



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM
Kertészettudományi Doktori Iskola

**A szőlő feketerothadását okozó *Phyllosticta ampellicida* QoI
fungicidekkel szembeni érzékenységeinek és *citokróm b*
génjének jellemzése**

Doktori (PhD) értekezés

HORVÁTH N. ÁRON

Készült a HUN-REN ATK Növényvédelmi Intézetében

Budapest

2024

Doktori iskola megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Kertészettudomány

Vezetője:

Zámboriné Dr. Németh Éva

Egyetemi tanár, az MTA doktora

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezető:

Dr. Bereczky Zsolt

Kutatási vezető

Saniplant Biotechnológiai Kutató és Fejlesztő Kft.

Társtémavezető:

Prof. Dr. Palkovics László Amand

Egyetemi tanár

Széchenyi István Egyetem, MÉK,

Növénytudományi Tanszék

.....
Zámboriné Dr. Németh Éva

Iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Bereczky Zsolt

Témavezető jóváhagyása

.....
Prof. Dr. Palkovics László Amand

Társtémavezető jóváhagyása

TARTALOM

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
2. BEVEZETÉS.....	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
3.1. A betegség és a kórokozó bemutatása.....	7
3.1.1. A feketerothadás története.....	7
3.1.2. A <i>P. ampellicida</i> és rokon fajainak filogenetikai helyzete.....	8
3.1.3. A feketerothadás elterjedése és jelentősége.....	9
3.1.4. A <i>P. ampellicida</i> életciklusa és a fertőzés tünetei.....	10
3.1.5. A szőlő fogékonysága.....	13
3.2. A <i>P. ampellicida</i> -val szembeni védekezés lehetőségei.....	13
3.2.1. Agrotechnikai eljárások.....	13
3.2.2. Kémiai növényvédelem és fungicidrezisztencia.....	14
3.2.2.1. Fungicidek és fungicidrezisztencia.....	14
3.2.2.2. Kémiai védekezés a <i>P. ampellicida</i> ellen.....	16
3.2.2.3. A QoI-k hatásmechanizmusa.....	16
3.2.2.4. A QoI fungicidekkel szembeni rezisztencia aspektusai.....	17
3.2.2.5. A <i>citokróm b</i> gén exon/intron szerkezetének szerepe a QoI rezisztenciában.....	18
3.2.2.6. Az alternatív-oxidáz útvonal szerepe a QoI rezisztenciában.....	20
3.2.3. Korábbi vizsgálatok a <i>P. ampellicida</i> QoI-kkal szembeni érzékenységevel kapcsolatban.....	20
3.3. Molekuláris ujjlenyomat módszerek genotipizáláshoz.....	22
4. CÉLKITŰZÉSEK.....	26
5. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	27
5.1. Törzsgyűjtemény létrehozása és fenntartása.....	27
5.2. <i>In vitro</i> fungicidérzékenységi teszt.....	29
5.2.1. Micéliumnövekedés-gátlási teszt.....	29
5.2.2. Konídiumcsírázás-gátlási teszt.....	35

5.3. Molekuláris vizsgálatok	36
5.3.1. Nukleinsav kivonás	36
5.3.2. ISSR genotipizálás	37
5.3.3. Szőlőről és vadszőlőről származó <i>Phyllosticta</i> izolátumok/törzsek filogenetikai elemzése.....	39
5.3.4. A <i>citokróm b</i> gén és mRNS részleges felszaporítása.....	40
5.3.5. Molekuláris klónozás és szekvenciameghatározás	44
5.4. Statisztikai elemzések	46
6. EREDMÉNYEK	47
6.1. ISSR genotipizálás	47
6.2. Szőlőről és vadszőlőről származó <i>Phyllosticta</i> izolátumok/törzsek filogenetikai elemzése	48
6.3. Fungicid érzékenységi teszt	51
6.3.1. A micéliumnövekedés gátlása.....	51
6.3.2. A konídiumcsírázás gátlása.....	57
6.4. A <i>citokróm b</i> gén/mRNS molekuláris jellemzése <i>Phyllosticta</i> izolátumokban/törzsekben	59
6.4.1. Molekuláris fungicidrezisztencia-markerek a <i>citokróm b</i> mRNS-ben.....	59
6.4.2. A <i>citokróm b</i> gén exon/intron szerkezete.....	60
7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	65
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	72
9. ÖSSZEFOGLALÁS.....	74
10. SUMMARY	76
11. MELLÉKLETEK.....	78
M.1. Irodalomjegyzék.....	78
M.2. Egyéb mellékletek	87
M.2.1. táblázat. A <i>Vitis vinifera</i> -ról izolált és ISSR módszerrel és klaszterelemzéssel genotipizált 499 <i>P. ampellicida</i> izolátum gyűjtési és klaszterbesorolási adatai.	87

M.2.2. táblázat. A gombatelepek növekedésének *.jpg képekből történő mérésére használt MATLAB® szkript kódja.	99
M.2.3. ábra. A 499 <i>P. ampellicida</i> izolátum három ISSR-marker segítségével meghatározott ISSR-mintázata alapján készült Unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) dendrogram.	107
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	108

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AOX	alternatív-oxidáz enzim
AOXI	alternatív-oxidáz enzim inhibitor (pl. SHAM)
AS	azoxistrobin
BlastN	Basic local alignment search tool Nucleotide version
bp	bázispár (base pair)
cDNS	kiegészítő (complementary) DNS (mRNS átírásából keletkezik)
<i>cyt b</i>	<i>citokróm b</i> gén
<i>CYTB</i>	<i>citokróm b</i> mRNS
CYTB	citokróm b fehérje
DMI	demetiláz inhibitor fungicid (DeMethylase Inhibitor)
DNS	dezoxiribonukleinsav
EC ₅₀	félhatásos koncentrációérték (Effective Concentration for 50% inhibition)
Gly	glicin (aminosav)
ISSR	köztes egyszerű szakvenciaismétlődés (inter simple sequence repeat)
ITS	belső átíródo elválasztó (DNS szakasz) (internal transcribed spacer)
mRNS	hírvivő (messenger) RNS
SSR	egyszerű szekvenciaismétlődés (simple sequence repeat) vagy mikroszatellit (microsatellite)
ORF	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
Phe	fenilalanin (aminosav)
QoI	Quinone outside Inhibitor
RNS	ribonukleinsav
SD	szórás (standard deviation)
SHAM	szalicil-hidroxámsav (salicylhydroxamic acid)
SNP	pontmutáció (single nucleotide polymorphism)
T _a	primerkötődési hőmérséklet (annealing temperature)
T _e	lánchosszabbítási hőmérséklet (elongation temperature)
t _e	lánchosszabbítási idő (elongation time)
TS	trifloxistrobin
UPGMA	unweighted pair group method with arithmetic mean
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid

2. BEVEZETÉS

A szőlő feketerothadását a *Phyllosticta ampellicida* (Engelm.) Aa (szinonim név: *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala és Ravaz) tömlősgomba okozza. A kórokozó Észak-Amerikában őshonos, azonban 1999-ben hazánkban is kimutatták jelenlétét (Mikulás és Tomcsányi, 1999). A feketerothadás jelentősége világszerte elsősorban a borvidék földrajzi elhelyezkedésétől és az adott év időjárásától/vagy a borvidék éghajlati viszonyaitól függ. Magyarországon a kórokozó az északi borvidékeken (pl. Egri és Tokaj-hegyaljai) tartósan jelen van, és állandó figyelmet igényel. Kedvező (meleg és párás) körülmények között a *P. ampellicida* képes a szőlő minden zöld szervét megfertőzni (Molitor és Berkemann-Loehnertz, 2011). Megfelelő védelem nélkül a fiatal bogyók fertőződése súlyos, 5%-tól akár 100%-ig terjedő termés kiesést okozhat (Loskill *et al.*, 2009).

A kórokozó jelentősége a 21. században mind itthon, mind Európa más részein is növekedett, olyannyira, hogy Magyarországon 2010-ben és 2014-ben, két a szokásosnál csapadékosabb nyári időjárást mutató évben is jelentős járványt okozott (Dula, 2017; Mikulás, 2015). A kórokozó elleni védekezés elsősorban a növényegészségügyi intézkedésekre (pl. a gyümölcsmúmiák eltávolítása a növényről) és növényvédőszer alkalmazására támaszkodik. A feketerothadás elleni védekezésben a fungicidek leghatékonyabb csoportjai közé tartoznak a mitokondriális légzést gátló ún. quinone outside inhibitorok (QoI-k) és demetiláz inhibitorok (DMI-k), valamint a ditiokarbamátok (Hoffman *et al.*, 2002). Egészségügyi és környezetvédelmi aggályok miatt azonban az Európai Unió nemrégiben számos, leginkább a DMI és ditiokarbamát csoportba tartozó hatóanyag engedélyét visszavonta (EU Pesticides Database (v.2.2) Search Active substances, safeners and synergists, 2022). További, a kórokozó számára feltételezhetően kedvező folyamatok (pl. liztharmat-rezisztenciát hordozó újabb szőlőfajták használata, valamint a klímaváltozás hatására átalakuló időjárási körülmények) összességében kiemelhetik a QoI fungicidek fontosságát a szőlő feketerothadás elleni védekezésben.

Ezért a jelen doktori munka elsődleges célja a *P. ampellicida* izolátumok QoI fungicidekkel szembeni érzékenységének *in vitro* felmérése és ehhez kapcsolódóan a QoI fungicidrezisztenciával összefüggésbe hozható *citokróm b* gén és mRNS nukleinsav-szekvenciájának jellemzése.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A betegség és a kórokozó bemutatása

3.1.1. A feketerothadás története

A betegség első írásos említése 1804-re vezethető vissza, amikor az Egyesült Államok nyugati részén felfedeztek egy új szőlőbetegséget (Lamson-Scribner és Viala, 1888). Az 1848-as első komolyabb járványig azonban nem folytak a feketerothadással kapcsolatos vizsgálatok (Ramsdell és Milholland, 1988). Az 1870-es évekre a feketerothadás több amerikai államban is tartós problémát jelentett, több helyről teljes termés kiesésről számoltak be, ami egyes területeken a szőlőtermesztés felhagyásához vezetett (Lamson-Scribner és Viala, 1888). A kórokozó feltehetően fertőzött szőlő szaporítóanyag szállítmányokkal került 1885-ben Franciaországba, ahol nem sokkal a lisztharmat és peronoszpóra elterjedését követően terjedni kezdett a csapadékosabb, meleg délnyugati szőlőterületeken. A betegséget Európában először Viala és Ravaz (1886) írták le. Ezt követően azonban néhány évtizedig csak Franciaország egyes tartományaiban, elsősorban ütötte fel a fejét a feketerothadás. Magyarországon hivatalosan 1892-ben tettek először megelőző lépéseket ezzel az akkor új betegséggel kapcsolatban: ennek részeként két évre szőlővesszőbehozatali zárlatot rendeltek el. Ezután pedig csak feketerothadástól mentes területekről származó és felszínsterilizált szőlővesszők behozatalát engedélyezték (Linhart és Mezey, 1895). A megelőző intézkedéseknek és más tényezőknek (pl. lisztharmat és peronoszpóra elleni kémiai növényvédelem) köszönhetően egészen a 2000-es évek elejéig a kórokozó jelenléte nem okozott komolyabb gondot az európai szőlőtermesztésben, ekkor azonban egyre több országban figyelték meg járványszerű pusztítását (Molitor, 2009). Annak ellenére, hogy jelenlétét Európában már több mint 100 évvel korábban felfedezték, hazánkban egészen a 20. század végéig nem észlelték (Mikulás és Tomcsányi, 1999). A feketerothadás kórokozóját a felfedezése óta eltelt több mint 150 évben számos tudományos névvel illették. Ennek oka többek között az volt, hogy mind az ivaros, mind az ivartalan alakja ismert, amelyeket külön névvel illetnek. Az ivartalan alak nemzetségneve *Phyllosticta* helyett *Phoma* volt egészen van der Aa (1973) taxonómiai revíziójáig. De szinoním névként előfordultak a *Laestedia*, *Sphaeria* és *Botryosphaeria* nemzetségnevek is. A jelenlegi rendszertani besorolást Kendrick (2017) molekuláris biológiai eredményekkel is megerősítette. Ennek megfelelően a *P. ampellicida* a gombák országán (*Fungi*) belül, a tömlősgombák törzsén

(Ascomycota) belül, a *Dothideomycetes* osztály, *Botryosphaeriales* rendjének *Phyllostictaceae* családjába tartozik.

