiai műveletek hatásai az egri bikavér élettanilag aktív vegyületeinek összetételére és érzékszervi tulajdonságaira = A review of the effect of wine technology procedures on the polyphenolic compounds and sensory analysis in red wines. In: *Doktori értekezés*, Budapesti Corvinus Egyetem.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V. (2012): The microbial ecology of wine grape berries, In: *International journal of food microbiology*, 153 (3), pp. 243–259.

Barbanti et al. (2008): Effect of various thermo-hygrometric conditions on the withering kinetics of grapes used for the production of “Amarone” and “Recioto” wines, In: *Journal of food engineering*, 85 (3), pp. 350-358.

Barbe, J.-C. et al. (2000): Role of carbonyl compounds in SO<sub>2</sub> binding phenomena in musts and wines from botrytized grapes, In: *Journal of agricultural and food chemistry*, 48 (8), pp. 3413–3419.

Baarlen, P. et al. (2007): Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control, In: *Molecular Plant Pathology*, 8 (1), pp. 41-54.

Beever, R. E. and Weeds, P. L. (2007): Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*, In: *Botrytis: Biology, pathology and control*. Springer, pp. 29–52.

Bellincontro, A. et al. (2016): Management of postharvest grape withering to optimise



the aroma of the final wine: A case study on Amarone, In: *Food chemistry*, 213, pp. 378–387.

Bene, Zs. and Magyar, I. (2004): Characterization of yeast and mould biota of botrytized grapes in Tokaj wine region in the years 2000 and 2001, In: *Acta Alimentaria*, 33 (3), pp. 259–267.

Benson, R. W. (1977): Botrytis Cinerea: The Noble Rot, In: *ABAJ*, 63, p. 867.

Billard, A. et al. (2011): Fenhexamid resistance in the Botrytis species complex, responsible for grey mould disease, In: *Fungicides-Beneficial and harmful aspects*. N. Thajuddin, ed. InTech Publisher, Rijeka, Croatia, pp. 61–78.

Blanco-Ulate, B. et al. (2014): Genome-wide transcriptional profiling of Botrytis cinerea genes targeting plant cell walls during infections of different hosts, In: *Frontiers in plant science*, 5, p. 435.

Blanco-Ulate, B. et al. (2015): Developmental and metabolic plasticity of white-skinned grape berries in response to Botrytis cinerea during noble rot, In: *Plant physiology*, 169 (4), pp. 2422–2443.

Bodnár, L. (2001): Az Egri borvidék, Vámospércs: Bodnár és Társa Geográfus Bt. 225-236.

Bokulich, N. A. et al. (2013): Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota, In: *PloS one*, 8 (6), p. e66437.

Bokulich, N. A. et al. (2014): Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate, In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (1), pp. E139–E148.

Broome, J. C. et al. (1995): Development of an infection model for Botrytis bunch rot of grapes based on wetness duration and temperature, In: *Phytopathology*, 85 (1), pp. 97–102.

Brunke, H. et al. (n.a.): German Wine Auctions: A Marketing Tool for Differentiated Products (k.n.)

Cantoral, Jesus M. et al. (2011): Filamentous fungi (Botrytis cinerea), In: *Molecular Wine Microbiology*, pp. 257–277.

Cantu, D. et al. (2008): The intersection between cell wall disassembly, ripening, and

fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*, In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (3), pp. 859–864.

Campia, P. et al. (2017): Genetic structure and fungicide sensitivity of *Botrytis cinerea* populations isolated from grapevine in northern Italy, In: *Plant Pathology*, 66 (6), pp. 890-899.

Carbajal-Ida, D. et al. (2016): Physico-chemical properties of botrytised Chenin blanc grapes to assess the extent of noble rot, In: *European Food Research and Technology*, 242 (1), pp. 117–126.

Chen, Y. et al. (2020): Microbial community composition and its role in volatile compound formation during the spontaneous fermentation of ice wine made from Vidal grapes, In: *Process Biochemistry*.

Ciliberti, N., Fermaud, M., Roudet, J., et al. (2015a): Environmental conditions affect *Botrytis cinerea* infection of mature grape berries more than the strain or transposon genotype, In: *Phytopathology*, 10 (8), pp. 1090–1096.

