



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

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**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Témavezetők: 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

.....
Dr. Geml József

.....
Dr. Táncsics András

A munka előzményei, célkitűzések

A szőlőt érintő egyik legsúlyosabb gombás betegség a szőlő korai elhalása (Grapevine Trunk Diseases - GTD), melyhez kapcsolódóan több száz gombafajt írtak le. Világszerte növekszik a GTD előfordulása a hatékony védekezési stratégiák hiánya miatt. Számos, a GTD-hez köthető gombafaj funkcionális szerepe nagyrészt ismeretlen. 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 a növények mikrobiomját. Az újgenerációs szekvenálás lehetőséget ad arra, hogy a GTD-t részletesebben vizsgáljuk, és feltárjuk, hogy mely tényezők befolyásolhatják a betegség epidemiológiáját.

A kutatómunkám a szőlő (*Vitis vinifera*) kérgének, faszövetének, valamint a talaj mikroorganizmusainak taxonómiai és funkcionális jellemzését foglalja magába. A központi téma a szőlő patobiomja, különös tekintettel a GTD kórokozókra és a talaj és a növény mikrobiomja közötti kölcsönhatásokra. Munkánk során vizsgáltuk a Tokaji borvidéken a terroir, a mikroélettér és az egészségi állapot hatását a növényi kórokozókra, azon belül is a GTD kórokozókra. Az Egri borvidéken vizsgáltuk a fajta, a mikroélettér, a szezonális és az évjárat mikrobiomra gyakorolt hatását az egészséges és GTD-tünetes növények esetén.

A mikrobák izolálása és jellemzése hagyományosan idő- és munkaigényes folyamat, de fontos lépés. Azonban egy adott mikroorganizmus tisztatenyészetben kínálja a legjobb lehetőséget a teljeskörű jellemzéséhez filogenetika, taxonómia és funkcionalitás szempontjából. A tenyésztéstől független DNS metabarcoding technika mellett hagyományos izolálással vizsgáltuk a szőlőtőke egészséges és beteg faszövetéből tenyészthető gombákat, hogy meghatározzuk a 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. Az *in planta* tesztek további vizsgálatát tervezzük, hisz nagyon fontos, hogy egy biokontroll faj, mely laboratóriumi körülmények között megállja a helyét, képes-e erre kevésbé kontrollált környezetben. 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 *C. rosea in planta* vizsgálata néhány GTD kórokozó ellen

Anyag és módszer

Mintagyűjtés, DNS kivonás

Az Egri borvidéken Egerben az Eszterházy Károly Katolikus Egyetem kísérleti szőlőbirtokán 4 fajtát (kékfrankos, leányka, cabernet sauvignon, chardonnay) vizsgáltunk. Két Esca tünetes és két egészséges tőkét jelöltünk ki, melyekből kéreg és faszöveti mintát gyűjtöttünk, illetve a környező talajból is gyűjtöttünk talajmintát. 2020. februárban és augusztusban és 2021. februárban és augusztusban történt a mintagyűjtés. A Tokaji borvidéken 3 dűlőt vizsgáltunk, és dűlönként jelöltünk ki 2 egészséges, és két Esca tünetes növényt, majd az Egri borvidékhez hasonlóan elvégeztük a mintagyűjtést az említett időpontokban. A mintákat egységesítettük, liofilizáltuk, homogenizáltunk és DNS-t vontunk ki belőle. Ezt követően a kivont DNS-t újgenerációs szekvenálásra küldtük, melyet az Illumina MiSeq platformon végeztek el. A szekvenálás során az ITS2 rDNS (riboszómális DNS) régiót szekvenálták a FITS7 (IHRMARK et al., 2012) és az ITS4 (WHITE et al., 1990) primerek segítségével.

DNS metabarcoding adatfeldolgozás, 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 Development Core Team 2013). A szekvenciákat ezután trimmeltük, zajtalanítottuk, összeillesztettük, majd amplitikon szekvencia variánsokba (ASV) rendeztük. 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-ket TEDERSOO és munkatársainak (2014) listája alapján rendeztük funkciós csoportokba. Ezen ASV-k közül kiemeltük azokat a nemzetségeket, melyek a GTD-vel a szakirodalom szerint összefüggésbe hozhatóak. Minden analízist az R környezetben végeztünk.