3.1.2. A *P. ampellicida* és rokon fajainak filogenetikai helyzete

A *P. ampellicida*-val kapcsolatos kutatásokban érdemes megfontolni a vele közeli rokonságban álló *Phyllosticta* fajok vizsgálatát is, ugyanis ezek a fajok nemrég még egységesen a *P. ampellicida* fajkomplexbbe tartoztak. A 19. században úgy vélték, hogy a *P. ampellicida* a *Vitaceae* növény család számos nemzetségét képes megfertőzni, köztük az *Ampelopsis* Michx. (pl. borszőlő), a *Cissus* L. (pl. hármalevelű kúszóka), a *Parthenocissus* Planch. (pl. tapadó- és háromkarélyú vadszőlő) és *Vitis* L. (pl. borszőlő) nemzetségeket is (Lamson-Scribner és Viala, 1888). Ugyanakkor Luttrell (1948) keresztfertőzési kísérletekkel kimutatta, hogy a gombának három különböző gazdaspecifitású típusa létezik: *G. bidwellii* f. *euvitis* Luttrell a *Vitis* nemzetség fajait fertőzi; *G. bidwellii* f. *muscadini* Luttrell a *Vitis rotundifolia* és a *Vitis vinifera* fajokat fertőzi, míg a *G. bidwellii* f. *parthenocissi* Luttrell a *Parthenocissus* fajok kórokozója. Ezt követően az első komplexebb, molekuláris biológiai, proteomikai módszereket és morfológiai jellemzést is alkalmazó munkájukban Wicht *et al.* (2012) azt javasolták, hogy molekuláris bizonyítékok alapján legalább két fajt különítsenek el a *P. ampellicida* fajkomplexben belül. Végül Zhang *et al.* (2013) és Zhou *et al.* (2015) további molekuláris vizsgálatok alapján a *Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch. és *Pa. tricuspadata* (Sieb. és Zucc.) Planch. fajokat fertőző *P. ampellicida* törzseket *Phyllosticta parthenocissi* K. Zhang, N. Zhang és L. Cai, illetve *Phyllosticta partricuspadatae* N. Zhou és L. Cai néven új fajokba sorolták. Ezek a fajok jelenlegi tudásunk szerint csak az eredeti gazdanövényüket (*Pa. quinquefolia*, vagy *Pa. tricuspadata*) képesek megfertőzni. Míg a *P. ampellicida* fajba tartozó törzsek gazdaspecifitása jelenlegi tudásunk szerint a *Vitis* spp. fajaira korlátozódik (pl. *V. vinifera*, *V. labrusca* és *V. riparia*; Zhang *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015).

A *P. ampellicida* QoI fungicidekkel szembeni érzékenységére Miessner *et al.* (2011) már végeztek kísérleteket, amelyekbe a CBS törzsgyűjtemény 237.48 számú, *Pa. tricuspadata*-ról izolált törzsét is bevonták, ezért az összehasonlíthatóság érdekében én is bevontam ezt a törzset a munkámba. Ez a törzs nem szerepelt Zhang *et al.* (2013) és Zhou *et al.* (2015) vizsgálataiban, ezért fajszerű besorolásának megerősítése érdekében ennek a törzsnek és néhány más *V. vinifera*-ról származó *P. ampellicida* izolátumnak az ITS lókuszát filogenetikai elemzésnek vetettük alá.

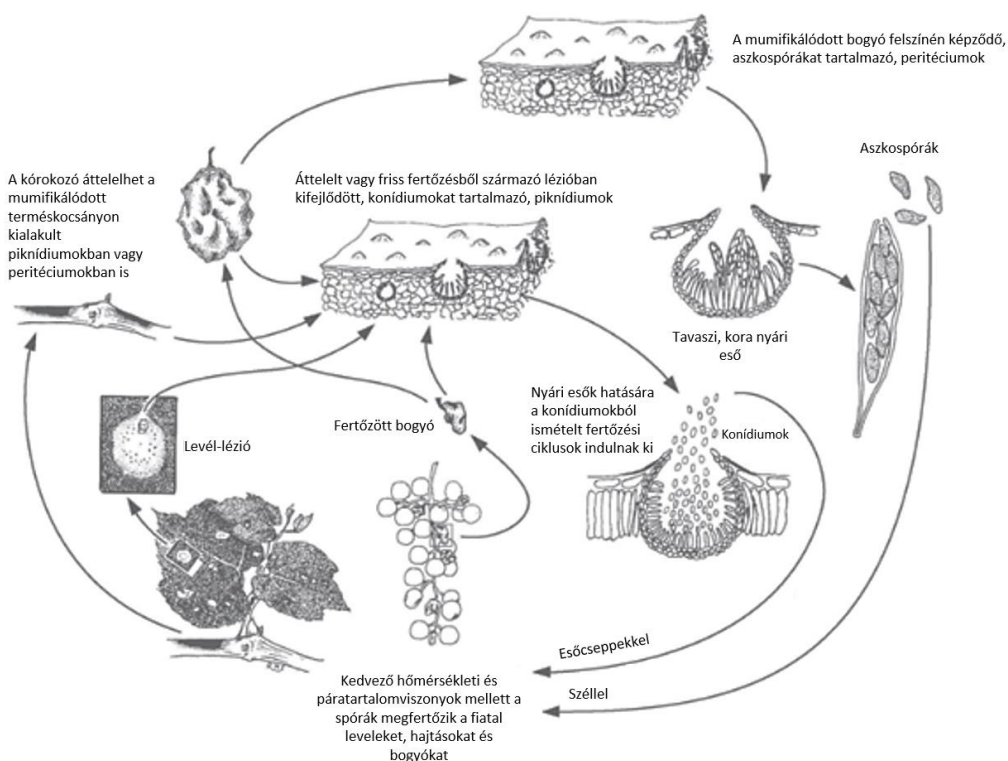
3.1.3. A feketerothadás elterjedése és jelentősége

Bár a *P. ampellicida* Észak-Amerikában őshonos kórokozó, mára Ausztrália kivételével a világ valamennyi bortermelő vidékén megtalálható (Distribution map - *Guignardia bidwellii*, 1991). A legújabb molekuláris bizonyítékok arra utalnak, hogy több független behurcolása is történhetett Európába (Rinaldi *et al.*, 2017). Az első behurcolást követően feltehetően lassan terjedt tovább a kontinens belseje felé, de mára szinte minden európai országban jelen van. Bár minden hagyományos európai szőlőfajta fogékony a kórokozóra (McGrew és Still, 1961), a 19. és 20. század nagy részében nem jelentett komoly fenyegetést a szőlőtermesztésre Európa legtöbb borvidékén. A 21. század eleje óta azonban Európa különböző országaiban (pl. Svájc, Franciaország, Németország) jelentős veszteségekkel járó feketerothadás járványok zajlottak le (Harms *et al.*, 2005). Hasonlóan az Európai kontinensen eltöltött első néhány évtizedéhez, a kórokozó hazánkban sem okozott komolyabb megbetegedéseket az első 10 évben, de fokozatosan növekvő jelentőséggel bír (Dula, 2017). Magyarországon a kórokozó az Egri és a Tokaj-hegyaljai borvidékeken tartósan jelen van és állandó figyelmet igényel, míg más, szárazabb éghajlatú borvidékeken, mint például a Szekszárdi borvidéken ritkán okoz megbetegedést és akkor is főleg az ökológiai művelésű ültetvényekben (Hoffmann Péter személyes közlése). Ugyanakkor egyes országokban (pl. Portugália, Olaszország) a kórokozó fokozódó jelentőségét és terjedését figyelték meg az elmúlt években, feltehetően a kórokozó számára kedvező (pl. klimatikus, növényvédelmi) viszonyok kialakulása miatt (Rinaldi *et al.*, 2013; Rinaldi és Mugnai, 2012).

Általánosan elmondható, hogy feketerothadás jelentősége a szőlő másik három járványos megbetegedéséhez (szőlőlisztharmat (*Erysiphe necator* Schwein.), szőlőperonoszpóra (*Plasmopara viticola* (Berk. és M.A. Curtis) Berl. és De Toni) és szürkerothadás (*Botrytis cinerea* Pers.)) viszonyítva elsősorban a borvidéktől (mikroklimatikus viszonyok) és művelési módtól (ökológiai, vagy üzemi) függ. Üzemi szőlőtermesztés és szárazabb éghajlati viszonyok között általában a feketerothadás a legkisebb jelentőségű betegség a négy közül, azonban egyes helyszíneken és/vagy évjáratokban akár a legjelentősebbé is előléphet. Fontos kórokozó például a Németországban a Rajna-vidéken található ökológiai gazdálkodásokban (Holz *et al.*, 2005), valamint esős koranyári, nyári időjárású években hazánkban is okozott már országos szintű járványt (Mikulás, 2015).

3.1.4. A *P. ampellicida* életciklusa és a fertőzés tünetei

A szőlő feketerothadás kórokozójának életciklusa egy rövid ivaros szakaszt leszámítva nagyrészt ivartalan (haploid) szakaszból áll. A kórokozó elsődlegesen a fertőzés hatására összetöppedő, kiszáradó, megfeketedő ún. mumifikálódott szőlőbogyók felszínén kialakult ivaros termőtestek (peritéciumok) formájában telet át (1. ábra; Wilcox *et al.*, 2015).



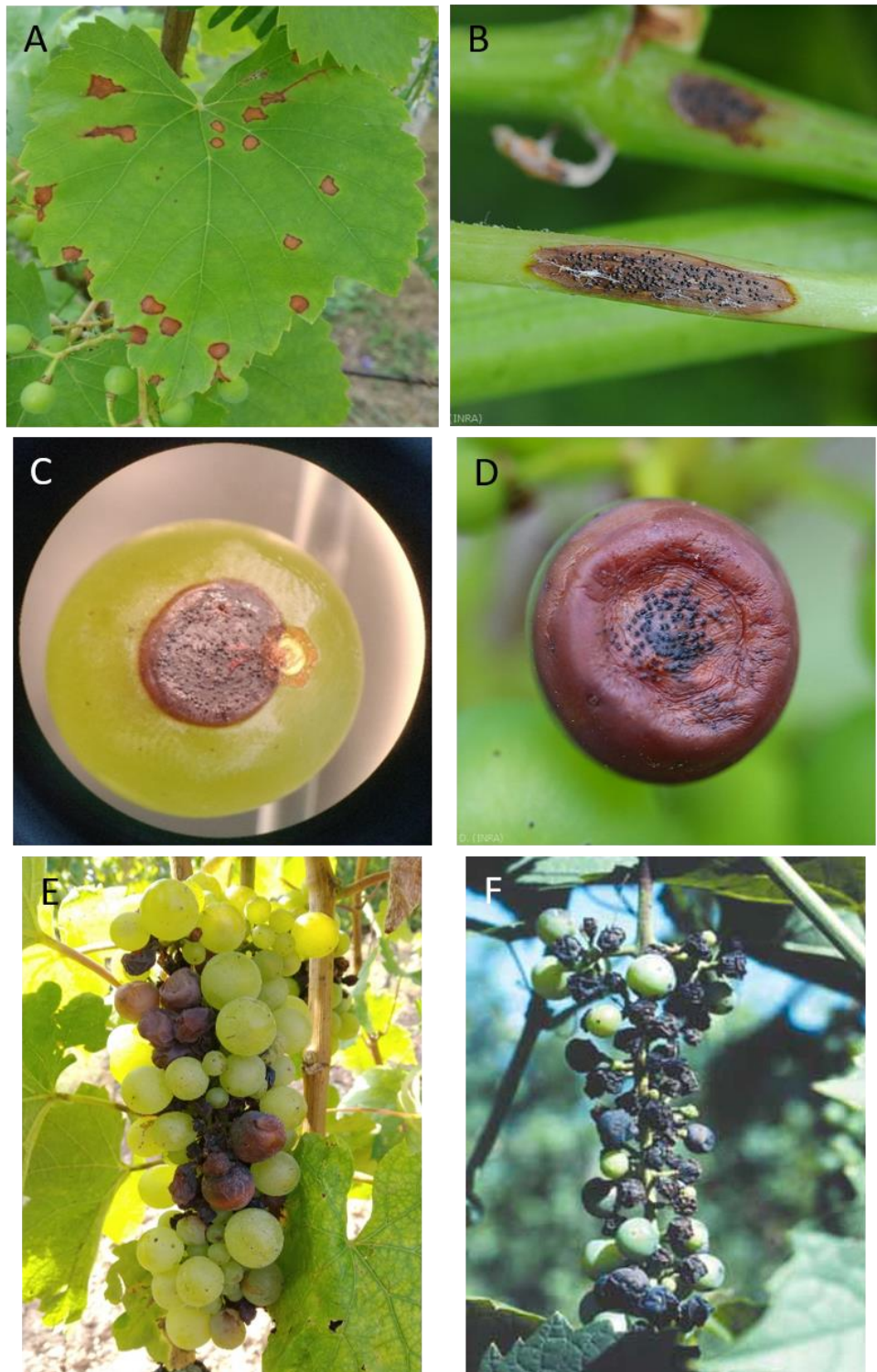
1. ábra. A *P. ampellicida* életciklusa (Wilcox *et al.*, 2015 nyomán).