Ciliberti, N., Fermaud, M., Languasco, L., et al. (2015b): Influence of fungal strain, temperature, and wetness duration on infection of grapevine inflorescences and young berry clusters by *Botrytis cinerea*, In: *Phytopathology*, 105 (3), pp. 325–333.

Cliff, M. et al. (2002): Characterization of Canadian ice wines by sensory and compositional analyses, In: *American Journal of Enology and Viticulture*, 53 (1), pp. 46-53.

Cocolin, L. et al. (2013): Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation, In: *International journal of food microbiology*, 167 (1), pp. 29-43.

Damialis, A. et al. (2015): Fungi in a changing world: growth rates will be elevated, but spore production may decrease in future climates, In: *International Journal of Biometeorology*, 59 (9), pp. 1157–1167.

Deytieux-Belleau, C. et al. (2009): Grape berry skin features related to ontogenic resistance to *Botrytis cinerea*, In: *European Journal of Plant Pathology*, 125 (4), p. 551.

Doumouya, S. et al. (2014): Physical and physiological heterogeneity within the grape bunch: impact on mechanical properties during maturation, In: *American Journal of*

*Enology and Viticulture*, 65 (2), pp. 170–178.

Droby, S. and Lichter, A. (2007): Post-harvest Botrytis infection: etiology, development and management, In *Botrytis: Biology, pathology and control*. Springer, pp. 349–367.

Edgar, R. C. (2010): Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, In: *Bioinformatics*, 26 (19), pp. 2460–2461.

Elad, Y. et al. (2007): Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems—an introduction, In: *Botrytis: Biology, pathology and control*, 1-8.

Elad, Y., Vivier, M. and Fillinger, S. (2016): Botrytis, the good, the bad and the ugly, In: *Botrytis—The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. 413-486.

Elad, Y. Pertot, I. Prado, A.M.C., Stewart, A. (2016): Plant hosts of Botrytis spp., In: *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, 413-486.

Elmer, P. A. G. and Michailides, T. J. (2007): Epidemiology of Botrytis cinerea in orchard and vine crops, In: *Botrytis: biology, pathology and control*. Springer, pp. 243–272.

Fedrizzi, B. (2011): Changes in wine aroma composition according to botrytized berry percentage: a preliminary study on Amarone wine, In: *Food Technology and Biotechnology*, 49 (4), pp. 529.

Fournier, E. et al. (2002): Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus Botrytis cinerea (Ascomycota), In: *Molecular Ecology Notes*, 2 (3), pp. 253–255.

Fournier, E., Gladieux, P. and Giraud, T. (2013): The “Dr Jekyll and Mr Hyde fungus”: noble rot versus gray mold symptoms of Botrytis cinerea on grapes, In: *Evolutionary applications*, 6 (6), pp. 960–969.

Fleet, G. (2003): Yeast interactions and wine flavour, In: *International journal of food microbiology*, 86 (1-2), pp. 11-22.

Gardes, M. and Bruns, T. D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts, In: *Molecular ecology*, 2 (2), pp. 113–118.

Gaspar, J. (2021): Sotolon in madeira Wine. New insights on the aroma impact and main formation pathways, URL: <https://digituma.uma.pt/handle/10400.13/3289>, Keresőprogram: Google Scholar, Kulcsszavak: stolon, aroma, Lekérdezés időpontja: 2021.10.21.

Genovese, A. et al. (2007): Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine, In: *Food Chemistry*, 103 (4), pp. 1228–1236.

Geri, Á. (2021): Egerben sikerült leírni a tökéletes aszú bogyó receptjét, URL: <https://vinoport.hu/tema/egerben-sikerult-leirni-a-tokeletes-aszu-bogyo-receptjet/4370>. Keresőprogram: Google, Kulcsszavak: eger, aszú, kutatás, Lekérdezés időpontja: 2021.03.28.

Giraud, T. et al. (1997): RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species., In: *Molecular Biology and Evolution*, 14 (11), pp. 1177–1185.

Giraud, T. et al. (2006): Importance of the life cycle in sympatric host race formation and speciation of pathogens, In: *Phytopathology*, 96 (3), pp. 280–287.

