



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

**A SZŐLŐ (*VITIS VINIFERA*) ÉS AZ AZT ÖVEZŐ TALAJ  
GOMBAKÖZÖSSÉGÉNEK, VALAMINT A RÁ HATÓ TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA**

**AZ EGRI ÉS A TOKAJI BORVIDÉKEN**

DOI: 10.54598/005190

Doktori (PhD) értekezés

**GEIGER ADRIENN**

**GÖDÖLLŐ**

**2024**

**A doktori iskola:** Környezettudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Környezettudományok

**vezetője:** Csákiné Prof. Dr. Michéli Erika,  
az MTA doktora, egyetemi tanár, DSc  
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem  
Környezettudományi Intézet  
Talajtani Tanszék

**Témavezető(k):** Dr. Geml József  
kutatócsoport vezető, tudományos tanácsadó, PhD  
Eszterházy Károly Katolikus Egyetem  
Élelmiszertudományi és Borászati Tudásközpont  
HUN-REN-EKKE Lendület Környezeti Mikrobiom  
Kutatócsoport

Dr. Táncsics András  
Tanszékvezető, tudományos tanácsadó, PhD  
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem  
Molekuláris Ökológia Tanszék  
Mikrobiális Ökológia Kutatócsoport

.....  
Csákiné Prof. Dr. Michéli Erika

Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
Dr. Geml József

A témavezető jóváhagyása

.....  
Dr. Táncsics András

A társtémavezető jóváhagyása

## Tartalom

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Bevezetés .....</b>                                              | <b>6</b>  |
| <b>2. Célkitűzések.....</b>                                            | <b>8</b>  |
| <b>3. Irodalmi áttekintés.....</b>                                     | <b>11</b> |
| 3.1. A növényi mikrobiom jelentősége .....                             | 11        |
| 3.2. A szőlő korai tőkeelhalása .....                                  | 12        |
| 3.2.1 Botrioszfériás elhalás.....                                      | 16        |
| 3.2.2 Eutipás elhalás .....                                            | 18        |
| 3.3.3 Feketelábúság .....                                              | 19        |
| 3.3.4 Fomopszisos elhalás.....                                         | 21        |
| 3.2.5 Esca komplex.....                                                | 23        |
| 3.3 Védekezési lehetőségek a szőlő korai elhalása (GTD) ellen .....    | 25        |
| 3.3.1 Védekezés a GTD kórokozók ellen az oltványiskolában .....        | 26        |
| 3.3.2 Védekezés a GTD kórokozók ellen a szőlőültetvényeken .....       | 26        |
| 3.3.3. Vegyszeres növényvédelem a GTD kórokozók ellen.....             | 27        |
| 3.3.4 Biokontroll ágensek alkalmazása a GTD kórokozók ellen.....       | 28        |
| 3.4 A GTD vizsgálata újgenerációs technikák alkalmazásával .....       | 33        |
| 3.4.1 NGS és DNS-metabarcoding technika.....                           | 33        |
| 3.4.2 A GTD vizsgálata DNS metabarcoding technika alkalmazásával ..... | 34        |
| <b>4. Anyag és módszer .....</b>                                       | <b>36</b> |
| 4.1 Mintagyűjtés.....                                                  | 36        |
| 4.1.1 Egri mintagyűjtés.....                                           | 36        |
| 4.1.2 Tokaji mintagyűjtés .....                                        | 37        |

|                                                                                                                              |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2 Minták feldolgozása, DNS kivonás, szekvenálás .....                                                                      | 38         |
| 4.3 Bioinformatikai, statisztikai analízis .....                                                                             | 38         |
| 4.3.1 A Tokaji borvidéken a növényi kórokozók abundanciájának,<br>fajgazdagságának és összetételének elemzése .....          | 39         |
| 4.3.2 Az Egri borvidéken a különböző funkciós csoportok abundanciájának,<br>fajgazdagságának, összetételének elemzése .....  | 41         |
| 4.4 Hagyományos mikrobiológiai módszerrel történő izolálás a faszövetből .....                                               | 42         |
| 4.5 <i>In planta</i> üvegházi kísérlet a potenciális biokontroll jelölt <i>Clonostachys rosea</i><br>19B/1-es törzzsel ..... | 43         |
| 4.6 Speciális szakkifejezések definiálása a könnyebb érthetőség végett .....                                                 | 45         |
| <b>5. Eredmények és azok megbeszélése .....</b>                                                                              | <b>46</b>  |
| 5.1 A Tokaji borvidék DNS metabarcoding adatsorából nyert eredmények, azok<br>kiértékelése .....                             | 46         |
| 5.2 Az Egri borvidék DNS metabarcoding adatsorából nyert eredmények és azok<br>kiértékelése .....                            | 55         |
| 5.3 A faszövetből történő hagyományos izolálás eredménye .....                                                               | 68         |
| 5.4 A <i>Clonostachys rosea</i> 19B/1-es törzzsel végzett <i>in planta</i> teszt eredménye ....                              | 72         |
| <b>6. Következtetések és a javaslatok .....</b>                                                                              | <b>77</b>  |
| <b>7. Új tudományos eredmények .....</b>                                                                                     | <b>80</b>  |
| <b>8. Összefoglalás .....</b>                                                                                                | <b>82</b>  |
| <b>9. Summary .....</b>                                                                                                      | <b>86</b>  |
| <b>10. Mellékletek .....</b>                                                                                                 | <b>90</b>  |
| M1. Irodalomjegyzék .....                                                                                                    | 90         |
| M2. Ábrák és táblázatok .....                                                                                                | 115        |
| <b>11. Köszönetnyilvánítás .....</b>                                                                                         | <b>121</b> |

### **Jelölések, rövidítések jegyzéke**

**GTD** – A szőlő korai elhalásának (angolul grapevine trunk diseases) rövidítése

**HWT**– Az oltványok melegvizes kezelése (angolul hot water treatment)

**MTT** – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) - 2,5-difeniltetrazólium bromid -viális festék

**NGS** – Újgenerációs szekvenálás (angolul next generation sequencing)

**DNS** – dezoxiribonukleinsav

**ITS** – a gombák azonosítására általánosan elterjedt lókuszt (angolul internal transcribed spacer)

**PCR** – polimeráz láncreakció (angolul polymerase chain reaction)

**ASV** – ampikon szekvencia variáns (angolul apicon sequence variant)

**ANOVA** – varianciaanalízis

**PerMANOVA** – permutációs varianciaanalízis

**PDA** – burgonya dextróz agar (angolul potato dextrose agar)

## 1. Bevezetés

A mikroorganizmusok a bioszféra, a Földön élő több milliárd egyedi élő szervezet összességének igen nagy részét alkotják. Számos ökoszisztémával összefüggő folyamatban kulcsfontosságú szerepet töltenek be, például a szén (C), nitrogén (N), kén (S), foszfor (F) és különféle fémek biogeo-kémiai körforgásában. A növény mikrobiomjában, a gombák és baktériumok között kialakuló szimbiotikus kölcsönhatások kiváló példái a mikroorganizmusok fontosságára, legyen szó akár a tápanyagszerzésről, akár a növény biotikus és abiotikus stresszel szembeni ellenállásáról (ARNOLD et al., 2003; BERENDSEN et al., 2012; MARTIN et al., 2017). A nagy biológiai sokféleség megnehezíti a környezeti mikrobiom, és azon kulcsfontosságú ökológiai és evolúciós folyamatok jellemzését, amelyek befolyásolják a mikrobiom szerkezetét és funkcióját (BERENDSEN et al., 2012; TOJU et al., 2016).

A szőlő (*Vitis vinifera*) Magyarországon fontos mezőgazdasági növény, 23 borvidéken jelenleg körülbelül 60 ezer hektáron folyik szőlőtermesztés. A KSH (2020) adatai szerint ez az érték két évtizede kb. 30%-kal volt több. A területcsökkenés oka többek között a gazdaságosabban művelhető minőségi árutermelésre történő átállás. Emellett számos kihívással szembesülnek a szőlőtermelők, például a klímaváltozás hatásai, a fogyasztói preferenciák változása, illetve a szőlő különböző betegségei. A betegségek és kártevők jelentik az egyik legnagyobb veszélyt a szőlőültetvényekre.

A szőlőt nagyon sok betegség támadja, ezek közül az egyik legfontosabb gombás betegség a szőlő korai elhalása (Grapevine Trunk Diseases – GTD). A GTD-vel számos tanulmány foglalkozott, mind külföldön, mind hazánkban, ennek ellenére a betegség lefolyásával kapcsolatosan rengeteg kérdés még mindig megválaszolatlan.

Jelenleg nincs hatékony védekezési módszer, a növényvédő szerek és fungicidek hatástalanok, ugyanis a betegséget előidéző gombák a szőlő faszövetében védve vannak. Az utóbbi évtizedben megjelentek a tenyésztéstől független technikák, melyek segítségével megismerhetjük a különböző élőlények, így a növények mikrobiomját is. Az újgenerációs szekvenálás lehetőséget ad arra, hogy a GTD-t részletesebben vizsgáljuk, és feltárjuk, hogy melyek azok a tényezők, melyek befolyásolhatják a betegség megjelenését.

A nagy áteresztőképességű amplitikon szekvenálás (pl. a DNS-metabarcoding) ígéretes technika a komplex mikrobiális közösségek jellemzésére. Ezenkívül számos új, a kórokozókval kapcsolatos orvostudományi kutatási metodika alkalmazható mezőgazdasági ökoszisztémákra is. Ilyen például az úgynevezett 'core' (adott élőhelyen általánosan előforduló) mikrobák vizsgálata (LUNDBERG et al., 2012; VAN DER HEIJDEN és HARTMANN, 2016), illetve a hálózatelmélet (FAUST és RAES, 2012). Ezen módszerek lehetőséget biztosítanak a mikrobiom és a növények egészsége közötti kapcsolatok felderítésére (MAUCHLINE és MALONE, 2017).

## 2. Célkitűzések

A kutatómunkám a szőlő (*Vitis vinifera*) kérgében és faszövetében, valamint a talajban található mikroorganizmusok taxonómiai és funkcionális jellemzését foglalja magába. A központi téma a szőlő patobiomja, különös tekintettel a szőlő korai elhalására (Grapevine trunk diseases – GTD), a talaj és a növény mikrobiomja közötti kölcsönhatásokra, valamint a patogéneket elnyomó mikroorganizmusokra.

A szőlő korai elhalása egy komplex betegség, melyhez kapcsolódóan eddig több száz gombát azonosítottak. Számos GTD kórokozó a talajban is megtalálható, például a feketelábúságot (Black foot disease) előidéző *Ilionectria* és *Neonectria* fajok. A GTD a szőlő egyik különösen aggasztó betegsége, ugyanis világszerte tapasztalható a GTD előfordulásának növekedése, a hatékony védekezési stratégiák hiánya miatt (BERTSCH et al., 2013). Becslések szerint a francia szőlőültetvények körülbelül 10%-a érintett a betegségben (GROSMAN és DOUBLET, 2012). Ezenkívül számos olyan gombafajt azonosítottak, melyek összefüggésbe hozhatóak a beteg növényekkel, azonban funkcionális szerepük nagyrészt ismeretlen.

A különböző termőhelyeken található sokféleségnek nagy szerepe van a végtermék, azaz a bor ízének kialakításában. Ezért ezt is fontos tanulmányozni, hiszen a jövőben akár manipulálni is lehet (GOBBI et al., 2022). Így munkánk egyik része a terroir, a termőhely mikrobiomra gyakorolt hatásának a vizsgálata a Tokaji borvidéken. A terroir hatás mellett vizsgáltuk a mikroélettér (a szőlőn belül a kéreg és a faszövet, valamint a talaj), és az egészségi állapot hatását is ezen a borvidéken.

A genotípus és a mikrobiom közötti összefüggést már sok növény esetén kimutatták. A szőlő esetében tenyésztéstől független eljárásokkal még nem vizsgálták. A doktori munkám során egyrészt vizsgáltuk a fajta hatását a mikrobiom összetételére

vonatkozóan az Egri borvidéken. A változó klíma is befolyásolhatja a mikrobiom összetételét, ezért a szezonális és az évszaki hatását is elemeztük a különböző életerekekben egészséges és GTD tünetes növények esetén.

A DNS- alapú módszerek megjelenését követően gyakran elhanyagolták a mikrobák izolálását, részben azért, mert idő- és munkaigényes folyamat. Azonban egy adott mikroorganizmus tisztatenyészetben kínálja a legjobb lehetőséget a teljeskörű jellemzéséhez filogenetika, taxonómia és funkcionalitás szempontjából (BALDRIAN 2019). A tenyésztési technikák fejlődésével a domináns mikrobák jelentős része izolálható és így jellemezhető (LLADÓ et al., 2016; YURKOV 2018). A tenyésztéstől független DNS metabarcoding technika alkalmazása mellett így célul tűztük ki, hogy a szőlőtőke egészséges és beteg szövetéből hagyományos eljárással gombákat izoláljunk, hogy meghatározzuk a szőlő faszöveti részében élő, tenésztethető domináns fajokat.

A mesterképzés során megkezdett témát is szerettem volna folytatni. A diplomamunkámban a *Clonostachys rosea*, mint lehetséges biokontroll faj jellemzését végeztük el a GTD kórokozók ellen *in vitro* körülmények között. 5 *C. rosea* törzset vizsgáltunk, és megállapítottuk, hogy a *C. rosea* nekrotróf mikoparazitizmust mutat *Botryosphaeria* fajokkal szemben, illetve antibiotikus hatású vegyületeket választ ki, melyek gátolják a GTD kórokozók növekedését. A diplomamunkám folytatásaként az 5 törzs közül a legjobban sporuláló törzsszel *in planta* teszteket szeretnénk végezni üvegházi körülmények között, hisz nagyon fontos, hogy egy biokontroll faj, mely *in vitro* körülmények között megállja a helyét, képes-e ugyanerre kevésbé kontrollált környezetben is.

Összefoglalva a célkitűzéseim a következők:

1. A Tokaji borvidéken a terroir, a mikroélettér, az egészségi állapot növénypatogénekre, azon belül is a GTD patogénekre gyakorolt hatásának vizsgálata
2. Az Egri borvidéken a különböző fajták, a mikroélettér, a szezonális, az évjárat és az egészségi állapot mikrobiomra gyakorolt hatásának vizsgálata
3. Az újgenerációs technikák mellett hagyományos tenyésztési eljárással a faszövetből gombák izolálása, ezek azonosítása, az újgenerációs szekvenálás adataival történő összehasonlítása
4. A diplomamunkám során *in vitro* körülmények között jellemzett biokontroll *Clonostachys rosea* faj *in planta* vizsgálata néhány GTD kórokozó ellen

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. A növényi mikrobiom jelentősége

A növények és a mikroorganizmusok közötti kapcsolat már régóta ismert, a mikorrhiza kölcsönhatást már több évtizede tanulmányozzák (MENGE 1982; MCGONIGLE et al., 1990; AZCÓN-AGUILAR és BAREA, 1997; GIANINAZZI et al., 2010). Az elmúlt néhány évben a növényi mikrobiommal kapcsolatos kutatások száma jelentősen megnövekedett. A növényi mikrobiom vizsgálata magába foglalja a növény - mint gazdaszervezet – biológiájának és működésének összekapcsolását a mikrobiális ökológiával. A növény és a mikrobiomja közötti interakció fontos, hisz ez az interakció igazoltan kiterjeszti a növény alkalmazkodóképességét a különböző környezeti körülményekhez, változásokhoz (BULGARELLI et al., 2013).

A növények komplex mikrobiális közössége változatos taxonómiai összetételű. Az elmúlt években a tenyésztéstől független nagy áteresztőképességű szekvenálás nagymértékben elősegítette a növényen, a növényben és a környezetében található még eddig nem vizsgált mikrobák tanulmányozását. Habár a növényi mikrobiom egyes tagjai rendelkezhetnek önmagukban bizonyos jótékony tulajdonságokkal, azonban egy adott tulajdonságnak a mikrobiális közösségben való megnyilvánulását nem lehet előre megjósolni (TRIVEDI et al., 2020). A mikróba-mikróba, valamint a növény-mikrobiom kölcsönhatások fő mozgatórugói még nem ismertek (AFRIDI et al., 2022).

Tulajdonképpen a növény minden szövetében mikrobiális közösségek élnek. A rizoszférát egy fajgazdag, nagyrészt talaj eredetű mikrobiális közösség jellemzi, mely közösséget a növény nyálkahártyája és gyökérváladéka befolyásol. Ezzel szemben a filoszféra, a növény talajszint felett elhelyezkedő részeinek összessége, amelyet a

mikroorganizmusok élőhelyének tekintenek, tápanyagban viszonylag szegény, és a környezeti hatásoknak, pl. a hőmérsékletnek, csapadéknak, sugárzásnak nagyobb mértékben kitett. A rizoszféra és a filoszféra mikrobiális lakói az epifiták, míg a növény szöveteiben (endoszférában) élő mikrobák az endofiták. Ezen mikrobák jótékony, semleges vagy káros hatással lehetnek a gazdanövényre. A mikrobák és a modellnövények közötti specifikus interakciók már ismertek, de a növények mikrobiomjának többsége, illetve a gazda fenotípusához való hozzájárulásuk még nem. A mikrobiom erőteljesen befolyásolja a növény genomját, a növény egyfajta kiterjesztésének tekinthető, együttesen az úgynevezett pán-genomot alkotják (TURNER et al., 2013).

A növényi részek mikroba összetételét számos biotikus és abiotikus tényező befolyásolja. A talajban lévő növényi részek számára ezen tényezők lehetnek a talaj pH-ja, sótartalma, magának a talajnak a típusa, szerkezete, talajnedvesség, szervesanyag tartalom. Míg bizonyos külső tényezők, például az éghajlat, a különböző mezőgazdasági gyakorlatok, az emberi beavatkozás a talajban élő és a növényi mikrobiomot képesek befolyásolni. Az azonos talajkörnyezetben élő növények jelentősen eltérő mikrobaközösségeket foglalnak magukban mind a filoszférában, mind a rizoszférában. Egyéb tényezők, mint például a növény életkora és fejlődési szakasza, egészségi állapota és kondíciója szintén befolyásolják a mikrobiom összetételét (COMPANT et al., 2019).

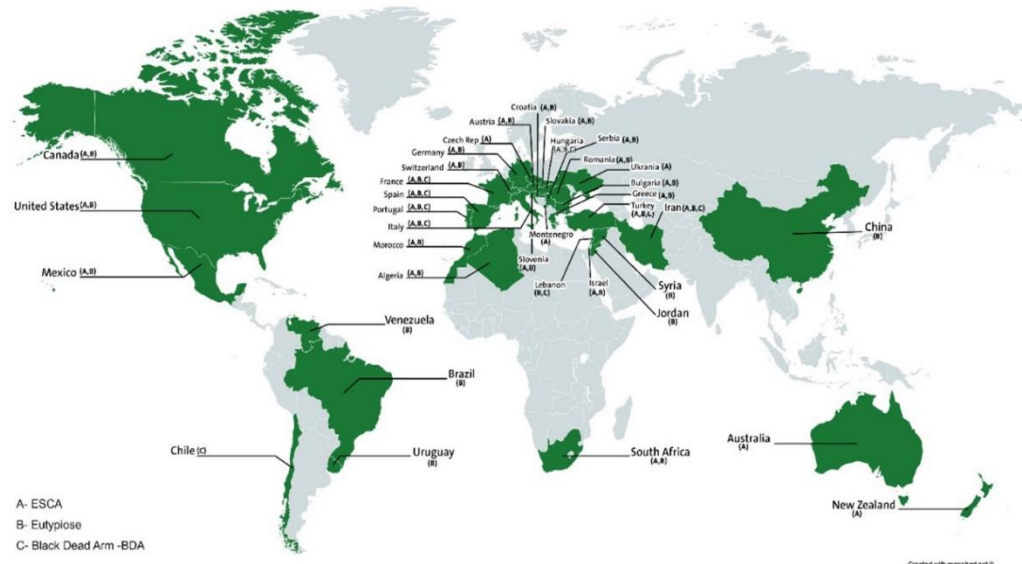
### **3.2. A szőlő korai tőkeelhalása**

A szőlő gazdasági szempontból jelentős növény, a világon körülbelül 7,3 millió hektáron termesztik (International Organisation of Vine and Wine, 2023), ebből körülbelül 60 ezer hektáron Magyarországon (KSH, 2022). A szőlő a fás szárú

mezőgazdasági növényeket tekintve a legkülönbözőbb kórokozók gazdaszervezete, számos mikroorganizmus kolonizálhatja és fertőzheti meg, például oomicéták, baktériumok, vírusok és gombák (MARTELLI 1997; BERTSCH et al., 2013). Ezek közül a gombák kiemelkedő jelentőséggel bírnak, ugyanis a szőlő WILCOX és mtsai (2015) szerint 29 gombás betegségre fogékony. Ezen kórokozók drasztikus hatást gyakorolhatnak a gazdanövényre, a termésre, így a bor minőségére és érzékszervi tulajdonságaira, gazdasági veszteséget okozva a szőlő- és bortermelőknek (COMPANT et al., 2013).

A szőlő korai tőkeelhalását (Grapevine Trunk Diseases- GTD) taxonómiaiilag igencsak sokféle, a szőlő fás részét kolonizálni képes gomba idézi elő, melyek hasonló tünettani, epidemiológiai és gazdasági hatással rendelkeznek. Ezen gombák a világ összes szőlőtermelő területén jelen vannak (1. ábra) (MONDELLO et al., 2018). A szőlő korai elhalása jelentős aggodalomra ad okot a bortermelő régiókban, azonban a pontos adatok hiánya szinte lehetetlenné teszi a betegség által okozott gazdasági hatás kiszámítását. A minimális összeget, mely ahhoz szükséges, hogy az elhalt növényeket cseréljék, azonban meg lehet becsülni. A szőlőültetvények összterületéből és az egy hektár ültetési költségéből (15000 euró - BRUGALI 2009), amennyiben az évente

elhalt növények csupán 1%-át cserélik ki, a pótlás költsége meghaladja az 1 milliárd eurót a világon (HOFSTETTER et al., 2012).



1. ábra. A GTD globális eloszlása. A térképen a GTD három tünetegyüttesének eloszlása látható az érintett országokban (A - Esca, B - Eutipás elhalás, C – Botrioszfériás elhalás. Forrás: KENFAOUI et al., 2022

A GTD kifejezést megannyi tudós, köztük Dr. Luigi Chiarappa alkotta meg az 1990-es évek végén. Olyan levél- és faszöveti tüneteket kialakító gombák egy csoportját foglalták ebbe a gyűjtőnévbe, melyek elsősorban a metszési sebeken keresztül fertőzik meg a növényt, majd a vaszkuláris szöveteket kolonizálják (GRAMAJE et al., 2018). A gombák, melyek a GTD-t előidézik, azonban már régóta ismertek. Feltételezések szerint az Esca, a GTD egyik betegségcsoportja egyidős lehet a szőlőtermesztéssel (MUGNAI et al., 1999). A GTD-t jelenleg a szőlő legsúlyosabb betegségeként tartják számon. Sokkal komplexebb, mint egyéb, a szőlőt érintő gombás betegség, például a lisztharmat (kórokozó: *Erysiphe necator*), vagy a peronoszpóra (kórokozó: *Plasmopara viticola*), így a kezelése jelentős dilemmát okoz az oltvány-, és szőlőtermesztőknek. A GTD-vel kapcsolatosan az egyik legellentmondásosabb jelenség a meghatározhatatlan idejű látens időszak (tünetmentes fázis) (BERTSCH et al., 2013). A GTD számos betegségcsoportra osztható, melyek mindegyike a szőlő

faszövetében szaporodó gombákkal hozható összefüggésbe (GUERIN-DUBRANA et al., 2019).

2018-ig 34 nemzetségből összesen 133 gombafajt azonosítottak a GTD-vel kapcsolatosan világszerte, habár a Koch-posztulátumok követelményeit még nem mindegyik faj esetén sikerült teljesíteni (GRAMAJE et al., 2018). 2018 óta számos fajt írtak le a világ különböző részein, mint a GTD-vel összefüggésbe hozható kórokozó, például Iránban a *Biscogniauxia rosacearum*, vagy éppen Magyarországon a *Neofabraea kienholzii* és *Kalmusia longispora* fajokat (BAHMANI et al., 2021; KARÁCSONY et al., 2021; LENGYEL et al., 2020). Az ismert GTD patogének életciklusa és epidemiológiája igencsak hasonló (BERTSCH et al., 2013). A betegség sokáig látens, a tünetek több év alatt fejlődnek ki, megnehezítve a diagnosztizálást. A spórák fő fertőzési pontja a metszési seb, de mechanikai és fagyási sérüléseken keresztül is bejuthatnak. A gombák növekedésük során a faszövetben korhadást okoznak, és a szőlőtőke lassan elpusztul. Az elkorhadt részekben a termőtestek és spóráik víz jelenlétében a szél által szétszóródnak, így kezdve újra a fertőzési ciklust (ROLSHAUSEN és KIYOMOTO 2012).

A GTD-t különböző betegségcsoportokra oszthatjuk fel a rájuk jellemző tünetegyüttesek alapján. 5 fő csoportot különböztetünk meg: botrioszfériás elhalás, eutipás elhalás, feketelábúság, fomopsziszos elhalás és az Esca. Az Esca Európában jelentős problémát okoz, a botrioszfériás elhalás globális elterjedésű, azonban sok termelő számára még ismeretlen betegség (SMART, 2015). A következőekben ezen betegségcsoportokat jellemzem röviden.

### 3.2.1 Botrioszfériás elhalás

A botrioszfériás elhalásért felelős, a *Botryosphaeriaceae* családba tartozó fajok számos fás szárú növényt (*Prunus*, *Quercus*, *Eucalyptus*, *Pistacio* stb.) fertőzhetnek meg. A *Botryosphaeria dothidea* fajt a világ különböző pontjain több száz növényfajról írták le kórokozóként (SHOEMAKER et al., 1964, MARSBERG et al., 2016). A *Botryosphaeriaceae* család 1918-as bevezetése óta kiterjedt taxonómiai változásokon ment keresztül, a családba tartozó fajokat elsősorban szaprofitaként tartják számon (PHILLIPS et al., 2013). Csak az utóbbi két évtizedben végeztek részletes, molekuláris technikákkal alátámasztott kutatásokat a *Botryosphaeriaceae* családdal kapcsolatosan, melyek bebizonyították, hogy a család tagjai megtalálhatóak tünetmentes növényekben is. Ez további vizsgálatokat eredményezett azon hipotézis alátámasztására, mely szerint egyes *Botryosphaeriaceae* fajok látens patogénként viselkedhetnek. A család sok tagja nem gazda specifikus, a gazdaszervezet affinitásában valószínűleg a környezet játszik nagyon fontos szerepet. Számos kutatás szerint a tünetek a különböző gazdaszervezetekben egybeesnek az aszályos időszakokkal, vagy egyéb szélsőséges eseménnyel (HRYCAN et al., 2020). A korai tűkeelhalással azonban sokáig nem hozták összefüggésbe, a szőlőben élő szaprofitának vagy másodlagos kolonizáló fajnak tekintették. 2006-ig a *Botryosphaeria* nemzetségből 13 fajt azonosítottak kórokozóként szőlő esetén (ÚRBEZ-TORRES et al., 2006). A borvidékekről leggyakrabban izolált faj a *Diplodia seriata* (CASTILLO-PANDO et al., 2001), *Diplodia mutila* (TAYLOR et al., 2005), *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum luteum* (CROUS et al., 2006), *Neofusicoccum australe* (SLIPPERS et al., 2004), *Botryosphaeria dothidea* (SLIPPERS et al., 2007) and *Lasiodiplodia theobromae* (ÚRBEZ-TORRES, 2010a).



2. ábra. Ék alakú nekrosis a szőlő szállítószövetében, melyet a botrioszfériás elhalás, az eutipás elhalás és/vagy az Esca idézhet elő. Forrás: HRYCAN et al., 2020.

A családba tartozó gombák a vesszők és hajtások elhalását, kései rügyfakadást, rügy elhalását, a vesszők kifehéredését okozzák, a faszövetben pedig ék alakú elhalást (2. ábra). A betegség lefolyása lassú, és gyakran összekeverhető más betegségcsoport kórokozói, pl az *Eutypa lata* vagy a *Phomopsis viticola* által előidézett tünetekkel (TAYLOR et al., 2005). A *Botryosphaeriaceae* családba tartozó fajok életciklusáról kevés információ áll rendelkezésre. A gomba szaporítóképletei, a piktídiumok a fertőzött faszövetben, vagy a hajtásokon fejlődnek ki. Különösen esős időjárás esetén az inokulumok a levegőbe kerülnek (VAN NIEKERK et al, 2010, ÚRBEZ-TORRES et al., 2010b). LEHOCZKY és mtsai már 1974-ben leírták a *Botryosphaeria stevensii* által okozott, magyarul fekete kordonkar elhalásnak (black dead arm) nevezett betegséget a Tokaji borvidéken. A betegség során klorotikus pontok jelentek meg a leveleken, melyek később hervadásnak indultak.

### 3.2.2 Eutipás elhalás

Az eutipás elhalás elsődleges kórokozója az *Eutypa lata*. Az *E. lata*-t eddig számos évelő mezőgazdasági növényről, köztük a szőlőről is leírták kórokozóként. Az *E. lata* különböző sejtfalbontó enzimeket termelve a vaszkuláris szövetben okoz elhalást, valamint fitotoxikus másodlagos anyagcseretermékei a nedvkeringéssel a növény zöld részeibe is eljut, ahol a levelek satnyaságát és deformációját okozza (3. ábra) (ROLSHAUSEN et al., 2014, 2015).



3. ábra – Az *E. lata* által okozott levélsatnyulás és deformitás cabernet sauvignon fajtán az Eszterházy Károly Katolikus Egyetem kísérleti szőlőbirtokán az Egri borvidéken. Forrás: saját felvétel

Az *E. lata* epidemiológiája a szőlőben részletesen tanulmányozott, a kórokozó életciklusa jól ismert. Az *E. lata* aszkospórái a korábban fertőzött részekből (kordon, csap, tőke) az ún. peritéciumokból szabadulnak ki, kedvező környezeti feltételek mellett az aszkospórák esőcseppekkel és/vagy széllel elterjednek. Az aszkospórák a szőlő metszési sebein landolnak, ahol újra fertőzik a szőlőt (ROLSHAUSEN et al., 2015; GRAMAJE et al., 2018). Az *E. lata* jelenléte olyan helyekre korlátozódik, ahol az éves csapadék legalább 350 mm, illetve az aszkospórák kibocsátása fagypont feletti hőmérsékleten történhet. Ennek következtében a fertőzés mértéke az év során és

földrajzi régióként is változhat, de elsősorban a nyugalmi időszak alatti metszéssel eshet egybe (HRYCAN et al., 2020).