Tavasza a peritéciumokon belül a tömlőkben fejlődnek ki az aszkospórák, amelyek a tavaszi vagy nyár eleji eső hatására kiszóródva megkezdik az elsődleg (primer) fertőzést (1. ábra; Hoffman *et al.*, 2004). Amennyiben a kórokozó spórája megfelelő hőmérsékletű és páratartalmú körülmények között (Molitor és Beyer, 2014; Onesti *et al.*, 2016; Spotts, 1977), víz jelenlétében kerül a gazdanövény fiatal, zöld részeinek (levél, levélnyel, hajtás, kacs, fürt) felszínére, úgy a csírázást követően a képződő hifa behatol a kutikula alá. Ezt követően tünetmentes, látens időszak következik, amelynek hossza általában 10 és 20 nap közé esik, ezt követően jelennek meg a tünetek (Kuo és Hoch, 1996b). Ezek a tünetek 0,5-1 cm átmérőjű, esetleg összeérő telepek esetében nagyobb méretű világosbarna nekrotikus elváltozások (léziók) (2. ábra A és C; Ullrich

et al., 2009). A léziók megjelenését követően ezekben 1-2 napon belül kifejlődnek a piknídiumok, amelyekből nedvesség hatására hamarosan nagy mennyiségű konídium szabadul ki (másodlagos fertőzés; Onesti *et al.*, 2017).

Szárakon, levélnyélen és a hajtásokon a hosszúkás, sötétebb léziók jellemzőek, amelyeken szintén piknídiumok fejlődnek (2. ábra B). Az akár 2 cm hosszú foltok benyomódhatnak, elpusztítva a kapcsolódó szöveteket, ami a hajtáscsúcs, a virágzat és a virágzatnyél elhalását okozza (Ramsdell és Milholland, 1988). A levélnyélen lévő hosszúkás fekete foltok körülveszik a szárat, amely letörhet, és a levél teljesen elszáradhat (Wilcox, 2003).

A szőlő feketerothadása a legnagyobb kárt a virágzat és/vagy a bogyók fertőzésével okozza. A bogyók fertőződése eleinte apró, ütődésszerű foltként válik láthatóvá általában zöldborsó méretű állapotban, amely rövid idő alatt kékesbarna folttá, majd 1 cm-es nekrotikus lézióvá alakul (2. ábra C). Ezt követően általában az egész bogyó 1-2 nap alatt nekrotizálódik, megpuhul, és csokoládébarna színűvé válik (2. ábra D és E). Végül 4-5 nap alatt fokozatosan kiszáradva, zsugorodva, kemény, lilásfekete ún. bogyó-múmiává alakul át, amelynek felszínén kialakulnak a piknídiumok és idővel a peritéciumok is (Hoffman *et al.*, 2002; Molitor és Berkelmann-Loehnertz, 2011; Wilcox, 2003). A mumifikálódott bogyók (ellentétben pl. a peronoszpórással) nem peregnek ki a fűrtől, erősen a fűrthöz kötődve maradnak, amellyel jelentős fertőzési gócot alakíthatnak ki a tőkéken (2. ábra F; (Kuo és Hoch, 1996b; Molitor és Beyer, 2014)). Megfelelő védelem nélkül a fiatal bogyók fertőződése és mumifikálódása súlyos termés kiesést okozhat (Loskill *et al.*, 2009).



2. ábra. A feketerothadás tünetei a szőlő levelén (A), hajtásán (B), bogyóján (C és D), valamint a fürtökön (E és F). A B, C és D képeken látható fekete pontszerű képletek a kórokozó ivartalan szaporítóképletei, a piknidiumok. A C képen a bogyó korai fertőzési stádiuma, az ún. „madárszem” tünet látható, D-E-F képeken keresztül pedig látható a bogyó fertőződésének folyamata a mumifikálásig (fekete bogyók az F képen). Forrás: A, C és E (a szerző felvételei), B és D (<http://ephytia.inra.fr/en/D/2052>), F (Wilcox, 2003).

3.1.5. A szőlő fogékonysága

A levelek és a fürtök fejlődésük korai állapotában a legérzékenyebbek (Hoffman *et al.*, 2002; Lamson-Scribner és Viala, 1888). A levelek fogékonysága a levelek teljes kiterüléséig megmarad, de fokozatosan csökken, majd teljesen meg is szűnik (Kuo és Hoch, 1996a). A kiterülés közben megfertőződött leveleken nagyobb méretű léziók alakulhatnak ki. Legfogékonyabbnak a hajtáscsúcstól számított 2. és 3. levelek tekinthetők (Ullrich *et al.*, 2009). Ugyanez igaz a bogyókra is: az időjárási viszonyoktól függően a fürtök legérzékenyebb időszaka a virágzás utáni 2-7. hétig tartó időszakban van (Molitor és Berkelmann-Loehnertz, 2011; Ferrin és Ramsdell, 1977; Hoffman *et al.*, 2002). A fürtök fogékonysága a virágsapkák lehullásától számított körülbelül a 10. hétig fokozatosan csökken, a zsendülést követően pedig szinte teljesen megszűnik. A szőlő érettebb szerveiben ún. ontogenetikus rezisztencia alakul ki a kórokozóval szemben (Hoffman *et al.*, 2002; Kuo és Hoch, 1996b), amelyhez hasonlót az *Erysiphe necator*-ral szemben is tapasztaltak (Gadoury *et al.*, 2003). A fogékony periódus kezdete és hossza azonban erősen függ az időjárási viszonyoktól és az alkalmazott növényvédelmi technikáktól is.

3.2. A *P. ampellicida*-val szembeni védekezés lehetőségei

3.2.1. Agrotechnikai eljárások

Az üzemi szőlőtermesztésben a feketerothadás elleni védekezés elsősorban a megfelelő növényegészségügyi intézkedésekre (pl. a gyümölcsmúmiák eltávolítása) és a fungicidek alkalmazására támaszkodik. A fertőző anyag mennyiségének csökkentését célzó növényegészségügyi intézkedések jelentik a kórokozó elleni védekezés alapját, és jelentősen befolyásolhatják a fungicidek hatékonyságát is. A fertőzött növényi részek eltávolítása és talajba forgatása vagy elégetése kulcsfontosságú, mert ezzel jelentősen csökkenthetjük az áttelelő inokulum mennyiségét (Northover, 2009). A betegség kialakulásának esélyét tovább csökkenthetjük időben elvégzett zöldmunkával, szellős lombfal kialakításával és a sorok gyommentesen tartásával (Dula, 2012). Ugyanakkor néhány egyéb tényező is befolyásolhatja a feketerothadás elleni védekezés hatékonyságát. Elsősorban az, hogy a fertőzés kezdeti, látens szakaszában a gomba hemibiotróf (Luttrell, 1974), endoparazita életmódot mutat (Ullrich *et al.*, 2009), így a betegséget kb. 10-20 napig nem lehet szabad szemmel észlelni, ami a fürtfertőzéshez kedvező feltételek esetén komoly termés kiesést eredményezhet. További tényező lehet a jellegzetes tünetek

ismeretének hiánya, így a nem megfelelő diagnózis, ami helytelen gombaölőszerek alkalmazásához vezethet, ahogyan azt Gessler (2006, 2008), Rinaldi és Mugnai (2012), valamint ifj. Szepsy István (személyes közlés, 2021, Mád, Magyarország) is tapasztalták. A felhagyott szőlőültetvények a kórokozó felhalmozódásával külső, független inokulumforrásként szolgálhatnak (Harms *et al.*, 2005). A gépi metszés alkalmazása elősegítheti a *P. ampellicida* fertőző anyagának (pl. fertőzött hajtások, bogyómúmiák) tőkén maradását, ami az inokulum felhalmozódásához és így elégtelen védekezéshez vezethet (Becker és Pearson, 1996).

3.2.2. Kémiai növényvédelem és fungicidrezisztencia

3.2.2.1. Fungicidek és fungicidrezisztencia

Fungicideket az emberiség már 200 évvel ezelőtt is rendszeresen használt, elsősorban a gabona és a szőlő védelmére. A felhasznált növényvédőszer szama, mennyisége, valamint a kezelt kultúrnövények köre hatalmas mértékben megnőtt a második világháborút követően (Brent és Hollomon, 2007). Két nagyon régi, bevált gyógymódot, a rézalapú készítményeket és a ként még mindig széles körben és hatékonyan használják (Hollomon, 2015). Némely régebbi vegyületcsoport tagjait, mint például a ditiokarbamátokat (metiram) és a ftálamidokat (folpet) továbbra is használják. Ezek esetében az elmúlt több mint 60 évben sem tapasztaltak rezisztenciát, amelynek oka feltételezhetően abban keresendő, hogy ezek a hatóanyag csoportok főleg megelőző kezelésre használható, többhatáshelyű fungicideket tömörítnek (Brent és Hollomon, 2007).

A szisztémás, egyhatáshelyű, specifikusabb fungicidek bevezetésével a rezisztencia előfordulása nagymértékben megnőtt, és a rezisztencia kialakulásához szükséges idő gyakran viszonylag rövid volt, néha az első kereskedelmi bevezetéstől számított két év. A fungicidrezisztenciának számos mechanizmusa ismert. Ezek közé tartozik az ún. kötőhely-változás (target-site mutation), a célfehérje fokozott termelése; egy alternatív anyagcsere-út vonal kifejlesztése, amely megkerüli a célpontot; a gombaölőszer metabolikus lebontása és kizárása vagy kiürítése ATP-áz-függő transzporterfehérjék segítségével. Ezek közül a leggyakoribb mechanizmus a kötőhely megváltozása, amelynek hatására a célfehérje részben vagy teljesen elveszti érzékenységét a fungiciddal szemben. Ez magyarázatot adhat arra, hogy a régebbi fungicid hatóanyagokkal szemben miért nem merültek fel rezisztenciaproblémák. Miután behatoltak a gomba sejtjébe, a régebbi fungicidek általános enzimgátlóként hatnak,

számos célpontra hatva (ezért nevezik őket néha "multi-site" inhibitoroknak). A gombákra szelektíven hatnak, mivel sokkal könnyebben hatolnak be a gombákba és sokkal könnyebben halmozódnak fel bennük, mint a növények és az állatok szervezetében. A számos célpontnak egyszerre kell megváltoznia ahhoz, hogy a gombaölőszer ne tudjon hatni. Az ehhez szükséges nagyszámú genetikai változás együttes bekövetkezésének esélye elhanyagolható, ráadásul egy ilyen sok változással rendelkező szervezet nagy valószínűséggel nem lenne patogén vagy akár életképes. Ezzel szemben a modern fungicidek elsősorban egyetlen célpontra fejtik ki hatásukat, ezért gyakran "egyhatáshelyű" vagy "helyspecifikus" fungicideknek nevezik őket. Így egyetlen génmutáció is okozhat olyan változást a célpontra, hogy az sokkal kevésbé lesz érzékeny a fungiciddel szemben (Brent és Hollomon, 2007). A gombapopulációk fungicidérzékenység-monitorozásának megalapozására szokták meghatározni a populáció/faj alapérzékenységét (baseline sensitivity). Ez alatt azt az átlagos félhatásos koncentráció (EC_{50}) értéket kell érteni, amellyel egy, az adott hatóanyagra még érzékeny (adott esetben a hatóanyaggal még nem kezelt), populáció/faj rendelkezik. A félhatásos koncentráció (EC_{50}) azt a koncentrációértéket jelenti, amelyen az adott hatóanyag a teljes hatásának 50%-át fejt ki a célpontra. Más szóval az EC_{50} koncentráció alkalmazásával például fungicidek esetében a kórokozó növekedési üteme felére korlátozható. Az alapérzékenységet általában EC_{50} értéktartományban szokták megadni. Ennek meghatározása fontos kiindulási alap, amelyhez a szabadföldi gombapopulációk érzékenységében bekövetkező változásokat lehet viszonyítani (Russel, 2014).