Guild Somm (2019): Understanding the Role of Sugar in Wine, URL: <https://daily.seventyfive.com/understanding-the-role-of-sugar-in-wine/>. Keresőprogram: Google, Kulcsszavak: sweet wine, aszú wine, aszú balace, Lekérdezés időpontja: 2021.03.28.

Gump, P. and Kupina, S. (2012): Analysis of gluconic acid in botrytised wines, In: *Liquid Chromatographic Analysis of Food and Beverages V2*, 2, pp. 331.

Grindle, M. (1979): Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*, In: *Microbiology*, 111 (1), pp. 109-120.

González-Álvarez, M. et al. (2014): Sensory description of sweet wines obtained by the winemaking procedures of raisining, botrytisation and fortification, In: *Food chemistry*, 145, pp. 1021-1030.

Halliday, J. (2007): *Wine atlas of Australia*, University of California Press.

Hennebert, G. L. (1973): *Botrytis* and *Botrytis*-like genera, In: *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 7 (2), pp. 183–204.

Holz, G., Coertze, S. and Williamson, B. (2007): The ecology of *Botrytis* on plant surfaces, In: *Botrytis: Biology, pathology and control*. Springer, pp. 9–27.

- Jakucs, E. and Vajna, L. (2003): Mikológia, Agroinform Kiadó és Nyomda Kft. Budapest, pp. 239-305.
- Jarvis, W. R. (1977): Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology and pathogenicity, Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada
- Judet-Correia, D. et al. (2010): Validation of a predictive model for the growth of Botrytis cinerea and Penicillium expansum on grape berries, In: *International journal of food microbiology*, 142 (1–2), pp. 106–113.
- Kallitsounakis, G. and Catarino, S. (2020): An overview on botrytized wines, In: *Ciência e Técnica Vitivinícola*, (n.a.)
- Kaló, I. (2006): Termesztési tapasztalatok a Turán szőlőfajtával, *Borászati füzetek*, 5, 31-33.
- Karabulut, O. et al. (2003): Near-harvest applications of Metschnikowia fructicola, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in central California, In: *Plant Disease*, 87 (11), pp. 1384-1389.
- Kerridge, G. and Gackle, A. (2004): *Vines for Wines: A Wine Lover's Guide to the Top Wine Grape Varieties*. Csiro Publishing.
- Kiss, J. and Sass-Kiss, A. (2005): Protection of originality of Tokaji Aszú: amines and organic acids in botrytized wines by high-performance liquid chromatography, In: *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (26), pp. 10042–10050.
- Kleb, B. (1978): *Eger múltja a jelenben*, Budapest, pp.161-166.
- Knapp, D. et al. (2021): Above-ground parts of white grapevine *Vitis Vinifera cv.* Furmint share core members of the fungal microbiome, In: *Environmental Microbiology Reports*.
- Köycü, N. (2014): T-resveratrol accumulation and polygalacturonase inhibition during infection of grape berries by Botrytis cinerea, In: *Journal of Plant Pathology*, 96 (2), pp. 261-269.
- Kurtzman, C., Fell, J. W. and Boekhout, T. (2011) *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- Ky, I. et al. (2012): Assessment of grey mould (Botrytis cinerea) impact on phenolic and sensory quality of Bordeaux grapes, musts and wines for two consecutive vintages,