Az *E. lata* a leggyakrabban izolált, ebből fakadóan a legrészletesebben vizsgált faj a *Diatrypaceae* családból. Emellett még számos faj található a családban, melyekről kevés az információ, pl. az *Eutypella*, *Diatrype*, *Cryptovalsa*, *Cryptosphaeria* és *Diatrypella* nemzetségbe tartozó fajok (LUQUE et al. 2012). 23 további fajt izoláltak szőlő esetén a *Diatrypaceae* családból, azonban csak az *E. lata*-ról bizonyosodott be, hogy a szőlő kórokozója, képes levéltüneteket előidézni (HRYCAN et al., 2020). A tünetek évről évre változhatnak, az egyik évben tünetes növény a következő évben teljesen tünetmentessé válik (SOSNOWSKI et al., 2017). A fajta hatással lehet az *E. lata* által okozott tünetek kifejeződésére, CARDOT és mtsai (2019) bizonyították, hogy egyes fajták kevésbé fogékonyak, míg más fajták fogékonyabbak. A Merlot fajtát találták az eutipás elhalásra legkevésbé fogékonyabb fajtának. Míg PÉROS és BERGER (1994) az *E. lata*-val történő fertőzést követő 5-10 hétben megfigyelt levéltünetek alapján a cabernet sauvignon-t találták a legfogékonyabbnak, a sauvignont a legkevésbé fogékonyabbnak.

### 3.3.3 Feketelábúság

A feketelábúság egy viszonylag újonnan leírt betegség, előidézői *Cylindrocarpon* (teleomorf *Neonectria*) *Campylocarpon*, *Ilionectria*, *Dactylonectria* fajok, melyek főleg a fiatal szőlőket fertőzik. Tavasszal a kései rügyfakadás majd rendellenes növekedés, a nyár eleji hervadás jellemzi a betegséget, valamint előfordulhat a rügyfakadás teljes hiánya. A tünetek nemcsak a zöld részeken, hanem a gyökérzeten is megjelennek elhalás formájában (4. ábra). A gyökértömeg elvesztésének kompenzálására néha a szőlő egy második, horizontálisan növekvő gyökérzetet is

növeszt közel a talajfelszínhez (HALLEEN et al 2004, 2007; AGUSTÍ-BIRSCHACH és ARMENGOL 2013). Ezen nemzetségek fajai gyakori talajlakók, szaprofitaként, gyökérkolonizálóként vagy patogénként tartják őket számon, és klamidospóra (micélium eredetű ivartalan szaporítósejt) formában sokáig képesek a talajban túlélni (VAN JAARSVELD et al., 2020).



4. ábra. Egészséges szőlő oltvány gyökérzete (bal oldal), feketelábúsággal fertőzött oltvány csökkent volumenű gyökérzete (jobb oldal) (Forrás: ABEYWICKRAMA et al., 2021)

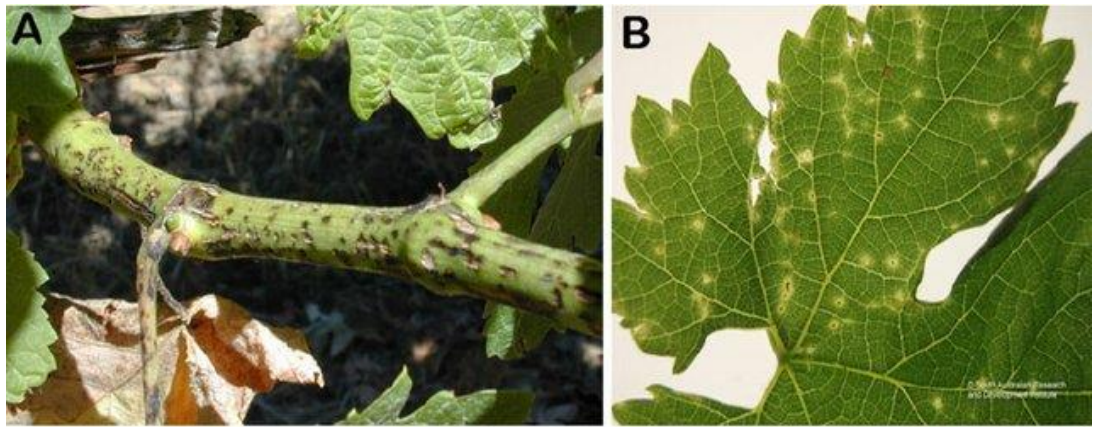
A kórokozók már az oltványelőállítás során megfertőződhetnek az ültetőközeg által. A feketelábúság nagy problémát okoz az oltványelőállítás során. Emiatt a megelőző és a felszámoló intézkedéseknek fontos szerepe van az oltványiskolákban. Idősebb szőlő esetén a fertőzés lassabb. A betegség tünetei a vegetációs időszak elején már észrevehetőek. Az érintett tőkék gyenge növekedést mutatnak, nem képesek új hajtást fejleszteni a nyugalmi fázis után, ennek következtében nyár közepére elhalnak. Amelyek túlélnek a vegetációs időszakot, azok az azt követő nyugalmi időszakban halnak el. A feketelábúság kórokozóit izolálták már aszimptomatikus és szimptomatikus anyaoltványról, oltványról, frissen oltott szőlőről, mind az oltványiskolákból, mind fiatal ültetvényekből. A nyugalmi állapotú oltványok

melegvizes kezelésétől (hot water treatment - HWT) eltekintve jelenleg nincs semmilyen módszer, amely megakadályozná a feketelábúság kórokozóit az oltványok megfertőzésében. A melegvizes kezelés (50°C, 30 perc) hatékonynak mondható a feketelábúság kórokozóira ellen, azonban rövidtávú hatásai lehetnek, illetve az oltvány elhalását eredményezheti, amennyiben nem megfelelően, nem megfelelő minőségű oltványokon alkalmazzák (HALLEEN et al, 2006; REGO et al., 2009; AUGUSTÍ-BIRSCACH és ARMENGOL 2013).

### 3.3.4 Fomopszis elhalás

A *Phomopsis* nemzetségbe több, mint 800 faj tartozik, melyek általában patogének, endofiták vagy szaprotrófok (VAN NIEKERK et al., 2005). A nemzetség jelenlegi fajainak többségét hemibiotrófoknak tekintik. Ez azt jelenti, hogy a biotróf és a nekrotróf életmód sajátosságai keverednek, életciklusuk első felében inkább biotróf kórokozók (fertőzésük esetén a növényi sejtek tovább élnek, alig károsodnak), majd később nekrotrófká válnak. Amikor a gazdaszervezetet nekrotróf kórokozó fertőzi meg, a növényre negatív hatással van, a kórokozó a gazdaszervezet elhalása után szaprotrófként viselkedik, az elhalt szövetekből származó tápanyagot fogyasztja. A *Phomopsis* fajok a fertőzés látens fázisában nekrotrófok, ezért nevezik őket hemibiotrófoknak (UDAYANGA et al., 2011). A nemzetség számos fajt rutinszerűen izolálják különböző növények száráról, gyökeréről, leveléről. A *Phomopsis* fajok (teleomorf *Diaporthe*) besorolása korábban morfológiai alapon történt. De a nagy morfológiai változatosság miatt a későbbiekben az osztályozásuk főként a gazdaszervezet hovatartozásán alapult. Azonban tanulmányok szerint a *Phomopsis* fajok számos gazdaszervezetet képesek megfertőzni, így a gazdához történő társítás már nem volt elegendő. Az anamorf/teleomorf formák használata szintén nem

lehetséges, ugyanis a *Phomopsis* fajok teleomorf alakja közül csak körülbelül 20% ismert (VAN NIEKERK et al., 2005).



5. ábra. *Phomopsis* fajok által okozott tünet szőlő hajtásán (A) és a levelén (B). Forrás: UDAYANGA et al. 2011

Ez a betegségcsoport azokon a területeken sokkal nagyobb mértékben fordul elő, amelyet nedves mérsékelt éghajlat jellemez a szőlő vegetációs időszaka alatt. A betegség okozta termésveszteség az érintett területeken elérheti akár a 30%-ot. A fő kórokozó a *Phomopsis viticola*, mely a szőlő zöld részeit fertőzheti, tünetei megjelenhetnek a hajtáson (5/A. ábra), a levélen (5/B. ábra), a száron és a bogyókon is. A fiatal hajtásokon a betegség az első internóduszokban kis fekete foltok formájában jelenik meg, melyek később jól elkülönülő fekete vagy barna léziókká alakulnak. A vesszők a tünetek miatt a szélről vagy akár a termés súlya alatt le is törhetnek. A levél fő és másodlagos erein, valamint a levélnyélen is fekete nekrotikus foltok is előfordulhatnak (LARIGNON 2012; ÚRBEZ-TORRES et al., 2013). A *P. viticola*-n kívül még a *P. theicola*-t is azonosították, mint a betegség másik kórokozóját. Fertőzése következtében a mortalitás fiatal növények esetén igen nagy százaléku. A faszövetben szektoriális, illetve pontszerű, barna színű elhalást idéz elő (FONTAINE et al., 2016).

### 3.2.5 Esca komplex

Az Esca egy összetett betegség, amelyet legalább három gombafaj jelenléte okoz: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* és a *Fomitiporia mediterranea*. A kórokozók a faszövetben lokalizálódnak, kisebb arányban az éves hajtásokban, de sosem találhatók meg a levelekben, ahol a tünetek jelentkeznek. A *Phaeomoniella*, *Phaeoacremonium* fajok és a *F. mediterranea* egyenként történő vagy együttes inokulációja nem befolyásolja a faszövetben előforduló tünetek mértékét (SPARAPANO et al., 2000). Nagy valószínűséggel az internális és az externális tünetek egy részét a gombák által termelt fitotoxikus metabolitok vagy a növény által termelt válaszcukrok oxidációja okozza (BRUNO és SPARAPANO, 2007). Az Esca komplexitása feltehetőleg több tényező egyidejű hatásának következményéből fakad (ANDOLFI et al., 2011; BÉNARD-GELLON et al., 2015).



6. ábra – A krónikus Esca tipikus levéltünete, a tigriscsíkoság - a levél erek közötti klorózis és elhalás cabernet sauvignon fajtán az Eszterházy Károly Katolikus Egyetem kísérleti szőlőbirtokán az Egri borvidéken. Forrás: saját felvétel

Epidemiológiai szempontból is különleges az Esca, ugyanis kétféle tünetformája különböztethető meg – krónikus és akut. A betegség krónikus lefolyása során a levél

erek közötti területek klorotikussá, majd később nekrotikussá válnak, a levél széle felé terjednek (6. ábra). A betegség sokkal súlyosabb, akut lefolyása, az úgynevezett apoplexia során a levelek hirtelen elhervadnak (7. ábra), amely a növény elhalását okozza pár nap alatt (LETOUSEY et al., 2009).

Az apoplexia okának vizsgálata nehézkes, így kevésbé dokumentált. A tüneteket mutató leveleken az Esca nagy mértékben befolyásolja a növény fiziológiáját. Emellett a víz szállítása is gátlódhat a beteg növényeknél a xilém diszfunkciója miatt. Apoplexia valószínűleg abban az esetben alakulhat ki, ha a talajban vízfelesleg jelentkezik, és az idő meleg, ugyanis ez megbontja az egyensúlyt a transpiráció és a vízfelszívás között (WAGSCHAL et al., 2008).



7. ábra – Apoplexia cabernet sauvignon fajtán az Eszterházy Károly Katolikus Egyetem kísérleti szőlőbirtokán az Egri borvidéken. Forrás: saját felvétel

Az Esca további jellemző tünete a szőlő faszövetében megjelenő elhalás, fiatalabb tőkénél a bogyók összetöppedése, sorvadása, idősebb tőkénél fekete, sárga bogyók kialakulása (FISCHER és PEIGHAMI ASHNAEI, 2019). *In vitro* és üvegházi körülmények között megfigyelték a gyökértömeg csökkenését is. A tőkén előfordulhatnak aszimptomatikus és szimptomatikus vesszők, illetve az is

előfordulhat, hogy a szimptomatikus és aszimptomatikus levelek egy vesszőn találhatóak (WAGSCHAL et al., 2008). Az Escát, mely főként idősebb szőlőket érint, elsőként Franciaországban írták le 1898-ban (RAVAZ, 1898). A betegség az ókor óta ismert, azonban az Escát elhanyagolható betegségként tartották számon, amit fungicidekkel ellenőrzés alatt lehet tartani (GRANITI et al., 2000). Az Escával összefüggésbe hozható gombákat eltérő abundanciával izolálták oltványokról, alanyról, fiatal egészséges, és idősebb egészséges növényekről is, így arra következtettek, hogy a kórokozók látens patogének. Az éghajlati és edafikus tényezők, valamint a gazda genotípusa, azaz a szőlő fajta is befolyásolhatja a betegség előfordulását, ami arra utal, hogy a gombák jelenléte előfeltétele a tünetek kifejeződésének, de önmagukban nem mindig felelősek a megjelenésükért (HOFSTETTER et al., 2012). Az elmúlt években lenyűgöző számú fitopatológiai vizsgálat ellenére a GTD epidemiológiája és etiológiája továbbra is kevésbé ismert (BERTSCH et al., 2009).

Az Escával összefüggésbe hozható gombák filogenetikailag változatosak, aszkomikóta, és bazidiomikóta fajok is előidézik a betegséget. A legelterjedtebb aszkomikóta Esca kórokozók a *P. chlamydospora* és a *P. minimum*. A bazidiomikóták közül pedig a *Fomitiporia* és egyéb farontó nemzetségek fajai, elsősorban a *Hymenochaetaceae* család képviselői (BROWN et al., 2019).

### **3.3 Védekezési lehetőségek a szőlő korai elhalása (GTD) ellen**

A betegség ellen nehéz a védekezés, mert a kórokozók a szőlő faszövetében védve vannak a környezeti hatásoktól (BERTSCH et al., 2013). A nátrium-arzenit volt az egyik legnagyobb mennyiségben használt vegyszer Európában a GTD elleni küzdelemben egészen addig, amíg 2003-ban használatát az EU betiltotta az emberi

szervezetre gyakorolt karcinogén hatása, illetve a környezetre gyakorolt magas toxicitása miatt (BISSON et al., 2006; GRAMAJE és ARMENGOL 2011; SONGY et al., 2019). Hatásos fungicid hiányában számos kutatást folytattak különböző kemikáliák, biokontroll fajok, természetes molekulák tesztelésére. Azonban az törekvések ellenére úgy tűnik, hogy egyetlen módszer alkalmazásának hatékonysága korlátozott, ezek kombinált alkalmazása segíthet a betegség előfordulásának csökkentésében (BERTSCH et al., 2013).

### **3.3.1 Védekezés a GTD kórokozók ellen az oltványiskolában**

A GTD kórokozók az oltványelőállítás során számos ponton képesek fertőzni a növényt, például a metszési sebeken, a nem megfelelően begyógyult oltási pontokon, - ez később, már a telepítés során is bekövetkezhet. Ezért a sebvédelem és a kontamináció megelőzése elengedhetetlenül fontos (GRAMAJE és ARMENGOL, 2011). A szaporítóanyag minőségének javítása érdekében gyakran alkalmaznak forró vizes kezelést (hot water treatment – HWT). A forró vizes kezelést általában 50°C-on fél óráig végzik, azonban, ha nem megfelelően alkalmazzák, akkor a kezelés stresszforrás lehet a növények számára. A *Vitis* fajok különböző mértékben érzékenyek a HWT-re, az érzékenységre hatással lehet az a hőmérséklet, melyen korábban a szaporítóanyagot nevelték. Az alkalmazott hőmérséklet tartomány attól függ, hogy mely patogének ellen szeretnénk védekezni. 45-47°C-os hőmérséklet már elegendő a *P. chlamydospora* ellen, míg más patogének esetén magasabb, 50-51°C-os hőmérsékletet kell alkalmazni (BERTSCH et al., 2013; WAITE et al., 2013).

### **3.3.2 Védekezés a GTD kórokozók ellen a szőlőültetvényeken**

A szőlőültetvényen alkalmazott jó gyakorlatok elengedhetetlenek a fertőzés terjedésének korlátozásához. A legegyszerűbb módszer a fertőzött, elhalt tőkék, a

metszés során keletkező venyige elégetése, eltávolítása az ültetvényről. Emellett fontos lenne a metszési sebek számának csökkentése, a metszési sebek kezelése (FONTAINE et al., 2016). A duplametszés vagy előmetszés egy, a termesztők által alkalmazott technika, mellyel a tünetek előfordulását lehet csökkenteni. Ezeket a gyakorlatokat gyakran egészítik ki a metszési sebek gombaölő szerekkel vagy biológiai készítményekkel történő kezelésével, melyek megvédik a sebeket a fagytól, a különböző vektoroktól (BERTSCH et al., 2013). Másik lehetőség a talajfertőtlenítés, amennyiben a talaj eredetű GTD kórokozók okozzák a problémát (TRAVADON et al., 2015). A nyugalmi időszak végén, a rügyfakadáshoz közeli időpontban történő metszés is bevett gyakorlat, a sebek ugyanis gyorsabban gyógyulnak a magasabb hőmérséklet következtében. A sebek érzékenysége nagymértékben függ a relatív páratartalomtól és az esős időszakoktól (LUQUE et al., 2014).

### **3.3.3. Vegyszeres növényvédelem a GTD kórokozók ellen**

A nátrium-arzenit betiltása után a kutatók több, mint 90 hatóanyagot teszteltek le az Esca, a botrioszfériás elhalás és az eutipás elhalás ellen. A vizsgált hatóanyagok jelentős része szintetikus szerves anyag, például triazolok, benzimidazolok, melyeket önállóan, vagy kombinálva használtak fel (MONDELLO et al., 2018). A GTD kórokozók endofita természetük miatt védve vannak a permetezőszerekkel szemben, a fungicidek aeroszolként kijuttatva hatástalanok. A fungicideket közvetlenül a tőkébe (DULA et al., 2007), vagy a talajba injektálva jobb eredményt lehet elérni (DI MARCO et al., 2000). Az említett gyakorlatok azonban idő-, költségigényesek, nem beszélve a vegyszerek nagy mértékű alkalmazásával kapcsolatos egészségügyi aggályokról, illetve a környezetre gyakorolt hatásaikról. Mindebből kifolyólag számos természetes hatóanyagot is vizsgáltak a GTD kórokozók ellen, az egyszerű vegyületektől kezdve, (pl. hidrogén-peroxid -  $H_2O_2$ ), az összetettebb keverékekig (pl.

propolisz). A különböző vegyületek változó eredményt hoztak (MONDELLO et al., 2018).

#### **3.3.4 Biokontroll ágensek alkalmazása a GTD kórokozók ellen**

A szőlő a metszési sebeken keresztül 2-4 hónapig fogékony lehet a betegségekre. Ilyen hosszú időszak alatt a leghatékonyabb fungicidek sem képesek megvédeni a metszési sebeket. Ezért számos kutató kezdett el tesztelni különböző biokontroll szervezeteket a GTD ellen (KOTZE et al., 2011). A biokontroll kifejezés a biológia több részterületén, főként az entomológiai (rovartani) és a növénykórtani körökben használatos. Az entomológiában az olyan entomopatogén fonálférgekre, ragadozó rovarokra vagy mikrobiális kórokozókra alkalmazzák ezt a kifejezést, melyeket különböző kártevő rovarpopulációk elnyomására használnak. A növénykórtan területén a kifejezés általában a mikrobiális antagonistákra vonatkozik (PAL és GARDENER 2006). A biokontroll szervezetek lehetnek baktériumok, gombák, vírusok, élesztők akár egysejtűek is, és képesek a betegségeket közvetlenül vagy közvetett formában szabályozni (KÖHL et al., 2019). A közvetlen szabályozás a biokontroll szervezet antagonisztikus hatását jelenti, mely élősködés, antibiózis vagy a tápanyagokért, illetve a fertőzési pontokért való versengés formájában nyilvánul meg. A közvetett formában a biokontroll szervezet a növényi választ indukálja, mely lehetővé teszi a növény számára, hogy gyorsabban és hatékonyabban reagáljon a későbbi fertőzésekre (VOS et al., 2015). Tágabb értelmezés szerint a biokontroll fogalom magába foglalja a biológiai eredetű, nem élő hatóanyagok alkalmazását is (TIMMUSK et al., 2017).

Új, a kereskedelemben nem kapható biokontroll ágensek felkutatására az egyik mód az effektív antagonisták ökológiai szempontból történő szelekciója. Eszerint a

kiválasztott szervezet képes kell legyen arra, hogy ugyanolyan környezeti körülmények mellett szaporodjon, ahol a szabályozni kívánt patogén. A legegyszerűbb módja, hogy ez a feltétel teljesüljön, ha a potenciális biokontroll szervezetet a gazdaszervezetből, vagy annak közvetlen közeléből izolálják. Amennyiben ökológiai szempontból szelektálnak egy biokontroll szervezetet, van rá esély, hogy az elnyomni kívánt patogénen kívül egyéb kórokozóval szemben is hatásos lesz. Ez főként akkor teljesül, ha a különböző patogének hasonlóak mind ökológiai, mind epidemiológiai szempontból (JENSEN et al., 2004).

Amennyiben a biokontroll szervezet hosszútávú fennmaradását biztosítani lehetne a kezelt növény faszövetében, a metszési sebek védelme hatékony módszer lehetne a GTD kórokozókkal szemben. Amellett, hogy közvetlenül gátolja a patogéneket, számos mikroorganizmus pozitív hatást gyakorolhat a gazdanövény fiziológiájára. Például növelheti a növény ellenállóképességét a biotikus és abiotikus stresszhatásokkal szemben, illetve rendszerszintű indukált rezisztenciát válthat ki (MONDELLO et al., 2018).

A szakirodalomban jegyzett legtöbb tanulmányban biokontroll ágensként a *Trichoderma atroviride* és a *Trichoderma harzianum* fajokat alkalmazták szőlő esestén, a patogénekre gyakorolt hatás mechanizmusát főként az oltványiskolákban vizsgálták (GRAMAJE et al., 2018). Mivel a biokontroll ágensek élő szervezetek, hatékonyságuk jelentősen változhat a különböző fizikai és kémiai környezeti feltételek függvényében. Ennek köszönhetően a *Trichoderma* törzsek hatékonyságát szabadföldi körülmények között nehéz előre megjósolni. A különböző törzsek genetikai változatosságának és a biokontroll hatásmechanizmusának megértése kiemelkedő fontosságú annak érdekében, hogy a lehető legjobb alkalmazásfokot érjük el vele (BENÍTEZ et al., 2004).

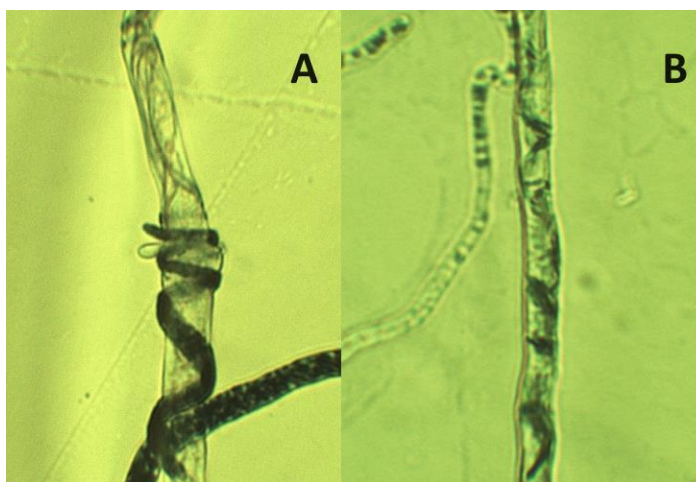
A gyakorlatban a *Trichoderma* fajokkal történő védekezés megvalósítható, azonban az eddig elvégzett kísérleteket egy éves, vagy annál fiatalabb növények üvegházban történő inkubálásával végezték. Ebből kifolyólag a *Trichoderma* fajok ültetvényeken történő alkalmazása még nem tekinthető optimálisnak. A jövőbeni kutatásoknak elsősorban a biokontroll fajokkal történő kezelés hatékonyságára kellene összpontosítania, valamint meglévő és új biokontroll fajok keresésére, melyek képesek a GTD kórokozók által termelt toxikus másodlagos anyagcseretermékek lebontására (GRAMAJE et al., 2018).

Egy másik lehetséges biokontroll ágens a *Clonostachys rosea*. A *C. rosea* a *Hypocreales* renden belül a *Bionectriaceae* családba tartozik, ahogy a fentebb említett *Trichoderma* nemzetség is. A *Hypocreales* rendbe tartozó fajok filogenetikai kapcsolatának megértése kulcsfontosságú a mikotrofikus gombák szempontjából. A különböző családokba tartozó gombafajok összehasonlító genomikája lehetővé teszi a kulcsfontosságú hasonlóságok és különbségek azonosítását az életmódjukban, ami közvetlenül hatással van a biokontroll szervezet alkalmazhatóságára a mezőgazdaságban (KARLSSON et al., 2015).

A *C. rosea* egy elterjedt gombafaj, megtalálható mind trópusi, mind mérsékelt éghajlaton, sőt még sivatagi területeken is. Jelen van a mezőgazdasági területeken, legelőkön, erdőkben, vizek mentén, és a talajban is. Az utóbbi négy évtizedben különösen nagy figyelmet szenteltek ennek a gombafajnak, mivel képes más gombákon élősködni. A *C. rosea* látszólag tünetmentesen kolonizálja az egészséges növényi részeket, például a szójabab termését, vagy az eper és málna leveleit. A *C. rosea* antagonisztikus hatást mutat számos gomba ellen, ez a tápanyagért való küzdelemben, mikoparazitizmusban és indukált rezisztenciában nyilvánul meg. Emellett számos biokontroll fajhoz hasonlóan antibiotikus hatású másodlagos

anyagcsere-termékeket is termelhet (SUTTON et al., 1997; RODRÍGUEZ et al., 2011). A *C. rosea* kereskedelmi forgalomban már kapható, tanulmányok szerint jelentősen csökkentette a *Fusarium oxysporum* által okozott gyökér- és szárrothadást üvegházban nevelt uborkák esetén, hatékony volt a *Pythium ultimum* által okozott gyökérrothadás csökkentésében dísznövények esetén, valamint képes volt redukálni a *Botrytis cinerea* sporulációját a betakarított hagymán, illetve a liliom levelein is. Ezek az eredmények azt igazolják, hogy a *C. rosea* széles spektrumú hatékonysággal rendelkezik számos gombafaj ellen (CHATTERTON et al., 2008).

A *C. rosea*, mint biokontroll faj hatékonysága három fő mechanizmuson alapul. A gomba jellemzése során megállapították, hogy a gombát nekrotróf mikoparazitizmus jellemzi, ami azt jelenti, hogy a gazdaszervezetet, melyen élősködik el is pusztítja. Képes a gazdaszervezet köré fonódni, és sejtfalbontó enzimek segítségével a sejtfalon áthatolni, így a sejten belül növekedni (CHATTERTON és PUNJA, 2009). Ezt a jelenséget diplomamunkám során bizonyítottuk a GTD kórokozó *Botryosphaeria* és *Phomopsis* fajok ellen (8. ábra).



8. ábra. - Fénymikroszkópos felvétel egy *Botryosphaeria* faj. és *C. rosea* koinokulációjáról vizes agaron. A micéliumokat MTT szelektív festékkel festettük, mely az élő sejteket festi. Az A ábrán a *C. rosea* micéliumának a gazdatest köré fonódása, a B ábrán a *C. rosea* micéliumának növekedése

látható a gazdatestben. Forrás: saját felvétel.

A mikoparazitizmus mellett antibiózist is mutat a *C. rosea* számos gombával szemben, vagyis olyan vegyületeket választ ki a tápközegbe, mely a kontrollálni kívánt gombafajok spóráinak csírázását, vagy éppen a micéliumok növekedését gátolja (9. ábra). A *C. rosea* különböző szekunder metabolitokat termel, melyek antagonisztikus hatásúak a növénypatogének ellen, ezen vegyületek nagyban elősegítik a gombát az erőforrásokért való versengésben. Kimutatták, hogy a *C. rosea* által termelt poliketid típusú Clonorosein A és B vegyületek gátolták a *B. cinerea* és a *F. graminearum* csíranövekedését (FATEMA et al., 2018). Emelett a *C. rosea* peptaibol típusú vegyületek keverékét is termeli, melyek a *Sclerotinia sclerotinium* növekedését gátolták (RODRÍGUEZ et al., 2011).



9. ábra. Konfrontációs tesztek kivitelezése. Balra - GTD patogén *P. chlamydospora* önmagában leoltva. Középen - *P. chlamydospora* (Petri csésze bal oldala) és *C. rosea* (Petri csésze jobb oldala) koinokulációja, megfigyelhető a patogén csökkent növekedése. Jobbra – GTD patogén *Botryosphaeria* (csésze bal oldala) és *C. rosea* koinokulációja (csésze jobb oldala). Megfigyelhető a *C. rosea* felülnövekedése, mely mikoparazitizmusra utal. Forrás: saját felvétel.

A gomba emellett olyan elicitor hatású vegyületeket is termel, melyek stimulálják a növényt, ily módon járulva hozzá a növények patogénekkal szembeni ellenállásához (ROBERTI et al., 2006; MOUEKOUBA et al., 2013; LAHLALI és PENG, 2014). WANG és mtsai (2019) kimutatták, hogy a *C. rosea* képes paradicsom esetén a *B. cinerea* elleni rezisztenciát növelni a jázmonsav és a szalicilsav szintézisen keresztül.

### **3.4 A GTD vizsgálata újgenerációs technikák alkalmazásával**

#### **3.4.1 NGS és DNS-metabarcoding technika**

A GTD hatásmechanizmusának megértését nagyban befolyásolja a rendelkezésre álló technikák korlátjai. A tenyésztési módszerek hátránya, hogy a gyorsan növekvő gombák túldominálják a lassú növekedésűeket, illetve néhány fajt igencsak nehéz tenyészteni (MORALES-CRUZ et al., 2018). Az újgenerációs szekvenálás vagy mélyszekvenálás (Next Generation Sequencing – NGS) olyan DNS-szekvenálási technológia, mely forradalmasította a genomikai kutatásokat (BEHJATI és TARPEY 2013). Az NGS és a DNS-vonalkódolás kombinációja a DNS-metabarcoding technika. A „meta” prefix a különböző fajokból származó vonalkód szekvenciák összességére utal (STAATS et al., 2016). Az ITS (internal transcribed spacer) régió a gombák molekuláris azonosítására általánosan elterjedt szakasz, melyet több, mint két évtizede alkalmaznak nagyfokú fajok közötti változékonysága, több kópiás jellege és a konzervált primer helyek miatt. Az ITS1 és ITS2 régió általában jó felbontást biztosít a fajok közötti, akár egy fajon belüli szinten is (BLAALID et al., 2013). A DNS metabarcoding során a szekvenálást 5'→3' és 3'→5' irányban is elvégzik, amelynek számos előnye van. Többek között a szekvencia minőségének javítása, különböző polimorfizmusok észlelése, szekvenálási hibák kiküszöbölése. A mindkét irányból történő szekvenálás javítja a létrehozott szekvencia adatok megbízhatóságát és pontosságát, mely precízebb taxonómiai azonosítást tesz lehetővé (ELBRECHT et al., 2017; PORTER és HAJIBABAEI, 2018;)

Az ökológiai vizsgálatok során jellemzően az adott ökológiai folyamatban résztvevő fajok meghatározása kulcsfontosságú. Az ilyen biológiai sokféleségre vonatkozó adatok kiértékelése taxonómiai szakértelmet igényel. A DNS metabarcoding technika drasztikusan leegyszerűsítette ezt az azonosítási lépést (COISSAC et al., 2012). A

DNS-metabarcoding technikát gyakran használják mikrobiális ökológiai tanulmányokban, ígéretes módszer számos patogén, akárcsak a GTD kórokozók egyszerre történő *in planta* kimutatására. A GTD patogének profilozása különösen nagy kihívást jelent, mivel egyetlen lézióban számos, egyszerre fertőző GTD kórokozó és más a faszövetet kolonizáló gomba is jelen van (MORALES-CRUZ et al., 2018). A DNS szekvencia adatok a növénypatogén gombák meghatározásának és osztályozásának kulcsfontosságú forrása (AGLER et al., 2016).