Mindkét mintagyűjtési hely mintáit, melyek kevés szekvenciát tartalmaztak (<1000), kihagytuk az analízisből. Ezután a mátrixokat normalizáltuk, majd Tokaj esetén a növényi kórokozókkal, míg Eger esetén több funkciós csoporttal dolgoztunk tovább (GTD patogének, nem GTD patogének mikoparaziták, generalista szaprotrófok, GTD-hez köthető fa szaprotrófok, fa szaprotrófok). A kategorikus változók pl. a mikroélettér (faszövet, kéreg, talaj), terroir, szezonális, évszám és egészségi állapot hatásának teszteléséhez a diverzitást, illetve az abundanciát hasonlítottuk össze a minták között egy irányú ANOVA (varianciaanalízis) modellekkel. A szignifikáns különbséget a Tukey HSD teszttel azonosítottunk. Az ASV-k diverzitását és abundanciáját dobozdiagrammal ábrázoltuk a *ggplot2* (WICKHAM, 2016) csomag segítségével a kétirányú mikroélettér-terroir modell alapján Tokaj esetén, míg Eger esetén a mikroélettér alapján. A minták összetételbeli különbségeit nem metrikus multidimenziós skálázással (NMDS) szemléltettük a *vegan* csomag segítségével.

Permutációs varianciaanalízist (PerMANOVA) végeztünk a *vegan* csomag *adonis* funkciójának segítségével, hogy megbecsüljük a terroir, a mikroéletter, évszám, szezonális és az egészségi állapot által magyarázott változást. Az egri mátrixot mikroéletterekre felosztva is elvégeztük az NMDS-t és a PerMANOVA-t. A növénypatogén ASV-k eloszlása hálózatként lett ábrázolva az *sna* csomaggal (BUTTS, 2008) a különböző mikroéletterekre a tokaji adatsorból és az egri adatsorból.

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 oxitetraciklin-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, 4 hétig monitoroztuk, majd tisztatenyészeteket képeztünk a felnövő gombákból. A mintákból DNS-t vontunk ki, majd PCR-rel (Polimerase chain reaction – polimeráz láncreakció) a gombák azonosítására általánosan használt ITS régiót sokszorosítottuk fel, 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 a DNS metabarcoding technikával azonosított szekvenciákhoz hasonlóan végeztük el.

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

A *C. rosea* hatékonyságát *in planta* üvegházi kísérletben teszteltük le. Az *Eutypa lata*, *Botryosphaeria dothidea* és *Phaeoconiella chlamydospora* törzsekből kb. 3 mm-es micélium korongokat vágunk ki, majd inokuláltuk a megsebzett cabernet sauvignon dugványok xilémjébe. Minden kórokozó - talaj kombinációhoz 5 dugványt használtunk fel. A dugványokat kezeletlen, illetve a *C. rosea* 19B/1-es törzs konídium szuszpenziójával kiegészített talajba ültettük (10⁴ spóra/gramm). A növényeket üvegházban inkubáltuk környezeti fényviszonyok mellett. 90 napos inkubációt követően a dugványokat gyökerestül kivettük a talajból, a kéreg eltávolítása után hosszirányban felvagtuk, 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). Azon gombákból, melyek morfológiájukat tekintve hasonlítottak a *C. rosea*-hoz, egy kevés micéliumot átoltottunk PDA táptalajra, hogy tisztatenyészeteket kapjunk. A gombákat morfológiai bélyegek, valamint az ITS régió alapján azonosítottuk.

Eredmények és azok megbeszélése

A Tokaji borvidék DNS metabarcoding adatsorából nyert eredmények, azok kiértékelése

A GTD, és a nem GTD patogének, valamint az összes növénypatogén abundanciája különbözött az eltérő mikroéletterekben, az egészségi állapotok között azonban nem. Az összes növénypatogén abundanciája a faszövetben, a GTD patogéneké a faszövetben, míg a nem GTD patogéneké a talajban volt a legnagyobb. Az összes növénypatogén fajgazdagsága különbözött a mikroéletterek között, illetve a terroir-ok között is. A nem GTD patogének a talajban voltak a legdiverzebbek, míg a GTD patogének a farészben, majd a kéregben, és kis diverzitást mutattak a talajban.