- In: *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18 (2), pp. 215–226.
- Letaief, H. *et al.* (2008a): Assessment of grape skin hardness by a puncture test, In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (9), pp. 1567–1575.
- Letaief, H., Rolle, L. and Gerbi, V. (2008b): Mechanical behavior of winegrapes under compression tests, In: *American Journal of Enology and Viticulture*, 59 (3), pp. 323–329.
- Levis, C., Fortini, D. and Brygoo, Y. (1997): Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*, In: *Molecular and General Genetics MGG*, 254 (6), pp. 674–680.
- Lorenzini, M. and Zapparoli, G. (2014): An isolate morphologically and phylogenetically distinct from *Botrytis cinerea* obtained from withered grapes possibly represents a new species of *Botrytis*, In: *Plant pathology*, 63 (6), pp. 1326–1389.
- Mádi Kör Bor-eredetvédelmi Egyesület, URL: <http://www.madikor.hu/teruletek/>  
Keresőprogram: Google, Kulcsszavak: betsek dűlő, Lekérdezés időpontja: 2021.03.28.
- Magyar, I. (2010) 'Boraszati mikrobiológia', *Mezőgazda Kiadó, Budapest*.
- Magyar, I. *et al.* (2008): Oenological characterization of indigenous yeast species involved in fermentation of Tokaji aszú, In: *Bulletin de l'OIV-Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*, 81 (923-925), pp. 35-44.
- Magyar, I. (2011) 'Botrytized wines', *Advances in food and nutrition research*, 63, pp. 147–206.
- Magyar, I. and Soós, J. (2016): Botrytized wines—current perspectives, In: *International Journal of Wine Research*, 8, pp. 29–39.
- Martinez, F. *et al.* (2003): Phenotypic differences between vacuola and transposon subpopulations of *Botrytis cinerea*, In: *European Journal of Plant Pathology*, 109 (5), pp. 479–488.
- Martinez, F. *et al.* (2005): The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards, In: *Phytopathology*, 95 (6), pp. 692-700.
- Martins, G. *et al.* (2012): Grape berry bacterial microbiota: impact of the ripening

process and the farming system, In: *International journal of food microbiology*, 158 (2), pp. 93–100.

Mashuda, M. et al. (1984): Identification of 4, 5-dimethyl-3-hydroxy-2 (5H)-furanon (sotolon) and ethyl-9-hydroxynonanoate in botrytised wine and evolution of the roles of compounds characteristic of it, In: *Biol. Chem*, 48, pp. 2707–2710.

Masneuf-Pomarede, I. et al. (2015): The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments, In: *FEMS yeast research*, 15 (5), p. fov045.

Masneuf-Pomarede, I. et al. (2016): The genetics of non-conventional wine yeasts: current knowledge and future challenges, In: *Frontiers in microbiology*, 6, p. 1563.

Mencarelli, F. et al. (1994): Accurate detection of firmness and colour changes in the packing of table grapes with paper dividers, In: *Journal of Horticultural Science*, 69 (2), pp. 299–304.

Mencarelli, F. and Tonutti P. (2013): Sweet, reinforced and fortified wines: Grape biochemistry, technology and vinification, UK, John Wiley & Sons Ltd.

Meyer, U. et al. (2000): Detection and quantification of *Botrytis cinerea* by ELISA in pear stems during cold storage, In: *Plant disease*, 84 (10), pp. 1099-1103.

Miklós, É. and Kerényi, Z. (2004): Comparison of the volatile aroma components in noble rotted grape berries from two different locations of the Tokaj wine district in Hungary, In: *Analytica Chimica Acta*, 513 (1), pp. 177–181.

Miklós, É. et al. (2004): Identification of some characteristic aroma compounds in noble rotted grape berries and Aszu wines from Tokaj by GC-MS, In: *Acta Alimentaria*, 33 (3), pp. 215-226.

Moyano, C. et al. (2003): Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* populations, In: *European Journal of Plant Pathology*, 109 (5), pp. 515-522.

Nagy, K. (2014): "...Vagyon egy Oremus nevű szőlő, fő bortermő..." A sátoraljaújhelyi Oremus szőlő történetéhez, In: *Történelmi Szemle*, (01), pp. 91–106.

Nair, N. G. and Allen, R. N. (1993): Infection of grape flowers and berries by *Botrytis cinerea* as a function of time and temperature, In: *Mycological Research*, 97 (8), pp. 1012–1014.