A kórokozó populációk mindegyike tartalmazhat olyan pontmutációkat hordozó izolátumokat, amelyek egy vagy több fungiciddel szemben kevésbé érzékennyé teszik az izolátumot. Ezek a mutációk egy gombaölőszer ismételt használatának (szelekciós hatás) vagy egy másik fungicid ismételt alkalmazásának hatására előnyt jelenthetnek hordozóiknak. Egy gombaölőszer használatának éve alatt a kórokozó túlélése szempontjából előnyös mutációt hordozó izolátumok, amelyek már nem eléggé érzékenyek ahhoz, hogy megfelelő védekezést lehessen ellenük végezni az adott szerrel, kiválogatódhatnak és elszaporodhatnak a populációban. A korábban jól kontrollált célszervezetek rezisztens populációinak kialakulása az antibiotikumok (pl. szulfonamidok, penicillin, streptomycin), valamint egyes rovarölő szerek (pl. DDT) esetében már közel hatvan éve széles körben ismert (Brent és Hollomon, 2007).

Az elmúlt 20 évben a rezisztenciához köthető pontmutációk (rezisztenciamarkerek) kimutatására szolgáló PCR-alapú diagnosztikai módszerek gyors fejlődése segítette a rezisztencia mechanizmusok azonosítását, különösen a kötőhely-változással járó mechanizmusokét. Mára több fontos rezisztenciagént izoláltak és jellemeztek. Mindegyik esetben egyetlen pontmutáció a célfehérje egyetlen aminosavának megváltozását okozza, így a gombaölőszer már nem kötődik olyan szorosan (Brent és Hollomon, 2007).

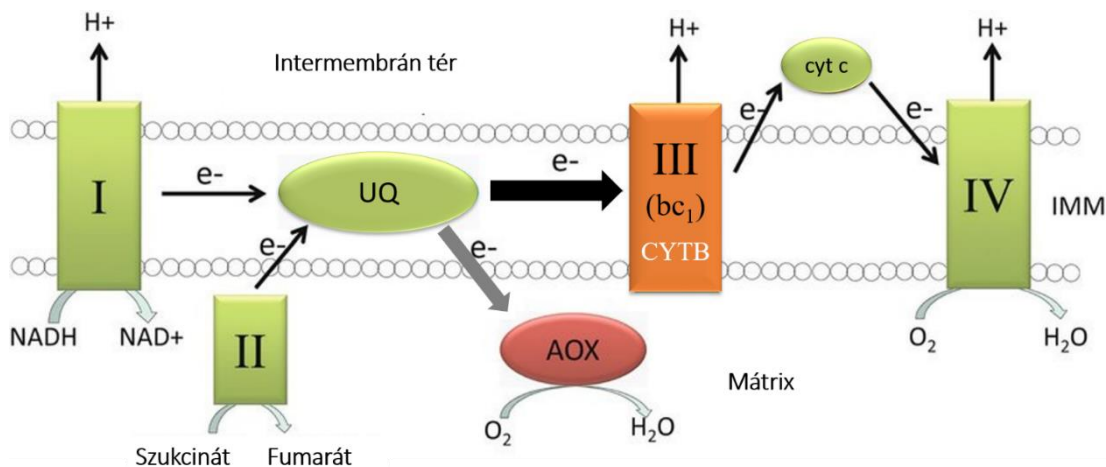
3.2.2.2. Kémiai védekezés a *P. ampellicida* ellen

A *P. ampellicida* elleni védekezés elsősorban a növényvédőszer használatára támaszkodik. A kémiai növényvédelem alkalmazásakor is elsődleges a bogyók és fürtök védelme, amelyet a virágsapkák lehullásától számított 6-10. hétig szokás fenntartani fajtától függően. Ennek eléréséhez ebben az időszakban, párás körülmények esetén akár 12 naponkénti ismétlésre is szükség lehet (Harms *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 2002). Több, nagyobb hatóanyagcsoport tagjai hatásosnak bizonyultak a *P. ampellicida* ellen, amelyeket régóta használnak a szőlő más járványos betegségei (pl. szőlőlisztharmat, szőlőperonoszpóra) esetében is (Harms *et al.*, 2005; Molitor és Beyer, 2014). Ezek közül a QoI-k, DMI-k vagy a ditiokarbamátok hatóanyagcsoportjából származó legtöbb növényvédőszer hatásosnak bizonyult a feketerothadás kórokozója elleni védekezésben (Hoffman és Wilcox, 2003). Ezek közül jelen doktori munkában a QoI-kkal szembeni érzékenységet vizsgáltam.

3.2.2.3. A QoI-k hatásmechanizmusa

Az első QoI-k 1996-os piacra kerülése óta ezeket a gombaölőszereket gyakran és széles körben használják a nagyüzemi kémiai növényvédelemben, mert az élesztő és fonalas gombafajok széles köre ellen hatásosak (Bartlett *et al.*, 2002). A QoI-k a gombák mitokondriális légzési elektrontranszportlánc gátlóiként hatnak azáltal, hogy blokkolják a citokróm-c-oxidáz útvonal elektrontranszportját (3. ábra). A gátlás a mitokondriális *bc1* komplex (komplex III; ubikinol-citokróm c oxidoreduktáz, EC 1.10.2.2; Bartlett *et al.*, 2002; Von Jagow *et al.*, 1986) citokróm b fehérjéje (CYTB) által alkotott ubikinol-oxidációs központhoz (Qo - Von Jagow *et al.*, 1986) való kötődés révén valósul meg. Szinte valamennyi QoI gombaölőszer osztozik ebben az egyhatáshelyű mechanizmusban; ezért a Fungicide Resistance Action Committee (FRAC; <https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/qol->

fungicides/information) előrejelzése szerint esetükben nagy a kockázata a rezisztencia kialakulásának.



3. ábra. A mitokondriális elektrontranszportlánc sematikus felépítése a legfontosabb komponensekkel és folyamatokkal (Liu és Guo, 2017 nyomán). Az I, II, III, IV számok az elektrontraszportlánc egyes fehérjekomplexeit jelölik. Az elektronáramlás elsődleges citokróm-c-oxidáz útvonala a III. komplex „előtt” vastag fekete nyíllal van feltüntetve: az ubikinolról (UQ) a *bc₁* komplexben (narancssárga) található CYTB fehérje felé. Az elektronáramlás alternatív(-oxidáz) útvonala szürke nyíllal van feltüntetve: az ubikinolról (UQ) az alternatív-oxidáz enzim (AOX; pirossal jelölve) felé.

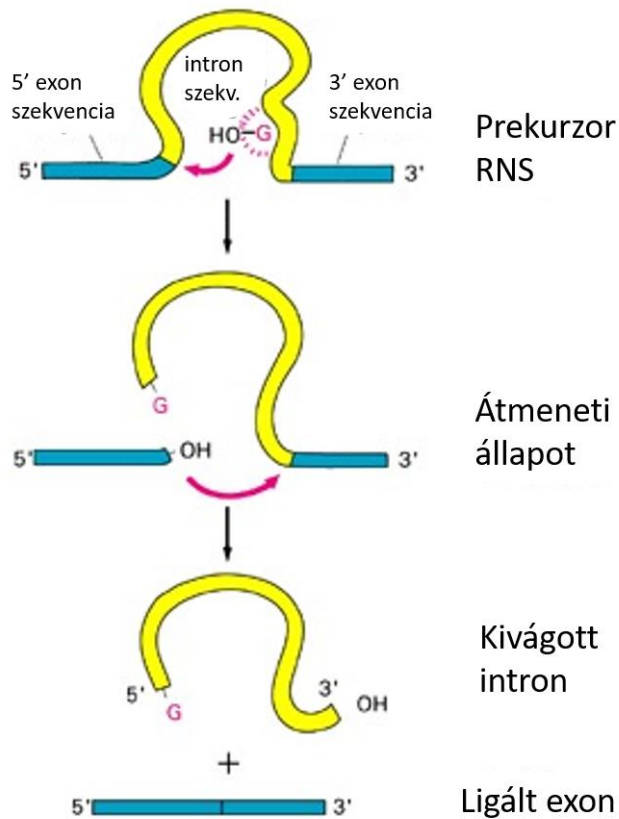
3.2.2.4. A QoI fungicidekkel szembeni rezisztencia aspektusai

A QoI-kkal szemben rezisztens gombaizolátumokról szóló első jelentések már a QoI gombaölőszerek piacra kerülését megelőzően (Colson, 1993), vagy röviddel (1-3 évvel) az után megjelentek (Sierotzki *et al.*, 2000; Heaney *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 2001; Chin *et al.*, 2001). A QoI-k 26 éves használata során számos gombaeredetű kórokozót találtak kevésbé érzékenynek, vagy rezisztensnek a fungicidek ezen csoportjával szemben (Ishii *et al.*, 2001; Fernández-Ortuño *et al.*, 2008; Bolton *et al.*, 2013; Cheval *et al.*, 2017; Torriani *et al.*, 2009; Lesniak *et al.*, 2011; Forcelini és Peres, 2018). A hatóanyagok (pl. fungicidek, gyógyszerek stb.) élő sejtekre, szervezetekre (pl. kórokozók tenyészteti) gyakorolt hatását, más szóval a kórokozók hatóanyagokkal szembeni érzékenységét legtöbbször a félhatásos koncentráció (EC₅₀) meghatározásával szokták felmérni.

A QoI fungicidekkel szembeni rezisztencia leggyakrabban előforduló mechanizmusának a *citokróm b* (*cytb*) génben történt pontmutációkat (fungicidrezisztencia-markerek) találták, ami a CYTB fehérjében aminosavcserékhez vezet. A *cytb* génben több pontmutációt is leírtak, amelyek a CYTB fehérjében a 120-160 és 250-300 aminosavpozíciók között, ún. „hot spot” régiókban aminosavcserét okoznak és ezzel a QoI rezisztencia kialakulásáért tehetőek felelőssé (di Rago *et al.*, 1989). A leggyakoribb és legfontosabb szubsztitúció a 143-as pozícióban a glicin-alanin csere (G143A), amely magas rezisztenciaszinttel járó minőségi rezisztenciát okoz (Tron *et al.*, 1991a). További, kevésbé gyakori aminosavcserék a 129-es (fenilalanin-leucin; F129L) és a 137-es pozícióban (glicin-arginin; G137R) fordulhatnak elő, ám ezekhez általában mérsékelt rezisztenciaszint és így kisebb gyakorlati jelentőség párosul (di Rago *et al.*, 1989; Tron *et al.*, 1991a; Tron és Lemesle-Meunier, 1990; Kim *et al.*, 2003; Sierotzki *et al.*, 2007; Olaya *et al.*, 2012). A *cytb* génben további pontmutációkat is találtak, amelyek kombinációban is felléphetnek, és mérsékelt vagy magas rezisztenciaszintekkel járhatnak, de ezek hatása egyelőre kevésbé ismert (Fernández-Ortuño *et al.*, 2008; Tron *et al.*, 1991b).