A növénypatogén gombaközösség szerkezetét két dimenziós NMDS-sel ábrázoltuk. A mikroélettér befolyásolta a legnagyobb mértékben a növénypatogén gombaközösséget, a variáció 19,25%-át magyarázva, ezt követte a terroir 7,78%-kal, és az egészségi állapot 1,86%-kal. Az elvégzett hálózatanalízis is igazolta a GTD patogének dominanciáját a farészben és a kéregben, míg a nem GTD patogének dominanciáját a talajban, számos domináns nemzetség ASV-je több mintában is megjelent. A hálózatanalízis alapján az egészséges és beteg növények patobiomja nem tért el egymástól, azonban a kéreg és a faszövet domináns GTD nemzetségei igen. A talajminták a terroirok szerint szépen elkülönülnek, a minden dűlőben megtalálható ASV-k mellett terroir specifikus ASV-ket 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 kórokozók a faszövetben és a kéregben fordultak elő, egyes talajmintákból teljesen hiányoztak, vagy éppen nagyon alacsony gyakoriságot mutattak. Ez az állítás nincs összhangban NERVA és mtsai (2019) vizsgálatainak eredményeivel, miszerint a talaj a GTD kórokozók igencsak fontos inokulum forrása. Fontos megemlíteni, hogy a mikroéletterek diverzitását 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 diverzek, a GTD kórokozók túlnyomórészt többségi tagjai a szőlő patobiomjának, különösen a farésznek, kiszorítva onnan a nem GTD kórokozókat. A hálózatanalízisünk alapján a *Phaeoconiella*, *Seimatosporium* és *Diplodia* fajok okozzák az előbb említett abundancia többletet a faszövetben, a kéregben a *Seimatosporium* és *Diplodia* fajok. A *Phaeoconiella* fajok nagy számát a faszövetben és alacsony gyakoriságukat 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).

Annak ellenére, hogy a Tokaji borvidéken a mintagyűjtési területek egymáshoz viszonylag közel voltak (<10 km), nagy összetételbeli különbségeket találtunk a

növénypatogén gombaközösség összetételében terroironként. Ez főként a talajban élő patogének esetében mutatkozott meg, és kisebb mértékben a farészben lévő patogének esetén is, ami egyfajta mezoklimatikus és edafikus tényezők által vezérelt környezeti szűrésre utal. A terroir nagyobb mértékben befolyásolta a kéreg növénypatogén gombaközösségét, mint a faszövet gombaközösségét, valószínűleg azért, mert a kéreg a környezeti tényezőknek nagyobb mértékben kitett, mint a tőke.

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. 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 farészben találhatóak, a talajban egy-két nemzetség kivételével nem voltak jelen. Ez alátámasztja azt az elméletet, hogy a GTD kórokozók elsősorban szaprofiták, másodsorban opportunisták kórokozók.

Az Egri borvidék DNS metabarcoding adatsorából nyert eredmények és azok kiértékelése

A nem GTD patogének a talajban domináltak, míg a GTD patogének a farészben, majd a kéregben. A generalista szaprotrófok a talajban és a kéregben voltak gyakoriak, 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. A talaj volt a legdiverzebb 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. Tokajjal ellentétben a GTD kórokozók abundanciája és fajgazdagsága nagyobb volt a tünetes növények esetén. Az abundancia esetén a *Botryosphaeria* és *Eutypella* fajok szekvencia száma volt magasabb a tünetes növényekben, míg a fajgazdagság esetén a *Botryosphaeria*, *Eutypella* és *Fomitiporia* fajok száma. Ahogyan több kutató is felveti, a tünetek megjelenésének hátterében a GTD kórokozók abundanciájának változása állhat, mely hipotézist az egri adatsorral mi is meg tudunk erősíteni. Tokajban nagy valószínűséggel a különbséget azért nem tudtuk kimutatni, mert csak egy mintagyűjtés adatait elemeztük ki. Ezt bizonyítja, hogy MOTA LEAL és mtsai (2024) a Tokaji borvidéken mind a négy mintagyűjtést kielemezve találtak különbséget a növényi kórokozók abundanciája és fajgazdagsága között az egészséges és a tünetes növények esetén. Az Egri borvidéken számos funkció csoport abundanciája és fajgazdagsága jelentősen lecsökkent a 2021-es évben a 20-as évhez viszonyítva, valószínűleg a szárazabb évjárat következtében.