- Navi, S. et al. (1999): A pictorial guide for the identification of mold fungi on sorghum grain, *Information Bulletin* (59). International Crops Research Institute for Semi Arid Tropics, Patancheru, Andhra Pradesh, India.
- Oksagen, J. et al. (2012): Package ‘Vegan’. Community Ecology Package, Version 2. 2013. Available at: <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Padgett, M. and Morrison, J. C. (1990): Changes in grape berry exudates during fruit development and their effect on mycelial growth of *Botrytis cinerea*, In: *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115 (2), pp. 269–273.
- Peterson, S. W. and Kurtzman, C. P. (1991): Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts, In: *Systematic and applied microbiology*, 14 (2), pp. 124–129.
- Pezet, R. et al. (2003): Latency of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. and biochemical studies during growth and ripening of two grape berry cultivars, respectively susceptible and resistant to grey mould, In: *Journal of Phytopathology*, 151 (4), pp. 208–214.
- Pinar, A. L. et al. (2016): Effects of *Botrytis cinerea* and *Erysiphe necator* fungi on the aroma character of grape must: a comparative approach, In: *Food Chemistry*, 207, pp. 251–260.
- Ribéreau-Gayon, P. (1982): The anthocyanins of grapes and wines, In: *Anthocyanins as food colors*, 6, pp. 214–215.
- Ribéreau-Gayon, P. et al. (2006): Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications. John Wiley & Sons Ltd.
- Robinson, J. and Harding, J. (2015). *The Oxford companion to wine*. American Chemical Society.
- Robinson, J. et al. (2013): Wine grapes: a complete guide to 1,368 vine varieties, including their origins and flavours. Penguin UK.
- Rolle, L. et al. (2010): Evolution of mechanical variables of winegrapes for icewine production during on-vine drying, In: *Italian Journal of Food Science*, 22 (2), p. 143.
- Rolle, L. et al. (2011): Varietal relationship between instrumental skin hardness and climate for grapevines (*Vitis vinifera* L.), In: *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (19), pp. 10624–10634.



- Rolle, L. et al. (2012): Instrumental texture analysis parameters as markers of table-grape and winegrape quality: A review, In: *American Journal of Enology and Viticulture*, 63 (1), pp. 11-28.
- Romanazzi, G. et al. (2009): Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape, In: *Phytopathology*, 99 (9), pp. 1028–1036.
- Rousseau, S. and Donèche, B. (2001): Effects of water activity (aw) on the growth of some epiphytic micro-organisms isolated from grape berry, In: *Vitis*, 40 (2), pp. 75–78.
- Sanzani, S. et al. (2012): Early detection of *Botrytis cinerea* latent infections as a tool to improve postharvest quality of table grapes, In: *Postharvest biology and technology*, 68, 64-71.
- Sass-Kiss, A. et al. (2008): Multivariate statistical analysis of botrytised wines of different origin, In: *Food chemistry*, 110 (3), pp. 742–750.
- Sato, A. et al. (1997): Varietal differences in the texture of grape berries measured by penetration tests, In: *Vitis*, 36 (1), pp. 7-10.
- Schoch, C. L. et al. (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (16), pp. 6241–6246.
- Segade, S. R. et al. (2008): Phenolic ripeness assessment of grape skin by texture analysis, In: *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (8), pp. 644–649.
- Sipiczki, M. (2003): *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines, In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53 (6), pp. 2079-2083.
- Szabó, J. és Török, S. (Szerk.) (1867): *Album of the Tokay-Hegyalja*, Pest, Gustavusemich, pp. 62-63.
- Teixeira, A. et al. (2013): Berry phenolics of grapevine under challenging environments, In: *International journal of molecular sciences*, 14 (9), pp. 18711-18739.
- Thomas, C. S. et al. (1988): The effects of wind speed, temperature, and relative humidity on development of aerial mycelium and conidia of *Botrytis cinerea* on grape,

In: *Phytopathology*, 78 (3), pp. 260–265.

Thuy, P. T. et al. (1995): Optimal Conditions for the Formation of Sotolon from. alpha.-Ketobutyric Acid in the French " Vin Jaune", In: *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 43 (10), pp. 2616–2619.

Tofalo, R. et al. (2009): Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must, In: *International journal of food microbiology*, 130 (3), pp. 179–187.

Tofalo, R. et al. (2012): Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines, In: *Food Microbiology*, 29 (1), pp. 18–26.

Tosi, E. (2012): Effects of noble rot on must composition and aroma profile of Amarone wine produced by the traditional grape withering protocol, In: *Food Chemistry*, 130 (2), pp. 370-375.

Váczy, K. Z. et al. (2008): Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards, In: *Phytopathology*, 98 (12), pp. 1312–1319.

Váczy K. Z. (2009): *Botrytis cinerea* populációk vizsgálata az Egri borvidéken, Doktori értekezés, Debreceni Egyetem

Valero-Jiménez, C. et al. (2018): Comparative genomics of plant pathogenic *Botrytis* species with distinct host specificity, In: *BMC genomics*, 20 (1), pp. 1-12.