3.2.2.5. A *citokróm b* gén exon/intron szerkezetének szerepe a QoI rezisztenciában

A *cytb* gén exon/intron szerkezete további tényező, amely befolyásolhatja a G143A aminosavcseréhez vezető pontmutáció (GGT → GCT) kialakulását. Ezt a pontmutációt/rezisztenciamarkert, amely kvalitatív és a növényvédelmi gyakorlatban is jelentős problémákat okozó rezisztenciához vezet, számos, különböző nemzetségekhez tartozó növénypatogén gombafaj populációjában megtalálták (Chin *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Sierotzki *et al.*, 2007; Veloukas *et al.*, 2014). Ugyanakkor a G143A-t más gombafajok (pl. *Puccinia* spp.) esetében az ismételt QoI használat következtében kialakuló növekvő szelekciós nyomás ellenére sem fedezték fel (Grasso *et al.*, 2006a, 2006b; Sierotzki *et al.*, 2007). A jelenleg elfogadott magyarázat, az úgynevezett "intron elmélet" szerint a *cytb* génben, közvetlenül a 143. kodon után elhelyezkedő ún. I-es típusú önkivágódó intront (Group I. selfsplicing intron; 4. ábra; Burke, 1988) hordozó kórokozónak a CYTB fehérje 143. pozíciójában a vad típusú aminosavat kellene tartalmazniuk (Grasso *et al.*, 2006a, 2006b).



4. ábra. A kivágódás sematikus lépései és szükséges elemei az I-es típusú önkivágódó intronok esetében (Alberts *et al.*, 2003 nyomán). Kék színnel az exon, míg sárgával az intronszakaszok vannak jelölve. Piros nyilak jelölik az önkivágódási folyamatban végbemenő szálvágásokat és szálligálásokat.

Az elmélet szerint a G143A szubsztitúciót okozó pontmutáció a *CYTB* mRNS érési folyamatában önkivágódási hibához (Cech, 1988) vezetne (De La Salle *et al.*, 1982), amely nem-funkcionális fehérjét és ezen keresztül letalitást eredményezne (Maciaszczyk *et al.*, 2004; Vallières *et al.*, 2011). Ezért a közvetlenül a 143. kodon után I-es típusú önkivágódó intront hordozó gombafajoknál nem várható, hogy a G143A-t tartalmazó magas rezisztenciaszintű izolátumok szelektálódjanak ki a Qo inhibitorokkal szemben. Ugyanakkor ismertek lehetséges elkerülő mechanizmusok, mint például két különböző exon/intron szerkezet ugyanazon populáción belül, vagy az önkivágódási hibát részben vagy teljesen kompenzáló másodlagos mutációk (Vallières *et al.*, 2011; Banno *et al.*, 2009). Ezen kívül az F129L, a G137R, vagy bármely más aminosavszubsztitúciót hordozó izolátumok szelekcióját ez az intron nem befolyásolja, így ezek a pontmutációk ettől függetlenül is megtörténhetnek (Pasche *et al.*, 2005; Semar *et al.*, 2007). Míg néhány *Phyllosticta* faj *cytb* génjének

exon/intron szerkezetét publikálták már (pl. *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa és *Phyllosticta capitalensis* Henn.; Hincapie *et al.*, 2013; Stammler *et al.*, 2013), addig több más, a *P. ampellicida*-val közelebbi vagy távolabbi rokoni kapcsolatban álló faj, például a *P. parthenocissi* K. Zhang, N. Zhang és L. Cai, a *Phyllosticta partricuspidatae* N. Zhou és L. Cai és a *Phyllosticta gaultheriae* Aa citokróm *b* génjének vagy mRNS-ének szekvenciainformációja még nem volt ismert.

3.2.2.6. Az alternatív-oxidáz útvonal szerepe a QoI rezisztenciában

A másik rezisztenciamechanizmus, amellyel a citokróm-c-oxidáz útvonal QoI-k általi gátlása megkerülhető a mitokondriális elektrontranszport láncon, az alternatív-oxidáz útvonal aktivitásának növelése (Miguez *et al.*, 2004). Ez az útvonal megkerüli a funkcionálisan károsodott bc₁ komplexet és több gombafajban részben helyettesítheti annak funkcióját (3. ábra; Miguez *et al.*, 2004; Piccirillo *et al.*, 2018; Ziogas *et al.*, 1997). Miközben a citokróm-c-oxidáz útvonal gátolt, az alternatív légzés amolyan kikapuként szolgálhat a kórokozó számára, így a fungicidkezelés hatékonysága csökkenhet (Ziogas *et al.*, 1997; Avila-Adame és Köller, 2003; Olaya és Köller, 1999). Az alternatív-oxidáz útvonalat gátolni képes egyik hatóanyag a szalicil-hidroxámsav (SHAM). Ugyanakkor fontos a megfelelő koncentráció megválasztása, mert túl magas koncentrációban alkalmazva hatással van a citokróm-c-oxidáz útvonalra is (Schonbaum *et al.*, 1971). Néhány gombakórokozó esetében kimutatták, hogy a QoI-k és az alternatív oxidációs gátlók (AOXI-k) között szinergista hatás állhat fenn (Ma *et al.*, 2003). Ezek miatt a QoI-kat és SHAM-ot gyakran használják együttesen *in vitro* fungicid tesztekben, lehetővé téve olyan kísérleti elrendezést, amely képes megkülönböztetni a citokróm-c-oxidáz és az alternatív-oxidáz útvonalak szerepét a gombák légzésében (Hoffman és Wilcox, 2003; Fernández-Ortuño *et al.*, 2008; Sierotzki *et al.*, 2007; Avila-Adame *et al.*, 2003).

3.2.3. Korábbi vizsgálatok a *P. ampellicida* QoI-kkal szembeni érzékenységgel kapcsolatban

A szőlő növényvédelmében a QoI gombaölőszereket kezdetben nagyon előnyösnek tartották, mert ebből a csoportból bizonyos hatóanyagok nemcsak a *P. ampellicida*, de az *E. necator* (szőlőlisztharmat), sőt a *Pl. viticola* (szőlőperonoszpóra) kórokozók ellen is hatásosnak bizonyultak. A szőlővirágzatok és -fürtök legérzékenyebb időszaka ezen három kórokozó esetében nagyjából egybeesik, így ezek a fungicidok egyidejűleg

kínálnak védekezési lehetőséget mindhárom kórokozó ellen. Bár számos kórokozó QoI-rezisztenciája jól dokumentált, a *P. ampellicida* izolátumok QoI-fungicidekkel szembeni érzékenysége mindmáig kevesebb figyelmet kapott. Eddig két különálló típusú vizsgálatot végeztek: vagy a kórokozó izolátumok *in vivo* érzékenységet (Hoffman és Wilcox, 2003; Molitor *et al.*, 2011), vagy pedig a *cytb* gén molekuláris jellemzőit vizsgálták (Miessner *et al.*, 2011). Hoffman és Wilcox (2003) két amerikai *P. ampellicida* populáció alapérzékenységét határozták meg 50, illetve 60 izolátumnál, azonban ezt az érzékenységet csak a miklobutanillal (DMI fungicid) szemben vizsgálták. További bizonytalanságot okoz, hogy Molitor *et al.* (2011) és Miessner *et al.* (2011) nagyon korlátozott számú *P. ampellicida* izolátummal (1, illetve 2) végezték kutatásukat. Ráadásul Miessnerék egyik izolátumát is Molitor biztosította (bár ez a kódja alapján feltehetően nem volt azonos azzal, amivel Molitor és munkatársai dolgoztak). Az így rendelkezésre álló, de némiképp hiányos ismereteken túl előzetes eredményeink azt mutatták, hogy a *P. ampellicida* izolátumok között lehetnek olyanok, amelyek a *cytb* gén különböző exon/intron szerkezetét hordozzák a mitokondriumokban (ezeket az adatokat nem mutatom be).

A molekuláris módszerem ellenőrzése/validálása érdekében további hat *Phyllosticta* faj *citokróm b* génszakaszát és/vagy mRNS-ét szaporítottam fel és meghatároztam nukleotidsorrendjét. Két faj, a gazdaságilag fontos, a citrusfélék fekete foltosság betegségét okozó *P. citricarpa* (McAlpine) Aa (teleomorf *Guignardia citricarpa* Kiely; Hincapie *et al.*, 2013) és a széles gazdanövénykörrel rendelkező endofita gomba, a *P. capitalensis* Henn. (Wikee *et al.*, 2013) esetében ezeknek a szakaszoknak a nukleotidsorrendjét korábban már publikálták (Stammler *et al.*, 2013). Azonban egy kevésbé fontos kórokozó faj, nevezetesen a *Gaultheria humifusa* (Grah.) Rydb. levélfoltosságának kórokozója, a *P. gaultheriae* Aa (teleomorf *Guignardia gaultheriae* Aa; Wikee *et al.*, 2013) esetében a *citokróm b* gén/mRNS szekvenciainformációk még nem álltak rendelkezésre.

A fentiekén túl az elmúlt évtized tendenciái, mint például a szélsőséges időjárási viszonyok, a betegséggel kapcsolatos ismeretek hiánya és a kórokozó ellen hatékony kémiai vegyületek és növényvédőszeres számának csökkentése az EU-ban (pl. a feketerothadás elleni védekezés hatékony eszközeinek, a miklobutanil hatóanyagú készítményeknek a visszavonása) kedvezőbb feltételeket biztosíthatnak a kórokozó számára, és egyben megfelelő indokot szolgáltat a *P. ampellicida* izolátumok QoI-fungicidekkel szembeni aktuális érzékenységének felmérésére.

3.3. Molekuláris ujjlenyomat módszerek genotipizáláshoz

A *P. ampellicida* populációi Európa különböző országaiban eltérő szintű genetikai sokszínűséget mutatnak. Ennek egyik feltételezett oka a behurcolások eltérő időpontjában és számában keresendő, amely az ivaros szaporodás és az így kialakuló genetikai változatosság mértékével is összefügg (Rinaldi *et al.*, 2017). A genetikailag variábilisabb populációkból szelekció hatására feltételezhetően nagyobb eséllyel szaporodhatnak fel pl. fungicid rezisztenciát mutató izolátumok, ezért a vizsgált populációk ilyen szempontú felmérése szilárd alapot jelenthet a további vizsgálatokhoz.

Az elmúlt két-három évtizedben számos PCR alapú DNS ujjlenyomat technikát fejlesztettek ki élőlények populációinak genetikai jellemzésére, izolátumainak vagy törzseinek azonosítására, amelyeket a növényneveléstől a természetvédelemig számos tudományterületen használnak (Arif *et al.*, 2011; Lateef, 2015). Ezeknek a technikáknak hatalmas előnye, hogy az adott izolátum teljes genomjának szerkezetéről adnak egyfajta képet, amely „kép” a genom elrendeződésének esetleges megváltozásával (pl. meiózis) párhuzamosan változik.

A PCR alapú technikák megjelenését megelőzően a legelső említésre méltó DNS-marker módszer a Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) technika volt, amely a DNS-szál restrikciós enzimátikus hasításán alapszik. A módszer a restrikciós enzimek felismerőhelyeinek nukleotidszekvenciáiban bekövetkező változást, vagy több nukleotid mutációs eseményeinek (beillesztések vagy deléciók) következtében létrejövő hosszpolimorfizmust képes kimutatni (Tanksley *et al.*, 1989). A fő előnyeit az jelenti, hogy nagymértékben ismételhető eredményeket ad, ugyanakkor időigényes és a nagy mennyiségű tiszta DNS szükséges hozzá (Lateef, 2015).

Az egyik legrégebbi PCR-alapú DNS-ujjlenyomat technika a Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) módszer, amely véletlenszerű DNS-szakaszok random primerekkel történő felszaporításán és a termékek agaróz gélektroforézissel történő megjelenítésén alapszik (Williams *et al.*, 1990; Gupta és Varshney, 2013). A RAPD egyik legnagyobb hátránya azonban, hogy a keletkezett termékek (markerek) nem mutatnak megbízható amplifikációs mintázatot, mivel ez a kísérleti körülmények függvényében változhat (Edwards és McCouch, 2007).