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 minta esetén. A PerMANOVA alapján a mikroélettér, az évszám, a fajta és a szezonális mutatók szignifikáns korrelációt a gombaközösség szerkezetével. A mikroélettér az eltérés 3,8%-át magyarázza, míg az évszám 2,5%-át, a fajta 1,3%-át, szezonális mutató 1,2%-át. Az egészségi állapot nem korrelált szignifikánsan a közösség szerkezetével, amikor az összes mintát együtt vizsgáltuk. A gombaközösség összetételét a különböző mikroélettérben is ábrázoltuk kétdimenziós NMDS-sel, így egyéb változók hatása is előjött. A kéreg esetében például a fajta hatás. A chardonnay és leányka fajtából származó minták teljesen elkülönülnek.

Az egri első mintagyűjtésből származó hálózatanalízis alapján Tokajhoz hasonlóan a talajban a nem GTD kórokozók dominálnak, míg a kéregben már egyre több GTD kórokozó megjelenik. A faszövetben a GTD kórokozók kiszorítják a nem GTD kórokozókat. A GTD kórokozók közül a faszövetben a *Phaeomoniella* és *Diplodia* fajok dominálnak, akárcsak Tokajban. Érdekes módon a *Diaporthe* fajok az Egri borvidéken csak a talajban vannak jelen, illetve a GTD kórokozók több ASV-vel vannak jelen a talajban az Egri borvidéken, mint a Tokaji borvidéken.

Az egri eredményeink alapján a szőlő gombaközösségének összetétele jobban különbözik a talaj és a vizsgált növényi részek között, mint a vizsgált szezonok, évszámok, fajták vagy éppen az egészségi állapot között. A talaj mikrobiomjának összetételbeli változékonysága a legnagyobb mértékben abiotikus tényezőkkel (évszám, szezonális mutató) korrelál, míg a biotikus tényezők (fajta, egészségi állapot) hatása hangsúlyosabb a szőlővel közvetlen kapcsolatban lévő gombaközösség esetén.

Amikor az összes mintát együtt elemeztük, a talaj gombaközösségének összetétele jelentősen eltért a kéreg és a farsz mikrobiom összetételétől, míg a növényi részek hasonló mikrobiom összetétellel rendelkeztek. Ez azt jelenti, hogy a vizsgált mikroélettérben 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 a mikroélettérben elemeztük, azt tapasztaltuk, hogy az évszám gyakorolta a legnagyobb hatást a gombaközösség összetételére, különösen a talajban, míg a szezonális mutató, fajta és egészségi állapot hatása a mikroélettértől függően változott.

A 2021-es évszámban 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 évszám következtében. 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 faszövetből történő hagyományos izolálás eredménye

Az Egri borvidéken sikerült mind a négy mintagyűjtésből hagyományos eljárással gombákat tenyésztetni a farészből. 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. 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. A szőlőn általánosan előforduló fajokat is izoláltunk, mint pl. az *Aureobasidium*, *Cladosporium* *Alternaria* fajok. A mikoparaziták közül az *Angustimassarina* fajok jelentek meg a téli időszakban. Érdekes lehet ezen fajok életmódját a későbbiekben vizsgálni a szőlőn.

A 2021-es évben az Egri borvidékről nagyobb százalékban izoláltunk GTD patogéneket, a nyári szezonban az izolátumok több, mint 60%-át GTD patogénként azonosítottuk. 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. Mind a téli, mind a nyári időszakban izoláltunk *Cladosporium*, *Alternaria* fajokat. 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. A 2021-es évben a Tokaji borvidéken is izoláltunk gombákat a farészből. 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 (átlag 80 izolátum/mintagyűjtés), 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 azonosítottunk, 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 *Clonostachys rosea* 19B/1-es törzssel végzett *in planta* teszt eredménye

Az *E. lata* és *B. dothidea* esetében mélyen a fertőzött dugványok faszövetében nekrotikus léziók alakultak ki, míg a *P. chlamydospora* a faszövetet közvetlenül a kéreg alatt nekrotizálta. 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.

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 mennyisége egy nagyságrendet nöött a 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.

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 mikoparazitimus, bár utóbbi is ígéretes hosszútávú stratégia lehet, ha a *C. rosea* szisztematikus kolonizációját lehetővé tudjuk tenni a szőlőtőkében.

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 taxonómiai, hanem a genetikai diverzitást tekintve is. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy Tokaj esetén csak egy mintavételezés adatait elemeztük. 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 farészben élők.