### **3.4.2 A GTD vizsgálata DNS metabarcoding technika alkalmazásával**

Az első, a szőlővel kapcsolatos DNS-metabarcoding tanulmányban a szőlőbogyó mikrobiomját vizsgálták Kaliforniában. Az eredmények alapján a baktérium és gombaközösség szerkezetét és összetételét a bortermelő régió, a helyspecifikusság, valamint a fajta befolyásolta. Továbbá azt találták, hogy a mikrobiális közösség korrelál a különböző klimatikus viszonyokkal, vagyis az ültetvények környezeti feltételei és a mikrobiális élőhelymintázat között összefüggés van. A vizsgált tényezők együttesen határozzák meg a mikrobák borokra kifejtett egyedi hatását (BOKULICH et al., 2014).

ZARRAONAINDIA és mtsai (2015) különböző életterek (levél, virág, bogyó, gyökérzet) baktériumközösségeinek térbeli és időbeli dinamikáját jellemezték Long Islanden, hogy meghatározzák a fajta, az edafikus paraméterek, a fejlődési stádiumok és az ültetvény hatását. Azt találták, hogy a vizsgált közösség összetételét, szerkezetét számos tényező befolyásolta, a taxonok többsége a talajból származott, és eloszlásukat az erősen lokalizált biogeográfiai tényezők, valamint az ültetvény kezelése határozta meg.

NERVA és mtsai (2019) a talaj mikrobiális közösségét vizsgálták Esca tünetes és tünetmentes szőlők esetén Olaszországban. A fajgazdagság tekintetében nem találtak különbséget az egészséges és a tünetes növény talaja között. Azonban megfigyelték, hogy a tünetes növények esetén az Escát előidéző gombák gyakorisága magasabb, ami arra utal, hogy a talaj fontos inokulum forrás lehet, így az újonnan telepített növények a fertőzött talaj miatt nagy mennyiségű kórokozónak lehetnek kitéve.

A GTD megértéséhez kulcsfontosságú nemcsak a talaj, de a szőlőtőke mikrobiomjának meghatározása, megismerése. Szintén 2019-ben DEL FRARI és mtsai Esca tüneteket mutató szőlő faszöveti részének mikrobiomját vizsgálták Portugáliában. A faszövetet kolonizáló GTD fajok közül a *P. chlamydospora* és *Fomitiporia* fajok domináltak. A mikrobiom összetétel a tünetes és a tünetmentes növények esetén nagyon hasonló volt. Ez a megfigyelés alátámasztja azt a nézőpontot, miszerint a levéltünetek megjelenése nincs közvetlen kapcsolatban a faszövetben élő gombaközösséggel. BRUEZ és mtsai (2020) ugyancsak megállapították, hogy a *P. chlamydospora* az egyik legfőbb, a faszövetet kolonizáló gombafaj. Egészséges növényekben az előfordulása nem okozott látható elhalást vagy az Esca tüneteit, ez arra utal, hogy nem patogén, endofita növekedést mutat. Ez pedig azt a korábbi megállapítást támasztja alá, mely alapján a *P. chlamydospora* különböző abiotikus és biotikus hatások következményeképpen képes endofita életmódból patogénre váltani (PIERRON et al., 2016). Az egyetlen különbség, melyet az egészséges és a tünetes faszövet között BRUEZ és mtsai találtak, az a kordonban fellelhető fehérrothadt nekrotikus szövet. Ebben a szövetben a *F. mediterranea* dominált, melyhez a *P. chlamydospora* és néhány egyéb baktérium taxon is társult.

## 4. Anyag és módszer

### 4.1 Mintagyűjtés

A mintagyűjtés két borvidéken történt, az Egri és a Tokaji borvidéken. Egerben az Eszterházy Károly Katolikus Egyetem kísérleti szőlőbirtokán, míg Tokajban a Szent-Tamás dűlőben, illetve a Nagy-Kopasz hegy északi és déli felén (1. táblázat). A Tokaji borvidéken az első mintagyűjtésből elemeztük a DNS metabarcoding adatokat, míg Eger esetében az összes mintagyűjtés eredményét együtt értékeltük ki, így sokkal részletesebb elemzést tudtunk végezni.

1. táblázat. A mintagyűjtés helye a különböző terroirokban a Tokaji borvidék esetén, a különböző fajtákban az Egri borvidék esetén. (T-talaj, K-Kéreg, F-faszövet). A zöld háttérrel jelölt minták esetén végeztünk disszertációm során DNS-metabarcoding adatelemzést.

| Mintagyűjtés helye     |                        | 2020. február | 2020. szeptember | 2021. február | 2021. szeptember |
|------------------------|------------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|
| Tokaji borvidék        | Terroir                |               |                  |               |                  |
|                        | Nagy-Kopasz hegy dél   | T,K,F         | T,K,F            | T,K,F         | T,K,F            |
|                        | Nagy-Kopasz hegy észak | T,K,F         | T,K,F            | T,K,F         | T,K,F            |
|                        | Szent-Tamás dűlő       | T,K,F         | T,K,F            | T,K,F         | T,K,F            |
| Egri borvidék<br>SZBKI | Fajta                  |               |                  |               |                  |
|                        | cabernet sauvignon     | T,K,F         | T,K,F            | T,K,F         | T,K,F            |
|                        | chardonnay             | T,K,F         | T,K,F            | T,K,F         | T,K,F            |
|                        | leányka                | T,K,F         | T,K,F            | T,K,F         | T,K,F            |
|                        | kékfrankos             | T,K,F         | T,K,F            | T,K,F         | T,K,F            |

#### 4.1.1 Egri mintagyűjtés

Egerben a kísérleti szőlőbirtokon kiválasztott ültetvényt nagyjából 30 éve telepítették, a fajtákat ugyanazon az alanyra (Teleki 5C) oltották, a terület ugyanolyan körülmények között lett fenntartva az elmúlt három évtizedben. Ezen körülményeknek köszönhetően egyszerűen tudtuk vizsgálni a fajta mikrobiomra gyakorolt hatását. 2019 őszén a szakirodalmi áttekintésben említett betegség, az Esca tipikus levéltünetét (5.

ábra) mutató két növényt jelöltünk ki, négy fajtából: kékfrankos, leányka, chardonnay és cabernet sauvignon. Az Esca levéltünetét azért választottuk, mert egyszerűen meg lehet különböztetni más betegségek által előidézett tünetektől. A kijelölt tőkék egy nagyjából 500 m-es körön belül találhatóak. A tüneteket mutató tőkék mellett tünetmenteseket is kijelöltünk kontrollként, így összesen 16 tőkét.

#### **4.1.2 Tokaji mintagyűjtés**

Tokajban a három dűlőt körülbelül 26 – 44 éve telepítették, ugyanazon alanyt használták (V. berlandieri x riparia Teleki Kobler 5BB), a három dűlőben a furmint fajta T85-ös klónja található. A Tokaji borvidéken többek között a terroir, a termőhely mikrobiomra gyakorolt hatását elemeztük. 2019 őszén a Tokaji borvidéken is az Esca tüneteit mutató 4 tőkét jelöltünk ki, illetve a tünetes növények mellett tünetmenteseket is mind a három dűlőből, összesen 24-et.

2020. februárban, augusztusban, illetve 2021. februárban és augusztusban végeztük a mintagyűjtést. Így a mikrobiom szezonailtását, a különböző évjáratok hatását, a fajtahatást (az Egri borvidéken), a termőhely hatását (a Tokaji borvidéken), valamint a mikroélőhelyek által előidézett változásokat is képesek voltunk vizsgálni a tünetes és a tünetmentes növényekben és a talajban.

A tőkékről steril szikével kérget gyűjtöttünk 4 pontból, ugyanazon a helyen a faszövetbe fűrtünk, a fűrés során kieső faszövetet steril csőbe összegyűjtöttük, illetve a tőkék körüli 50 cm-es sugárban, körülbelül 20 cm mélységben talajmintát is vettünk 4 pontból. Az előidézett sebeket minden mintagyűjtéskor sebgéllal kezeltük. A különböző pontokból gyűjtött mintákat egységesítettük, az egri mintákat azonnal a laborba szállítottuk, ahol egy -80°C-os fagyasztást követően körülbelül 72 órán át,

vagy a minták teljes kiszáradásáig liofilizáltuk. A tokaji mintákat folyékony nitrogénben hűtöttük le, majd szárazjégen tároltuk a laborba érkezésig.

#### **4.2 Minták feldolgozása, DNS kivonás, szekvenálás**

A liofilizálást követően a mintákat steril acélgolyók (2 mm átmérő) használatával homogenizáltuk (TissueLyser LT, Qiagen), majd DNS-t (dezoxiribonukleinsav) vontunk ki belőle a NucleoSpin® Plant és Soil DNS kivonó kitet használva (Macherey-Nagel GmbH & Co. m Düren, Németország). A DNS kivonás sikerességének ellenőrzése céljából a mintákból PCR (Polimerase chain reaction – polimeráz láncreakció) segítségével a gombák azonosítására általánosan elterjedt ITS (internal transcribed spacer) régiót sokszorosítottuk fel. A PCR reakció sikerességét agaróz (1,0%) gél elektroforézissel ellenőriztük. A DNS minták koncentrációját a szekvenáló cég által megadott 20 ng/ul-re állítottuk be a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotométer segítségével. Ezt követően a mintákat a BaseClear-hez (Leiden, Hollandia) illetve a Biomi KFT-hez (Gödöllő, Magyarország) küldtük újgenerációs szekvenálásra, melyet az Illumina MiSeq platformon végeztek el. A szekvenálás során az ITS2 riboszómális DNS régiót szekvenálták az fITS7 (bázis-sorrend: GTGAATCATCGAATCTTTG) (IHRMARK et al., 2012) és az ITS4 (bázis-sorrend: TCCTCCGCTTATTGATATGC) (WHITE et al., 1990) primerek segítségével, melyekhez Illumina adaptereket csatoltak, majd a következő beállításokkal PCR-t végeztek: 95°C 5 perc, ezt követően 35 cikluson keresztül 95°C 20 másodperc, 56°C 30 másodperc, majd végül 72°C 1,5 perc.

#### **4.3 Bioinformatikai, statisztikai analízis**

A tokaji minták adatfeldolgozása az első mintagyűjtésből történt, míg az egri mintáknál mind a négy mintagyűjtés adatait együtt elemeztük. A nyers szekvenciákat a *dada2* (CALLAHAN et al., 2016) csomaggal dolgoztuk fel az R környezetben (R

Developement Core Team 2013). A *dada2* a szekvenciákat nem OTU-kba (operational taxonomic unit) rendezi, hanem a *dada2* által generált egyedi amplikon szekvencia variánsokba (ASV), melyek mind inter-, és intraspecifikus szinten elkülöníthetők, illetve a csomag segítségével azok a szekvenciák is kiszűrhetők, melyek nem a mintából származnak. Az 5'> 3' lefutású szekvenciákat 240 bázispárnál vágtuk le, a 3'>5' lefutású szekvenciákat pedig 200 bázispárnál. Ezt követően a szekvenciákat zajtalanítottuk, majd eltávolítottuk a szekvenálási hibákból eredő úgynevezett kimérákat (a kimérák olyan műszekvenciák, melyek kettő, vagy több biológiai szekvencia hibás összekapcsolódásával keletkeznek). Az 5'> 3' és a 3' >5' lefutású szekvenciákat összeillesztettük, majd ASV-kbe rendeztük. A gombák taxonómiai besorolását az UNITE (<https://unite.ut.ee/repository.php>) adatbázisában fellelhető összes gomba faj referencia szekvenciái alapján a USEARCH (11. verzió, Edgar, 2010) program segítségével végeztük. Az ASV-k azonosítását TEDERSOO és munkatársainak (2014) listája alapján végeztük el. Ezen ASV-k közül kiemeltük azokat a nemzetségeket, melyek a GTD-vel a szakirodalom szerint összefüggésbe hozhatóak. Az összes szekvencia letétbe került a GenBank® (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/about/genbank/>) genetikai szekvencia adatbázisába (OK053235-OK053804 - Tokaj, SUB14168478 - Eger), ahol a nyilvánosan elérhető DNS-szekvenciák megjegyzésekkel ellátott gyűjteményét találhatjuk. Minden analízist az R környezetben végeztünk. Mindkét mintagyűjtési hely mintáit, melyek kevés szekvenciát tartalmaztak (<1000), kihagytuk az analízisból.

#### **4.3.1 A Tokaji borvidéken a növényi kórokozók abundanciájának, fajgazdagságának és összetételének elemzése**

A tokaji első mintagyűjtésből az alacsony össz-szekvenciaszámú minták kihagyása után összesen 68 mintán végeztük el a statisztikai analízist. A mátrixot normalizáltuk

véletlenszerű mintavételezéssel a legkevesebb szekvenciát tartalmazó mintára (1577 szekvencia) (*rrarefy* funkció, *vegan* R csomag (OKSANEN et al., 2013)). A mátrixból kiemeltük a növénypatogéneket, majd azokat az ASV-ket, melyek csak egy mintában voltak jelen, kivettük a mátrixból, így összesen 579 növénypatogén ASV-t használtunk fel az analízishez. A kategorikus változók pl. a mikroélettér (faszövet, kéreg, talaj), terroir és egészségi állapot hatásának teszteléséhez a fajgazdagságot (a különböző ASV-k számát), illetve az ASV-k abundanciáját hasonlítottuk össze a minták között egy irányú és kétirányú ANOVA (varianciaanalízis) modellekkel. Csak azokat a változókat teszteltük kétirányú ANOVA-val, melyek az egyirányú ANOVA alapján szignifikáns hatást gyakoroltak a gombaközösségre (az egészségi állapot nem volt szignifikáns hatással az abundanciára, és a fajgazdagságra). A szignifikáns különbséget a Tukey HSD teszttel azonosítottunk. A növénypatogén ASV-k fajgazdagságát és abundanciáját dobozdiagrammal ábrázoltuk a *ggplot2* csomag segítségével (WICKHAM 2016), a kétirányú mikroélettér-terroir modell alapján. A minták összetételbeli különbségeit nem metrikus multidimenziós skálázással (NMDS) szemléltettük a *vegan* csomag segítségével, a Hellinger-transzformált mátrixon a Bray-Curtis távolságmérés alapján. Permutációs varianciaanalízist (PerMANOVA) végeztünk a *vegan* csomag *adonis* funkciójának segítségével 9999 permutációval, hogy megbecsüljük a terroir, a mikroélettér és az egészségi állapot által magyarázott változást. A növénypatogén ASV-k eloszlása hálózatként lett ábrázolva az *sna* csomaggal (BUTTS 2008) a különböző mikroéletterekre, melyhez jelenlét-hiány mátrixot használtuk. Azokat az ASV-ket, melyek csak egy mintában fordultak elő, kivettük a mátrixból. Továbbá indikátor faj analízist végeztünk az *indicspecies* csomag *multipatt* funkciójával 999 permutációval, hogy a különböző életterekre és az

egészségi állapotra jellemző növénypatogén taxonokat azonosítsunk (DUFRÊNE and LEGENDRE 1997; DE CÁCERES et al., 2012).

#### **4.3.2 Az Egri borvidéken a különböző funkciós csoportok abundanciájának, fajgazdagságának, összetételének elemzése**

Az Egri borvidéken mind a négy mintagyűjtést bevontuk az analízisbe, az alacsony össz-szekvenciaszámú minták kihagyása után összesen 184 mintát. A különböző funkciós csoportokat tartalmazó mátrixot normalizáltuk mintánként, véletlenszerű mintavételezéssel a legkevesebb szekvenciát tartalmazó mintára (13046 szekvencia). Az egri minták esetében nemcsak a növénypatogéneket, de egyéb funkciós csoportokat is vizsgáltunk, például a GTD patogéneket, mikoparazitákat, a generalista szaprotrófokat, a GTD-hez köthető fa szaprotrófokat és a fa szaprotrófokat. Azok az ASV-k melyek csak egy mintában voltak jelen, kivettük a mátrixból, így kapva összesen 3418 ASV-t az analízishez. A kategorikus változók pl. a mikroélettér (faszövet, kéreg, talaj), a fajta, a szezonális, az évszám és az egészségi állapot hatásának teszteléséhez a fajgazdagságot (ASV-k számát), illetve az abundanciát hasonlítottuk össze a különböző, fentebb említett funkciós csoportok között egyirányú ANOVA-val. Szignifikáns különbséget a Tukey HSD teszttel azonosítottunk. A különböző funkciós csoportok fajgazdagságát és abundanciáját dobozdiagrammal ábrázoltuk a mikroélettér alapján a *ggplot2* csomag segítségével (WICKHAM 2016). A minták összetételbeli különbségeit nem metrikus multidimenziós skálázással (NMDS) szemléltettük a *vegan* csomag segítségével, a Hellinger-transzformált mátrixon a Bray-Curtis távolságmérés alapján az összes mintára. Permutációs varianciaanalízist (PerMANOVA) végeztünk a *vegan* csomag *adonis* funkciójának segítségével 9999 permutációval, hogy megbecsüljük a fajta, az évszám, a szezonális, a mikroélettér és az egészségi állapot által magyarázott változást. A mátrixot

mikroéletterekre felosztva is elvégeztük az NMDS-t és a PerMANOVA-t, hogy megbecsüljük a fajta, az évjárat, a szezonális és az egészségi állapot által magyarázott változás mértékét az mikroélettereken belül.

Annak érdekében, hogy a tokaji mintagyűjtés adatsorából elkészült hálózatanalízis eredményeit össze tudjuk hasonlítani, az egri első mintagyűjtésből elvégeztük az adatelemzést a 4.1.2 fejezetben leírtakkal megegyezően, és elkészítettük a hálózat analízis ábrát a különböző mikroéletterekre az *sna* csomaggal, csak a növénypatogének jelenlét-hiány mátrixát használva. Azokat az ASV-ket, melyek csak egy mintában fordultak elő, kivettük a mátrixból.

#### **4.4 Hagyományos mikrobiológiai módszerrel történő izolálás a faszövetből**

Az egri minták esetén mind a négy mintagyűjtésből, a tokaji minták esetén a 2021-es évből a faszövetből hagyományos tenyésztési eljárással gombákat izoláltunk. A fadarabkákat egyesével oxitettraciklin-hidrokloriddal (10 µg/ml Sigma-Aldrich) kiegészített PDA (potato dextrose agar – burgonya dextróz agar, Oxoid) táptalajra helyeztük, 5 darabot egy csészére, egy tőkéről 3 ismétlésben. A lerakást követően a csészéket körülbelül 4 hétig monitoroztuk, majd a felnövekvő gombákat külön táptalajra oltottuk, tisztatenyészeteket képezve belőlük. Az egy csészéről izolált hasonló morfológiai paraméterekkel rendelkező törzseket szelektáltuk. Szelektálást követően a törzsekből kb 100 mg micéliumot gyűjtöttünk össze, DNS kivonásig - 80°C-on tároltuk. A DNS kivonás Qiagen DNEasy Plant Mini Kittel történt. A mintákból PCR-rel (Polimerase chain reaction – polimeráz láncreakció) a gombák azonosítására általánosan használt ITS régiót sokszorozítottuk fel az ITS1F (bázis-sorrend: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) és ITS4 (bázis-sorrend: TCCTCCGCTTATTGATATGC) primerekkel (MANTER és VIVANCO, 2007). Agaróz (1%) gél elektroforézissel ellenőriztük a kapott PCR termékeket, melyeket

ezután polietilén-glikolos módszerrel (SCHMITZ et al., 2006) tisztítottunk ki. A tisztítást követően Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotométerrel mértük a minták koncentrációját, majd elküldtük őket Sanger szekvenálásra az Eurofins Genomics-hoz (Ebersberg, Németország). A nyers szekvenciákat a Geneious Prime bioinformatikai program segítségével szűrtük. A gombák taxonómiai besorolását az UNITE adatbázisában fellelhető összes gomba faj referencia szekvenciái alapján a USEARCH (11. verzió, EDGAR, 2010) program segítségével végeztük. Az ASV-k azonosítását TEDERSOO és munkatársainak (2014) listája alapján végeztük el. Az R környezetben a *ggplot piechart* funkcióját használva ábrázoltuk az izolátumokat az évjárat, a mintagyűjtési hely és a szezon alapján. A tokaji első két mintagyűjtés során a mintákat folyékony nitrogénben tartottuk, és liofilizáltuk, ezért ebből a két alkalomból származó mintákból nem készült tenyésztéses izolálás. Az utolsó két mintagyűjtésen már az összegyűjtött minta egy részét elkülönítettük a tenyésztéshez.

#### **4.5 *In planta* üvegházi kísérlet a potenciális biokontroll jelölt *Clonostachys rosea* 19B/1-es törzssel**

A diplomamunkám folytatásaként egy lehetséges biokontroll faj, a *C. rosea* hatékonyságát teszteltük le *in planta* üvegházi kísérletben. A diplomamunka során *in vitro* jellemeztünk egy korábbi, dugványról izolált faj, a *C. rosea* 5 törzsét, vizsgáltuk antagonisztikus és mikoparazitikus tulajdonságaikat, megállapítottuk, hogy a *C. rosea* antibiotikus hatású vegyületeket szekretál, illetve nekrotróf mikoparazitizmust mutat a *Botryosphaeria* nemzetségbe tartozó kórokozók ellen. Az *in vitro* eredmények alapján (növekedésgátlás, felülnövekedés, sporuláció) kiválasztottuk a legjobban teljesítő törzset, a 19B/1-et. Ezt követően egy három hónapos üvegházi kísérletben egy éves cabernet sauvignon dugványokat fertőztünk korábban szőlőről izolált GTD

kórokozókkal. A cabernet sauvignon, ahogy a szakirodalomban írtuk, a GTD-re az egyik legfogékonyabb fajta.

Az *E. lata* (T15/2), *B. dothidea* (99C/1) és *P. chlamydospora* (48C/4) törzseket előzetesen PDA táptalajon növesztettük 25 °C-on egy hétig. Ezen törzsekből kb. 3 mm-es micélium korongokat vágunk ki, majd inokuláltuk a megsebzett dugványok xilémjébe. Az *E. lata* és *P. chlamydospora* izolátumokat azért választottuk ki, mert az *in vitro* konfrontációs tesztekben a *C. rosea* jelentős mértékben gátolta a növekedésüket, a *B. dothidea* izolátumot pedig azért, mert nagyon fogékony volt a *C. rosea* által okozott mikoparazitizmusra, de ezen gomba esetén növekedésgátlást nem idézett elő a *C. rosea*.

Minden kórokozó - talaj kombinációhoz 5 dugványt használtunk fel. A dugványokat kezeletlen, illetve a *C. rosea* 19B/1-es törzs konídium szuszpenziójával kiegészített talajba ültettük ( $10^4$  spóra/gramm). A konídium szuszpenziót a 19B/1-es *C. rosea* táptalajokra történő leoltásával nyertük. A leoltott táptalajokat 8 napig konstans fluoreszcens fény alatt inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd a csészék felületét 0,01%-os TWEEN 80 (Sigma-Aldrich) oldattal mostuk le, a spórák számát Bürker-kamrával határoztuk meg. A növényeket üvegházban inkubáltuk környezeti fényviszonyok mellett. A hőmérséklet részleges szabályozását a magasabb hőmérsékletre automatikusan nyíló felső ablakokkal oldottuk meg.

90 napos inkubációt követően a dugványokat gyökerestül kivettük a talajból, a kéreg eltávolítása után hosszirányban felvágtuk, és megmértük a nekrotikus elváltozások hosszát. A *C. rosea* 19B/1 törzs visszaizolálását is megkíséreltük a talajból, illetve az inokulált talajban nevelt dugványok három különböző pontjából is (alap, internódium közepe, sebzés). Az inokulált talajból desztillált vízzel hígítási sort készítettünk, majd

PDA táptalajra szélesztettük. A dugványokról a három pontból korongokat vágunk ki, ezeket 70v/v%-os etanolba, majd nátrium-hipokloritba (4v/v% klór) és ismét 70 v/v%-os etanolba helyeztük 2 percre. A sterilizált korongokat darabokra vágtuk és oxitetraciklinnel (10 µg/ml, Sigma-Aldrich) kiegészített PDA táptalajra helyeztük. A csészéket 25 °C-on, sötétben inkubáltuk. Azon gombákból, melyek morfológiájukat tekintve hasonlítottak a *C. rosea*-hoz, egy kevés micéliumot átvittünk PDA táptalajra, hogy tisztatenyészeteket kapjunk. A gombákat hagyományos mikrobiológiai eljárással morfológiai bélyegek alapján, valamint molekuláris biológiai úton az ITS régió alapján azonosítottuk.

#### **4.6 Speciális szakkifejezések definiálása a könnyebb érthetőség végett**

Abundancia: A leolvasott szekvenciák számának összessége

Diverzitás: Az azonosított ASV-k sokfélesége (különböző ASV-k száma)

Funkciós csoport: TEDERSOO és munkatársainak (2014) listája alapján az azonosított ASV-ket funkciós csoportokba rendeztük: generalista szaprotrófok, GTD kórokozók, nem GTD kórokozók, GTD-hez köthető fa szaprotrófok, nem GTD-hez köthető fa szaprotrófok, mikoparaziták

Mikroélettér: A szőlőn belül a vizsgált mintatípusok – a kéreg és a faszövet, illetve a talaj gyűjtőneveként használjuk

Stresszérték: A nem metrikus multidimenziós skálázás (NMDS) során a stressz érték azt tükrözi, hogy az ordináció mennyire jól összegzi a minták között megfigyelt távolságokat. A stressz mind a minták számával, mind a változók számával nő. Ha a stressz érték kisebb, mint 0,05; az NMDS kiváló (ez nagyon ritkán valósul meg). Ha kisebb, mint 0,1; akkor nagyon jónak, 0,1- 0,2 között jónak számít, a 0,3-nál nagyobb stresszérték alapján az elkészült NMDS rossz ábrázolásnak minősül.

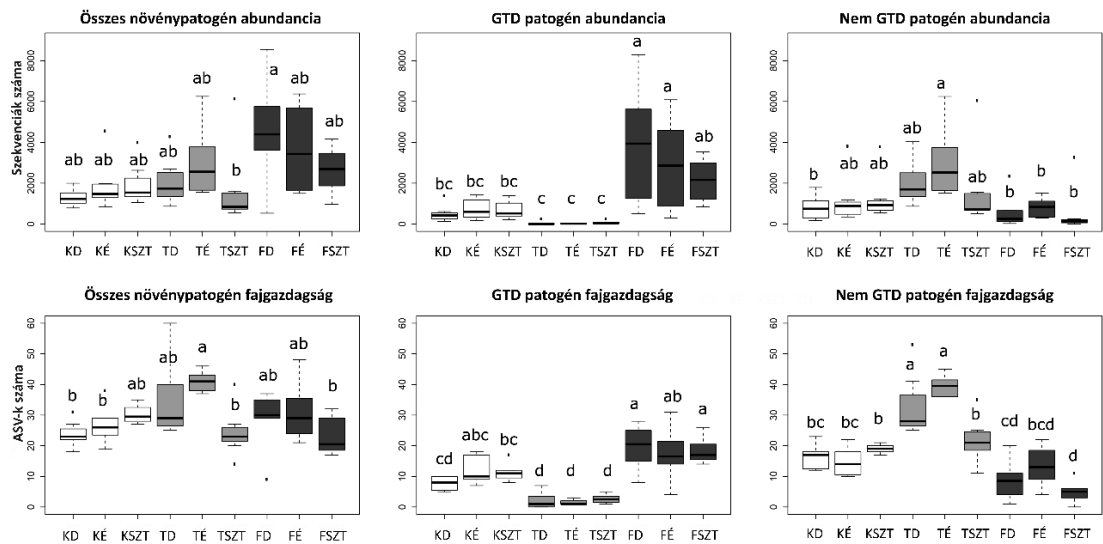
## 5. Eredmények és azok megbeszélése

### 5.1 A Tokaji borvidék DNS metabarcoding adatsorából nyert eredmények, azok kiértékelése

Az 579 növénypatogén ASV közül 119 ASV bizonyult a GTD-hez köthető kórokozónak, 16 különböző nemzetségből. A GTD patogének közül a domináns nemzetségek a *Phaeomoniella* (24 ASV), a *Fomitiporia* (17 ASV), a *Phaeoacremonium* (16 ASV), a *Diaporthe* (15 ASV), a *Diplodia* és *Seimatosporium* (11 ASV) fajok voltak. A nem GTD-hez köthető nemzetségek közül a *Botrytis* volt a legváltózatossabb (24 ASV), majd a *Fusarium* (23 ASV), *Alternaria* (20 ASV), *Veronaea* (18 ASV), és *Phaeosperiopsis* (17 ASV) nemzetségek. A GTD, és a nem GTD patogének, valamint az összes növénypatogén abundanciája különbözött az eltérő mikroéletterekben (talaj, kéreg, faszövet) ( $p=0,0007$ ), az egészségi állapotok között nem. Az összes növénypatogént figyelembe véve az ASV-k abundanciája a faszövetben volt a legnagyobb, majd a kéregben és a talajban (10. ábra).

A GTD patogének jelenléte a talajban nem volt számottevő, főként a növényi részekben, ezen belül is a faszövetben domináltak, míg a nem GTD patogének a talajban voltak többségben. Az összes növénypatogén fajgazdagsága különbözött a mikroéletterek között, illetve a *terroir*-ok között is (mikroélettér:  $p=0,0209$ ; *terroir*:  $p=0,0248$ ). A nem GTD patogének a talajban voltak a legváltózatosabbak, míg a GTD patogének a faszövetben, majd a kéregben, és alacsony diverzitást mutattak a talajban.

Nem találtunk különbséget az ASV-k fajgazdagságában és abundanciájában az egészséges és a tünetes növények között semelyik növénypatogén nemzetségekben, kivéve a *Diaporthe* nemzetséget, ahol a faszövetben magasabb volt az ASV-k fajgazdagsága a tünetes növények esetén.