Az AFLP markerek szintén PCR alapúak, de az RFLP restrikciós technikáját kombinálják a PCR szelektivitásával (Vos *et al.*, 1995). A módszer előnye, hogy közepes DNS-mennyiségigény mellett költséghatékonyan lehet nagyobb mennyiségű

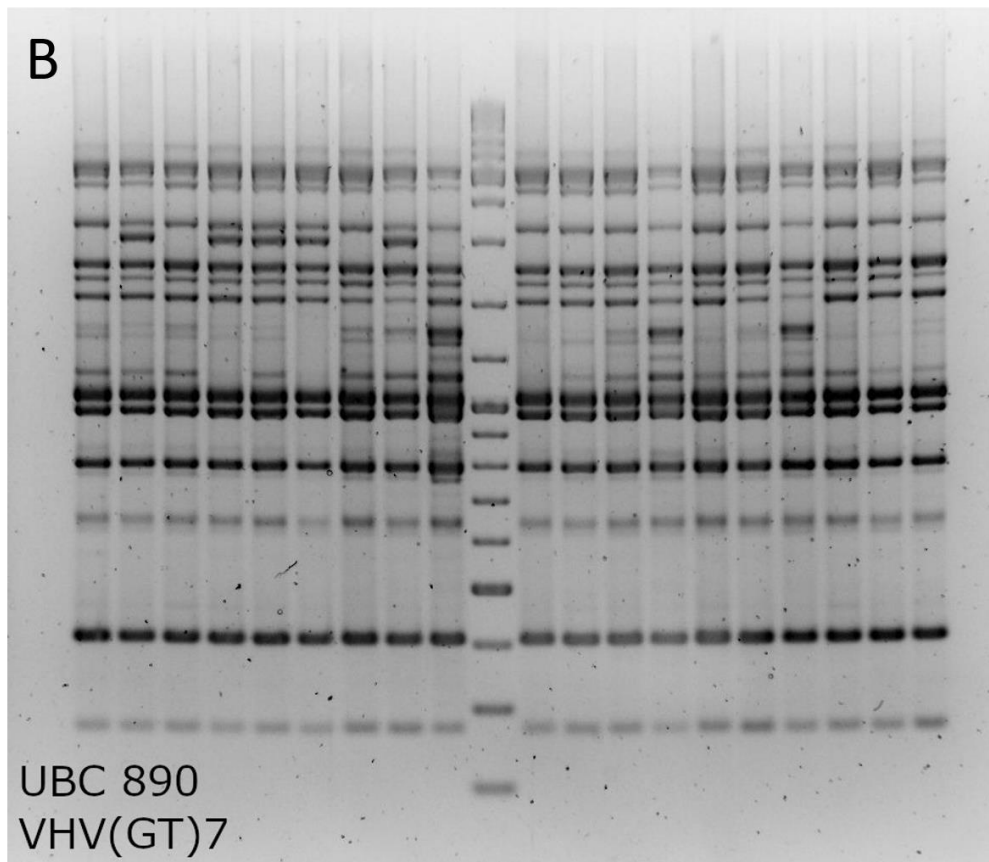
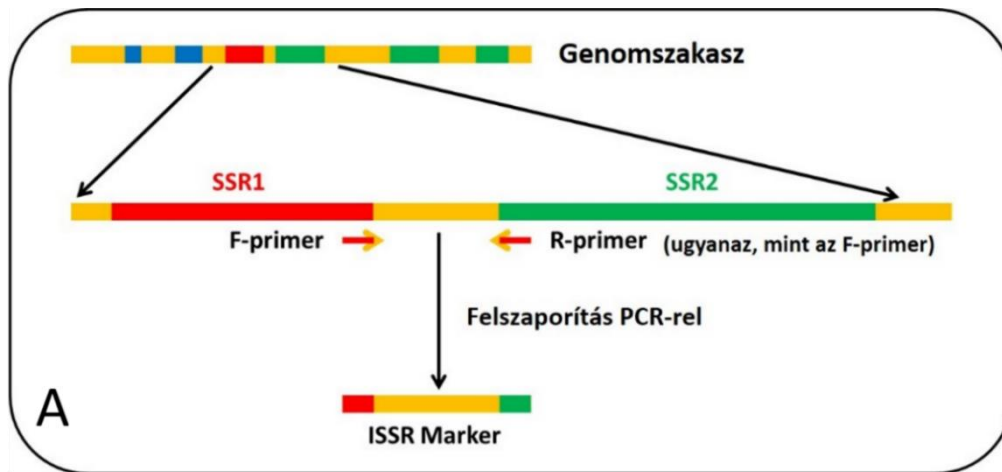
markert felszaporítani vele, ráadásul a RAPD-nál nagyobb mértékben reprodukálható az eredménye. Hátránya ugyanakkor, hogy a markerek megjelenítéséhez polakrilamid gélelektroforézis (PAGE) használata szükséges, amelyhez magasabb szakértelemre van szükség (az agaróz gélelektroforézishez viszonyítva) (Lateef, 2015).

Az ún. mikroszatellit vagy egyszerű szekvenciaismétlődés (simple sequence repeat; SSR) régiókban mutakozó hosszkülönbségek kimutatására alkalmas a PCR alapú SSR technika. A mikroszatellitek 1-6 nukleotid hosszúságú nukleotidrészletek tandem ismétlődéséből szerveződő DNS szakaszok, amelyek a genomban elszórtan helyezkednek el (Lim *et al.*, 2004). Ezek a régiók gyakran nagyon polimorfikusak (genotípusonként eltérő számú ismétlést mutathatnak) ezért alkalmasak a genotipizálásra pl. a növényeknél genetikai és nemesítési vizsgálatokban (Kalia *et al.*, 2011). Az SSR módszer előnye, hogy termékei legtöbbször agaróz gélelektroforézissel kimutathatóak (Koelling *et al.*, 2012), ugyanakkor négy-öt nukleotidnál rövidebb ismétlődő elemű mikroszatelliteknél a hosszpolimorfizmus megállapítása nehéz lehet és speciális eszközt (pl. kapillaris gélelektroforézis) igényelhet (Lateef, 2015).

Egy szintén az SSR szakaszokon alapuló technika az ISSR módszer is, amely hatékony, gyors, egyszerű, reprodukálható és olcsó módszernek bizonyult a genetikai sokféleség felmérésére, vagy a közeli rokonsági viszonyok azonosítására (Pradeep Reddy *et al.*, 2002). A módszer során egy mikroszatellit szekvenciát használnak primerként, amellyel a genomból a mikroszatellitek közötti szakaszokat szaporítják fel, ami nagyszámú termék előállítását eredményezi primerenként (5. ábra A). Amennyiben ezekből két azonos szekvenciájú szakasz fordított orientációban, felszaporítható távolságban helyezkedik el a genomban, akkor a két SSR közötti DNS darab (ISSR marker) felszaporítható ISSR-PCR-rel (Pradeep Reddy *et al.*, 2002). Ilyen elhelyezkedésű SSR szakaszból több is található egy genomon belül, ráadásul ezek eltérnek a közrefogott DNS-szakasz hosszában, ezért a keletkezett PCR termék várhatóan különböző hosszúságú ampliconokat tartalmaz. Ezeket agaróz gélelektroforézissel elválasztva és megjelenítve több sávból álló ún. ISSR profilt kapunk, amelynek egy-egy sávja taxonra, fajra vagy izolátumra/törzsrre is jellemző lehet (5. ábra B; Grünig *et al.*, 2001). Az ISSR-PCR által felszaporított szekvenciák további előnye, hogy előzetes szekvenciaismeret nélkül is felhasználhatók DNS-ujjlenyomatok készítésére (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Ellentétben a fent említett egyéb technikákkal a mikroszatellit alapú módszerek előnye, hogy alacsony költség- és DNS-mennyiségigény mellett nagyfokú polimorfizmus-kimutatásra képesek (Hassel és

Gunnarsson, 2003). Ez lehetővé tette, hogy széles körben alkalmazzák pl. növényfajták elkülönítésére (Bornet és Branchard, 2001; Godwin *et al.*, 1997), valamint izolátumok/törzsek azonosítására gombák esetében (Grünig *et al.*, 2001). Oliveira és Azevedo, (2022) kimutatták, hogy 2012 óta az ISSR-t elsősorban növénykórokozók (42,2%) és genetikai sokféleség (25,0%) tanulmányozására használták gombák esetében.

A fenti előnyök és a módszerről a laborunkban összegyűlt tapasztalat (Pintye *et al.*, 2012) alapján az ISSR technikát választottam munkámhoz.



5. ábra. A: Az ISSR-PCR elméleti alapjainak sematikus ábrázolása. Piros és zöld jelöli a mikroszatellit (SSR-), míg sárga a köztes genomszakaszokat. További jelölések: F-primer: Forward primer, R primer: Reverse primer. (Forrás: <https://pmlab.wordpress.com/2013/10/10/qa-in-agh635-course-what-is-issr-marker-and-how-to-generate-the-marker/>). **B:** *P. ampellicida* izolátumokból (19 db) felszaporított ISSR markerek által adott profilok agaróz gélen, középen a 100 bp – 10 kb méretmarkerrel (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific). Az UBC890 a primer megnevezése, míg a VHV(GT)₇ a primer szekvenciáját jelöli.

4. CÉLKITŰZÉSEK

A *P. ampellicida* QoI-érzékenységének értékelése érdekében nagyszámú izolátumot (499) tartalmazó gyűjteményt hoztunk létre. Az izolátumok többségét a feketerothadással leginkább érintett két magyarországi borvidékről (Egri és Tokaj-hegyaljai) és néhányat három másik európai országból gyűjtöttünk be 2010 és 2019 között. A *P. ampellicida*-val rokon (*P. gaultheriae*, *P. capitalensis*, *P. citricarpa*) és közeli rokon (*P. partricuspidatae* és *P. parthenocissi*) fajok kiválasztott törzsei is bekerültek a gyűjteménybe. A rokon fajok törzseit használtam az exon/intron szerkezet-összehasonlításokhoz, míg a közeli rokon fajok törzseit használtam mind az exon/intron szerkezet-összehasonlításokhoz, mind a filogenetikai elemzéshez.

A vizsgálat céljai a következők voltak:

1. Az első hazai nagyméretű *P. ampellicida* törzsgyűjtemény létrehozásában való részvétel.
2. A *P. ampellicida* törzsgyűjteményen belüli genetikai variabilitás értékelése ISSR genotipizálással.
3. A *P. ampellicida* és rokon *Phyllosticta* fajok közötti filogenetikai kapcsolatok ellenőrzése (különös tekintettel a CBS 237.48 számú törzsére).
4. A QoI fungicidekkel szembeni *in vitro* érzékenység és az alternatív légzési útvonal hatékonyságának felmérése kiválasztott *P. ampellicida* izolátumok micéliumnövekedésének és konídiumcsírázásának értékelésével.
5. A *CYTB* mRNS-ben található fungicidrezisztencia-markerek felmérése és
6. a *cytb* gén exon/intron szerkezetének feltárása kiválasztott *P. ampellicida* és rokon *Phyllosticta* fajok izolátumaiban/törzseiben.
7. Továbbá a *cytb* gén szekvenciájának és exon/intron szerkezetének összehasonlítása a különböző populációkban/borvidékeken/országokban és/vagy különböző évszakokban gyűjtött *P. ampellicida* izolátumok és más *Phyllosticta* fajok törzsei között.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. Törzsgyűjtemény létrehozása és fenntartása

Együttműködő partnereim az Eszterházy Károly Katolikus Egyetemről (EKKE) 2010 óta Magyarországon rendszeresen gyűjtenek *P. ampellicida*-val fertőzött szőlőleveleket és bogyókat. A begyűjtött mintákból a kórokozó izolálásával létrehoztak egy *P. ampellicida* törzsgyűjteményt. Ebbe a gyűjtésbe és izolálásba kollégáimmal 2018-ban kapcsolódtunk be, amikor is a gyűjteményt megkettőztük, így ma már az EKKE-nél és az ATK-nál is tartós fenntartásban található. Azóta a gyűjteményt 78 darab *P. ampellicida* izolátummal gyarapítottuk ATK-s kollégáimmal az alábbi izolálási technikával.

A fertőzött növényi részek felszínét 5%-os nátrium-hipoklorit-oldatban történő öblítéssel sterilizáltuk, majd steril desztillált vízzel (Direct-Q® Water Purification System, MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) mostuk és steril körülmények között megszáritottuk. Ezután a leveleket nedves szűrőpapírral ellátott Petri-csészébe („nedves kamrába”) helyeztük a magas páratartalom elérése érdekében. Másnap a felnyíló piktídiumokból kiáramló konídiumcseppet (cirrus) steril üvegtűvel módosított Czapek-Dox agar lemezre helyeztük (Czapek-Dox agar 2% malátakivonattal kiegészítve; Thom és Church 1926). Az így kapott gombaizolátumokat (M.2.1. táblázat) 20 °C-on tartottuk a módosított Czapek-Dox táptalaj lemezeken, és havonta egyszer átoltottuk friss táptalajra. A dolgozatban az általam vagy kollégáim által létrehozott gombatenyészetekre izolátumként, míg a nemzetközi törzsgyűjteményekből beszerzett tenyészetekre törzsként hivatkozom.