Vallejo, I. et al. (2003): Virulence of *Botrytis cinerea* strains on two grapevine varieties in south-western Spain, In: *Section Cellular and Molecular Biology*.

Walker, A. et al. (2011): *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*, In: *Phytopathology*, 101 (12), pp. 1433-1445.

Walker, A. et al. (2015): Population structure and temporal maintenance of the multihost fungal pathogen *Botrytis cinerea*: causes and implications for disease management, In: *Environmental Microbiology*, 17 (4), pp. 1261-1274.

Walker, A. (2016): Diversity within and between species of *Botrytis*, In: *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, 91-125.

White, T. J. et al. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*,

18 (1), pp. 315–322.

Wilcox, W. (2007): Understanding and controlling Botrytis, In: *Vinery Vineyard*, 2, pp. 12-14.

Williamson, B. et al. (2007): Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease, *Molecular plant pathology*, 8 (5), pp. 561–580.

Youssef, K. and Roberto, S. R. (2014): Salt strategies to control Botrytis mold of ‘Benitaka’ table grapes and to maintain fruit quality during storage, In: *Postharvest Biology and Technology*, 95, pp. 95–102.

Zapparoli, G. et al. (2018): Changes in chemical and sensory properties of Amarone wine produced by Penicillium infected grapes, In: *Food chemistry*, 263, pp. 42–50.

Zsófi, Z. et al. (2014): Texture characteristics of the grape berry skin and seed (*Vitis vinifera* L. cv. Kékfrankos) under postveraison water deficit, In: *Scientia Horticulturae*, 172, pp. 176–182.

## További mellékletek

Táblázat M1: A szomolyai szőlőterület növényvédelme 2013-2015<sup>a</sup>

Date	Active ingredients	Trade name <sup>b</sup>	Dosage (%)
2013			
10 April	copper hydroxide, 24%; plant oil, 25%	Vegesol RS	0,4
1, 10 May	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4
	mancozeb, 750 g kg <sup>-1</sup>	Vondozeb DG	0,2
24 May, 11 June	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4
	dimetomorf, 9%; mancozeb, 60%	Acrobat MZ WG	0,2
25 June, 5 July	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4
	copper hydroxide, 77%	Champion WG	0,2
15 July	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4
2014			
12 April	copper hydroxide, 24%; plant oil, 25%	Vegesol RS	0,4
5, 16 May	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4
	mancozeb, 750 g kg <sup>-1</sup>	Vondozeb DG	0,2
25 May, 13 June	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4
	dimetomorf, 9%; mancozeb, 60%	Acrobat MZ WG	0,4
24 June, 5 July	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4
	copper hydroxide, 77%	Champion WG	0,2
10 July	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4
15 July	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4
	meptildinokap, 350 g l <sup>-1</sup>	Karathane Star	0,075
20 July	meptildinokap, 350 g l <sup>-1</sup>	Karathane Star	0,075
2015			
10 April	copper hydroxide, 24%; plant oil, 25%	Vegesol RS	0,4
2, 12 May	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4
	mancozeb, 750 g kg <sup>-1</sup>	Vondozeb DG	0,2
22 May, 9 June	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4
	dimetomorf, 9%; mancozeb, 60%	Acrobat MZ WG	0,2
23 June, 4 July	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4
	copper hydroxide, 77%	Champion WG	0,2
15 July	elemental sulphur, 80%	Kumulus S	0,4

<sup>a</sup> Rovarölő szereket egyik évben sem alkalmaztak, a gyomnövények ellen mechanikailag védekeztek

<sup>b</sup> Vegesol RS (BVN Ltd, Budapest Hungary), Kumulus S (BASF Hungary Ltd., Budapest, Hungary), Acrobat MZ WG (BASF Hungary Ltd., Budapest, Hungary), Vondozeb DG (UPL Europe Ltd., Cheshire, UK), Champion WG (Kwizda Agro Ltd, Budapest, Hungary), Karathane Star (Dow AgroSciences Hungary Ltd, Budapest, Hungary).