10. ábra – A növénypatogén gombák abundanciája (azonosított szekvenciák száma) (fent) és fajgazdagsága (lent) a különböző mikroéletterekben és a különböző terroirokban. Az összes növénypatogén, a GTD, és a nem GTD patogének külön lettek feltüntetve az ökológiai különbségek kiemelése végett. A rövidítések a következők: KD – Nagy-Kopasz délről származó kéregminták, KÉ– Nagy-Kopasz északról származó kéregminták, KSZT – Szent Tamás dűlőből származó kéregminták, TD – Nagy-Kopasz délről származó talajminták, TÉ- Nagy-Kopasz északról származó talajminták, TSZT – Szent Tamás dűlőből származó talajminták, FD – Nagy-Kopasz délről származó faszöveti minták, FÉ- Nagy-Kopasz északról származó faszöveti minták, FSZT – Szent Tamás dűlőből származó faszöveti minták. A betűk az egyirányú ANOVA és post hoc Tukey HSD teszt által kimutatott szignifikáns különbséget jelölik ( $p < 0,05$ )

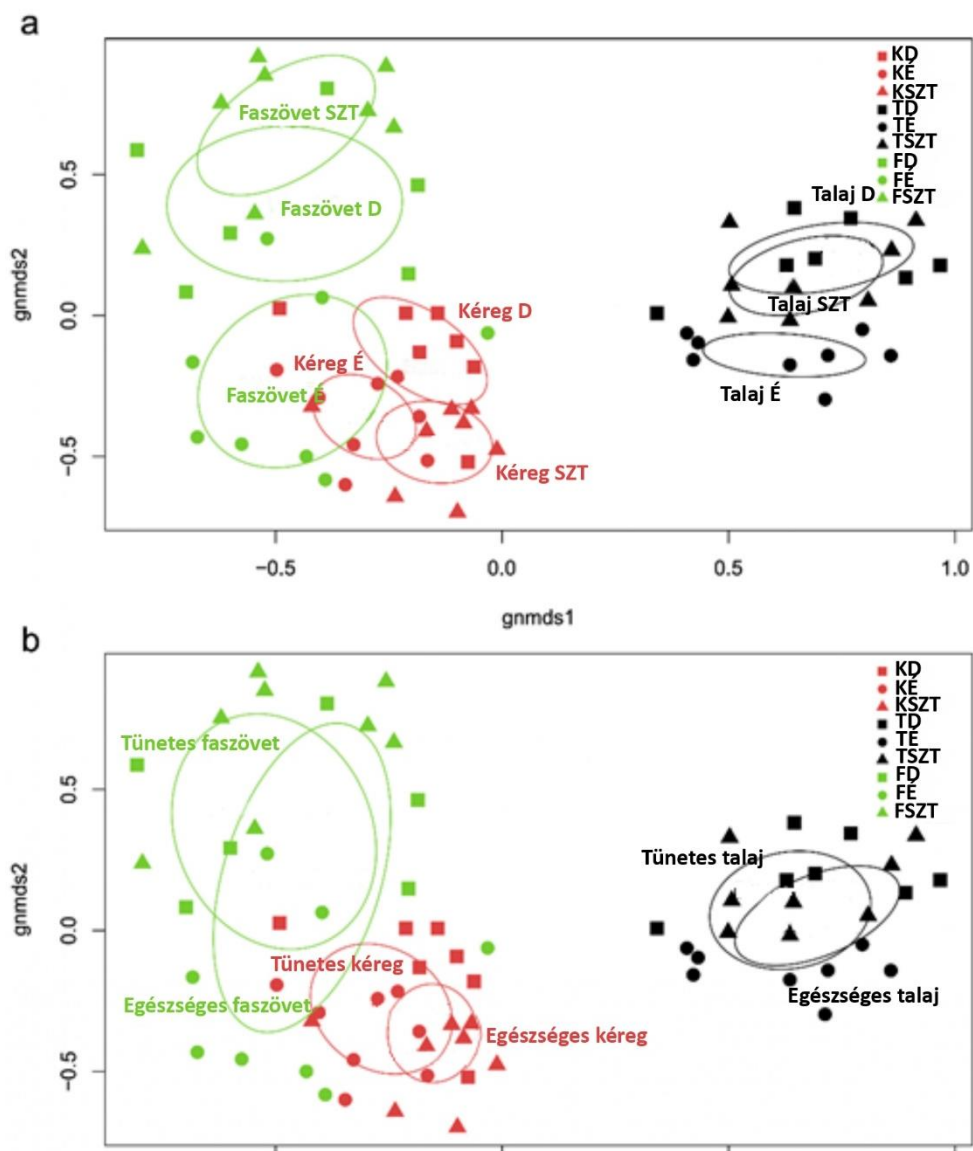
Amikor a mikroélettereket hasonlítottuk össze, megfigyeltük, hogy a *Phaeomoniella* fajok abundanciája a faszövetben voltak a legnagyobb, a *Diplodia* és *Seimatosporium* fajok főként a faszövetben és a kéregben voltak megtalálhatóak. A fajgazdagság tekintetében a *Fomitiporia*, *Phaeomoniella* és *Phaeoacremonium* fajok a faszövetben voltak a legváltozatosabbak, a *Seimatosporium* és *Diplodia* fajok a kéregben, míg az *Ilyonectria* fajok kizárólag a talajban fordultak elő. A nem GTD patogének 18 nemzetsége közül 13 a talajban volt a legváltozatosabb, (1. melléklet) míg a másik három nemzetség (*Devriesia*, *Exobasidium* és *Catenulostroma*) ASV-i a kéregben voltak dominánsak.

A növénypatogén gombaközösség szerkezetét két dimenziós NMDS-sel ábrázoltuk (stressz érték = 0,1993238) (11. ábra). A stressz érték azt tükrözi, hogy az ordináció mennyire jól összegzi a minták között megfigyelt távolságokat. A 0,2 alatti stresszérték a minták ábrázolása szempontjából jó. A PerMANOVA szerint a mikroélettér hatott a legnagyobb mértékben a növénypatogén gombaközösségre, a variancia 32,18%-át magyarázva. Ez azt jelenti, hogy a minták közötti eltérés kb. 32%-áért a mikroélettér volt felelős. A 10. ábrán is jól látszik, hogy az abundancia és fajgazdagság értékek eltérnek a különböző mikroélettérek között, ahogyan a terroirok között is. A terroir a variancia 7,78%-áért, és az egészségi állapot 1,86%-áért volt felelős (2. táblázat). A feltüntetett p-értékek alapján a megfigyelt különbségek a mikroélettérek esetén, a terroirok esetén, valamint az egészségi állapotok esetén valószínűleg nem véletlenül alakultak ki.

2. táblázat A Tokaji borvidék mintáit elemző perMANOVA eredménye a vizsgált változókkal, a változók közötti variancia eloszlásával, a p értékekkel és a szignifikancia szinttel.

| Változó                  | Variancia (%) | p érték       | Szignifikancia szint |
|--------------------------|---------------|---------------|----------------------|
| <b>Mikroélettér</b>      | 32,18         | <b>0,001</b>  | <b>***</b>           |
| <b>Terroir</b>           | 7,78          | <b>0,001</b>  | <b>***</b>           |
| <b>Egészségi állapot</b> | 1,86          | <b>0,0291</b> | <b>*</b>             |

A 11. „a” és „b” ábra ugyanazt az ordinációt ábrázolja, azonban az ellipszisek különböznek. A 11. „a” ábrán az ellipszisek az összetételbeli különbségek szórását mutatják az azonos mikroélettérből és terroirból, míg a 11. „b” ábrán az azonos mikroélettérből és egészségi állapotból.



11. ábra – A nem metrikus multidimenziós skálázás (NMDS) által kapott ordinációs ábra, mely a Tokaji borvidékről az egészséges és Esca tünetes növényekről gyűjtött minták növénypatogén gombaközösséget ábrázolja az mikroélettérek alapján. Az ordinációt a Bray-Curtis féle távolság alapján generáltuk az abundancia (azonosított szekvenciák száma) táblázat alapján. A két ábra ugyanazt az ordinációt ábrázolja, az ellipszisek az összetételbeli különbségek szórását mutatják az azonos mikroélettérből és terroirból (a), valamint az azonos mikroélettérből és egészségi állapotból (b) származó minták esetén. A rövidítések a következők: KD – Nagy-Kopasz délről származó kéregminták, KÉ- Nagy-Kopasz északról származó kéregminták, KSZT – Szent Tamás dűlőből származó kéregminták, TD – Nagy-Kopasz délről származó talajminták, TÉ- Nagy-Kopasz északról származó talajminták, TSZT – Szent Tamás dűlőből származó talajminták, FD – Nagy-Kopasz délről származó faszöveti minták, FÉ- Nagy-Kopasz északról származó faszöveti minták, FSZT – Szent Tamás dűlőből származó faszöveti minták.



Az elvégzett hálózatanalízis (12. ábra) is igazolta a GTD patogének dominanciáját a faszövetben és a kéregben, míg a nem GTD patogének dominanciáját a talajban, számos domináns nemzetség ASV-je több mintában is megjelent.

A hálózatanalízis alapján is látható, hogy az egészséges és beteg növények patobiomja nem tér el egymástól, azonban a kéreg és a faszövet domináns GTD nemzetségei igen. Például a *Phaeoacremonium* és *Fomitiporia* nemzetség ASV-i a faszövetben megtalálhatóak számos mintában, de egyetlen kéregmintában sem fordulnak elő. A *Semiatosporium*, *Diplodia* és *Neofabraea* fajok pedig a kéregmintákban voltak jelen, és csak egy-két mintában fordultak elő a faszövetben is. A talajminták a terroirok szerint szépen elkülönülnek, a minden dűlőben megtalálható ASV-k mellett terroir specifikus ASV-eket is láthatunk.

A Tokaji borvidéken vizsgált növénypatogén gombaközösség mintázatát, melyet a mikroélettér nagymértékben befolyásolt, elsősorban a GTD és a nem GTD kórokozók eloszlásbeli különbségei befolyásolták. A GTD patogének előfordulása szinte kizárólag a faszövetre és a kéregre korlátozódott, egyes esetekben teljesen hiányoztak a talajmintákból, vagy éppen nagyon alacsony abundanciát mutattak. Ez az állítás nincs összhangban NERVA és mtsai (2019) vizsgálatainak eredményeivel, miszerint a talaj a GTD kórokozók igencsak fontos inokulum forrása. Nehéz az eredmények összehasonlítása, ugyanis NERVA és mtsai (2019) csak a talaj mikrobiomját vizsgálták. Azonban két GTD kórokozó nemzetség igen magas abundanciát mutatott a talajban, a *Nectria* és *Ilyonectria* fajok, melyek a feketelábúságot okozzák (GRAMAJE et al., 2018). A DEL PILAR MARTÍNEZ-DIZ és mtsai (2019) által egészséges növényeken végzett rizoszféra tanulmány eredményei szerint a talajban és a szőlő élő szöveteiben megfigyelt patogén gombafajok között összetételbeli különbségek vannak. Ez a tanulmány is felhívja a figyelmet arra, hogy egy élettér

mikrobiomjának jellemzése csak korlátozott információt nyújthat, az összkép megértéséhez elengedhetetlen a teljes növényt vizsgálni.

Fontos megemlíteni, hogy az mikroélettérek sokféleségét a nem GTD-hez köthető patogének befolyásolták, míg a GTD patogének inkább az abundancia értékekre voltak hatással a normalizált mátrixunk alapján. Ez azt jelenti, hogy bár kevésbé változatosak, a GTD kórokozók túlnyomórészt többségi tagjai a szőlő patobiomjának, különösen a faszövetnek, kiszorítva onnan a nem GTD kórokozókat. A hálózatanalízisünk alapján a *Phaeomoniella*, *Seimatosporium* és *Diplodia* fajok okozzák az előbb említett többletet a faszövetben, míg a kéregben a *Seimatosporium* és *Diplodia* fajok. Míg a felsorolt nemzetségek szinte minden mintában jelen vannak az adott mikroélettérben, addig a *Fomitiporia*, *Lasiodiplodia* és *Diaporthe* fajok a faszövetben csak egy-két mintában, a kéregben a *Diaporthe* és *Phoma* fajok szintén csak egy-két mintában fordultak elő. A *Phaeomoniella* fajok nagy számát a faszövetben és alacsony abundanciájukat a kéregben vélhetőleg az okozza, hogy a *P. chlamydospora* a faszövet xilémjét preferálja jobban kolonizáció szempontjából (LANDI et al., 2012; FLEURAT-LESSARD et al., 2014).

A szintén a xilémet kolonizáló *Fomitiporia* nemzetség is kizárólag a faszövetben volt jelen, alátámasztva az állítást, miszerint a gomba hajlamos az élő szövetekben megtelepedni és ott fehérkorhadást előidézni. A *Seimatosporium* nemzetség mutatta a legnagyobb abundancia értékeket a kéregben, míg a faszövetben kevesebb ASV volt megtalálható. Ez a nemzetség a GTD-vel összefüggésbe hozható, és kimutatták, hogy a fajok virulenciája más GTD patogének jelenlététől is függ. LAWRENCE és mtsai 2018-ban megfigyelték a *Seimatosporium* fajok és a botrioszfériás elhalást előidéző *Diplodia* fajok közötti pozitív interakciót. Ez a két nemzetség esetünkben számos ASV-vel jelen volt a faszövetben, de főként a kéregben. A *Diplodia* nemzetséget a

szőlő kérgéből szaprofitaként jellemezték (CASTILLO-PANDO et al., 2001), ahol általában piknídium formájában telel át (LUQUE et al., 2016).

Annak ellenére, hogy a Tokaji borvidéken a mintagyűjtési területek egymáshoz viszonylag közel voltak (<10 km), nagy összetételbeli különbségeket találtunk a növénypatogén gombaközösség összetételében terroir-onként a PerMANOVA eredményei alapján. Ez főként a talajban élő patogének esetében mutatkozott meg, és kisebb mértékben a faszövetben lévő patogének esetén is, ami egyfajta mezoklimatikus és edafikus tényezők által vezérelt környezeti szűrésre utal. A talajban a terroir hatása egyértelmű volt a nem GTD patogén ASV-k esetén, mely a hálózat analízis ábrán is megfigyelhető (12. ábra). Ez a terroir hatás, habár gyengébben, de megmutatkozott a kéregben és a faszövetben is. A terroir nagyobb mértékben befolyásolta a kéreg növénypatogén gombaközösségét, mint a faszövet gombaközösségét. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a kéreg a környezeti tényezőknek nagyobb mértékben kitett, mint a tőke. A terroir és a környezeti tényezők a talaj és a növény mikrobiomjára gyakorolt együttes hatását érdemes lehet vizsgálni a jövőben.

Az egyetlen különbség, melyet az egészséges és Esca tünetes növények patobiom összetételében találtunk az a kéregben volt, a talajban és a faszövetben nem találtunk, ahogy NERVA és mtsai (2019) sem. Az általuk elvégzett analízis alapján különbséget véltek felfedezni a tünetes és egészséges növények talaja között. A szakirodalomban több kutató által is dokumentált, hogy az egészséges tőkéket is kolonizálhatják GTD patogének (HOFSTETTER et al., 2012; BRUEZ et al., 2014; DEL FRARI et al., 2019), és HOFSTETTER és mtsai (2012) azt a hipotézist állították fel, hogy a tünetek megjelenését a GTD kórokozók abundanciájának változása idézheti elő. Az általunk DNS metabarcoding technika alkalmazásával végzett tanulmány szerint sem a szőlő,

sem a talaj növénypatogén gombaközössége nem tér el egymástól abundancia, fajgazdagság és szerkezet alapján a Tokaji borvidéken. Eredményeink kihangsúlyozzák a GTD összetettségét, miszerint a kórokozók a mikrobiom általános tagjai az egészséges növények esetén is, és jelenlétük a levéltünetek megjelenésével közvetlenül nem kapcsolható össze. Az egyik lehetséges kivétel a *P. chlamydospora*, amely tipikusan a xilémet kolonizáló, az Esca komplexhez (SURICO et al., 2006) köthető gombafaj, és indikátor fajként azonosítottuk (M2 - 1.táblázat) a tünetes növények faszövetében. Ahogy HOFSTETTER és mtsai (2012) is megállapították, a legtöbb gomba, melyet GTD patogénként tartanak számon, inkább endofita és/ vagy látens patogén, mely opportunistaként viselkedhet olyan szőlő esetén, amely már eleve legyengült a hideg, a szárazság, az intenzív metszés vagy egyéb tényezők miatt. Megállapítottuk, hogy a GTD-hez köthető gombák szinte kizárólag a kéregben és az évelő faszövetben találhatóak, a talajban egy-két nemzetség kivételével nem voltak jelen. Ez alátámasztja azt az elméletet, hogy a GTD kórokozók elsősorban szaprofiták, másodsorban opportunisták kórokozók. A szőlő gombaközösségének összetételét befolyásoló ökológiai és környezeti tényezők további vizsgálatára van szükség, hogy jobban megértsük ezt a kérdéskört.

Az eddig tárgyalt eredmények alapján a növényi részek és a talaj gomba közösségének különbsége, melyet valószínűleg a környezeti szűrés és az ebből eredő mikroélettér specifikáció vezérel, sokkal nagyobb egy adott növényen belül, mint az egyes növények között. Ez alapján minden egyes mikroélettér a rá jellemző gombaközösséggel rendelkezik („core mycobiome”). Habár nem tárgyaltuk részletesen, úgy tűnik, hogy a földrajzi helyzet és az ebből eredő eltérő környezeti tényezők befolyásolhatják a szőlő mikrobiomját, ahogyan azt MEZZASALMA és mtsai (2018) is megállapították, illetve bizonyos mértékig a talajközösségek összetételbeli különbségeit is a mintavételi

helyek között. További vizsgálatok szükségesek a különböző bortermelő régiókból, hogy a szőlőben élő gombák összetételbeli dinamikájának regionális vonatkozásait nyomon tudjuk követni.

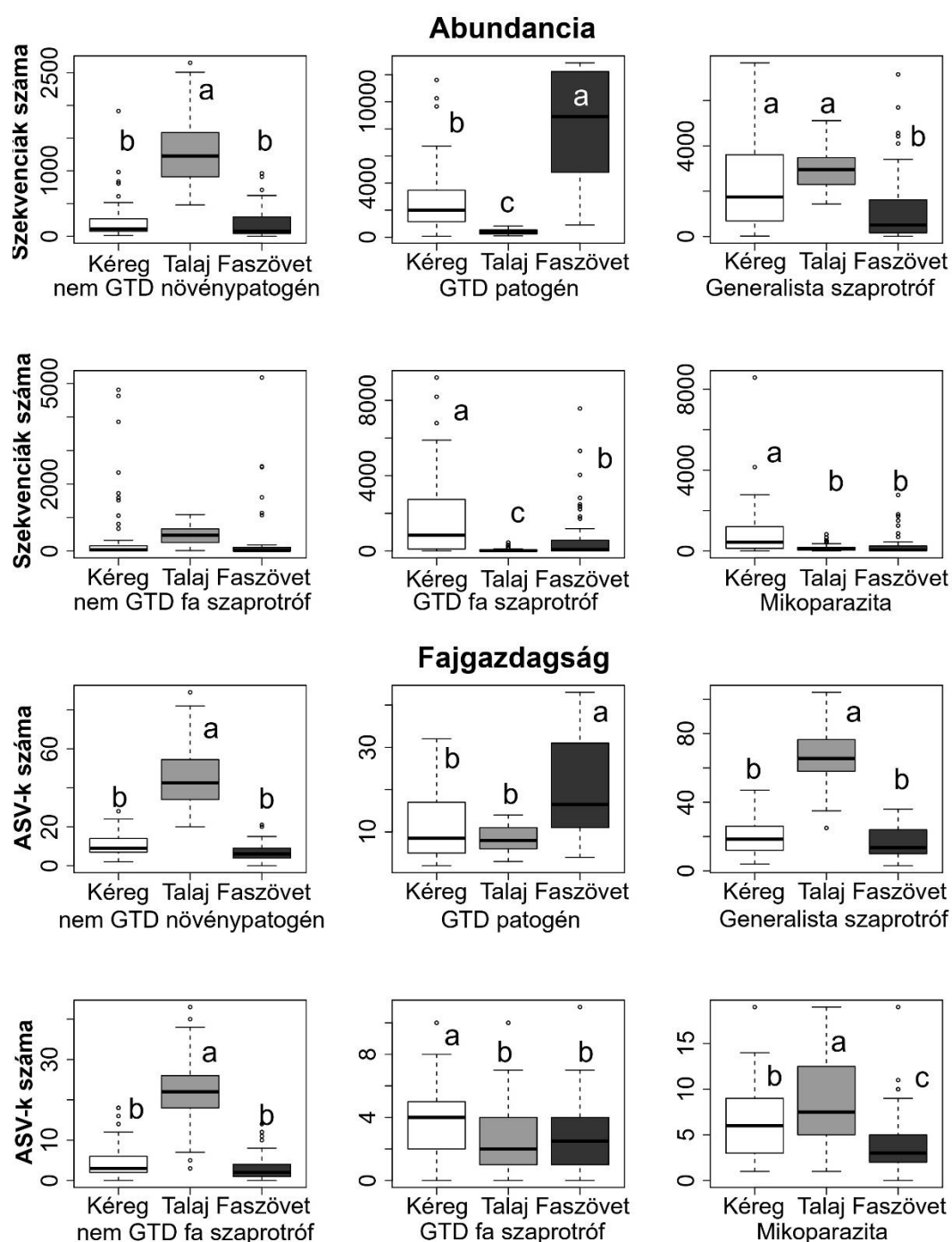
## **5.2 Az Egri borvidék DNS metabarcoding adatsorából nyert eredmények és azok kiértékelése**

Az Egri borvidéken a négy mintagyűjtésből a nemzetség szintig 2206 ASV-t azonosítottunk, melynek több mint negyede, 573 növénypatogén, ebből 223 ASV a GTD-hez köthető. Funkció szerint azonosítottuk még a faszövetben élő szaprotrófokat (286 ASV), melyek nem GTD-hez köthetők, 32 GTD-hez köthető fa szaprotrófot, mikoparazitákat (99 ASV), illetve generalista szaprotrófokat (705 ASV).

A növénypatogének közül a *Fusarium* fajok domináltak (44 ASV), ezt követték az *Alternaria* fajok (31 ASV), majd a *Devriesia* fajok (21 ASV). A GTD kórokozók legnagyobb része a *Diplodia* (48 ASV), *Phaeomoniella* és *Eutypella* (41 ASV) nemzetségbe tartoztak. A mikoparaziták közül a *Cystobasidium* és *Trichoderma* fajok (19 ASV), valamint a *Papiliotrema* fajok (11 ASV) voltak nagy számban jelen. A faszövetben élő szaprotrófok közül a *Lophiotrema* fajok (18 ASV), a *Peniophora* fajok (13 ASV) és a *Keissleriella* fajok (11 ASV) domináltak. A GTD-hez köthető fa szaprotrófok közül a *Kalmusia* (11 ASV) és *Stereum* (4 ASV), a generalista szaprotrófok közül a *Solicoccozyma* (61 ASV), *Mortierella* (45 ASV) és a *Vishniacozyma* (40 ASV) voltak a legváltozatosabbak.

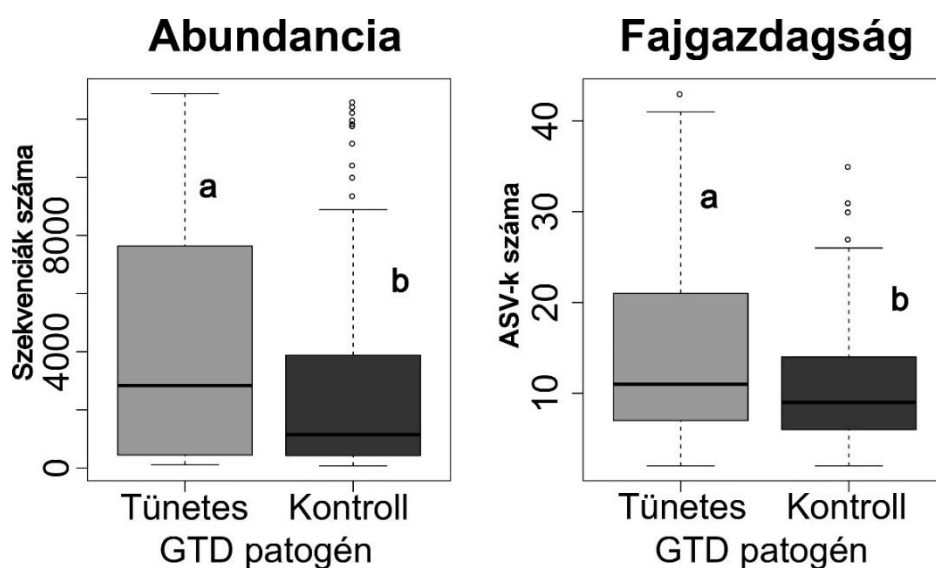
A nem GTD patogének a talajban domináltak, míg a GTD patogének a faszövetben, majd a kéregben. A generalista szaprotrófok a talajban és a kéregben voltak abundánsak, a nem GTD-hez köthető fa szaprotrófok mindhárom mikroélettérben előfordultak, viszont számos kiugró értékkel voltak jelen a kéregben és a faszövetben.

A GTD-hez köthető fa szaprotrófok a kéregben, és a faszövetben voltak jelen számos szekvenciával, míg a mikoparaziták főként a kéregben (13. ábra).



13. ábra – A különböző funkciós csoportok (nem GTD növénypatogén, GTD növénypatogén, generalista szaprotróf, nem GTD fa szaprotróf, GTD fa szaprotróf, mikoparazita) abundanciája és fajgazdagsága a vizsgált mikroéletekben. A betűk az egyirányú ANOVA post hoc Tukey HSD teszt alapján kimutatott szignifikáns különbséget jelzik ( $p < 0,05$ ).

Ha a fajgazdagságot nézzük, a talaj volt a legváltozatosabb mikroélettér a nem GTD patogének, a generalista szaprotrófok, a nem GTD-hez köthető fa szaprotrófok és a mikoparaziták esetében. A GTD-hez köthető fa szaprotrófok és a GTD patogének a faszövetben és a kéregben voltak a legdiverzebbek. A növénypatogének ASV-i voltak a legnagyobb számban jelen a mintákban (átlag 38 ASV/minta). A tőkék egészségi állapota csak a GTD patogének esetén befolyásolta az abundancia és fajgazdagság értékeket (14.ábra). A tünetes növényekből gyűjtött mintákban magasabb abundancia és fajgazdagság értékek figyelhetők meg. Az abundancia esetén a *Botryosphaeria* és *Eutypella*, míg a fajgazdagság esetén a *Botryosphaeria*, *Eutypella* és *Fomitiporia* fajok száma volt magasabb a tünetes növényekben.



14. ábra – A GTD patogének abundanciája és fajgazdagsága a tünetes és az egészséges növényekről gyűjtött mintákban. A betűk az egyirányú ANOVA post hoc Tukey HSD teszt alapján kimutatott szignifikáns különbséget jelzik ( $p < 0,05$ ).

A szezonális változás a fa szaprotrófok abundanciáját befolyásolta, valamint a mikoparaziták és a GTD-hez köthető fa szaprotrófok fajgazdagságát. Az évszak a növénypatogének, a GTD-hez köthető fa szaprotrófok abundanciájára volt hatással, valamint a

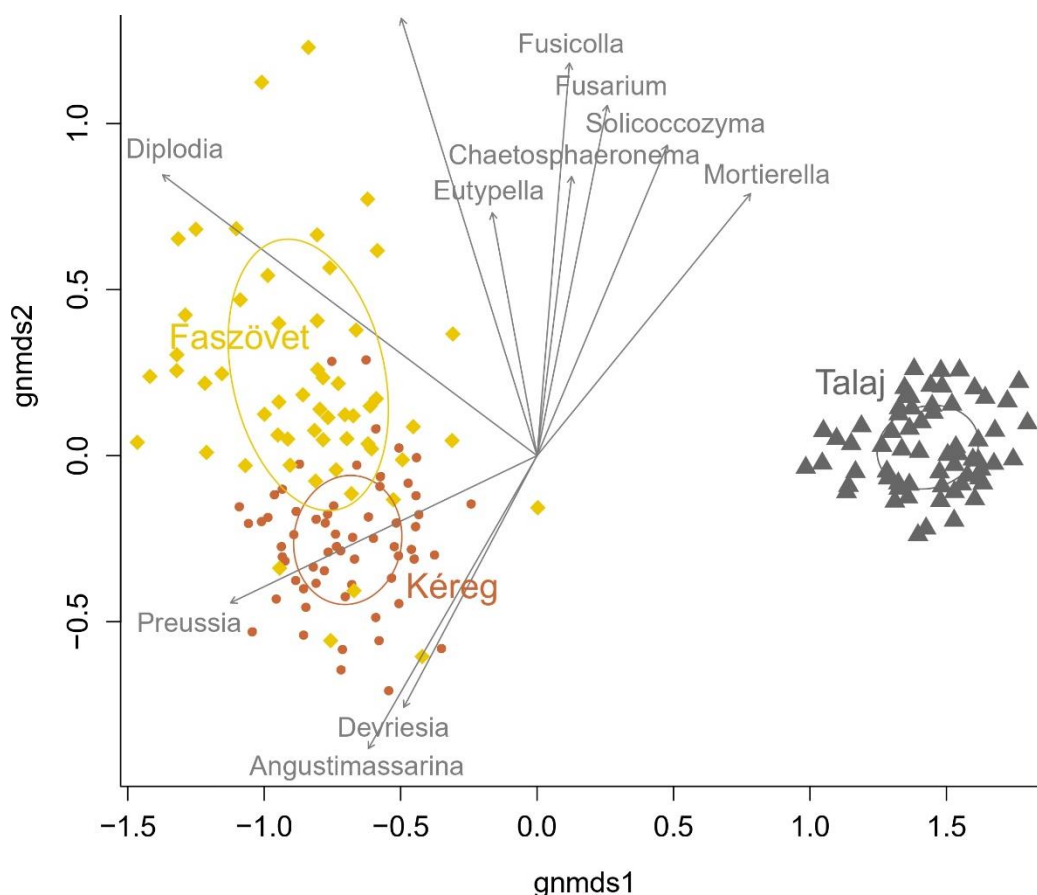
növénypatogének, a GTD patogének és a fa szaprotrófok fajgazdagságára. Az érintett csoportok abundanciája és fajgazdagsága jelentősen lecsökkent a 2021-es évben a 20-as évhez viszonyítva. Az egyetlen funkciós csoport, melyen a fajta hatás megnyilvánult, az a GTD-hez köthető fa szaprotrófok, melyek a legváltozatosabb a kékfrankosban, a legkevésbé változatosak a chardonnay-ben voltak. Összességében a mikroélettér volt a legmeghatározóbb tényező az abundancia és a fajgazdagság értékek alakításában a vizsgált funkciós csoportok esetén.

A gombaközösség összetételét nem metrikus multidimenziós skálázással ábrázoltuk az összes ASV felhasználásával, mely a stressz érték (0,1195879) szerint jó ábrázolásnak minősül (14. ábra). A PerMANOVA alapján a mikroélettér, az évjárat, a fajta és a szezonális mutatók szignifikáns korrelációt a gombaközösség szerkezetével (3. táblázat).