Ezekon kívül néhány más *Phyllosticta ampellicida* izolátumot/törzset is vizsgáltunk, amelyeket vagy eltérő földrajzi eredetük miatt vontunk be (1-4. izolátumok az 1. táblázatban), vagy törzsgyűjteményekből szereztük be őket módszertanunk (pl. *cytb* gén exon/intron szerkezetmeghatározás) validálása és a különböző *Phyllosticta* fajok egyes molekuláris jellemzőinek összehasonlítása céljából (5-13. törzsek az 1. táblázatban). Ezeket az izolátumokat/törzseket is a fent leírt módon tartottuk fent.

1. táblázat. A citokróm *b* mRNS/mtDNS és/vagy az ITS lókuszek szekvenciameghatározásához vizsgált *Phyllosticta* spp. izolátumok/törzsek adatai.

#	Izolátum / törzs azonosítója ^a	Faj	Gazdanövény	A gyűjtés helye ^b	A gyűjtés éve	GenBank azonosítószám cDNS / mtDNS / ITS
1	MG6	<i>P. ampellicida</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Mád, HU	2018	OQ873636 / OQ849743 / -
2	F60	<i>P. ampellicida</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Andornaktálya, HU	2010	OQ873635 / OQ849742 / -
3	Gb30 ▶	<i>P. ampellicida</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Vinhos Verdes, PT	2013	OQ873634 / OQ849744 / OQ800890
4	GbC ▶	<i>P. ampellicida</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Canneto Pavese, IT	2013	OQ873637 / OQ849745 / OQ800891
5	CBS 111645 ▶	<i>P. parthenocissi</i>	<i>Parthenocissus quinquefolia</i>	Egyesült Államok	1999	OQ873638 / OQ873625 / OQ800892
6	CBS 237.48 ▶ (= DSM 3513 = IFO 32906)	<i>P.</i> <i>partricuspadatae</i>	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	NA	1947	OQ873639 / OQ873626 / OQ800893
7	CBS 447.70	<i>P. gaultheriae</i>	<i>Gaultheria humifusa</i>	Egyesült Államok	1969	OQ873640 / OQ873627 / -
8	CBS 102374	<i>P. citricarpa</i>	<i>Citrus aurantium</i>	Brazília	1999	OQ873641 / - / -
9	CBS 122670	<i>P. citricarpa</i>	<i>Citrus sinensis</i> cv. <i>Valencia</i>	Dél-Afrika	2005	OQ873642 / - / -
10	CBS 828.97	<i>P. citricarpa</i>	<i>Citrus aurantium</i>	Brazília	1996	OQ873643 / OQ873628 / -
11	CBS 119720	<i>P. capitalensis</i>	- (<i>Musa</i> sp.)	Egyesült Államok	-	OQ873644 / OQ873629 / -
12	CBS 120428	<i>P. capitalensis</i>	<i>Sansevieria</i> sp.	Hollandia	2004	OQ873645 / - / -
13	CBS 123374	<i>P. capitalensis</i>	<i>Citrus maxima</i>	Thaiföld	2007	OQ873646 / - / -

^a CBS: CBSeKNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Hollandia.

▶ Az ITS filogenetikai elemzésbe bevont izolátumok/törzsek.

^b Az országok rövidítései a következők: „HU” – Magyarország, „PT” – Portugália, „IT” – Olaszország és „NA” – Nem ismert.

5.2. *In vitro* fungicidérzékenységi teszt

5.2.1. Micéliumnövekedés-gátlási teszt

Az ISSR genotipizálás (ld. lejjebb) eredménye és egyéb paraméterek (pl. a gyűjtés helye és éve stb.) alapján 48 *P. ampellicida* izolátumot választottam ki a micélium növekedésgátlási vizsgálatokhoz. Az izolátumok kiválasztásának részletesebb szempontjai az eredmények 6.3.1 alfejezetében, míg az izolátumok listája a 2. táblázatban látható. A micélium növekedésének *in vitro* gátlását kollégáimmal az ún. gradiens lemez módszer ("gradient plate technique") alkalmazásával teszteltük, az eredetitől némileg eltérő inokulálási módszerrel (micéliummal borított fogpiszkáló; Hunt és Sandham, 1969).

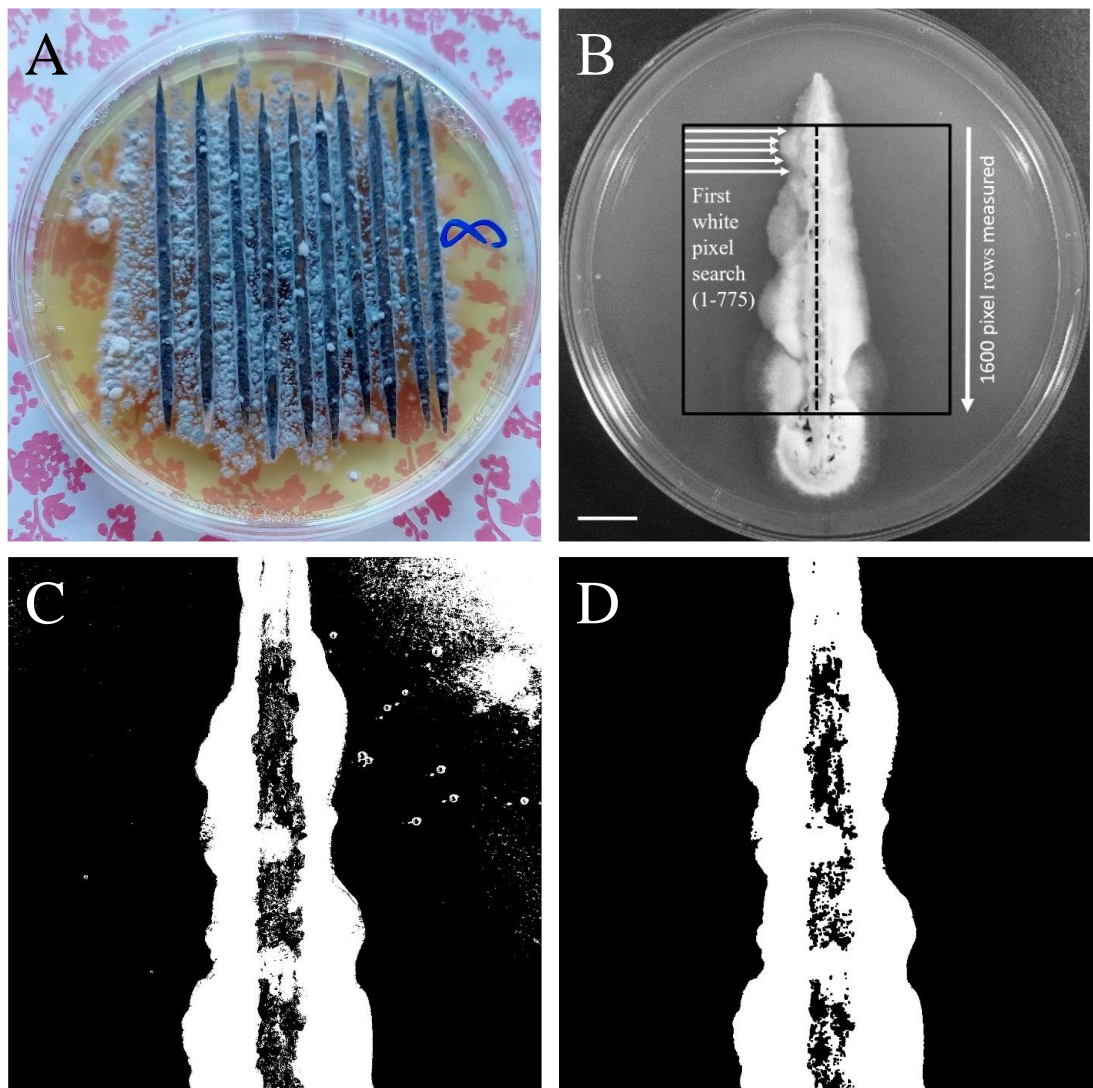
2. táblázat. Az *in vitro* fungicid-érzékenységi vizsgálatokhoz kiválasztott 48 *P. ampellicida* izolátum gyűjtési adatai.

#	Izolátum- azonosító	Gyűjtés helye	Gyűjtés éve	QoI kezelés-történet a
1	Fe12-101	Eger, HU	2012	+
2	F15-35	Szomolya, HU	2015	+
3	F16-51	Maklár, HU	2016	+
4	F 17-56	Eger, HU	2017	+
5	F 17-61	Maklár, HU	2017	+
6	18-4-12	Eger, HU	2018	-
7	18-5-2	Eger, HU	2018	-
8	18-1-2M	Miskolc, HU	2018	-
9	18-3-2 ▶	Eger, HU	2018	-
10	18-3-9	Eger, HU	2018	-
11	EB2G1A	Eger, HU	2018	-
12	G5B	Mád, HU	2018	-
13	MG25	Mád, HU	2018	-
14	19-7	Andornaktálya, HU	2019	+
15	19-116	Andornaktálya, HU	2019	+
16	19-119	Andornaktálya, HU	2019	+
17	19-123	Andornaktálya, HU	2019	+
18	19-125	Andornaktálya, HU	2019	+
19	19-129	Andornaktálya, HU	2019	+

20	19-136	Andornaktálya, HU	2019	+
21	19-159	Eger, HU	2019	-
22	19-162	Eger, HU	2019	-
23	19-169	Eger, HU	2019	-
24	19-17	Andornaktálya, HU	2019	+
25	19-179	Eger, HU	2019	-
26	19-194	Mád, HU	2019	-
27	19-195 ▶	Mád, HU	2019	-
28	19-208	Eger, HU	2019	-
29	19-210	Eger, HU	2019	-
30	19-214	Eger, HU	2019	-
31	19-226	Eger, HU	2019	-
32	19-234	Eger, HU	2019	-
33	19-236 ▶	Eger, HU	2019	-
34	19-25	Andornaktálya, HU	2019	+
35	19-31	Andornaktálya, HU	2019	+
36	19-36 ▶	Andornaktálya, HU	2019	+
37	19-40 ▶	Andornaktálya, HU	2019	+
38	19-47	Andornaktálya, HU	2019	+
39	19-54	Andornaktálya, HU	2019	+
40	19-61	Andornaktálya, HU	2019	+
41	19-69	Andornaktálya, HU	2019	+
42	19-73	Andornaktálya, HU	2019	+
43	19-82	Andornaktálya, HU	2019	+
44	19-97	Andornaktálya, HU	2019	+
45	BG2	Andornaktálya, HU	2019	+
46	BG4	Andornaktálya, HU	2019	+
47	BG7	Andornaktálya, HU	2019	+
48	MGST2	Mád, HU	2019	-

^a QoI hatóanyagot tartalmazó fungiciddel való kezelés megjelölése az izolálást megelőző két szezonban; "+" QoI-val kezelt; "-" QoI-val nem kezelt.