Táblázat M2: A mádi szőlőterület növényvédelme 2016-2017

Date	Active ingredients	Trade name <sup>b</sup>	Dosage
<b>2016-2017</b>			
<b>30 April</b>	abamektin 18 g l <sup>-1</sup>	Vertimec	0,75 l/ha
<b>10 June</b>	cimoxanil 330 g kg <sup>-1</sup> , zoxamid 330 g kg <sup>-1</sup>	Lieto	0,4 kg/ha
	tebukonazol 16%, triadimenol 4%, spiroxamin 25%	Falcon	70 l/ha
	difenokonazol 60 g l <sup>-1</sup> , cyflufenamid 30 g l <sup>-1</sup>	Dynali	0,6 l/ha
	elemental sulphur 80%	Kumulus S	0,4 kg/ha
<b>19 June</b>	cimoxanil 330 g kg <sup>-1</sup> , zoxamid 330 g kg <sup>-1</sup>	Lieto	0,4 kg/ha
	tebukonazol 16%, triadimenol 4%, spiroxamin 25%	Falcon	70 l/ha
	difenokonazol 60 g l <sup>-1</sup> , cyflufenamid 30 g l <sup>-1</sup>	Dynali	0,6 l/ha
	elemental sulphur 80%	Kumulus S	0,4 kg/ha
<b>5 July</b>	cyflufenamid 4,87 %	Cyflamid	0,35 l/ha
	cimoxanil 330 g kg <sup>-1</sup> , zoxamid 330 g kg <sup>-1</sup>	Lieto	0,4 kg/ha
	elemental sulphur 80%	Kumulus S	0,4 kg/ha
<b>26 July</b>	abamektin 18 g l <sup>-1</sup>	Vertimec	0,75 l/ha

Tábázat M3: A *B. cinerea* DNS izolálásának lépései

	<b>Feltárás, homogenizálás</b>
1.	Az összegyűjtött 96%-os etanollal mosott micéliumot a kerámiagolyókat tartalmazó feltáró csőbe (Green Beeds) tettem, amelybe előzőleg már belemértem 300µl AP1 puffert, 10µl RNáz oldatot és 10µl Proteináz K-t. Ezek segítségével a fehérje és RNS szennyeződés csökkenthető.
2.	Feltárás a MagNaLyser készülékkel (90 másodperc, 5000 rpm).
3.	A feltárt mintákat 10 percig 65 °C-on inkubáltam a fűthető eppendorf rázóban, folyamatos rázatás mellett.
4.	Az inkubáció után adtam hozzá 100 µl kloroformot, vortexeltem 10 másodpercig.
5.	Centrifugálás 20.000 g-n 5 percig. Ezután a felülúszóval dolgoztam tovább.
	<b>Szűrés</b>
6.	A sejtlizátumot tartalmazó felülúszót a (lila) QIAshredder Mini Spin oszlopokra pipettam, melyeket 2 ml-es centrifuga csőbe helyeztem.
7.	Centrifugálás 11.000 g-n 2 percig. (Ha a centrifuga csőben pellet volt fedezhető ügyeltem, hogy ne kavarjam fel a pipetázással.)
8.	Átpipetáltam centrifugálás után az oldatot új, steril 1,5 ml-es eppendorf csőbe.
	<b>DNS kicsapás, megkötés</b>
9.	Hozzáadtam 450µl PC puffert a tiszta lizátumhoz és azonnal kevertem pipetázással.
10.	Rápipetáltam max. 700µl oldatot a DNeasy Mini Spin oszlopra (zöld), melyeket előzőleg 2 ml-es eppendorfba tettem, majd centrifugáltam 11.000 g-n 1 percig, ezután kiöntöttem az átfolyót.
11.	A 10. lépést megismételtem azzal a maradék mintával, amely az előzőpipetázásból nem fért az oszlopra.
	<b>Mosás</b>
12.	A DNS-t tartalmazó szűrőt (DNeasy Mini Spin oszlop) a 2 ml-es gyűjtőbe tettem, 400 µl PW1 puffert pipetáltam rá és centrifugáltam 11.000 g-n 1 percig, az átfolyót kiöntöttem.
13.	700 µl PW2 puffert pipetáltam rá a membránra és centrifugáltam 11.000 g-n 1 percig.
14.	200µl PW2 puffert adagoltam az oszlopra, centrifugáltam 2 percig 11.000g-n, és a mosópuffert teljesen eltávolítottam.
	<b>Eluálás</b>
14.	A membrán szűrőt egy tiszta 1,5 ml-es (vagy 2 ml-es) eppendorfba tettem és rápipetáltam 50 µl 65 °C-os PE puffert közvetlenül a membránra, majd inkubáltam 5 percig 65 °C-on. Centrifugáltam 11.000 g-n 1 percig.
15.	Megismételtem a lépést újabb 50µl 65 °C-os PE puffer hozzáadásával és centrifugáltam 11.000g-n 1 percig.