3. táblázat. Az Egri borvidékről származó összes mintát elemző PerMANOVA eredménye, a változókkal, a változók közötti variancia eloszlásával, p értékekkel és a szignifikancia szinttel

| Változó                  | Variancia (%) | p érték      | Szignifikancia szint |
|--------------------------|---------------|--------------|----------------------|
| <b>Mikroélettér</b>      | 3,8           | <b>0,001</b> | <b>***</b>           |
| <b>Fajta</b>             | 1,3           | <b>0,019</b> | <b>*</b>             |
| <b>Évjárat</b>           | 2,5           | <b>0,001</b> | <b>***</b>           |
| <b>Szezonális</b>        | 1,2           | <b>0,039</b> | <b>*</b>             |
| <b>Egészségi állapot</b> | 0,085         | 0,8          |                      |

A mikroélettér az eltérés 3,8%-át magyarázza, míg az évjárat 2,5%-át, a fajta 1,3%-át, szezonális 1,2%-át. A talajból vett minták egyértelműen megkülönböztethetőek a kéreg- és famintáktól, míg az utóbbi kettő átfedi egymást. Az egészségi állapot nem korrelált szignifikánsan a közösség szerkezetével, amikor az összes ASV-t együtt vizsgáltuk.



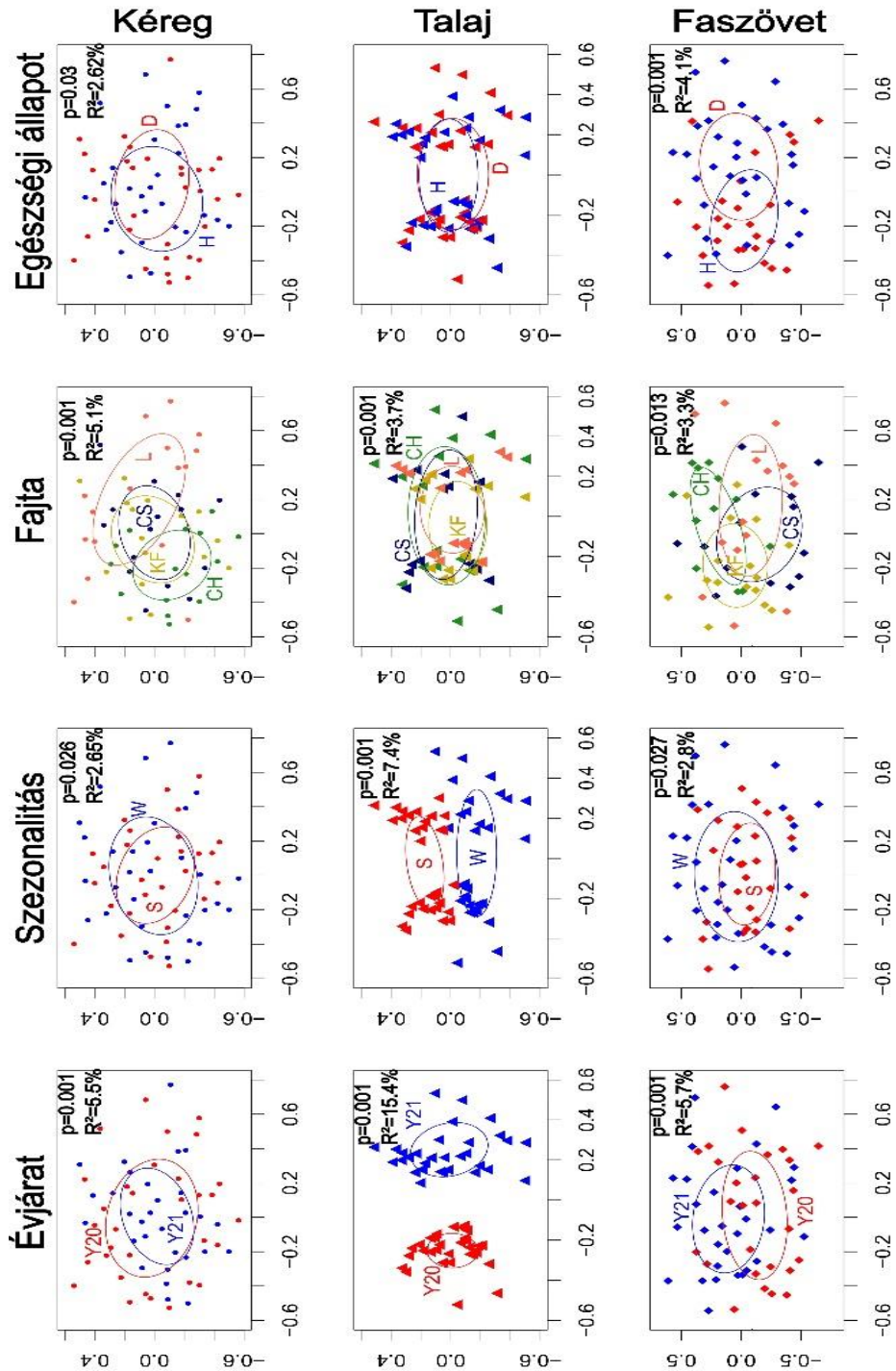
14. ábra- A nem metrikus multidimenziós skálázás (NMDS) eredményeként kapott ordinációs ábra, mely az Egri borvidékről az egészséges és Esca tünetes növényekről gyűjtött minták gombaközösségét ábrázolja az mikroéletterek alapján. Az ordináció a Bray-Curtis féle távolságon alapul, melyet az abundancia táblázatból generáltunk. Az ellipszisek az összetételbeli különbségek szórását mutatják az azonos mikroélettérből származó minták esetén, míg a nyilak a 11 legváltozatosabb nemzetséget, melyek szignifikánsan korrelálnak az ordinációs tengelyekkel ( $p < 0,05$ )

Az NMDS ordinációs ábrán az a 11 legváltozatosabb nemzetség vektora látható, melyek szignifikánsan korrelálnak az ordinációs tengelyekkel, hozzájárulva a gombaközösség megfigyelt mintázatának kialakulásához. A hosszabb nyilak erősebb asszociációt jelentenek. A *Devriesia*, *Angustimassarina* és *Preussia* nemzetségek a kéregmintákban, míg a *Phaeomoniella* és a *Diplodia* főként a faszövetből gyűjtött mintákban találhatók. A *Mortierella* nemzetség általánosan a talajmintákban fordul elő.

A gombaközösség összetételét a különböző mikroéletterekben is ábráztuk kétdimenziós NMDS-sel (kéreg - stresszárték = 0,2759618; fa - stresszárték = 0,2675174; és talaj - stresszárték = 0,1908301) (15. ábra). A stressz érték azt alapján az ordinációk megfelelően összegzik a minták között megfigyelt távolságokat. A kéreg esetében a fajta, az évjárat, a szezonális és az egészségi állapot szignifikáns összefüggést mutatott ki a gombaközösség szerkezetével (4. táblázat). A kéregminták között az évjárat okozta a legnagyobb eltérést (5,53%).

4. táblázat A mintákat mikroélettereként elemző perMANOVA eredménye, a változókkal, a változók közötti variancia eloszlásával, p értékekkel és a szignifikancia szinttel.

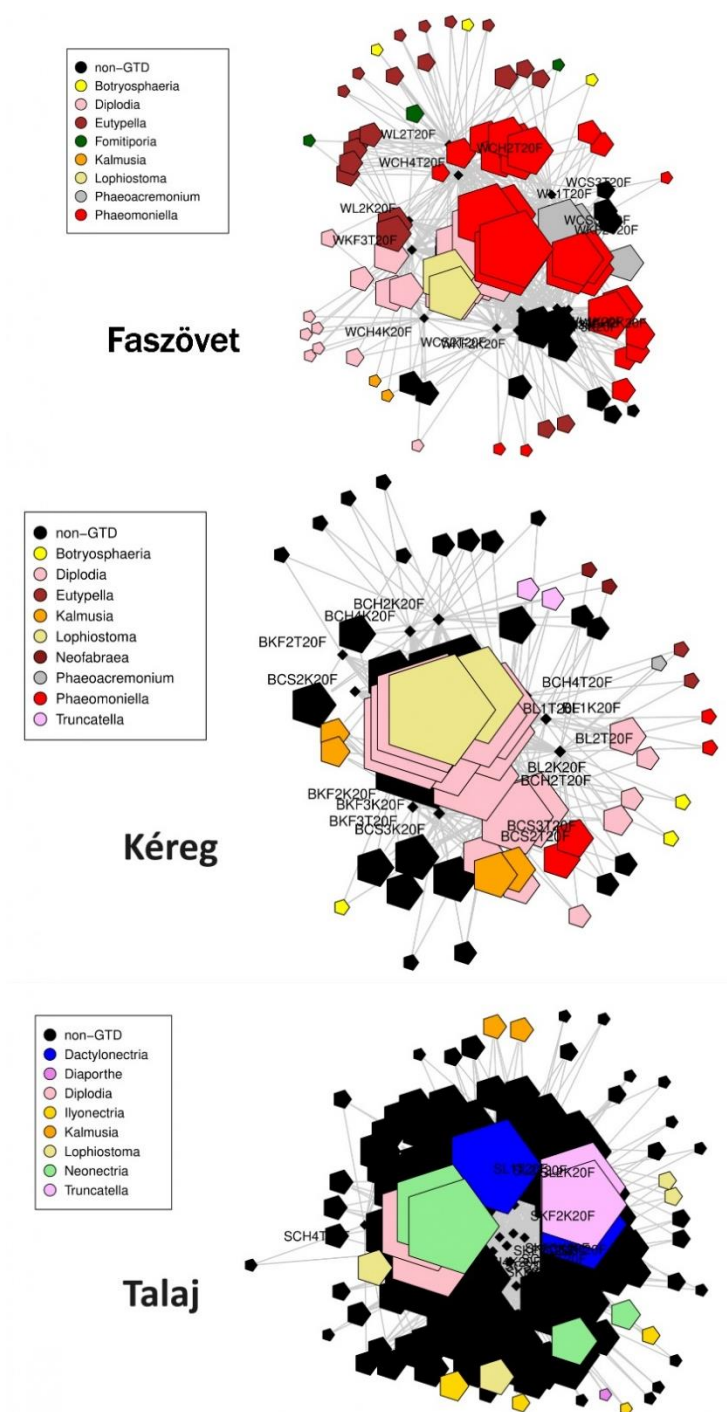
| <b>Mikroélettér</b> | <b>Változó</b>    | <b>Variancia<br/>(%)</b> | <b>p érték</b> | <b>Szignifikancia<br/>szint</b> |
|---------------------|-------------------|--------------------------|----------------|---------------------------------|
| <b>Kéreg</b>        | Fajta             | 5,07                     | <b>0,001</b>   | <b>***</b>                      |
|                     | Évjárat           | 5,53                     | <b>0,001</b>   | <b>***</b>                      |
|                     | Szezonális        | 2,65                     | <b>0,026</b>   | <b>*</b>                        |
|                     | Egészségi állapot | 2,62                     | <b>0,03</b>    | <b>*</b>                        |
| <b>Talaj</b>        | Fajta             | 3,69                     | <b>0,001</b>   | <b>***</b>                      |
|                     | Évjárat           | 15,4                     | <b>0,001</b>   | <b>***</b>                      |
|                     | Szezonális        | 7,4                      | <b>0,001</b>   | <b>***</b>                      |
|                     | Egészségi állapot | 1,2                      | 0,896          |                                 |
| <b>Faszövet</b>     | Fajta             | 3,28                     | <b>0,013</b>   | <b>*</b>                        |
|                     | Évjárat           | 5,7                      | <b>0,001</b>   | <b>***</b>                      |
|                     | Szezonális        | 2,76                     | <b>0,027</b>   | <b>*</b>                        |
|                     | Egészségi állapot | 4,1                      | <b>0,001</b>   | <b>***</b>                      |



15. ábra – A mikroéletterenként elvégzett nem metrikus multidimenziós skálázás (NMDS) eredményeként kapott ordinációs ábrák, melyek az Egri borvidékről származó minták mikrobiom összetételét ábrázolják az évjárat, szezonális, fajta és egészségi állapot szerint a különböző mikroéletterekben. Az ordináció a Bray-Curtis féle távolságon alapul, melyet az abundancia táblázat alapján generáltunk. Az ellipszisek az összetételbeli különbségek szórását mutatják a vizsgált tényezők szerint az azonos mikroéletterből származó minták esetén. Minden ábrán feltüntettük az  $R^2$  és p értékeket. Az  $R^2$  a variációt (%) jelöli a hozzátartozó p értékekkel

A kéregben a két fehér fajta (chardonnay, leányka) mikrobiomjának összetétele szinte teljesen eltért. A talajban az évjárat, a fajta és az évszak korrelált a gombaközösség szerkezetével. A talajminták között a legnagyobb eltérést az éves változás magyarázta, (15,4%), a talaj gombaközösségének összetétele teljesen eltért a két vizsgált évben. A faszövet esetében minden tényező szignifikáns korrelációt mutatott a közösség szerkezetével, itt is az évjárat volt a legmeghatározóbb változó (5,7%). Összességében, az évjárat volt a legnagyobb hatással a mikroélettereken belül a vizsgált mikroéletterekre, különösen igaz ez a talaj esetében, ahol igen nagy eltolódást idézett elő a 2021-es évjáratban a 20-as évjárhoz képest.

Az egri első mintagyűjtésből származó hálózatanalízis (16.ábra) alapján láthatjuk, hogy a faszövetben a *Phaeomoniella* és *Diplodia* fajok dominálnak, szinte minden mintában jelen vannak, akárcsak a Tokaji borvidéken. Azonban míg Tokajban a *Seimatosporium* fajok is szerves részét képezik a faszövetnek, addig Egerben teljesen hiányoznak. A nem GTD patogének aránya hasonló a faszövetben mindkét mintagyűjtési területen. A kéreg esetén a *Phaeomoniella*, *Diplodia*, *Neofabraea* fajok mindkét borvidéken, míg Egerben a *Truncatella*, *Phaeoacremonium*, *Eutypa*, *Kalmusia* és *Lophiostoma* fajok kizárólag Egerben, addig a *Seimatosporium*, *Diaporthe* és *Phoma* fajok kizárólag Tokajban fordulnak elő. Mindkét mintagyűjtési helyen a kéreg már több nem GTD patogén ASV-t tartalmazott, mint a faszövet. A talajban található a legtöbb, nem GTD-hez köthető patogén mindkét borvidék esetében. Érdekes módon a *Diaporthe* fajok az Egri borvidéken csak a talajban vannak jelen, illetve a GTD kórokozók több ASV-ben vannak jelen a talajban az Egri borvidéken, mint a Tokaji borvidéken, főként a *Dactylonectria*, *Neonectria*, *Diplodia* és *Truncatella* fajok.



16. ábra Az Egri borvidéken (1. mintagyűjtés) vizsgált különböző mikroéletterekben fellelhető növénypatogén ASV-k eloszlása hálózatanalízissel ábrázolva. Az ötszögek mérete arányos az ASV-k előfordulásával (minél nagyobb az ötszög, annál több mintából azonosítottuk az ötszöget reprezentáló ASV-t). A GTD patogén ASV-k különböző színekkel, míg a nem GTD ASV-k feketével vannak jelölve. A mintanevek az mikroéletttereket (B-kéreg, W-faszövet, S-talaj), a vizsgált fajtákat (CH - chardonnay, CS- cabernet sauvignon, KF – kékfrankos, L - leányka), a minta számát, és az egészségi állapotot (H - egészséges, D - tünetes) jelölik.

Az Egri borvidék DNS-metabarcoding adatsorából végzett vizsgálatunk az első olyan átfogó tanulmány, mely a szőlő mikrobiomjára ható különböző tényezőket, mint például a mikroéletteret, a szezonalitást, az évjáratot, a fajtát és az egészségi állapotot vizsgálja. Eredményeink alapján a szőlő gombaközösségének összetétele jobban különbözik a talaj és a vizsgált növényi részek között, mint a vizsgált szezonok, évjáratok, fajták vagy éppen az egészségi állapot között, ahogyan ezt a Tokaji borvidéken is megállapítottuk. A talaj mikrobiomjának összetételbeli változékonysága a legnagyobb mértékben abiotikus tényezőkkel (évjárat, szezonális) korrelál, míg a biotikus tényezők (fajta, egészségi állapot) hatása hangsúlyosabb a szőlővel közvetlen kapcsolatban lévő gombaközösség esetén.

Amikor az összes mintát együtt analizáltuk, a talaj gombaközösségének összetétele jelentősen eltért a kéreg és a faszövet mikrobiom összetételétől, míg a növényi részek hasonló mikrobiom összetétellel rendelkeztek. Ez azt jelenti, hogy a vizsgált mikroélettérek egyedi gomba közösségnek adnak életteret, ahogy ezt a növénypatogének esetén a Tokaji borvidéken is megállapítottuk. SWIFT és mtsai (2021) is ugyanerre a következtetésre jutottak. Amikor az egri adatsort az mikroélettérek alapján elemeztük, azt tapasztaltuk, hogy az évjárat gyakorolta a legnagyobb hatást a gombaközösség összetételére, különösen a talajban, míg a szezonális, fajta és egészségi állapot hatása a mikroélettértől függően változott. A talajban a szezonális hatása is számottevően megjelent. A fajta a kéreg esetén meghatározó tényező volt, míg a faszövet esetén az egészségi állapot jelentős varianciát okozott a minták között. FOTIOS és mtsai (2021) arra következtetésre jutottak, hogy a faszövetben élő mikrobiom összetételére a legnagyobb mértékben a fajta hat, magyarázva a minták közötti eltérés 23%-át. A fajta, mint befolyásoló tényező, különböző módon mutatkozhat meg, így például befolyásolhatja a genetikai

változatosságot, a szállítószövetek szerkezetét, vagy éppen a fiziológiai változékonyságot. Mindezen tényezők hozzájárulhatnak a mikroorganizmusok összetételének formálásához.

Az Egri borvidéken a talajban megmutatkoztak az évjárat hatásai, az évjárat volt a minták közötti különbségek fő mozgatórugója. Ezen megállapításunk összhangban van AGUILAR és mtsai (2020) eredményeivel, akik az évjáratot a talaj mikrobiális közösséget meghatározó tényezőként azonosították. A 2021-es évjáratban jelentős változást tapasztaltunk a talaj mikrobiális közösségének összetételében, érintve számos vizsgált funkciós csoport diverzitását is. 2021-ben a diverzitás értékek jelentősen csökkentek, valószínűleg a szárazabb évjárat következtében, a csapadék mennyiségének lecsökkenése főként a vegetációs időszak során június és július hónapokban volt szembetűnő (2. melléklet (M2) - 2. ábra).

Ez a diverzitás csökkenés magyarázhatja a közösség összetételének változását, mivel a szárazságtűrő fajok túlélhették a kedvezőtlen körülményeket. PAPADOPOULOU és mtsai (2022) is vizsgálták többek között az évjárat hatását, és azt találták, hogy a szőlőn élő epifita gombák diverzitására és összetételére az évjárat nagyobb hatással van, mint a szezonális. Az Egri borvidéken az adataink alapján elmondhatjuk mi is, hogy az évjárat nagyobb hatással volt a gombák abundanciájára, fajgazdagságára, valamint a közösség összetételére, mint a szezonális.

A GTD patogének abundanciája a növényi részekben volt a legmagasabb, míg a generalista szaprotrófok a talajban voltak a legváltozatosabbak. Ezen megfigyelésünk összhangban van DEL PILAR MARTÍNEZ-DIZ és mtsai (2019) eredményeivel. Habár az általuk elvégzett vizsgálatok az endoszférára összpontosítottak, DEL PILAR MARTÍNEZ-DIZ és mtsai a kórokozók esetében alacsonyabb, míg a szaprotrófok esetében magasabb abundanciát figyeltek meg a talaj esetén, a növényi részekkel

ellentétben. Esetünkben a generalista szaprotrófok, a mikoparaziták, a nem GTD-hez köthető fa szaprotrófok, a nem GTD patogének, és az összes gombát figyelembe véve, a talaj volt a legváltozatosabb mikroélettér, ami azt sugallja, hogy a gombák csak korlátozottan képesek kolonizálni a növényi részeket, valószínűleg részben az abiotikus környezeti körülmények, valamint a növény védekezési mechanizmusának köszönhetően.

A növénypatogének abundanciája és fajgazdagsága megegyezett az Esca tünetes és a tünetmentes növények között mind az Egri, mind a Tokaji borvidék esetén. Azonban a Tokaji borvidékkel ellentétben az Egri borvidéken a GTD kórokozók nagyobb abundanciát és diverzitást mutattak a tünetes növényekben, mint a tünetmentesekben. Ez ellentmond a Tokaji borvidéken végzett vizsgálatunk eredményeinek, ahol nem találtunk különbséget a tünetes és tünetmentes növények növénypatogén gombaközössége között. Ez a különbség annak tulajdonítható, hogy a Tokaji borvidéken elvégzett tanulmányunk egyetlen időpontban történt mintavételezésen alapult, egyetlen szőlőfajtáról (furmint) három terroirban, egy másik borvidéken. MOTA LEAL és mtsai (2024) nemrégiben publikáltak egy cikket a Tokaj borvidékről a négy mintagyűjtés adatait felhasználva, és arra a következtetésre jutottak, hogy a növényi kórokozók abundanciája különbözik az egészséges és az Esca-beteg növények között. Ahogy MOTA LEAL a Tokaji borvidéken, úgy mi is az Egri borvidéken jóval nagyobb mintaszámmal dolgoztunk, mint a tokaji adatelemzés során, ami lehetővé tette, hogy érzékenyebb kapcsolatokat is felfedezzünk a környezeti tényezők és a mikrobiom között.

Az Egri borvidéken a különbséget elsősorban a *Botryosphaeria* és *Eutypella* fajok abundanciája befolyásolta. A *Botryosphaeria* fajok esetében a tünetes növényekben két nagyságrenddel több szekvenciát azonosítottunk az egészséges növényekhez

képest. Emellett a *Botryosphaeria*, *Eutypella* és *Fomitiporia* fajok sokkal változatosabbak voltak az Esca tünetes növények esetén.

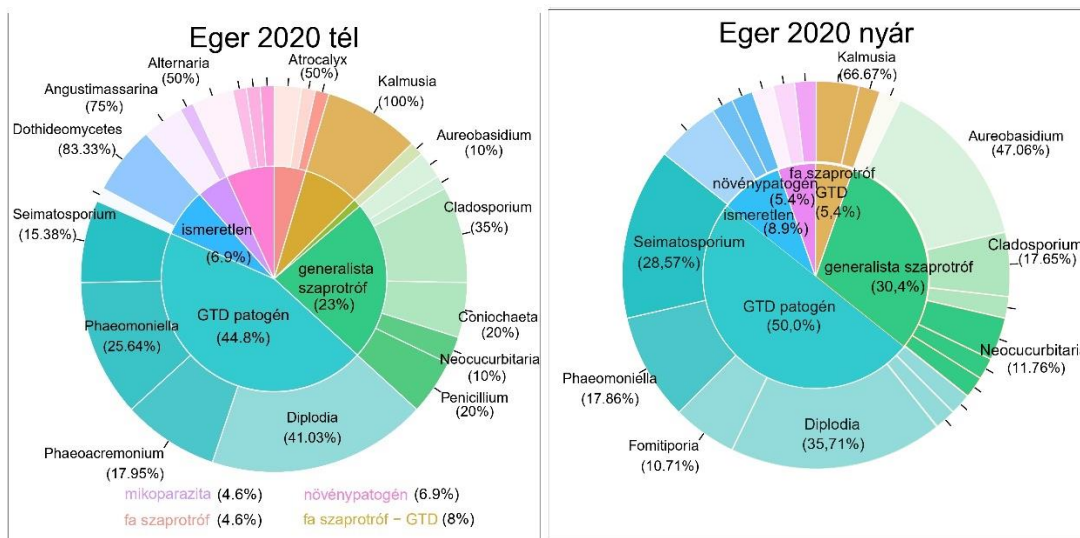
A mikoparaziták tekintetében olyan fajokat azonosítottunk, melyeket korábban biokontroll ágensként írtak le a GTD kórokozók ellen mind Magyarországon, mind külföldön (KOVÁCS et al., 2021; MUTAWILA et al., 2011; ÚRBEZ-TORRES et al., 2020; SILVA-VALDERRAMA et al., 2021). A leírt fajokon kívül számos olyan nemzetség ASV-jét azonosítottunk főként a kéregben, és bizonyos mértékig a faszövetben is, melyeket még nem vizsgáltak lehetséges biokontroll szervezetként a GTD ellen. Ezen eredményeink lehetőséget adnak új, potenciális biokontroll fajok keresésére irányuló kutatásokra.

Összességében láthattuk, hogy az Egri borvidéken is a különböző növényi részek és a talaj eltérő mikrobiális közösségnek adnak életteret, jelentős hatással vannak a mikrobiom abundanciájára, fajgazdagságára és összetételére. Amikor a mikroélettereket külön is megvizsgáltuk, az évjárat mellett az egészségi állapot és a fajta befolyása is nyilvánvalóvá vált a mikrobiom összetételének alakításában. Az évjáratot vizsgálva pedig láthattuk, hogy a szélsőséges időjárási körülmények, mint például a szárazság, jelentős hatást gyakorolhatnak a mikrobiom sokféleségére.

### 5.3 A faszövetből történő hagyományos izolálás eredménye

Az újgenerációs molekuláris elemzési eljárások mellett mind a két borvidéken sikerült hagyományos eljárással is gombatörzseket izolálnunk. Az egy csészéről hasonló morfológiai paraméterekkel rendelkező gombák szelektálását követően Egerben 227, míg Tokajban 180 izolátumot sikerült tisztatenyészetbe vonni.

Az Egri borvidéken sikerült mind a négy mintagyűjtésből hagyományos eljárással gombákat tenyészteni a faszövetből. A 2020-as évben a GTD patogéneket izoláltuk a legnagyobb számban, mind a téli mind a nyári időszakban. A GTD patogének közül a téli időszakban a *Diplodia* fajok nőttek fel a faszövetből, illetve a *Phaeomoniella* és *Phaeoacremonium* fajok (18. ábra). Nyáron a *Diplodia* fajok mellett több *Seimatosporium* fajt is izoláltunk, valamint a *Fomitiporia* fajok is megjelentek. A funkciós csoportok arányai a két szezonban nagyjából megegyeztek.

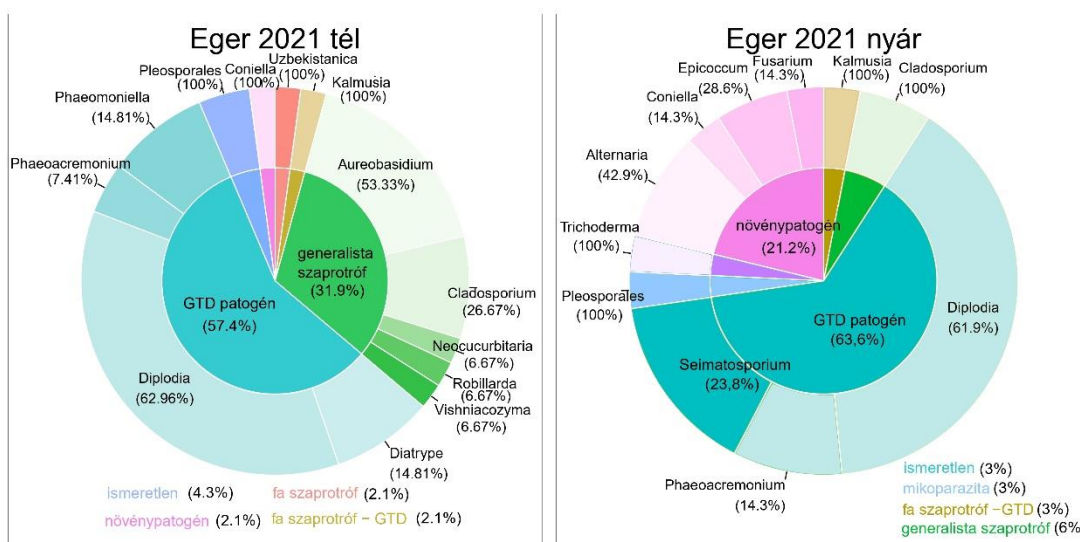


18. ábra – A tenyésztési izolálás eredménye az Egri borvidék esetén a 2020-as év téli és nyári időszakában. A kördiagramm belső részén a funkciós csoportok aránya, a külső részén a funkciós csoportokon belül az azonosított nemzetségek aránya látható.

Nagy számban izoláltunk még *Aureobasidium* fajokat, illetve *Cladosporium* fajokat is. Az *Aureobasidium pullulans* egy élesztő-szerű gomba, mely a szőlő

mikrobiomjának általános tagja, a szőlő föld alatti és föld feletti részeiből rendszeresen izolálják (SABATE et al., 2002; PINTO et al., 2014; PINTO et al., 2018). A *Cladosporium* fajokat egyes országokban a szőlő kórokozójaként tartják számon, például Chilében akár 50%-os terméseszkökenést és a bor minőségének romlását okozhatják, ha megfertőzik a bogyót (BRICENO et al., 2007, 2008, LATORRE et al., 2011).

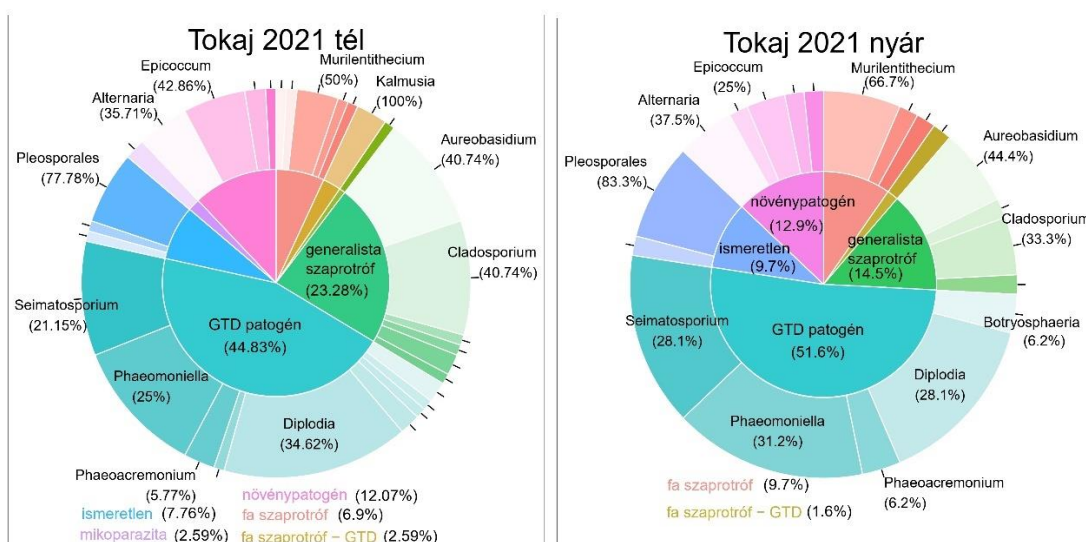
A mikoparaziták közül az *Angustimassarina* fajok jelentek meg a téli időszakban. Ezeket a fajokat eddig egy esetben izolálták szőlőről (KOLARÍK et al., 2023). Érdekes lehet ezen fajok életmódját a későbbiekben vizsgálni a szőlőn.



19. ábra - A tenyésztési izolálás eredménye az Egri borvidék esetén a 2021-es év téli és nyári időszakában. A kördiagramm belső részén a funkciós csoportok aránya, a külső részén a funkciós csoportokon belül az azonosított nemzetségek aránya látható.