A Tokaji borvidékhez hasonlóan az Egri borvidéken is a talaj és a szőlő általunk vizsgált részei különböző mikrobiális közösségeknek adnak életteret. 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 a GTD kórokozók abundanciája és fajgazdagsága nagyobb volt a tünetes növényekben, mely eltérést a *Botryosphaeria*, *Eutypella* és *Fomitiporia* fajok adták. A különbséget valószínűleg azért tudtuk detektálni, mert az Egri borvidéken több 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 tisztatenyészzettel további kísérleteket is végezhesünk. Ilyen például esetünkben a farészből történő izolálás során talált *Angustimassarina* és *Vishniacozyma* fajok, melyek parazitálhatnak más gombákat. Az egrri adatsorból látszik, hogy ezek a fajok 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 *C. rosea*-t is egy korábbi munkánk során izoláltuk, amikor oltványok mikrobiomját vizsgáltuk hagyományos tenyésztési módszerrel. Az oltványokból több *C. rosea* 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, elősegítené a GTD kialakulásának megértését, valamint feltárná a mikrobiális interakciók kulcsfontosságú szerepét a fenntartható szőlőtermesztés és a betegségek megelőzése, kezelése érdekében. 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.

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 kórokozók 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 mikroélettéreket (talaj, faszövet, kéreg) együttesen elemeztem. Az mikroélettéreket 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.

Az értekezéshez témaköréhez kapcsolódó publikációk

Tudományos folyóiratokban megjelent, lektorált, teljes szövegű tudományos közlemények

Idegen nyelvű, impakt faktoros folyóiratban:

Leal, C. M., **Geiger, A.**, Molnár, A., Váczy, K. Z., Kgobe, G., Zsófi, Z., & Geml, J. (2023). Disentangling the effects of terroir, season, and vintage on the grapevine fungal pathobiome. *Frontiers in Microbiology*, 14.

Szabó, D; Molnár, N; **Geiger, A**; Karácsony, Z; Váczy, KZ. (2023) *In vitro* characterization of a *Bacillus velezensis* isolate as an antagonist of grapevine trunk disease pathogens. *Acta phytopathologica et entomologica hungarica* 58. 2 pp. 156-167., 12 p.

Geiger, A., Karácsony, Z., Geml, J., & Váczy, K. Z. (2022). Mycoparasitism capability and growth inhibition activity of *Clonostachys rosea* isolates against fungal pathogens of grapevine trunk diseases suggest potential for biocontrol. *Plos one*, 17(9), e0273985.

Geiger, A., Karácsony, Z., Golen, R., Váczy, K. Z., & Geml, J. (2022). The compositional turnover of grapevine-associated plant pathogenic fungal communities is greater among intraindividual microhabitats and terroirs than among healthy and Esca-diseased plants. *Phytopathology®*, 112(5), 1029-1035.

Molnár, A., Geml, J., **Geiger, A.**, Leal, C. M., Kgobe, G., Tóth, A. M., ... & Zsófi, Z. (2022). Exploring Relationships among Grapevine Chemical and Physiological Parameters and Leaf and Berry Mycobiome Composition. *Plants*, 11(15), 1924.

Egy oldalas idegen vagy magyar nyelvű összefoglaló - előadás vagy poszter alapján - tudományos folyóiratban, vagy annak különszámában:

Geiger, A; Leal, CM; Karácsony, Z; Golen, R; Váczy, KZ; Geml, J. DNA metabarcoding reveals that grapevine parts harbor different, niche-specific mycobiome In: Christoph, Hoffman; David, Gramaje Abstracts Book, International Organisation for Biological and Integrated Control – West Palaearctic Regional Section (IOBC-WPRS) Meeting of the Working Group “Integrated Protection in Viticulture (2023) p. 75.

Geiger, A; Leal, CM; Karácsony, Z; Golen, R; Váczy, KZ; Geml, J. Microhabitats show stronger impact on grapevine mycobiome more than cultivar, season or health In: Szabó, A; Piwosz, K; Kormas, K; Panosyan, H Book of Abstracts Central and Eastern European Symposium on Microbial Ecology (2023) p. 27 Paper: 20.

Geiger, A; Leal, CM; Karácsony, Z; Golen, R; Váczy, KZ; Geml, J. DNA metabarcoding study reveals greater effect of microhabitat and vintage on grapevine

mycobiome than cultivar, season or health state In: Verdier, V 12th International Congress of Plant Pathology (2023) Paper: 21.