## Fontosabb publikációk

### **Impakt Faktoral rendelkező angol nyelvű folyóiratcikkek**

Júlia, Hegyi-Kaló; Imre, J. Holb ; Szabina, Lengyel; Ákos, Juhász; Kálmán, Zoltán Váczy

Effect of year, sampling month, grape cultivar and incubation temperature on mycelial growth and morphological type of Botrytis cinerea isolated during noble rot development

EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY (2019)

**2019 IF = 1,466**

Júlia, Hegyi-Kaló, Ádám István Hegyi, József Geml, Zsolt Zsófi, Xénia Pálfi, Kálmán Zoltán Váczy

Physico-chemical characteristics and culturable microbial communities of grape berries change strongly during noble rot development

MDPI Plants (2020)

**2020 IF = 2,762**

### **Magyar nyelvű folyóiratcikkek**

Hegyi-Kaló, Júlia; Lengyel, Szabina; Szalóki, Nikoletta; Szén, Orsolya; Juhász, Ákos; Váczy, Kálmán Zoltán

Különböző aszúsodási fázisokban gyűjtött szőlőbogyók felületén előfordulható élesztő és fonalgomba közösség vizsgálata

NÖVÉNYVÉDELEM 78: 11 pp. 507-512., 6 p. (2017)

**Nemzetközi konferencia (teljes)**

Hegyi-Kaló, J; Pomázi, A; Váczy, K Z

Diversity of Botrytis cinerea population of “Aszú” berries compared within two different vintages

In: Engelhardt, Tekla; Dalmadi, István; Baranyai, László; Mohácsi-Farkas, Csilla (szerk.) Food Science Conference 2015 - Integration of science in food chain: Book of proceedings

Budapest, Magyarország: Corvinus University of Budapest, (2015) pp. 94-97. 4 p.

Júlia, Kaló-Hegyi; Andrea, Pomázi; Zsuzsanna, Váczy; Kálmán, Zoltán Váczy

Genetic and morphologic characterisation of noble rotted Botrytis cinerea isolates from Eger wine - growing region

In: Dalmadi, I; Engelhardt, T; Bogó-Tóth, Zs; Baranyai, L; Bús-Pap, J; Mohácsi-Farkas, Cs (szerk.) Food Science Conference 2013 - With research for the success of Darányi Program: Book of proceedings

Budapest, Magyarország: Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, (2013) pp. 204-207., 4 p.



# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik segítették kutatói tevékenységemet:

**Dr. Váczy Kálmán Zoltánnak**, témavezetőmnek, aki támogatta, irányította, segítette kutatómunkámat és az értekezés készítését.

**Dr. Pomázi Andreának**, témavezetőmnek, aki segítette tudományos pályafutásomat.

További köszönetemet fejezem ki az átfogó szakmai segítségükért:

**Dr. Holb Imrének**

**Dr. Geml Józsefnek**

**Hegy Ádám Istvánnak**

Köszönettel tartozom egykori és jelenlegi kollégáimnak a laboratóriumi munkáim során nyújtott segítségükért:

**Lengyel Szabinának, Dr. Szalóki Nikolettának, Dr. Juhász Ákosnak, Geiger Adriennek, Golen Richárdnak, Pálfi Xéniának, Dr. Zsófi Zsoltnak, Lovas Miklósnak, Fejes Zsuzsának, Morvay Kálmánné Editnek és Markovics Györgyné Gabriellának.**

Köszönettel tartozom a vizsgálatokhoz kijelölt mintagyűjtési területek biztosításáért a **Kaló Imre Pincészetnek** és a **Szepsy Pincészetnek**.

Hálával és köszönettel tartozom **férjemnek** és **szüleimnek** az elfogadó türelmükért és támogatásukért.