A 2021-es évben az Egri borvidékről nagyobb százalékban izoláltunk GTD patogéneket, a nyári szezonban az izolátumok több, mint 60%-át GTD patogénként azonosítottuk (19. ábra). Ahogy a 2020-as évben, a 2021-es évben is a GTD patogének nagy részét a *Diplodia* fajok tették ki. A *Seimatosporium* fajokat csak nyáron tudtuk izolálni 2021-ben. Szintén nyáron izoláltunk egy *Trichoderma* fajt is, melynek

mikoparazitikus tulajdonságait a GTD kórokozók ellen számos tanulmány vizsgálta. A 2021-es év téli időszakában izoláltunk *Aureobasidium* fajokat, azonban a nyári mintákból nem azonosítottunk egyet sem. Itt megjelentek az *Alternaria* fajok is, melyek elsődlegesen növénypatogének, de számos tanulmány szerint az *Alternaria* nemzetség tagjai a szőlő leggyakoribb endofitái közé tartoznak (MOLNÁR et al., 2023). Az *Alternaria* fajokat évszaktól, régiótól függetlenül az *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium* és *Penicillium* fajok mellett számos alkalommal kimutatták mind tenyésztéses, mind tenyésztéstől független technikákkal szőlő esetén. A télen izolált *Vishniacozyma* fajt újgenerációs technikákkal már azonosították szőlőről (YANG et al., 2023). A *Vishniacozyma victoriae* antagonisztikus hatását mutatták ki számos gombával szemben, amikor biokontroll ágensként alkalmazták bio körte tárolási betegségei ellen (GORORDO et al., 2022). Az újgenerációs szekvenálás alapján *Seimatosporium* fajokat nem azonosítottunk az Egri borvidékről egyik mintagyűjtésből sem, míg a tenyésztés során számos *Seimatosporium* fajt azonosítottunk, mind a 2020-as mind a 2021-es évben.



20. ábra - A tenyésztéses izolálás eredménye az Egri borvidék esetén a 2020-as év téli és nyári időszakában. A kördiagramm belső részén a funkciós csoportok aránya, a külső részén a funkciós csoportokon belül az azonosított nemzetségek aránya látható.

A 2021-es évben a Tokaji borvidéken is izoláltunk gombákat a faszövetből (20. ábra). A minták legnagyobb részét, körülbelül a 40-50%-át itt is a GTD patogének tették ki mindkét szezonban. A GTD patogének közül a *Diplodia* fajok mellett nagy számban izoláltunk *Phaeomoniella* és *Seimatosporium* fajokat. Az *Alternaria* fajok mindkét szezonban megjelentek, ahogy az *Epicoccum*, *Cladosporium* és *Aureobasidium* fajok is.

A tenyésztéses izolálással nagyságrendekkel kevesebb gombát tudtunk azonosítani az újgenerációs szekvenáláshoz képest, azonban láthatjuk, hogy sikerült olyan fajokat is izolálni a tenyésztéssel, mely a szekvenálás esetén nem jött elő. A 2020-as és 21-es évben az Egri borvidéken *Seimatosporium* fajokat, a 2021-es évben szintén az Egri borvidékről egy *Uzbekistanica* fajt, melyek az analízishez felhasznált újgenerációs szekvenálással nyert adatsorokban nem találtunk. Hozzánk hasonlóan STEFANI és mtsai (2015) is találtak eltérést szénhidrogénnel szennyezett talaj mikrobiális közösségében a tenyésztéstől független és tenyésztéses technika alkalmazásakor.

A DNS kivonáshoz és a tenyésztéses izoláláshoz ugyanazon faszövetből fűrt minta egy-egy részét használtuk fel. A mintagyűjtés az első kritikus lépése az azonosítási folyamatnak, mellyel biztosítjuk a minta épségét és stabilitását. Habár LAUBER és mtsai (2010) azt állították, hogy a terepi körülmények között gyűjtött mintákból elvégzett újgenerációs szekvenálás eredményét nem befolyásolja a különböző időtartamú tárolás, későbbi tanulmányok rámutattak a mintagyűjtés körülményeinek fontosságára, a minta azonnali feldolgozása vagy stabilizálása, illetve a feldolgozásig megfelelően történő tárolása elengedhetetlen lépés (CHOO et al., 2015; MATHAY et al., 2015; PANEK et al., 2018). Előfordulhat, hogy más paraméterekkel elvégzett DNS kivonás az újgenerációs szekvenálás felbontását növelheti, ugyanis a különböző DNS-

kivonási módszerek eltérő eredményt hozhatnak a mikrobiális közösség szerkezetéről, ahogy azt talaj esetén vizsgálta ZIELIŃSKA és mtsai (2017).

A DNS-kivonási módszer kiválasztása befolyásolhatja a DNS-minta tisztaságát és integritását. A mintában található szennyeződések vagy a lebomlott DNS zavarhatják a szekvenálási reakciókat, amely megbízhatatlan eredményhez vezethet. A kinyert DNS mennyisége is nagyon fontos az újgenerációs szekvenálás esetén. Ezt a szekvenáló cégek meg is fogalmazzák kritériumként, esetünkben legalább 20 µg/ µl koncentrációjú mintákat szekvenáltak. Elégtelen mennyiségű DNS esetén alacsony lesz a lefedettség.

#### 5.4 A *Clonostachys rosea* 19B/1-es törzzsel végzett *in planta* teszt eredménye

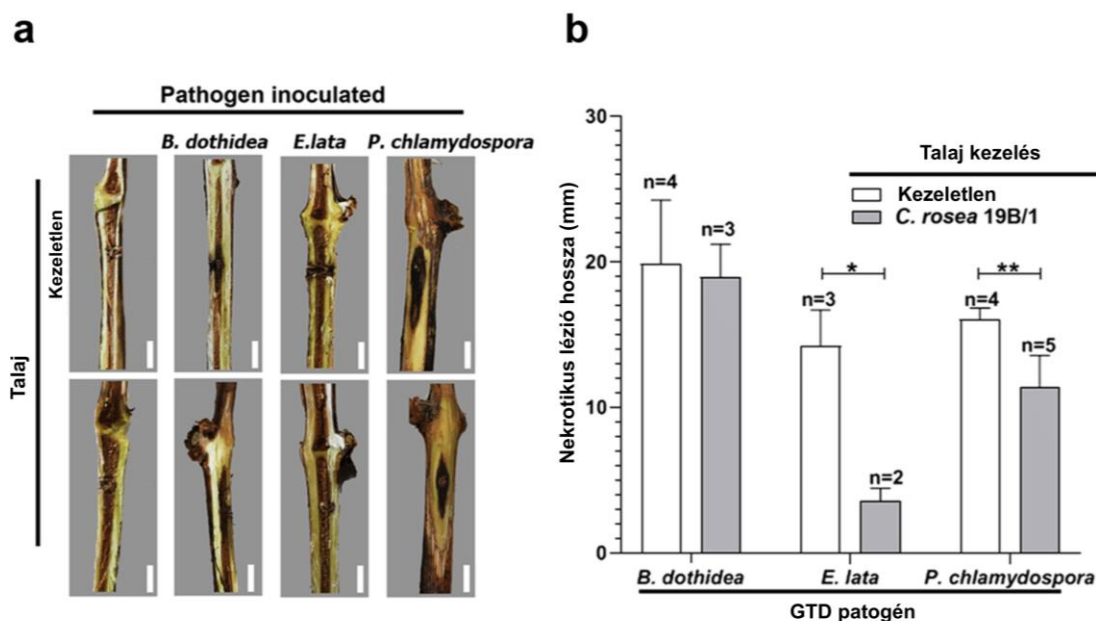
A *C. rosea* hatását a GTD tünetek megjelenésére egy éves cabernet sauvignon dugványokon vizsgáltuk. A dugványokat sebeztek, majd a xilémbe inokuláltuk a *B. dothidea*, *E. lata* és a *P. chlamydospora* növekvő micéliumait. A dugványokat kezeletlen és a *C. rosea* 19B/1-es törzs spóráival kezelt földbe ültettük, majd 90 napig inkubáltuk őket üvegházi körülmények között (21. ábra)



21. ábra – A 90 napos inkubációt követően a kezelt (bal oldal) és a kezeletlen (jobb oldal) földbe

ültetett cabernet sauvignon dugványok állapota. Forrás: saját felvétel.

Az inkubációt követően nekrotikus léziókat figyeltünk meg a dugványokon (22. ábra), míg a nem fertőzött dugványok nem mutatták ezt a tünetet.



22. ábra. (a) A cabernet sauvignon dugványokon, 90 napos inkubációt követően kialakult elhalás, melyet az *E. lata*, *B. dothidea* és *P. chlamydospora*-val történő fertőzés idézett elő. Az alsó sor a *C. rosea* 19B/1-es törzsszel inokulált földből származó dugványokat ábrázolja (skála - 1cm). (b) A kezeletlen és a *C. rosea*-val kezelt talajban nevelt dugványokon mért elhalás átlag hossza és a szórás. Az oszlopok felett lévő számok az öt fertőzött dugványból származó tünetes növények számát jelölik, a csillagok pedig a szignifikáns különbséget (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ ).

Az *E. lata* és *B. dothidea* esetében mélyen a fa szövetében nekrotikus léziók alakultak ki, míg a *P. chlamydospora* a faszövetet közvetlenül a kéreg alatt nekrotizálta (22/a ábra). Az *E. lata* és *P. chlamydospora* által okozott nekrotikus léziók hossza szignifikánsan csökkent a *C. rosea*-val kezelt talajban, a *B. dothidea*-val fertőzött növények esetében a betegség súlyossága nem változott (22/b ábra).

A *C. rosea* 19B/1-es törzs visszaizolálása a kórokozóval nem fertőzött dugványok esetén alulról felfelé csökkenő tendenciát mutatott. A dugványok alapjáról 5 növény esetén háromból, az internódusz közepén 5 növényből egyszer sikerült visszaizolálni a törzset, a sebzésből azonban nem sikerült a visszaizolálás. A 19B/1-es törzs

menyisége egy nagyságrendet nöött a talajban 90 napos üvegházi inkubáció után. Fontos, hogy a *C. rosea*-val kezelt talaj a sebzett, de nem fertőzött dugványokon semmiféle negatív hatást nem okozott.

Az eredményeink alapján elmondható, hogy a *C. rosea* erőteljes antagonisztikus hatást mutat egyes GTD kórokozók ellen, a gomba antibiotikus és mikoparazitikus képességeinek köszönhetően. Az elvégzett *in planta* konfrontációs teszt eredménye azt sugallja, hogy a *C. rosea* hatékonyan alkalmazható a talajban a GTD tünetek kialakulásának megelőzésére a szőlő esetén. Alkalmazhatósága elsősorban az oltványiskolákban lenne ajánlatos, hiszen amennyiben képes kolonizálni az oltványt és ott hosszútávon fennmaradni, akkor GTD kórokozók elleni hatása már az ültetvény telepítése előtt érvényesülne.

Azt már korábban is kimutatták, hogy a *C. rosea* antagonisztikus hatást gyakorol a *P. chlamydospora* ellen (SILVA-VADERRAMA et al., 2021), azonban antibiózist nem említettek ebben a tanulmányban. Az általunk elvégzett vizsgálat az első beszámoló arról, hogy a *C. rosea* antagonisztikus hatást gyakorol az *E. lata*-ra. SILVA-VALDERRAMA és mtsai a *Botryosphaeriaceae* családba tartozó *D. seriata* és *N. parvum* fajok esetében igazolta a *C. rosea* antibiotikus aktivitását. Az általunk vizsgált, a *Botryosphaeriaceae* családba tartozó *B. dothidea* ellen ezt az antibiotikus hatást nem tapasztaltuk. Ennek oka valószínűleg a fiziológiai polimorfizmus mind a patogén, mind a *C. rosea* esetén. A továbbiakban érdemes lehet olyan *C. rosea* törzseket szelektálni, melyek jobban sporulálnak. Az intenzív sporuláció előnyös, mert általában a konídiumokat használják a növények kezelésére, a magasabb sporuláció pedig költséghatékonyabb előállítást eredményez a biokontroll faj esetében. A hatékony spóra termelő törzsek valószínűleg ellenállóbbak, és jobban eloszlanak a kezelt területen.

Fontos megjegyezni, hogy a biokontroll faj antibiotikus aktivitásáért felelős vegyületek általában másodlagos anyagcseretermékek. Ezen anyagok általában a gomba növekedésének állófázisában keletkeznek, a konídium keletkezésével párhuzamosan (CALVO et al., 2002). Tekintve, hogy a GTD kórokozói a szőlő vaszkuláris szövetében telepsznek meg, az ellenük felhasználni kívánt bármely biokontroll faj alkalmazhatósága erősen függ a biokontroll faj vaszkuláris szövetben történő növekvő képességétől. A *C. rosea* kolonizáló képességét korábban már igazolták dinnyén (CHATTERTON et al., 2008), illetve jelenlétét észlelték szőlőben is (SCHROERS 2001; COSOVEANU et al., 2014; AKGÜL és AHIOĞLU 2019). Az általunk elemzett egri és tokaji adatsorunkban is azonosítottunk *Clonostachys* ASV-eket, melyek főként a talajban, de kisebb mértékben a kéregben és a faszövetben is jelen voltak.

*In planta* kísérletünk esetén képesek voltunk a *C. rosea*-t újraizolálni az ültetőközegeből, eszerint a 19B/1-es izolátum sikeresen megtelepedett a talajban, száma egy nagyságrenddel nőtt az inkubáció végére. A 19B/1-es izolátum eltérő mértékben telepedett meg a dugvány különböző részeiben. A dugvány alapját hatékonyan kolonizálta, míg a felső részét kevésbé. Ennek oka lehet a törzs eltérő hatékonysága a különböző GTD kórokozók ellen, amit az *in planta* kísérletben is megfigyeltünk.

A *C. rosea* jelentősen gátolta az elhalás kialakulását az *E. lata* és a *P. chlamydospora* esetén, mely fajok érzékenyek a *C. rosea* antibiotikus hatására. Ez arra utal, hogy a *C. rosea* antibiotikus vegyületeket választ ki a talajban vagy a dugványok alapjánál található vaszkuláris szövetekben, és ezek a vegyületek a xilémen keresztül szállítódnak az inokulált kórokozókhoz. Egy másik lehetséges mód, amely a kórokozó gátlásához vezethet közvetlen kontakt nélkül, az a növény *C. rosea* által indukált védelmi mechanizmusa. Ezt a jelenséget korábban bizonyították a paradicsom *Botrytis*

*cinerea*-val történő fertőzése esetén (MOUEKOUBA et al., 2014). Az, hogy a *C. rosea* nem tudta kolonizálni a dugványok felső részeit, megmagyarázza hatástalanságát a *B. dothidea* ellen, amely faj nem érzékeny a *C. rosea* antibiotikus hatására, de érzékeny a mikoparazitizmusra. Az antagonizmus utóbbi megnyilvánulása, a mikoparazitizmus, az élősködő és a préda közötti fizikai kapcsolat kialakítását igényli, amely nem valósulhatott meg az inkubációs időszak alatt a dugványokban a *C. rosea* viszonylag lassú növekedése miatt. Azonban a *C. rosea* alkalmazása hatékony védelmet eredményezhet a *B. dothidea* ellen, amennyiben hosszabb idő áll rendelkezésre a szőlő kolonizációjához.

Összességében elmondható, hogy a *C. rosea* jelentős potenciállal bír, hatékony biokontroll ágens lehet a GTD számos kórokozója ellen. A korábbi *in vitro* eredmények és az *in planta* eredményeink egybehangzóan sugallják, hogy a gyakorlatban inkább a *C. rosea* által termelt antifungális vegyületek fontosabbak, mint maga a mikoparazitizmus, bár utóbbi is ígéretes hosszútávú stratégia lehet, ha a *C. rosea* szisztematikus kolonizációját lehetővé tudjuk tenni a szőlőtőkében.

## 6. Következtetések és a javaslatok

A Tokaji borvidékről származó eredmények újszerű megközelítésből vizsgálják a szőlő mikrobiom összetételbeli dinamikáját, kiemelve a növénypatogének diverzitását, abundanciáját és eloszlását a vizsgált életterekben, egészséges és Esca tünetes növények esetén. Az általunk kiértékelt adatok bizonyítják, hogy igen nagy összetételbeli különbség van a talaj és a növényi részek növénypatogén gombaközösségében, akár egy növényen belül is. A GTD patogének a tőkében és kéregben dominálnak, míg a nem GTD patogének a talajban. A GTD patogének ugyanolyan diverzitást és abundanciát, valamint eloszlást mutatnak a tünetmentes és a tünetes növényekben nemcsak taxonómiaiilag, hanem a genetikai változatosságot tekintve is. A terroir-specifikus környezeti tényezők meghatározó befolyással bírnak a növénypatogén gombaközösség összetételére mindhárom vizsgált élettérben, azonban nagyobb hatással vannak a talajban élő növénypatogének összetételére, mint a faszövetben élőkre.

A Tokaji borvidékhez hasonlóan az Egri borvidéken is láthattuk, hogy a talaj és a szőlő általunk vizsgált részei különböző mikrobiális közösségnek adnak élettérrel. Annak köszönhetően, hogy több funkciós csoportot vizsgáltunk, láthattuk, hogy nemcsak a növénypatogének abundanciája, diverzitása és összetétele, hanem számos funkciós csoporté teljesen eltér a vizsgált mikroéletterekben. A mikroélettereket egyenként vizsgálva arra a következtetésre jutottuk, hogy az évjárat mellett egészségi állapot, és a fajta is hatással van a mikrobiális összetételre. A környezeti tényezők is kritikus szerepet játszanak, valamint az extrém időjárási feltételek, például egy aszályos év, hozzájárulhat a mikrobiom diverzitásának csökkenéséhez. A Tokaji borvidék eredményeivel ellentétben az Egri borvidéken az egészséges és a tünetes növényekben a GTD kórokozók abundanciája és fajgazdagsága között eltérést tapasztaltunk, mely

eltérést a *Botryosphaeria*, *Eutypella* és *Fomitiporia* fajok adták. A tünetes növényekben az említett kórokozók abundanciája és fajgazdagsága nagyobb volt. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a Tokaji borvidéken csak egy fajtát vizsgáltunk, és egy mintagyűjtés eredményeit elemeztük ki. Ahogyan több kutató is felveti, a patogének abundancia változása állhat a tünetek kialakulásának hátterében, mely hipotézist az egri adatelemzéssel mi is meg tudjuk erősíteni.

A GTD tünetek kialakulásának teljes megértéséhez azonban további tanulmányokra van szükség. A folyamat feltárása holisztikus megközelítést igényel, mely az egész szőlő mikrobiomját vizsgálja, ugyanis a mikrobiális interakciók kulcsfontosságú szerepet játszhatnak a tünetek kialakításában. Nemcsak a gomba-gomba kölcsönhatások, hanem a gomba – baktérium, gomba – vírus, valamint a mikrobiom – növény közötti interakciók is fontosak. Ezen interakciók vizsgálatára alkalmasak a modern "omikai" technikák, mint pl. a genomika, transzkriptomika, proteomika és metabolomika, melyek segítségével részletesen elemezhetjük a szőlő mikrobiomját, azonosíthatjuk pl. a GTD kialakulásához hozzájáruló kulcsfontosságú eseményeket, szereplőket.

Az omikai technikák mellett a hagyományos módszereket sem szabad elhagyni, egyrészt azért, mert eredményeink alapján vannak olyan gombák, melyeket a DNS-metabarcoding technikával nem tudtunk azonosítani a mintákból, míg a tenyésztési eljárással igen. Másrészt a tisztatenyészetek előállításával lehetőségünk adódik arra, hogy egy adott mikroorganizmus jelenlétének igazolásán túlmenően a tisztatenyészetével további kísérleteket is végezhessünk. Ilyen például esetünkben a faszövetből történő izolálás során talált *Angustimassarina* és *Vishniacozyma* fajok, melyek más gombákon élősködhetnek. Az egri adatsorból látszik, hogy ezek a fajok, (noha az *Angustimassarina* nemzetségből csak 2 ASV-t azonosítottunk, míg a

*Vishniacozyma* nemzetségből 40 ASV-t), nagyobb mennyiségben az egészséges szőlőkön, és az azokat övező talajban voltak megtalálhatóak. A továbbiakban érdemes lenne ezen fajok életmódját vizsgálni a szőlőn, és esetleges biokontroll tulajdonságaikat jellemezni a GTD-vel összefüggésbe hozható gombák ellen.

A *Clonostachys rosea*-t is egy korábbi munkánk során izoláltuk, amikor oltványok mikrobiomját vizsgáltuk hagyományos tenyésztési módszerrel. Az oltványokból több törzset is képesek voltunk azonosítani. A jövőben akár ugyanezen faj más törzseit, vagy akár a fent említett fajokat is lehetne vizsgálni a GTD kórokozók ellen mind *in vitro*, mind *in planta* kísérletekben, majd a jól teljesítő törzseket szabadföldi kísérletekben is. De ehhez elengedhetetlen a mikoparazitikus tulajdonsággal rendelkező gombák, vagy akár antibiotikus hatással rendelkező élesztők, baktériumok szőlőről történő izolálása.

A mikrobák közötti interakciók megértése, valamint a mikrobiomra gyakorolt környezeti hatások vizsgálata nagyon fontos. Egy egységes megközelítés, mely magába foglalja a növényvédelmi gyakorlatokat, a mikrobiális ökológiát és a szőlőtermesztést, nem csak azért fontos, hogy megértsük a GTD kialakulását, valamint a mikrobiális interakciók kulcsfontosságú szerepét, hanem a fenntartható szőlőtermesztés és a betegségek megelőzése, kezelése érdekében is. Ezen tényezők összetett együttműködésének mélyebb megértésével a szőlőtermesztők és borászok azon dolgozhatnak, hogy megőrizzék a szőlő egészségét, támogassák a mikrobiális sokféleséget, és végül olyan borokat készítsenek, amelyek magukba foglalják minden évjárat egyedi jellemzőit.

## 7. Új tudományos eredmények

1. A Tokaji borvidéken megállapítottam, hogy nagyobb különbség található a növényi részek és a talaj patobiomjában, mint az egyes növények között, legyenek ezek Esca- tünetesek vagy tünetmentesek. Emellett a talaj és a növény terroir – specifikus patobiommal rendelkezik, mely nagyobb mértékben a talajban nyilvánul meg.

2. Az Egri borvidéken a vizsgált funkciós csoportok (nem GTD patogén, GTD patogén, generalista szaprotróf, nem GTD fa szaprotróf, GTD fa szaprotróf, mikoparazita) abundanciájára és fajgazdagságára, valamint a mikrobiom összetételére a mikroélettér (talaj, faszövet, kéreg) volt a legnagyobb hatással. A GTD korokozók abundanciája és fajgazdagsága nagyobb volt a tünetes növények esetén, melyet az abundancia esetében a *Botryosphaeria* és *Eutypella* fajok, a fajgazdagság esetében a *Botryosphaeria*, *Eutypella* és *Fomitiporia* fajok okoztak.

3. Az Egri borvidéken a vizsgált tényezők közül – évjárat, fajta, szezonális, egészségi állapot – az évjárat volt a legnagyobb hatással a mikrobiom összetételére, amikor az mikroélettérek (talaj, faszövet, kéreg) együttesen elemeztem. Az mikroélettérek egyenként vizsgálva megmutatkozott az egészségi állapot és a fajta hatása is. A talaj mikrobiomjának összetételbeli változékonysága a legnagyobb mértékben abiotikus tényezőkkel (évjárat, szezonális) korrelált, míg a biotikus tényezők (fajta, egészségi állapot) hatása hangsúlyosabb volt a szőlővel közvetlen kapcsolatban lévő gombaközösség esetén.

4. A *Clonostachys rosea*-t sikeresen alkalmaztam biokontroll fajként *Eutypa lata* és *Phaeomoniella chlamydospora* fajok ellen *in planta* kísérletben cabernet sauvignon dugványok esetén.

5. Az általunk elvégzett kísérletek igazolták először, hogy a *Clonostachys rosea* antagonisztikus hatást gyakorol az *Eutypa lata*-ra. A *Clonostachys rosea* hatékonyan alkalmazható a talajban a GTD tünetek kialakulásának megelőzésére szőlő esetén

6. A faszövet tenyésztéses izolálása során olyan fajokat izoláltam, melyek egyrészt az újgenerációs szekvenálás során nem jöttek elő, illetve potenciális biokontroll fajként izoláltunk *Angustimassarina* és *Vishniacozyma* fajokat a GTD kórokozók ellen

## 8. Összefoglalás

A szőlő nemcsak Magyarországon fontos mezőgazdasági növény, világszerte 7 millió hektáron termesztik. Rengeteg kórokozó fertőzi, ezek közül a szőlő korai elhalása (GTD) az egyik legsúlyosabb gombás betegség, mely ugyanúgy érinti a fiatal és az idősebb ültetvényeket is, hatalmas károkat okozva a bortermelőknél. A betegség több csoportra osztható a tünetek megjelenése és a kórokozók taxonómiai besorolása alapján. Az egyik alcsoportja az Esca komplex. Ezek a gombák a szőlő faszövetét kolonizálják, ott lokális elhalást okozhatnak, az általuk termelt anyagcseretermékek eljuthatnak a növény zöld részeibe, a betegségcsoportokra jellemző tüneteket előidézve.

Az utóbbi négy évtizedben számos tanulmány foglalkozott a GTD-vel, azonban a betegség lefolyása, valamint, hogy milyen faktorok befolyásolják a kialakulását, máig nem tisztázott. A tanulmányok nagy része a hagyományos tenyésztési technikákra alapult, azonban a technika korlátjai a GTD hatásmechanizmusának megértését nagyban befolyásolja. Az újgenerációs technikák elterjedésével a mikrobiális közösségek jellemzése nagymértékben leegyszerűsödött.

Doktori munkám során a DNS-metabarcoding technika alkalmazásával jellemeztük a szőlő és az azt övező talaj mikrobiális közösségét mind taxonómiai mind funkcionális szempontból, valamint vizsgáltuk, hogy milyen tényezők hatnak erre a közösségre. Vizsgálatainkat két borvidéken végeztük. A Tokaji borvidéken 2020. februárjában három dűlőben vizsgáltuk a szőlő patobiomját a kéregben, a faszövetben és a talajban Esca-tünetes és tünetmentes Furmint növények esetén. A Tokaji borvidéken a talaj és a növényi részek patobiom összetételében jelentős eltérések vannak, akár ugyanazon növényen belül is. A GTD patogének a növényi részekben (kéreg, faszövet), míg a nem GTD patogének elsősorban a talajban találhatók. Érdekes módon a GTD

patogének hasonló diverzitást és eloszlást mutattak a tünetmentes és a tüneteket mutató növényekben, mind taxonómia, mind a diverzitás szempontjából. A terroir, a termőföld hatása is megmutatkozott a patobiom összetételén, főként a talaj esetén, azonban kisebb mértékben a faszövet és a kéreg patobiomját is befolyásolta.

Az Egri borvidéken a Tokaji borvidéken vizsgált tényezők mellett (egészségi állapot, mikroélettér) lehetőségünk nyílt további tényezők mikrobiomra gyakorolt hatását vizsgálni, így a szezonális, az évszám és a fajta hatását. 2020. februárban és augusztusban, illetve 2021. februárban és augusztusban 4 fajtáról (kékfrankos, leányka, cabernet sauvignon, chardonnay) gyűjtöttünk kéreg és faszöveti mintákat Esca tünetes és egészséges növényekről, valamint a növényeket övező talajból. A tényezők hatását több funkciós csoport esetén vizsgáltuk a DNS metabarcoding technikával (növényi kórokozók, a GTD kórokozók, mikoparaziták, GTD-hez köthető fa szaprotrófok, generalista szaprotrófok és fa szaprotrófok).

A Tokaji borvidék eredményeihez hasonlóan az Egri borvidéken is a növényi kórokozók, elsősorban a GTD kórokozók a kéregben és a faszövetben domináltak. A mikoparaziták és a GTD-hez köthető fa szaprotrófok a kéregben voltak főként jelen, a generalista szaprotrófok a talajban. A diverzitás a talajban volt a legnagyobb. A Tokaji borvidékkel ellentétben az Egri borvidéken az egészségi állapot hatással volt a GTD kórokozók abundanciájára és fajgazdagságára, a tünetes növényekben sokkal magasabb értékeket figyeltünk meg. Az abundancia többletet a *Botryosphaeria* és *Eutypella* fajok, míg a diverzitás többletet a *Botryosphaeria*, *Eutypella* és *Fomitiporia* fajok adták. Ez alátámasztja azt a hipotézist, mely szerint a GTD patogének látens patogének, melyek bizonyos körülmények hatására opportunistává válnak. A szezonális minimálisan befolyásolta a funkciós csoportok diverzitását. A fajta csak a GTD-hez köthető fa szaprotrófok fajgazdagságára volt hatással.

A szőlő mikrobiom összetétel elemzése alapján az évjárat volt az elsődleges befolyásoló tényező a talajban, de a növényi részek mikrobiomjára is számottevő hatással bírt. A funkciós csoportokat a mikroélettér is befolyásolta, egyedi mikrobiom összetétel jellemezte a különböző mikroélettereket. Eredményeink kiemelik a mikrobiomra hatást gyakorló mikroélettér kritikus szerepét, valamint értékes információt adnak arról, hogy a különböző tényezők hogyan befolyásolják a szőlő mikrobiomját.

A GTD-t illetően jelenleg nem áll a szőlőtermelők rendelkezésére hatékony vegyszeres védelem. A jó mezőgazdasági gyakorlatokkal a fertőzés mérsékelhető, azonban ez munka-, és pénzigényes. A biokontroll növényvédelem egy ígéretes megoldás lehet. A diplomamunkám során a *Clonostachys rosea*-t jellemeztük, mint biokontroll fajt a szőlő korai elhalását előidéző számos kórokozó ellen *in vitro* kísérletekben. Az *in vitro* kísérletek eredményeit felhasználva, a doktori munkám részeként *in planta* kísérleteket is elvégeztünk üvegházi körülmények között.

Ennek során megállapítottuk, hogy a *C. rosea* erőteljes antagonisztikus hatást mutat egyes GTD kórokozók ellen, mely hatásért a gomba antibiotikus és mikoparazitikus képességei felelősek. Elsőként igazoltuk a *C. rosea* antagonisztikus hatását *E. lata* ellen. Az *in planta* konfrontációs teszt eredménye alapján a *C. rosea* hatékonyan alkalmazható a talajban a GTD tünetek kialakulásának megelőzésére a szőlő esetén. A felhasználása elsősorban az oltványiskolákban lenne ajánlatos, amennyiben képes kolonizálni az oltványt és ott hosszútávon fennmaradni, akkor GTD kórokozók elleni hatása már az ültetvény telepítése előtt érvényesülne.

A faszövetből történő izolálás során láthattuk, hogy habár a hagyományos tenyésztéssel nagyságrendekkel kevesebb mikrobát tudtunk azonosítani, nem lehet csak a DNS metabarcoding technikára hagyatkozni. Egyrészt képesek voltunk olyan

fajokat izolálni, mely az újgenerációs szekvenálás során nem jöttek elő, másrészt a tisztatenyészetben fenntartott mikrobák lehetőséget adnak további vizsgálatokra is, legyen az egy új biokontroll faj a GTD ellen, vagy éppen szőlőről eddig nem izolált faj jellemzése, amellyel, ha növénypatogén, patogenitási tesztek is lehet végezni.