Geiger, A; Leal, CM; Karácsony, Z; Váczy, KZ; Geml, J. Microhabitats drive grapevine mycobiome more than cultivar, season or health state In: Julia, Kerrigan Annual Meeting of the Mycological Society of America 2023 (2023) Paper: 87.

Geiger, A; Karácsony, Z; Váczy, KZ. First report of mycoparasitism in *Diaporthe* species associated with grapevine trunk diseases. In: K., MÁRIALIGETI; O., DOBAY (szerk.) Abstracts of the 19th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology (2023) 38 p. p. 64.

Geiger, A; Leal, CM; Karácsony, Z; Golen, R; Váczy, KZ; Geml, J. Comparison of the grapevine-associated plant pathogenic fungal community among different microhabitats, cultivars and between healthy and Esca-diseased plants In: Ales, Eichmeier 12th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases (2022) p. 54.

Geiger, A; Karácsony, Z; Golen, R; Váczy, KZ; Geml, J. The compositional turnover of grapevine-associated plant pathogenic fungal communities are greater among intraindividual microhabitats and terroirs than among healthy and Esca-diseased plants. In: 16th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union (2022) Paper: 31.

Geiger, A; Karácsony, Z; Geml, J; Váczy, KZ. Evaluation of the biocontrol capabilities of *Clonostachys rosea* against grapevine trunk diseases. In: 16th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union (2022) Paper: 25.

Geiger, A; Leal, CM; Molnár, A; Lepres, L; Muller, M; Kgohe, G; Váczy, KZ; Geml, J. A szőlő növénypatogén gombaközösségére ható tényezők - mikroélőhely, fajta, egészségi állapot, évjárat, szezonális – vizsgálata In: Márialigeti, Károly; Dobay, Orsolya (szerk.) Magyar Mikrobiológiai Társaság 2022. évi Nagygyűlése (2022)

Geiger, A; Karácsony, Z; Golen, R; Váczy, KZ; Geml, J. Egészséges és Esca-tünetes szőlő növénypatogén gombaközösségének vizsgálata a tokaji borvidéken, különös tekintettel a GTD kórokozókra In: Haltrich, Attila; Varga, Ákos (szerk.) 68. Növényvédelmi Tudományos Napok Magyar Növényvédelmi Társaság (2022) 74 p. p. 29.

Geiger, A; Karácsony, Z; Golen, R; Váczy, KZ; Geml, J. The compositional turnover of grapevine-associated plant pathogenic fungal communities are greater among intraindividual microhabitats than among healthy and Esca-diseased plants

ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 68: Supplement 1 p. 68 (2021)

Geiger, A; Karácsony, Z; Golen, R; Geml, J; Váczy, KZ. A *Clonostachys rosea* biokontroll tulajdonságainak felmérése *in planta* konfrontációs tesztek segítségével a szőlő korai elhalását okozó gombás betegségek ellen. In: Haltrich, Attila; Varga, Ákos (szerk.) 67. Növényvédelmi Tudományos Napok konferenciakiadványa: Növényvédelmi Tudományos Napok 2021 (2021) 76 p. p. 62.

Geiger, A; Karácsony, Z; Golen, R; Váczy, KZ; Geml, J. Különböző fajtájú Esca tünetes és tünetmentes szőlők növénypatogén gombaközösségének vizsgálata az Egri borvidéken In: Haltrich, Attila; Varga, Ákos (szerk.) 67. Növényvédelmi Tudományos Napok konferenciakiadványa: Növényvédelmi Tudományos Napok 2021 (2021) 76 p. p. 30

Geiger, A; Karácsony, Z; Golen, R; Váczy, KZ; Geml, J. Esca tüneteit mutató szőlő növénypatogén gombaközösségét befolyásoló tényezők vizsgálata = Investigation Of Factors Influencing The Plant Pathogenic Fungal Community Of Grapevines Showing Symptomss Of Esca In: Bíró, Andrea Barbara; Tuza-Matyus, Judit; Hegyi, Ádám István; Váczy, Kálmán Zoltán (szerk.) Növényegészségügyi jó gyakorlatok az Eszterházy Károly Egyetem szőlő-bor kiválósági központjában: konferencia (2020) pp. 7-8., 2 p.

Irodalomjegyzék

1. BUTTS, C. T. (2008). Social network analysis with sna. J. Stat. Softw., 24, 1-51.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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>
6. 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.
7. 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.

8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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
15. WHITE TJ, 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.
16. 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. In: *PhytoFrontiers*, (ja).