## 9. Summary

Grapevine is an important crop not just in Hungary, it is cultivated on 7 million hectares globally. Numerous pathogens infect it, with grapevine trunk diseases (GTD) being one of the most severe fungal diseases, affecting both young and old vineyards and causing significant damage to the wine producers. The disease consists of several groups based on the appearance of the symptoms and the taxonomic classification of the different pathogens. One of the most destructive syndromes is Esca complex. These fungi colonize the grapevine's woody tissues, causing local necrosis and producing metabolites that can reach the plant's annual parts, leading to various symptoms characteristic of the different syndromes.

In the last four decades, several studies have focused on GTD, but the progression of the disease and the factors influencing the disease development remain still unclear. Most studies have relied on culture-based techniques, but the limitations of these techniques greatly affect the understanding of GTD's mechanisms. With the spread of next-generation techniques, the characterization of microbial communities has become more straightforward.

In my doctoral research, we characterized the microbial communities of grapevines and the surrounding soil using DNA metabarcoding, examining both taxonomic and functional aspects. We investigated the factors influencing these communities in two wine regions.

In the Tokaj wine region, we studied the grapevine pathobiome in the bark, wood, and soil of Esca-symptomatic and asymptomatic Furmint plants in three vineyards. Significant differences were observed in the pathobiome composition between the soil and plant parts, especially in the bark and wood. GTD pathogens were found in plant

tissues (bark, wood), while non-GTD pathogens were mainly present in soil. Interestingly, GTD pathogens showed similar diversity and distribution in symptomatic and asymptomatic plants, in terms of taxonomy and genetic diversity as well. The impact of terroir was evident in the pathobiome composition of soil, but also influenced the pathobiome of wood and bark to a lesser extent.

In the Eger wine region, in addition to the factors studied in Tokaj (health state and microhabitat), we investigated the effects of several other factors such as seasonality, vintage, and cultivar on the mycobiome.

Bark and wood samples were collected from Esca-symptomatic and asymptomatic plants, as well as soil from the surrounding of the plants in February and August of 2020 and 2021 from four cultivars (kékfrankos, leányka, cabernet sauvignon, chardonnay). We examined the impact of these factors on various functional groups (plant pathogens, GTD pathogens, mycoparasites, GTD-associated wood saprotrophs, generalist saprotrophs, and wood saprotrophs).

Similarly to the Tokaj wine region, plant pathogens, especially GTD pathogens dominated in the bark and wood. Mycoparasites and GTD-associated wood saprotrophs were mainly present in bark. Generalist saprotrophs were found in soil. Overall, soil was the most diverse compartment. Unlike in Tokaj, health state did affect the abundance and richness of GTD pathogens in Eger, with higher values observed in symptomatic plants. In terms of abundance, *Botryosphaeria* and *Eutypella* species, while in terms of diversity, *Botryosphaeria*, *Eutypella* and *Fomitiporia* species showed higher values. This supports the hypothesis that GTD pathogens are latent pathogens that, under certain conditions, become opportunistic. Seasonality minimally influenced the diversity of the functional groups, and cultivar only affected the richness of GTD-associated wood saprotrophs.

The analysis of the grapevine mycobiome composition revealed that vintage was the primary influencing factor in the soil, but it also had a significant impact on the mycobiome of plant parts. The different functional groups were affected by microhabitats, these microhabitats harbour unique mycobiome composition. Our results highlight the critical role of the microhabitat in influencing the mycobiome and provide valuable information on how various factors affect the grape mycobiome.

Currently grape growers do not have an effective chemical treatment against GTD. While infection can be mitigated with good agricultural practices, this approach is labor and resource-intensive. Biocontrol plant protection could be a promising solution. Previously in my Master thesis, I characterized *Clonostachys rosea* as a biocontrol species against various pathogens causing GTD in *in vitro* experiments. Subsequently, using the results of *in vitro* experiments, we conducted *in planta* experiments as part of my doctoral research under greenhouse conditions.

We found that *C. rosea* exhibited a strong antagonistic effect against certain GTD pathogens, attributed to its antibiotic and mycoparasitic capabilities. We first confirmed the antagonistic effect of *C. rosea* against *E. lata*. Based on the results of the *in planta* confrontation tests, *C. rosea* can be effectively applied in the soil to prevent the development of GTD symptoms in case of grapevines. Its use is recommended primarily in nurseries, as it can colonize and persist on the cuttings, exerting its effects even before the plantation of a new vineyard.

During the isolation from the woody tissue, we observed that although we identified significantly fewer fungal species with culture-based techniques, relying solely on DNA metabarcoding techniques is not sufficient. On one hand, we were able to isolate species that did not appear during next-generation sequencing, and on the other hand, maintaining fungi in pure culture in the laboratory allows us to do for further

investigations. This could involve testing new biocontrol species against GTD as we mentioned, or the characterization of species not isolated from grapevines before. If the species is a plant pathogen, it opens up the possibility of conducting pathogenicity tests too.

## 10. Mellékletek

### M1. Irodalomjegyzék

1. ABEYWICKRAMA, P.D., ZHANG, W., LI, X., JAYAWARDENA, R.S., HYDE, K.D., YAN, J. (2021). *Campylocarpon fasciculare* (Nectriaceae, Sordariomycetes); Novel emergence of Black-foot causing pathogen on young grapevines in China. In: Pathogens. 10, 1555. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121555>
2. AFRIDI, M.S., ALI, S., SALAM, A., CÉSAR TERRA, W., HAFEEZ, A., SUMAIRA ALI, B., S. ALTAMI, M., AMEEN, F., ERCISLI, S., MARC, R.A., MEDEIROS, F. H. V. (2022). In: Plant Microbiome Engineering: Hopes or Hypes. Biology, 11, 1782. <https://doi.org/10.3390/biology11121782>
3. AGLER, M.T., RUHE, J., KROLL, S., MORHENN, C., KIM, S-T., WEIGEL, D., KEMEN, E.M. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. In: PLoS Biol, 14, e1002352.
4. AGUILAR, M. O., GOBBI, A., BROWNE, P. D., ELLEGAARD-JENSEN, L., HANSEN, L. H., SEMORILE, L., PISTORIO, M. (2020). Influence of vintage, geographic location and cultivar on the structure of microbial communities associated with the grapevine rhizosphere in vineyards of San Juan Province, Argentina. In: PLOS ONE 15(12): e0243848.
5. AGUSTÍ-BRISACH, C. & ARMENGOL, J. (2013). Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. In: Phytopathol. Mediterr. 245-261.

6. AKGÜL, D. S., & AHIOĞLU, M. (2019). Fungal pathogens associated with young grapevine decline in the Southern Turkey vineyards. In: BIO web of conferences (Vol. 15, p. 01027). EDP Sciences.
7. ANDOLFI, A., MUGNAI, L., LUQUE, J., SURICO, G., CIMMINO, A., & EVIDENTE, A. (2011). Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. In: Toxins, 3, 1569-1605.
8. ARNOLD, A.E., MEJÍA, L.C., KYLLO, D., ROJAS, E.I., MAYNARD, Z., ROBBINS, N. HERRE, E.A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. In: PNAS 100, 15649-15654.
9. AZCÓN-AGUILAR, C., BAREA, J. (1997). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. In: Mycorrhiza 6, 457–464. <https://doi.org/10.1007/s005720050147>
10. BAHMANI, Z., ABDOLLAHZADEH, J., AMINI, J. EVIDENTE, A. (2021). *Biscogniauxia rosacearum* the charcoal canker agent as a pathogen associated with grapevine trunk diseases in Zagros region of Iran. In: Sci Rep 11, 14098. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93630-w>
11. BALDRIAN, P. (2019). The known and the unknown in soil microbial ecology. In: FEMS Microbiol Ecol. 95, fiz005
12. BEHJATI, S. & TARPEY, P.S. (2013). What is next generation sequencing? In: Arch. Dis. Child. Educ Pract. Ed. 98, 236-238. 10.1136/archdischild-2013-304340.
13. BÉNARD-GELLON, M., FARINE, S., GODDARD, M.L., SCHMITT, M., STEMPIEN, E., PENSEC, F., LALOUE, H., MAZET-KIEFFER, F., FONTAINE, F., LARIGNON, P. AND CHONG, J. (2015). Toxicity of extracellular proteins from

*Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* involved in grapevine Botryosphaeria dieback. In: Protoplasma, 252, 679-687.

14. BENÍTEZ, T., RINCÓN, A. M., LIMÓN, M. C., CODÓN, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. In: International Microbiology. 7 249-260.

15. BERENDSEN, R.L., PIETERSE, C.M.J., BAKKER, P.A.H.M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. In: Trends Plant Sci. 17, 478-486.

16. BERTSCH, C., LARIGNON, P., FARINE, S., CLÉMENT, C., & FONTAINE, F. (2009). The spread of grapevine trunk disease. In: Science, 324(5928), 721-721.

17. BERTSCH, C., RAMÍREZ-SUERO, M., MAGNIN-ROBERT, M., LARIGNON, P., CHONG, J., ABOU-MANSOUR, E., SPAGNOLO, A., CLÉMENT, C., FONTAINE, F. (2013). Grapevine trunk diseases: Complex and still poorly understood. In: Plant Pathol., 62, 243–265.

18. BISSON, M., HOUEIX, N., HULOT, C., LACROIX, G., LEFEVRE, J.P., LEVEQUE, S., MAGAUD, H., MORIN, A. (2006). Arsenic et ses Dérivés Inorganiques. Verneuil-en-Halatte, France: INERIS; Fiches de Données Toxicologiques et Environnementales des Substances Chimiques.

19. BLAALID, R., KUMAR, S., NILSSON, R. H., ABARENKOV, K., KIRK, P. M., KAUSERUD, H. (2013). ITS 1 versus ITS 2 as DNA metabarcodes for fungi. In: Molecular ecology resources, 13(2), 218-224.

20. BOKULICH, N. A., THORNGATE, J. H., RICHARDSON, P. M. MILLS, D. A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. In: PNAS, 111, E139-E148.

21. BRICEÑO, E. X. & LATORRE, B. A. (2007). Outbreaks of *Cladosporium* rot associated with delayed harvest wine grapes in Chile. In: Plant Dis., 91, 1060-1060.
22. BRICEÑO, E. X., & LATORRE, B. A. (2008). Characterization of *Cladosporium* rot in grapevines, a problem of growing importance in Chile. In: Plant Dis., 92(12), 1635-1642.
23. BROWN, A.A., LAWRENCE, P., BAUMGARTNER, K. (2019). Role of basidiomycete fungi in the grapevine trunk disease esca. In: Plant Pathol., 69, 205-220. <https://doi.org/10.1111/ppa.13116>
24. BRUEZ, E., VALLANCE, J., GERBORE, J., LECOMTE, P., DA COSTA, J. P., GUERIN-DUBRANA, L., REY, P. (2014). Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. In: PLoS one, 9(5), e95928.
25. BRUEZ, E., VALLANCE, J., GAUTIER, A., LAVAL, V., COMPANT, S., MAURER, W., SESSITSCH, A., LEBRUN, M.H., REY, P. (2020). Major changes in grapevine wood microbiota are associated with the onset of esca, a devastating trunk disease. In: Environ. Microbiol., 22, 5189-5206.
26. BRUGALI, L. (2009). Materials and methods for vineyard plant. Teatro In: Naturale International year 1 (1). utolsó elérés: 2023.11.01.
27. BRUNO, G. & SPARAPANO, L. (2007). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L. V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. In: Physiol. Mol. Plant Pathol., 71, 210-229.
28. BULGARELLI, D., SCHLAEPI, K., SPAEPEN, S., VER LOREN VAN THEMAAT, E., SCHULZE-LEFERT, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. In: Annu. Rev. Plant Biol., 64: 807-838.

29. BUTTS, C. T. (2008). Social network analysis with sna. In: J. Stat. Softw., 24, 1-51.
30. CALLAHAN, B. J., MCMURDIE, P. J., ROSEN, M. J., HAN, A. W., JOHNSON, A. J. A., HOLMES, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. In: Nat. Methods, 13, 581-583.
31. CALVO, A. M., WILSON, R. A., BOK, J. W., KELLER, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development In: MMBR, 66, 447-459.
32. CARDOT, C., MAPPA, G., LA CAMERA, S., GAILLARD, C., VRIET, C., COUTOS-THÉVENOT, P. (2019). Comparison of the molecular responses of tolerant, susceptible and highly susceptible grapevine cultivars during interaction with the pathogenic fungus *Eutypa lata*. In: Frontiers in Plant Sci., 10, 991.
33. CASTILLO-PANDO, M., SOMERS, A., GREEN, C.D., PRIEST, M., SRISKHANTADES, M. (2001). Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Hunter Valley of New South Wales. In: Australas. Plant Pathol. 30, 59–63.
34. CHATTERTON, S., JAYARAMAN, J., PUNJA, Z. K. (2008). Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. In: Biol. Control 46. 267-278. 10.1016/j.biocontrol.2008.02.007
35. CHATTERTON, S., & PUNJA, Z. K. (2009). Chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. In: Canadian J. of Microbiol., 55, 356-367. 10.1139/w08-156
36. CHOO, J. M., LEONG, L. E., ROGERS, G. B. (2015). Sample storage conditions significantly influence faecal microbiome profiles. In: Sci. Rep. 5

37. COISSAC, E., RIAZ, T., PUILLANDRE, N. (2012). Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. In: Mol. Ecol., 21, 1834-1847.
38. COMPANT, S., BRADER, G., MUZAMMIL, S., SESSITSCH, A., LEBRIHI, A., MATHIEU, F. (2013). Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. In: BioControl 58, 435–455. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9479-6>
39. COMPANT, S., SAMAD, A., FAIST, H., SESSITSCH, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. In: J. Adv. Res., 19, 29-37.
40. COSOVEANU, A., GIMENEZ-MARIÑO, C., CABRERA, Y., HERNANDEZ, G., CABRERA, R. (2014). Endophytic fungi from grapevine cultivars in Canary Islands and their activity against phytopatogenic fungi. In: Internat. J. of Agriculture and Crop Sci., 7, 1497.
41. CROUS, P.W., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., RHEEDER, J., MARASAS, W.F., PHILIPS, A.J., ALVES, A., BURGESS, T., BARBER, P. AND GROENEWALD, J.Z. (2006). Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. In: Stud. Mycol. 55, 235–53.
42. DE CÁCERES, M., LEGENDRE, P., WISER, S. K., BROTONS, L. (2012). Using species combinations in indicator value analyses. In: Methods Ecol. Evol., 3, 973-982.
43. DEL FRARI, G., GOBBI, A., AGGERBECK, M. R., OLIVEIRA, H., HANSEN, L. H., FERREIRA, R. B. (2019). Characterization of the wood mycobiome of *Vitis vinifera* in a vineyard affected by esca. Spatial distribution of

fungal communities and their putative relation with leaf symptoms. In: Front. in Plant Sci., 10, 910.

44. DEL PILAR MARTÍNEZ-DIZ, M., ANDRÉS-SODUPE, M., BUJANDA, R., DÍAZ-LOSADA, E., EICHMEIER, A., GRAMAJE, D. (2019). Soil-plant compartments affect fungal microbiome diversity and composition in grapevine. In: Fungal Ecol., 41, 234-244.

45. DI MARCO S., MAZZULLO A., CALZARANO F., CESARI, A. (2000). The control of esca: status and perspectives. In: Phytopathol. Mediterr., 39, 232-240

46. DUFRÊNE, M. & LEGENDRE, P. (1997). Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. In: Ecol. Monogr., 67, 345-366.

47. DULA, T., KAPPES, E. M., HORVATH, A., RABAI, A. (2007). Preliminary trials on treatment of esca-infected grapevines with trunk injection of fungicides. In: Phytopathol. Mediterr., 46, 91-95.

48. EDGAR, R. (2010). Usearch. Lawrence Berkeley National Lab. (LBNL), Berkeley, CA (United States).

49. ELBRECHT, V., VAMOS, E. E., MEISSNER, K., AROVIITA, J., LEESE, F. (2017). Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. In: Methods in Ecology and Evolution, 8, 1265-1275.

50. ELENA, G. & LUQUE, J. (2016). Pruning debris of grapevine as a potential inoculum source of *Diplodia seriata*, causal agent of Botryosphaeria dieback. In: Eur. J. Plant Pathol., 144, 803-810.

51. FATEMA, U., BROBERG, A., JENSEN, D. F., KARLSSON, M. DUBEY, M. (2018). Functional analysis of polyketide synthase genes in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea*. In: Sci. Rep. 8, 15009
52. FAUST, K. & RAES, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. In: Nat. Rev. Microbiol. 10, 538–550.
53. FISCHER, M. & PEIGHAMI ASHNAEI, S. (2019). Grapevine, esca complex, and environment: the disease triangle. In: Phytopathol Mediterr, 58, pp.17-37.
54. FLEURAT-LESSARD, P., LUINI, E., BERJEAUD, J. M., ROBLIN, G. (2014). Immunological detection of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungal pathogen found in esca disease. In: Eur. J. Plant Pathol., 139, 137-150.
55. FONTAINE, F., GRAMAJE, D., ARMENGOL, J., SMART, R., NAGY, Z.A., BORGO, M., REGO, C. AND CORIO-COSTET, M.F. (2016). Grapevine trunk diseases. A review. In: OIV Publications, 24 p., 2016, 979-10-91799-60-7. fahal-01604038f
56. FOTIOS, B., SOTIRIOS, V., ELENA, P., ANASTASIOS, S., STEFANOS, T., DANAE, G., GEORGIA, T., ALIKI, T., EPAMINONDAS, P., EMMANUEL, M. AND GEORGE, K. (2021). Grapevine wood microbiome analysis identifies key fungal pathogens and potential interactions with the bacterial community implicated in grapevine trunk disease appearance. In: Environ. Microbiome, 16, 1-17.
57. GIANINAZZI, S., GOLLOTTE, A., BINET, M.N., VAN TUINEN, D., REDECKER, D., WIPF, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. In: Mycorrhiza 20, 519–530  
<https://doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>

58. GOBBI, A., ACEDO, A., IMAM, N., SANTINI, R.G., ORTIZ-ÁLVAREZ, R., ELLEGAARD-JENSEN, L., BELDA, I. AND HANSEN, L.H. (2022). A global microbiome survey of vineyard soils highlights the microbial dimension of viticultural terroirs. In: Commun Biol 5, 241 <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03202-5>
59. GORORDO, M. F., LUCCA, M. E., & SANGORRÍN, M. P. (2022). Biocontrol efficacy of the *Vishniacozyma victoriae* in semi-commercial assays for the control of postharvest fungal diseases of organic pears. In: Curr. Microbiol., 79(9), 259.
60. GRAMAJE, D., & ARMENGOL, J. (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: Potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. In: Plant Dis. 96, 1040-1055. DOI: 10.1016/j.jplph.2019.05.010
61. GRAMAJE, D., ÚRBEZ-TORRES, J.R., SOSNOWSKI, M.R. (2018). Managing Grapevine Trunk Diseases With Respect to Etiology and Epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. In: Plant Dis. 102, 12-39. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0512-FE>
62. GRANITI, A., SURICO, G., MUGNAI, L. (2000). Esca of grapevine. A disease complex or a complex of diseases? [*Vitis vinifera* L.]. In: Phytopathol. Mediterr.
63. GROSMAN, J. & DOUBLET, B. (2012). Maladies du bois de la vigne. Synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003-2008 au réseau d'épidémio-surveillance actuel. In: Phytoma 651, 31-35.

64. GUERIN-DUBRANA, L., FONTAINE, F., MUGNAI, L. (2019). Grapevine trunk disease in European and Mediterranean vineyards: occurrence, distribution and associated disease-affecting cultural factors. In: *Phytopathol. Mediterr.* 58, 49-71. DOI: 10.13128/Phytopathol\_Mediterr-25153
65. HALLEEN, F., SCHROERS, H. J., GROENEWALD, J. Z., CROUS, P. W. (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). In: *Stud. Mycol.*, 50, 431-455.
66. HALLEEN, F., SCHROERS H.J., GROENEWALD J.Z., REGO C. OLIVEIRA H., CROUS P.W. (2006). *Neonectria liriodendri* sp.nov., the main causal agent of blackfoot disease of grapevine. In: *Stud. Mycol.* 55: 227–234.
67. HALLEEN, F, FOURIE, P.H. CROUS, P.W. (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. In: *Plant Pathol.* 56. 637-645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01613.x>
68. HOFSTETTER, V., BUYCK, B., CROLL, D., VIRET, O., COULOUX, A., GINDRO K. (2012). What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? In: *Fungal Divers.*, 4, 51–67. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0171-z>
69. HRYCAN, J., HART, M., BOWEN, P., FORGE, T., URBEZ-TORRES, J. R. (2020). Grapevine trunk disease fungi: Their roles as latent pathogens and stress factors that favour disease development and symptom expression. In: *Phytopathol. Mediterr*, 59, 395-424.
70. IHRMARK, K., BÖDEKER, I. T., CRUZ-MARTINEZ, K., FRIBERG, H., KUBARTOVA, A., SCHENCK, J., STRID, Y., STENLID, J., BRANDSTRÖM-DURLING, M., CLEMMENSEN, K.E., LINDAHL, B. D. (2012). New primers to

amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. In: FEMS microbiology ecology, 82(3), 666-677.

71. JENSEN, B., KNUDSEN, I. M., MADSEN, M., JENSEN, D. F. (2004). Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. In: Phytopathol., 94, 551-560.

72. KARÁCSONY, Z., KNAPP, D.G., LENGYEL, SZ., KOVÁCS, G.M., VÁCZY, K.Z. (2021). The fungus *Kalmusia longispora* is able to cause vascular necrosis on *Vitis vinifera*. In: PLoS One <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258043>

73. KARLSSON, M., DURLING, M. B., CHOI, J., KOSAWANG, C., LACKNER, G., TZELEPIS, G. D., NYGREN, K., DUBEY, M.K., KAMOU, N., LEVASSEUR, A. AND ZAPPARATA, A. (2015). Insights on the evolution of mycoparasitism from the genome of *Clonostachys rosea*. In: GBE, 7, 465-480.

74. KENFAOUI, J., RADOUANE, N., MENNANI, M., TAHIRI, A., EL GHADRAOUI, L., BELABESS, Z., FONTAINE, F., EL HAMSS, H., AMIRI, S., LAHLALI, R, BARKA, E.A. (2022). A panoramic view on grapevine trunk diseases threats: Case of Eutypa dieback, Botryosphaeria dieback, and Esca disease. In: J. of Fungi, 8(6):595. <https://doi.org/10.3390/jof8060595>

75. KÖHL, J., KOLNAAR, R., RAVENSBERG, W.J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. In: Front. Plant Sci., 10 845, 10.3389/fpls.2019.00845

76. KOLAŘÍK, M., VRUBLEVSKAYA, M., KAJZROVÁ, S., KULIŠOVÁ, M., & KOLOUCHOVÁ, I. J. (2023). Taxonomic analysis reveals host preference of rare

fungi in endophytes of *Vitis vinifera* from the Czech Republic. In: Folia Microbiologica, 1-15.

77. KOTZE, C., NIEKERK, J. V., MOSTERT, L., HALLEEN, F., FOURIE P. (2011). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection, In: Phytopathol. Mediterr. 50, pp. 247–263. doi:10.14601/Phytopathol\_Mediterr-8960

78. KOVÁCS, C., CSÓTÓ, A., PÁL, K., NAGY, A., FEKETE, E., KARAFFA, L., KUBICEK, C.P., SÁNDOR, E. (2021). The biocontrol potential of endophytic *Trichoderma* fungi isolated from Hungarian grapevines. Part I. Isolation, identification and *in vitro* studies. In: Pathogens, 10(12), 1612.

79. LAHLALI, R., PENG, G. (2014). Suppression of clubroot by *Clonostachys rosea* via antibiosis and induced host resistance. In: Plant Pathol., 63, 447-455. 10.1111/ppa.12112

80. LANDI, L., MUROLO, S., ROMANAZZI, G. (2012). Colonization of *Vitis* spp. wood by sGFP-transformed *Phaeomoniella chlamydospora*, a tracheomycotic fungus involved in esca disease. In: Phytopathology, 102(3), 290-297.

81. LARIGNON, P. (2012). “Maladies cryptogamiques du bois de la vigne: symptomatologie et agents pathogènes“. <http://www.vignevin.com>. 74.

82. LAUBER, C. L., ZHOU, N., GORDON, J. I., KNIGHT, R., & FIERER, N. (2010). Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. In: FEMS microbiology letters, 307(1), 80-86.

83. LATORRE, B. A., BRICEÑO, E. X., TORRES, R. (2011). Increase in *Cladosporium* spp. populations and rot of wine grapes associated with leaf removal. In: Crop Protection, 30(1), 52-56.
84. LAWRENCE, D. P., TRAVADON, R., BAUMGARTNER, K. (2018). Novel *Seimatosporium* species from grapevine in northern California and their interactions with fungal pathogens involved in the trunk-disease complex. In: Plant Dis., 102, 1081-1092.
85. LEHOCZKY, J. (1974). Black dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. In: Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung, 9, 319-327.
86. LENGYEL, S., KNAPP, D.G., KARÁCSONY, Z. GEML, J., TEMPFLI, B., KOVÁCS, G.M. AND VÁCZY, K.Z. (2020). *Neofabraea kienholzii*, a novel causal agent of grapevine trunk diseases in Hungary. In: Eur. J. Plant Pathol. 157, 975–984 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02043-4>.
87. LETOUSEY, P., BAILLIEUL, F., BOULAY, M., CLEMENT, C., & FONTAINE, F. (2009). Alteration of photosynthesis and activation of defense in grapevine before severe esca expression. In: Phytopathol. Mediter. 48, pp. 168-168).
88. LLADÓ, S., BENADA, O., CAJTHAML, T., BALDRIAN, P., GARCÍA-FRAILE, P. (2016). *Silvibacterium bohemicum* gen. nov. sp. nov., an acidobacterium isolated from coniferous soil in the Bohemian Forest National Park. In: Syst. Appl. Microbiol. 39, 14-19.
89. LUNDBERG, D., LEBEIS, S., PAREDES, S. H., YOURSTONE, S., GEHRING, J., MALFATTI, S., TREMBLAY, J., ENGELBREKTSON, A., KUNIN,

- V., RIO, T.G.D. EDGAR, R.C. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. In: Nature 488, 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature11237>
90. LUQUE, J. GARCIA-FIGUERES, F., LEGORBURU, F.J., MURUAMENDIARAZ, A., ARMENGO, L J. TROUILLAS, F.P. (2012). Species of *Diatrypaceae* associated with grapevine trunk diseases in Eastern Spain. In: Phytopathol. Mediterr. 51, 528-540.
91. LUQUE, J., ELENA, G., GARCIA-FIGUERES, F., REYES, J., BARRIOS, G., LEGORBURU, F. J. (2014). Natural infections of pruning wounds by fungal trunk pathogens in mature grapevines in Catalonia (Northeast Spain). In: Aust. J. Grape and Wine Res., 20, 134-143.
92. MANTER, D. K., ÉS VIVANCO, J. M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. In: J. of Microbiol Methods, 71(1), 7-14.
93. MARSBERG, A., KEMLER, M., JAMI, F., NAGEL, J.H., POSTMA-SMIDT, A., NAIDOO, S., WINGFIELD, M.J., CROUS, P. W., SPATAFORA, J. W., HESSE, C.N., ROBBERTSE, B., SLIPPERS, B. (2016). *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. Mol. Plant Pathol., 18, 477-488. In: Mol. Plant Pathol. 18, p. 477-488. <https://doi.org/10.1111/mpp.12495>
94. MARTELLI, G. P. (1997) Infectious diseases and certification of grapevine. In: Options Mediterr. Ser. B 29:47-64.
95. MARTIN, F.M., UROZ, S., BARKER, D.G. (2017). Ancestral alliances: plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. In: Science 356, eaad4501.

96. MATHAY, C., HAMOT, G., HENRY, E., GEORGES, L., BELLORA, C., LEBRUN, L., DE WITT, B., AMMERLAAN, W., BUSCHART, A., WILMES, P., BETSOU, F. (2015). Method optimization for fecal sample collection and fecal DNA extraction. In: *BIO*, 13, 79-93.
97. MAUCLINE, T.H. & MALONE, J.G. (2017). Life on earth - the root microbiome to the rescue? In: *Curr. Opin. Microbiol.* 37, 23-28.
98. MCGONIGLE, T.P., MILLER, M.H., EVANS, D.G., FAIRCHILD, G.L., SWAN, J.A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: *New Phytol.* 115:495–501.
99. MENGE, J.A. (1982). Effect of soil fumigants and fungicides on vesicular-arbuscular fungi. In: *Phytopathology* 72:1125–1132
100. MEZZASALMA, V., SANDIONIGI, A., GUZZETTI, L., GALIMBERTI, A., GRANDO, M. S., TARDAGUILA, J., LABRA, M. (2018). Geographical and cultivar features differentiate grape microbiota in Northern Italy and Spain vineyards. In: *Front. Microbiol.*, 9, 946.
101. MOLNÁR, A., KNAPP, D. G., LOVAS, M., TÓTH, G., BOLDIZSÁR, I., VÁCZY, K. Z., KOVÁCS, G. M. (2023). Untargeted metabolomic analyses support the main phylogenetic groups of the common plant-associated *Alternaria* fungi isolated from grapevine (*Vitis vinifera*). In: *Sci. Rep.* 13, 19298.
102. MONDELLO, V., LARIGNON, P., ARMENGOL, J., KORTEKAMP, A., VÁCZY, K., PREZMAN, F., SERRANO, E., REGO, C., MUGNAI, L., FONTAINE, F. (2018). Management of Grapevine Trunk Diseases: Knowledge transfer, current strategies and innovative strategies adopted in Europe. In: *Phytopathol. Mediterr.*, 57, 369–383.

103. MORALES-CRUZ, A., FIGUEROA-BALDERAS, R., GARCÍA, J. F., TRAN, E., ROLSHAUSEN, P. E., BAUMGARTNER, K., CANTU, D. (2018). Profiling grapevine trunk pathogens in planta: a case for community-targeted DNA metabarcoding. In: BMC Microbiol., 18, 1-14.
104. MOTA LEAL, C., GEIGER, A., MOLNÁR, A., VÁCZY, K. Z., KGOBE, G., ZSÓFI, Z., GEML, J. (2024) Disentangling the effects of terroir, season, and vintage on the grapevine fungal pathobiome. In: Front. Microb., 14, 1322559.
105. MOUEKOUBA, L. D. O., WANG, A., ZHANG, Z., ERINLE, K. O., CHEN, X., WANG, A. (2013). Enhancement of defense responses by *Clonostachys rosea* against *Botrytis cinerea* in tomatoes. In: Agricult. Sci., 4, 709. doi:10.4236/as.2013.412096
106. MOUEKOUBA, L. D. O., ZHANG, L., GUAN, X., CHEN, X., CHEN, H., ZHANG, J., ZHANG, J., LI, J., YANG, Y., WANG, A. (2014). Analysis of *Clonostachys rosea*-induced resistance to tomato gray mold disease in tomato leaves. In: PLoS One, 9(7), e102690.
107. MUGNAI, L., GRANITI, A., SURICO G. (1999). Esca (black measles) and brownwood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. In: Plant Dis. 83:404-418.
108. MUTAWILA, C., FOURIE, P. H., HALLEEN, F., MOSTERT, L. (2011). Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. In: Phytopathol. Mediterr, 50, S264-S276.
109. NERVA, L., ZANZOTTO, A., GARDIMAN, M., GAIOTTI, F., CHITARRA, W. (2019). Soil microbiome analysis in an ESCA diseased vineyard. In: Soil Biol. Biochem., 135, 60-70.

110. OKSANEN, J., BLANCHET, F.G., KINDT, R., LEGENDRE, P., MINCHIN, P.R., O'HARA, R.B., SIMPSON, G.L., SOLYMOS, P., STEVENS, M.H.H., WAGNER, H. AND OKSANEN, M.J. (2013) Package 'vegan'. Community ecology package, version, 2(9), pp.1-295.
111. PAL, K. K., & GARDENER, B. M. (2005) Biological control of plant pathogens. In: Plant Health Instr., doi:10.1094/PHI-A-2006-1117-02
112. PANEK, M., ČIPČIĆ PALJETAK, H., BAREŠIĆ, A., PERIĆ, M., MATIJAŠIĆ, M., LOJKIĆ, I., VRANEŠIĆ BENDER D., KRZNARIĆ, Ž., VERBANAC D. (2018). Methodology challenges in studying human gut microbiota—effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. In: Sci. Rep., 8(1), 5143.
113. PAPADOPOULOU, E., BEKRIS, F., VASILEIADIS, S., PAPADOPOULOU, K. K., KARPOUZAS, D. G. (2022). Different factors are operative in shaping the epiphytic grapevine microbiome across different geographical scales: Biogeography, cultivar or vintage? In: JSAE., 1, 287-301.
114. PÉROS, J. P. & BERGER, G. (1994). A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivars to *Eutypa dieback*. In: Agronomie, 14, 515-523.
115. PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., ABDOLLAHZADEH, J., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. (2013). The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. In: Stud. Mycol. 76, 51–167.
116. PIERRON, R., POUZOULET, J., COUDERC, C., JUDIC, E., COMPANT, S., ALBAN, J. (2016). Variations in early response of grapevine wood depending on

wound and inoculation combinations with *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. In: Front. in Plant Sci. 7:268.

117. PINTO, C., PINHO, D., SOUSA, S., PINHEIRO, M., EGAS, C., C. GOMES, A. (2014). Unravelling the diversity of grapevine microbiome. In: PLoS One, 9, e85622.

118. PINTO, C., CUSTÓDIO, V., NUNES, M., CLÉMENT, C., FONTAINE F. (2018). Understand the potential role of *Aureobasidium pullulans*, a resident microorganism from grapevine, to prevent the infection caused by *Diplodia seriata*. In: Front. Microbiol., 9, 3047.

119. PORTER, T. M. & HAJIBABAEI, M. (2018). Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. In: Molecular ecology, 27, 313-338.

120. RAVAZ, L. (1898). In: Sur le folletage. Rev. Vitic. 101:184-186.

121. REGO, C., NASCIMENTO, T., CABRAL, A., SILVA, M.J., OLIVEIRA, H. (2009). Control of grapevine wood fungi in commercial nurseries. In: Phytopathol. Mediterr. 48, 128–135.

122. ROBERTI, R., BADIALI, F., PISI, A., VERONESI, A., PANCALDI, D., CESARI, A. (2006). Sensitivity of *Clonostachys rosea* and *Trichoderma* spp. as potential biocontrol agents to pesticides. In: J. of Phytopathol., 154, 100-109.

123. Rodríguez M.A., Cabrera G., Gozzo F.C., Eberlin M.N., Godeas A. (2011). *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent, In: J. of Appl. Microbiol., 110, 1177–1186.

124. ROLSHAUSEN, P.E., & KIYOMOTO, R. (2012). The status of grapevine trunk diseases in the Northeastern United States. In: Proceedings of the New England Vegetable and Fruit Conference.
125. ROLSHAUSEN, P.E., BAUMGARTNER, K., TRAVADON, R., FUJIYOSHI, P., POUZOULET, J., WILCOX, W.F. (2014). Identification of *Eutypa* spp. causing Eutypa dieback of grapevine in Eastern North America. In: Plant Dis. 98, 483-491. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0883-RE>
126. ROLSHAUSEN, P.E., SOSNOWSKI, M.R., TROUILLAS, F.P., GUBLER, W.D. (2015). Eutypa dieback. In: Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests, 2nd Edition (pp. 57–61). Edited by Wilcox W.F., Gubler W.D., Uyemoto K.J. American Phytopathological Society Press.
127. SABATE, J., CANO, J., ESTEVE-ZARZOSO, B., GUILLAMÓN, J. M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. In: Microbiol. Res., 157, 267-274.
128. SCHMITZ, A. & RIESNER, D. (2006). Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. In: Anal. Biochem., 354, 311-313.
129. SHOEMAKER, R.A. (1964). Conidial states of some *Botryosphaeria* species on *Vitis* and *Quercus*. In: Canad. J. Bot. 42, 1297–301.
130. SCHROERS, H. J. (2001). A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. In: Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

131. SILVA-VALDERRAMA, I., TOAPANTA, D., MICCONO, M. D. L. A., LOLAS, M., DÍAZ, G. A., CANTU, D., CASTRO, A. (2021). Biocontrol potential of grapevine endophytic and rhizospheric fungi against trunk pathogens. In: *Front. Microbiol.* 11, 614620.
132. SLIPPERS, B., CROUS, P. W., DENMAN, S., COUTINHO, T. A., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J. (2004). Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. In: *Mycologia*, 96, 83-101.
133. SLIPPERS, B. & WINGFIELD, M.J. (2007). *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. In: *Fungal Biol. Rev.* 21, 90–106.
134. SMART, R. (2015). Trunk diseases: Timely trunk renewal to overcome trunk disease, In: *Wine & Viticulture Journal*, 30, 44.
135. SONGY, A., VALLET, J., GANTET, M., BOOS, A., RONOT, P., TARNUS, C., CLÉMENT, C., LARIGNON, P., GODDARD, M.L., FONTAINE, F. (2019). Sodium arsenite effect on *Vitis vinifera* L. Physiology. In: *J Plant Physiol.* 238, 72-79. doi: 10.1016/j.jplph.2019.05.010. Epub 2019 May 23. PMID: 31146184.
136. SOSNOWSKI, M.R., AYRES, M.R., WICKS, T.R., MCCARTHY, M., SCOTT, E.S. (2017). Evaluating grapevine germplasm for tolerance to grapevine trunk diseases. In: *Phytopathol. Mediterr.* 56: 557–558.
137. SPARAPANO, L., BRUNO, G., CICCARONE, C., GRANITI, A. (2000). Infection of grapevines by some fungi associated with esca. II. Interaction among *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. In: *Phytopathol. Mediterr.*, 39, 53–8.

138. STAATS, M., ARULANDHU, A.J., GRAVENDEEL, B., HOLST-JENSEN, A., SCHOLTENS, I., PEELEN, T., PRINS, T.W. AND KOK, E. (2016). Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. In: Anal Bioanal. Chem. 408, 4615–4630 <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9595-8>
139. STEFANI, F. O., BELL, T. H., MARCHAND, C., DE LA PROVIDENCIA, I. E., EL YASSIMI, A., ST-ARNAUD, M., & HIJRI, M. (2015). Culture-dependent and-independent methods capture different microbial community fractions in hydrocarbon-contaminated soils. In: PloS one, 10, e0128272.
140. SURICO, G., MARCHI, G., MUGNAI, L. (2006). Older and more recent observations on esca: a critical overview. In: Older and More Recent Observations on Esca, 1000-1019.
141. SUTTON, J. C., LI, D.-W., PENG, G., YU, H., ZHANG, P., VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. (1997). *Gliocladium roseum* a versatile adversary of Botrytis cinerea in crops. In: Plant Dis. 81, 316–328. doi:10.1094/PDIS.1997.81.4.316
142. SWIFT, J. F., HALL, M. E., HARRIS, Z. N., KWASNIEWSKI, M. T., MILLER, A. J. (2021). Grapevine microbiota reflect diversity among compartments and complex interactions within and among root and shoot systems. In: Microorganisms, 9, 92.
143. TAYLOR, A., HARDY, G.E ST, J., WOOD, P., BURGESS, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. Australas. In: Plant. Pathol. 34, 187–195 <https://doi.org/10.1071/AP05018>
144. TEDERSOO, L., BAHRAM, M., PÖLME, S., KÖLJALG, U., YOROU, N. S., WIJESUNDERA, R., RUIZ, L.V., VASCO-PALACIOS, A.M., THU, P.Q., SUIJA,

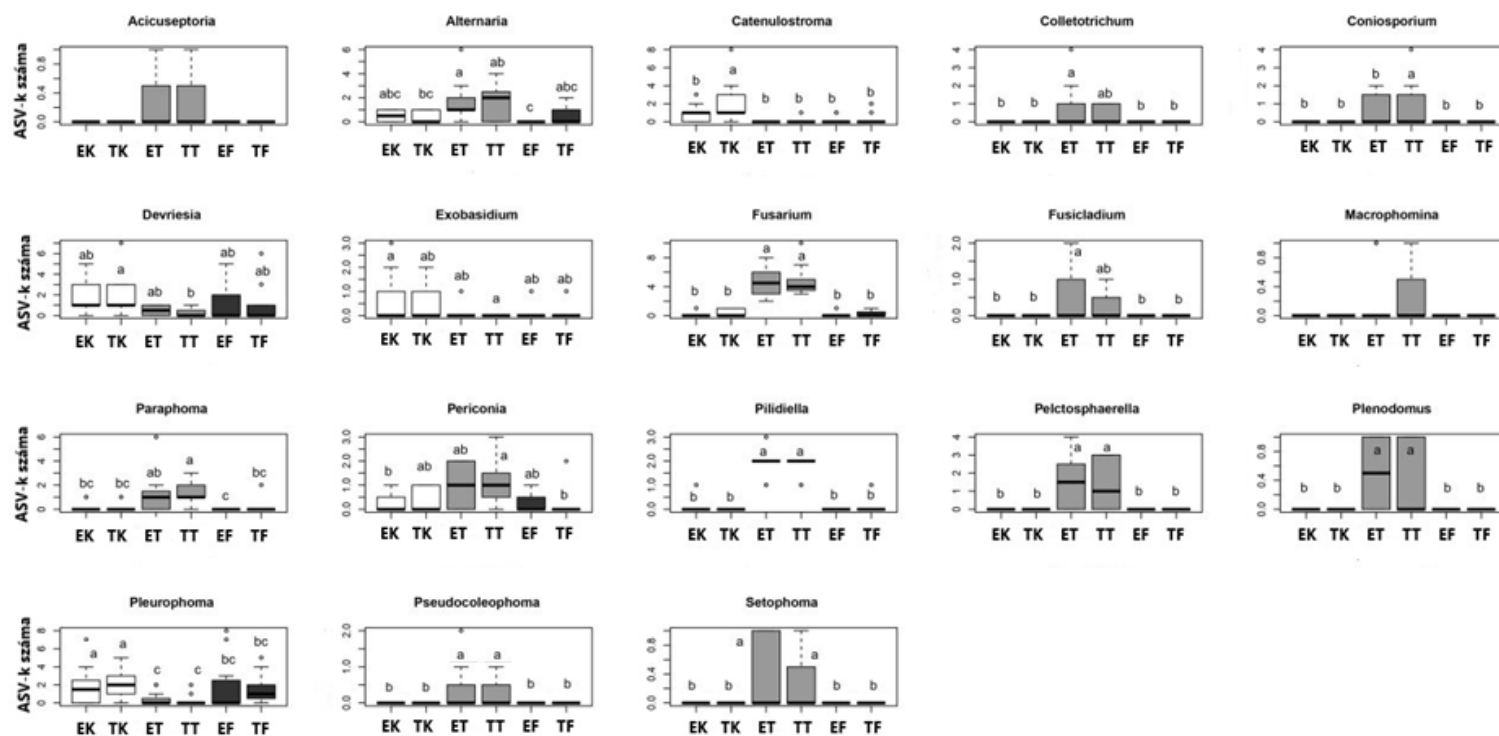
- A., SMITH, M.E. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. In: Science, 346, 1256688
145. TIMMUSK, S., BEHERS, L., MUTHONI, J., MURAYA, A., ARONSSON, A.C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement Front. In: Plant Sci., 8 49, 10.3389/fpls.2017.00049
146. TRAVADON, R., LAWERENCE, D.P., ROONEY-LATHAM, S., GUBLER, W.D., WILCOX, W.F., ROLSHAUSEN, P. E., BAUMGARTNER, K. (2015). *Cadophora* species associated with wood-decay of grapevine in North America. In: Fungal Biol 119, 53-66.
147. TRIVEDI, P., LEACH, J.E., TRINGE, S.G., SA, T., SINGH, B.K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. In: Nat Rev Microbiol 18, 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
148. TOJU, H., YAMAMOTO, S., TANABE, AS., HAYAKAWA, T., ISHII, H.S. (2016) Network modules and hubs in plant-root fungal biomes. In: J. R. Soc. Interface 13, 20151097.
149. TURNER, T. R., JAMES, E. K., POOLE, P. S. (2013). The plant microbiome. In: Genome biology, 14(6), 1-10.
150. UDAYANGA, D., LIU X., MCKENZIE, E. H. C., CHUKEATIROTE, E., BAHKALI, A. H. A. HYDE, K. D. (2011). The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. In: Fungal Div. 50, 189-225
151. ÚRBEZ-TORRES, J. R., LEAVITT, G. M., VOEGEL, T. M., GUBLER, W. D. (2006) Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. In: Plant Dis.,90, 1490-1503.

152. ÚRBEZ-TORRES, J.R., BATTANY, M., BETTIGA, L.J. GISPERT, C., MCGOURTY, G., RONCORONI, J., SMITH, R.J., VERDEGAAL, P., GUBLER, W.D. (2010a). *Botryosphaeriaceae* species spore-trapping studies in California vineyards. In: Plant Dis. 94, 717–24.
153. ÚRBEZ-TORRES, J.R., PEDUTO, F., GUBLER, W.D. (2010b) First report of grapevine cankers caused by *Lasiodiplodia crassispora* and *Neofusicoccum mediterraneum* in California. In: Plant Dis. 94, 785.
154. ÚRBEZ-TORRES, J.R., PEDUTO, F., SMITH, R. J., GUBLER, W. D. (2013). Phomopsis Dieback: A Grapevine Trunk Disease Caused by *Phomopsis viticola* in California. In: Plant Dis. 97, 1571-1579. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1072-RE>
155. ÚRBEZ-TORRES, J.R., GISPERT, C., TROUILLAS, F. P. (2020). Spore dispersal of *Eutypella* species under desert grape-growing conditions of southern California. In: Phytopathol. Mediterr. 59, 485-501. doi: 10.14601/Phyto-11807
156. VAN DER HEIJDEN, M.G.A. & HARTMANN, M. (2016). Networking in the plant microbiome. In: PLOS Biology 14, e1002378–9.
157. VAN JAARSVELD, W. J., HALLEEN, F., MOSTERT, L. (2020). *In vitro* screening of *Trichoderma* isolates for biocontrol of black foot disease pathogens. In: Phytopathol. Mediterr. 59,465-471. doi: 10.14601/Phyto-11173
158. VAN NIEKERK, J. M., GROENEWALD, J. Z., FARR, D. F., FOURIE, P. H., HALLEEN, F., CROUS, P. W. (2005). Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. In: Australasian Plant Pathology, 34, 27-39.

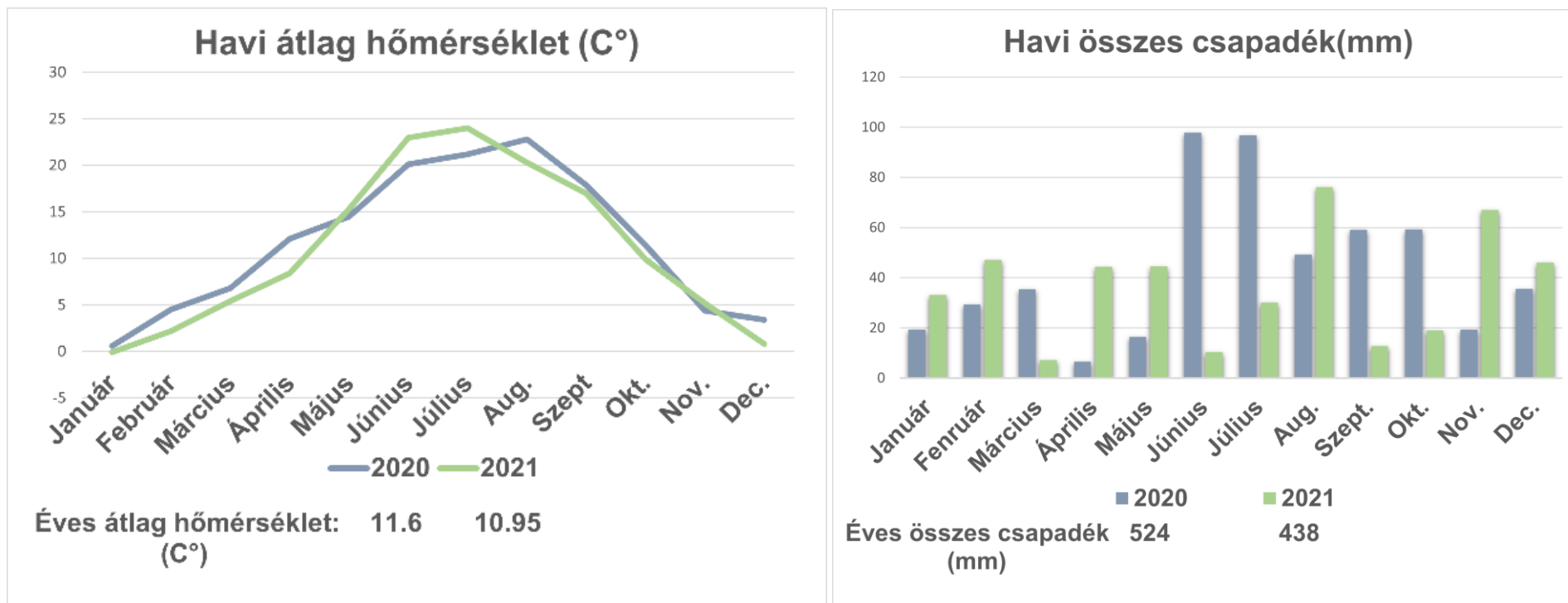
159. VAN NIEKERK, J.M., FRIKKIE, J.C., HALLEEN, F., FOURIE P.H. (2010). Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. In: Eur. J. Plant Pathol. 127, 375–90.
160. VOS, C.M.F., DE CREMER, K., CAMMUE, B.P.A., DE CONINCK, B. (2015). The toolbox of *Trichoderma spp.* in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. In: Mol. Plant Pathol., 16 400-412, 10.1111/mpp.12189.
161. WAGSCHAL, I., ABOU-MANSOUR, E., PETIT, A-N., CLEMENT, C., FONTAINE, F. (2008). 16 Wood diseases of grapevine: A review on eutypa dieback and esca.
162. WAITE, H., MAY, P., BOSSINGER, G. (2013). Variations in phytosanitary and other management practices in Australian grapevine nurseries. In: Phytopathol, Mediterr., 52, 369-379
163. WANG, Q., CHEN, X., CHAI, X., XUE, D., ZHENG, W., SHI, Y., WANG, A. (2019). The involvement of jasmonic acid, ethylene, and salicylic acid in the signaling pathway of *Clonostachys rosea*-induced resistance to gray mold disease in tomato. In: Phytopathologia, 109, 1102-1114.
164. WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White (Eds) PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, pp. 315–322. Academic Press, New York.
165. WILCOX, W. F., GUBLER, W. D., UYEMOTO, J. K. (2015). Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests, 2nd Ed. In: American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.

166. YANG, H. C., RODRIGUEZ-RAMOS, J. C., HALE, L., NAEGELE, R. P. (2023). Grapevine leaf epiphytic fungal and bacterial communities are influenced more by spatial and temporal factors than powdery mildew fungicide spray programs. *PhytoFrontiers*, (ja).
167. YURKOV, A. M. (2018). Yeasts of the soil – obscure but precious. In: *Yeast* 35, 369-378. <https://doi.org/10.1002/yea.3310>
168. ZARRAONAINDIA, I., OWENS, S. M., WEISENHORN, P., WEST, K., HAMPTON-MARCELL, J., LAX, S., BOKULICH, N.A., MILLS, D.A., MARTIN, G., TAGHAVI, S., VAN DER LELIE, D. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. In: *MBio*, 6, e02527-14.
169. ZIELIŃSKA, S., RADKOWSKI, P., BLENDOWSKA, A., LUDWIG-GAŁĘZOWSKA, A., ŁOŚ, J. M., ŁOŚ, M. (2017). The choice of the DNA extraction method may influence the outcome of the soil microbial community structure analysis. In: *MicrobiologyOpen*, 6, e00453.

## M2. Ábrák és táblázatok



M2 – 1. ábra. A Nem GTD-hez köthető növénypatogén nemzetségek diverzitása a Tokaji borvidéken a különböző mikroéletterekben (EK – egészséges kéreg, TK – tünetes növény, kéreg, ET – egészséges növény, talaj, TT- tünetes növény, talaj, EF- egészséges növény, faszövet, TF – tünetes növény, faszövet). A betűk a szignifikáns különbségeket ( $p < 0,05$ ) jelzik az egyirányú ANOVA és a Tukey HSD teszt alapján.



M2 - 2. ábra. A havi átlag hőmérséklet (bal oldal) és a havi összes csapadék (jobb oldal) a 2020-as és 2021-es évben. Az ábrákhoz az adatokat az Egri borvidéken az Eszterházy Károly Katolikus Egyetem kísérleti szőlőbirtokán a Boreas Fejlesztő és Szolgáltató Kft. által elhelyezett InterMet automata meteorológiai mérőállomás szolgáltatta.

M2 – 1. táblázat. A Tokaji borvidék adatsorából elvégzett indikátorfaj analízis eredménye, az mikroéletter és az egészségi állapot alapján, a fajokhoz tartozó p értékkel, funkcióval, SH (Species Hypothesis) azonosítóval, az ITS2 rDNS szekvencia százalékos egyezését, és a taxonómiai besorolással a UNITE+INSD SH alapján legjobban egyező szekvencia (2020. februári verzió). A funkciók rövidítései: NPAT-növénypatogén, GTD – a szőlő korai elhalásához köthető patogén. Azok az ASV-k vannak feltüntetve a táblázatban melyek p értékei kisebbek, mint 0,05. Ez azt jelenti, hogy az adott ASV megjelenése a mikroéletterben, vagy az egészséges és tünetes növényben, illetve ezek kombinációjában valószínűleg nem a véletlennek köszönhető.

| ASV          | p     | Funkció | Species Hypothesis | %    | Taxonómiai besorolás               | Törzs             | Osztály         |
|--------------|-------|---------|--------------------|------|------------------------------------|-------------------|-----------------|
| <b>Kéreg</b> |       |         |                    |      |                                    |                   |                 |
| ASV0149      | 0,005 | NPAT    | SH1514429.08FU     | 98   | <i>Exobasidium woronichinii</i>    | Exobasidiomycetes | Basidiomycota   |
| ASV0172      | 0,001 | GTD     | SH1615013.08FU     | 99,3 | <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> | Ascomycota        | Eurotiomycetes  |
| ASV0196      | 0,001 | NPAT    | SH1641282.08FU     | 99,5 | <i>Devriesia pseudoamericana</i>   | Ascomycota        | Dothideomycetes |
| ASV0214      | 0,001 | GTD     | SH1552800.08FU     | 97,1 | <i>Seimatosporium pistaciae</i>    | Ascomycota        | Sordariomycetes |
| ASV1105      | 0,032 | NPAT    | SH1573821.08FU     | 97,9 | <i>Minutiella tardicola</i>        | Ascomycota        | Eurotiomycetes  |
| ASV1108      | 0,045 | GTD     | SH2170012.08FU     | 100  | <i>Neofabraea kienholzii</i>       | Ascomycota        | Leotiomycetes   |
| ASV1586      | 0,006 | NPAT    | SH2127282.08FU     | 99,7 | <i>Alternaria oregonensis</i>      | Ascomycota        | Dothideomycetes |
| ASV1902      | 0,032 | NPAT    | SH1560866.08FU     | 93,3 | <i>Veronaea japonica</i>           | Ascomycota        | Eurotiomycetes  |

|              |       |      |                |      |                                    |               |                   |
|--------------|-------|------|----------------|------|------------------------------------|---------------|-------------------|
| ASV3964      | 0,033 | NPAT | SH1540544.08FU | 98,3 | <i>Microstroma bacarum</i>         | Basidiomycota | Exobasidiomycetes |
| <b>Talaj</b> |       |      |                |      |                                    |               |                   |
| ASV0016      | 0,001 | NPAT | SH1572654.08FU | 99,6 | <i>Fusarium oxysporum</i>          | Ascomycota    | Sordariomycetes   |
| ASV0047      | 0,001 | NPAT | SH2255649.08FU | 100  | <i>Pilidiella diplodiella</i>      | Ascomycota    | Sordariomycetes   |
| ASV0268      | 0,001 | NPAT | SH1644397.08FU | 96   | <i>Plectosphaerella delsorboi</i>  | Ascomycota    | Sordariomycetes   |
| ASV0345      | 0,001 | NPAT | SH1546659.08FU | 100  | <i>Fusarium solani</i>             | Ascomycota    | Sordariomycetes   |
| ASV0442      | 0,035 | NPAT | SH1142333.08FU | 99,3 | <i>Didymella bryoniae</i>          | Ascomycota    | Dothideomycetes   |
| ASV0454      | 0,003 | NPAT | SH1552815.08FU | 99,3 | <i>Immersidiscosia eucalypti</i>   | Ascomycota    | Sordariomycetes   |
| ASV0462      | 0,001 | NPAT | SH1623732.08FU | 99,7 | <i>Fusarium solani</i>             | Ascomycota    | Sordariomycetes   |
| ASV0463      | 0,040 | NPAT | SH1572654.08FU | 99,6 | <i>Fusarium oxysporum</i>          | Ascomycota    | Sordariomycetes   |
| ASV0529      | 0,001 | NPAT | SH1243424.08FU | 80,1 | <i>Setophoma terrestris</i>        | Ascomycota    | Dothideomycetes   |
| ASV1777      | 0,034 | NPAT | SH1601977.08FU | 99,7 | <i>Laetisaria arvalis</i>          | Basidiomycota | Agaricomycetes    |
| ASV1949      | 0,043 | NPAT | SH2219021.08FU | 99,7 | <i>Colletotrichum destructivum</i> | Ascomycota    | Sordariomycetes   |
| ASV2161      | 0,036 | NPAT | SH1527186.08FU | 95,8 | <i>Plenodomus biglobosus</i>       | Ascomycota    | Dothideomycetes   |
| ASV2186      | 0,004 | NPAT | SH1626902.08FU | 99,3 | <i>Fusicladium fagi</i>            | Ascomycota    | Dothideomycetes   |
| ASV2229      | 0,031 | NPAT | SH1614481.08FU | 99,2 | <i>Acicuseptoria rumicis</i>       | Ascomycota    | Dothideomycetes   |
| ASV2665      | 0,036 | NPAT | SH1936170.08FU | 95,1 | <i>Ganoderma leucocontextum</i>    | Basidiomycota | Agaricomycetes    |

|                                 |       |      |                |      |                                          |               |                 |
|---------------------------------|-------|------|----------------|------|------------------------------------------|---------------|-----------------|
| ASV3293                         | 0,037 | NPAT | SH1792736.08FU | 99,7 | <i>Gaeumannomyces<br/>hyphopodioides</i> | Ascomycota    | Sordariomycetes |
| <b>Faszövet</b>                 |       |      |                |      |                                          |               |                 |
| ASV0004                         | 0,001 | GTD  | SH1615013.08FU | 100  | <i>Phaeoconiella chlamydospora</i>       | Ascomycota    | Eurotiomycetes  |
| ASV0008                         | 0,002 | GTD  | SH1552800.08FU | 97,8 | <i>Seimatosporium pistaciae</i>          | Ascomycota    | Sordariomycetes |
| ASV0037                         | 0,001 | GTD  | SH1581100.08FU | 98   | <i>Phaeoacremonium minimum</i>           | Ascomycota    | Sordariomycetes |
| ASV0043                         | 0,003 | GTD  | SH1566934.08FU | 97,3 | <i>Fomitiporia punicata</i>              | Basidiomycota | Agaricomycetes  |
| ASV1586                         | 0,014 | NPAT | SH2127282.08FU | 99,7 | <i>Alternaria oregonensis</i>            | Ascomycota    | Dothideomycetes |
| <b>Egészséges növény, kéreg</b> |       |      |                |      |                                          |               |                 |
| ASV500                          | 0,041 | NPAT | SH1506899.08FU | 99,4 | <i>Neophaeococcomyces sp.</i>            | Ascomycota    | Eurotiomycetes  |
| ASV0426                         | 0,045 | NPAT | SH1838164.08FU | 97,2 | <i>Alpinaria rhododendri</i>             | Ascomycota    | Dothideomycetes |
| <b>Egészséges növény, talaj</b> |       |      |                |      |                                          |               |                 |
| ASV1339                         | 0,041 | NPAT | SH1573220.08FU | 96,3 | <i>Periconia sp.</i>                     | Ascomycota    | Dothideomycetes |

**Tünetes növény, kéreg**

|         |       |      |                |      |                               |            |                 |
|---------|-------|------|----------------|------|-------------------------------|------------|-----------------|
| ASV1586 | 0,045 | NPAT | SH2127282.08FU | 99,7 | <i>Alternaria oregonensis</i> | Ascomycota | Dothideomycetes |
|---------|-------|------|----------------|------|-------------------------------|------------|-----------------|

**Tünetes növény, talaj**

|         |       |      |                |     |                             |            |               |
|---------|-------|------|----------------|-----|-----------------------------|------------|---------------|
| ASV0119 | 0,019 | NPAT | SH2311583.08FU | 100 | <i>Botrytis californica</i> | Ascomycota | Leotiomycetes |
|---------|-------|------|----------------|-----|-----------------------------|------------|---------------|

## **11. Köszönetnyilvánítás**

Szeretném megköszönni Dr. Geml Józsefnek és Dr. Táncsics Andrásnak, akik a 4 év alatt témavezetőimként irányt mutattak. Szeretném megköszönni kollégámnak, Dr. Karácsony Zoltánnak a rengeteg gyakorlati tanácsot, amit kaptam tőle. Köszönettel tartozom a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetemnek és az Eszterházy Károly Katolikus Egyetemnek, amiért befogadták a témámat, és helyszínt, illetve támogatást nyújtottak a kutatásomhoz. Minden kollégámnak köszönöm, aki valamilyen formában hozzájárult az értekezésem elkészítéséhez.

Ezenkívül szeretném megköszönni a férjem, a családom és a barátaim támogatását, akik akkor is bátorítottak és ösztönöztek, amikor borúlátó voltam, nélkülük nem lennék itt.