Az inokulum előállításához a 48 kiválasztott *P. ampellicida* izolátumot 25 °C-on maláta kivonat agar táptalaj lemezeken tenyésztettem. Két hét elteltével a micéliumot lekapartam és 2 ml-es mikrocentrifuga-csövekbe mostam, amelyek 1 ml steril desztillált vizet és két steril (2 mm átmérőjű) üveggyöngyöt tartalmaztak. A micélium és a hifák kisebb darabokra törése és így az inokulumdarabok számának növelése érdekében a micéliumszuszpenziókat FastPrep-24™ homogenizátor készülékkel rázattam (3-szor 20 másodpercig). Ezzel párhuzamosan fogpiszkálókát sterilizáltam malátakivonat-táplevesben (MilliporeSigma), hogy tápoldattal borítsam be őket a hifák egyenletesebb tenyésztéséhez. Ezekből 10-12 darabot helyeztem egy-egy 90 mm átmérőjű maláta kivonat agar táptalaj lemez felületére. Ezután 250 µl micéliumszuszpenziót pipettáztam a fogpiszkálókra, és 5-10 alkalommal előre-hátragördítettem azokat egy steril csipesszel, hogy az inokulumot egyenletesen eloszlassam a fogpiszkálók felületén. Végül a fogpiszkálókát egymással párhuzamosan, egyenletesen elhelyeztem a lemezek felületén, majd sötétben, 25 °C-on két hétig inkubáltam a lemezeket (6. ábra A). A gátlási teszt beállítását megelőző napon frissen készítettem el a QoI-k azoxistrobin és trifloxistrobin ("AS" és "TS"; Pestanal analitikai standardok, MilliporeSigma), valamint az AOXI SHAM törzsoldatait. A gombaölő vegyületeket acetonban (Reanal Laborvegyyszer Kft., Budapest, HU), míg a SHAM-ot metanolban (Reanal) oldottam fel. A *P. ampellicida* izolátumok érzékenységét négy kezeléssel és két kontrollal vizsgáltuk izolátumonként és kezelésként öt technikai ismétléssel: fungicid önmagában, fungicid és SHAM együttesen, SHAM kontroll és oldószeres (aceton + metanol) kontroll. Az olvasztott (~55 °C-os) vizes agarhoz (VWR, Radnor, USA) autoklávozás után aszeptikusan vagy törzsoldatokat, vagy tiszta acetont és metanolt adtunk. A fungicidek és a SHAM végső koncentrációjának (maximális gradiens koncentráció) előkísérletek alapján a 0,05, illetve a 30,63 mg l⁻¹ (200 µM; FRAC Monitoring Methods) került kiválasztásra (ezeket az adatokat nem mutatom be). Az előkísérletben 0,1 µg ml⁻¹ maximális koncentrációjú fungicid koncentrációgradienst is teszteltünk, azonban ez a magasabb koncentrációgradiens olyan mértékben gátolta a micélium növekedését, hogy az egyes esetekben mérhetetlen volt (ezeket az adatokat nem mutatom be).



6. ábra. Kezdeti és köztes állapotok az *in vitro* micéliumnövekedés-gátlás felmérés folyamatában. **A:** az inokulum előkészítésének bemutatása. **B:** a gombanövekedés mérés folyamatának lépései egy gradiens lemezen lévő kolónián bemutatva (a mérce 1 cm). **C és D:** a képelemzés folyamán kivágott és elmentett elsődleges optimalizációs (C) és végleges „letisztázott”, méréshez használt (D) képek.

Az inokuláláshoz használt fogpiszkáló a fungicid-gradiensnek a fogpiszkáló és a Petri-csésze szélessége közötti különbség alapján számítva, csak körülbelül a középső, (0,012 és 0,038 $\mu\text{g ml}^{-1}$ közötti) szakaszt „fedte le” (6. ábra B), a fungicidkoncentráció tartománya szűkebb volt, mint az eredeti gradiensé (0-0,05 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Következésképpen, amely izolátumok növekedése nem érte el a kontroll növekedéséhez viszonyított 50%-os arányt a koncentrációgradiens egyik pontján sem, azok félhatásos koncentrációértékei (EC_{50}) nem voltak kimutathatóak/kiszámíthatóak ebben a tartományban. Az aceton, vagy metanol végső mennyisége nem haladta meg a 0,3%-os w/v arányt a táptalajban.

A gradiens lemezek elkészítéséhez 15 ml, fungiciddal vagy kontroll törzsoldattal (oldószer vagy SHAM) kiegészített, 1,5%-os vizes agar táptalajt mértünk egy 90 mm átmérőjű Petri-csészébe. Majd a csésze alsó peremének lehető legrövidebb szakaszát egy 5x5 mm-es négyzet profilú fapálcára helyeztük, hogy a táptalaj ferdén szilárduljon meg (7. ábra A). Ezt követően ezeket a csészéket vízszintes felületre helyeztük, és kiegészítő táptalajként 15 ml nem módosított maláta kivonat agar táptalajt öntöttünk a ferde vizes agarra (7. ábra B). Az acetonnal és metanollal kiegészített vizes agar táptalajt és a csak SHAM-ot tartalmazó lemezeket oldószer- és AOXI-kontrollként használtuk.



7. ábra. A gradiens lemez elkészítésnek sematikus ábrázolása. **A:** a ferdén feltámasztott Petri csészében ferdén megszilárdítottuk a fungicidet tartalmazó vizes agar táptalajt. **B:** A csészét vízszintes alapra helyezve kiegészítő, kezeletlen maláta kivonat agar táptalajt öntöttünk rá.

Az inokuláláshoz gombamicéliummal borított fogpiszkálót (6. ábra A) helyeztünk minden egyes lemez felszínének közepére, a koncentrációgradienssel párhuzamosan (6. ábra B). Az elhelyezés szórásának minimalizálása érdekében a Petri-csésze alá sablont helyeztünk. A lemezeket sötétben, 25 °C-on inkubáltuk. Két hét elteltével minden gombatelepről fényképeket készítettem szabványosított körülmények között:

sötét szobában, rögzített lámpák, szabványosított fényképezőgép-beállítások és egy rögzített asztali fényképezőgép-állvány segítségével. A képeket feldolgoztuk és a félhatásos koncentrációkat és a gátlási százalékokat minden izolátumra kiszámítottam. A 48 kiválasztott izolátum különböző kezelések melletti micéliumnövekedésének méréséhez számítógépes rövid programot (szkriptet) adaptáltunk a MATLAB® R2016b szoftvercsomagban (Fuentes *et al.*, 2010). A program kódja, magyarázó megjegyzésekkel együtt az M.2.2. táblázatban látható.

A gombatelepekről készített képeken (3000x4000 pixel) a micéliumnövekedés mértékét a telep szélének automatizált azonosításával és így a kép széléhez viszonyított távolságának mérésével határoztuk meg. Egyetlen kép kiértékelésének lépései a következők voltak: a színes képeken a piros-zöld-kék (RGB) színtér színintenzitás-minták alapján beállítottam a paramétereket, amelyek segítségével a szoftver a képet fekete-fehér képpé alakította (6. ábra B). A megfelelő paraméterek beállításával a szoftver a gombakoloníát ábrázoló pixeleket fehérré, míg az összes többi feketévé volt képes alakítani. Ezután a kép központi részét kivágtuk (1550x1600 pixel), hogy a kolóniának csak azokat a részeit mérjük, ahol a növekedés kezdőpontja egy vonalban volt az egyes koncentrációs pontokkal (a fogpiszkáló központi, hengeres részei; 6. ábra B). A kivágás eredményeként kapott „látótér” a 6. ábra C és D részén látható. Ezt követően az algoritmus minden egyes pixelsorban (1600 sor) balról jobbra haladva megkereste az első fehér pixelt (kolónia határa), és ezeknek a pixeleknek a sorszámát regisztrálta. Ezután a képet tükrözni kellett a függőleges tengely mentén (szaggatott vonal 6. ábra B), és a szkript ugyanezt a mérést elvégezte a kolónia másik oldalán. Végül a fehér pixelek sorszámát a szoftver eredménymátrixából egy Excel táblázatba (*.xlsx formátumba) másoltam (Microsoft Office Excel 2013; Microsoft Corporation, Redmond, WA), majd elvégeztem az alábbi számításokat.

Először a képek bal és jobb oldaláról származó pixelek sorszámait páronként átlagoltam a fungicid koncentrációs pontok szerint (1600 pixelsor = 2x1600 adatpont kolóniánként átlagolva 1600 adatponttá). Ezekből az adatokból két különböző indikátorértéket, a félhatásos koncentrációt (EC_{50}) és a micélium növekedésének gátlási mértékét (%) számoltam ki. Az EC_{50} kiszámításának első lépéseként átlagoltam az oldószeres kontroll lemezek és a SHAM-kontroll lemezek növekedési mértékét egy lemezen belül (1600 adatpont átlaga), majd pedig az öt párhuzamos lemez (technikai ismétlés) között. Ez egyetlen pixelsorszámot eredményezett az egyes izolátumok oldószeres és SHAM-kontroll lemezeihez, amely az adott izolátum átlagos kontroll-

növekedési mértékét jelentette. Ezeket az értékeket tekintettem a 100%-os növekedési értéknek, és ebből számoltam ki az 50%-os növekedési ráta (50%-os növekedésgátlás) értékeit minden egyes gombaizolátum négy kezeléséhez. Az EC₅₀ értékek meghatározásához minden egyes kezelt lemez pixelsorszámadatait fungicid koncentráció szerint csökkenő sorrendben (a kép tetejétől az alja felé haladva) ellenőriztem, hogy megtaláljam a legmagasabb koncentrációt, ahol a növekedési ráta megegyezik a megfelelő izolátum oldószeres vagy SHAM-kontroll 50%-os növekedési mértékével. Az oldószeres kontrollértékeket az azoxistrobinos vagy trifloxistrobinos lemezek esetében, míg a SHAM-kontrollértékeket a QoI-val és SHAM-mal egyaránt módosított lemezek esetében használtam fel. Az EC₅₀-értékeket az összes izolátumra és az összes kezelésre kiszámítottam.

Ezen kívül minden telep 1600 adatpontjából (a kép 1600 pixelsorából) meghatároztam a növekedési mérték mediánját, és az alábbi képlettel kiszámítottam a micéliumnövekedés-gátlásának százalékos arányát (Ishii *et al.*, 2009):

$$\text{Gátlás (\%)} = \frac{(1 - \text{medián növekedési mérték a módosított lemezen})}{\text{medián növekedési mérték az oldószeres vagy SHAM kontroll lemezen}} \times 100$$

5.2.2. Konídiumcsírázás-gátlási teszt

Az *in vitro* konídiumcsírázási fungicid érzékenységi vizsgálatához két *P. ampellicida* izolátumot választottam ki a micélium növekedésgátlási rangsor alapján. Az izolátumok kiválasztásának részletesebb szempontjai és az izolátumok listája az eredmények 6.3.2 fejezetében található. A kolóniákat 20 °C-on módosított Czapek-Dox táptalaj lemezekon növesztettem, és a sporulációt állandó fehér fluoreszcens (Tungsram F33-640, 36W, Cool White) és ultraibolya (Philips TLD, 36W/08, Blacklight-Blue) fényvel való megvilágítással segítettem elő. A spórákat 2 ml steril desztillált vízzel mostam le a telepek felületéről, majd a szuszpenziók koncentrációját Bürker-kamrában történő számolással 1,02x10⁶ („18-3-9” izolátum) és 3,02x10⁵ („19-129” izolátum) konídium ml⁻¹-ben határoztam meg. A szuszpenziókból 40-40 µl-t 5 cm átmérőjű, a micéliumnövekedés-gátlásnál leírt módon készített fungicid (azoxistrobin vagy TS) vagy kontroll (SHAM vagy oldószer) szuszpenziót tartalmazó maláta kivonat agar táptalaj lemezekre terített steril celofánkorongokra szélesztettem. A micéliumnövekedés-gátlási kísérlettel ellentétben a fungicidek végső koncentrációját a táptalajban a gyártó által borszőlő kultúrában szabadföldön ajánlott

koncentrációérték-tartomány minimuma és maximuma közötti köztes értékre állítottam be: 100 mg l⁻¹ volt mind azoxistrobin (Quadris, 2022), mind trifloxistrobin (Flint Max, 2022) esetében. A kontroll lemezeket SHAM-mal (30,63 mg l⁻¹ (200 µM; “FRAC | Monitoring Methods”), vagy oldószerekkel (aceton és metanol) egészítettem ki. Minden kísérletet négy párhuzamos mintával végeztem három független időpontban (12-12 minta izolátumonként és kezelésenként).

Minden lemezt Parafilm M fóliával lezárva sötétben, 25 °C-on inkubáltam. A csírázó konídiumok számlálását 24 óra elteltével végeztem el úgy, hogy steril pengével levágtam egy negyed körcikkelyt a celofánból és fénymikroszkóp alatt 400-szoros nagyítással megszámláltam, hogy 100 darab spórából hány darab csírázott ki. Csíratömlő- vagy hifanövekedést torzító hatást nem tapasztaltam. Egy konídiumot akkor tekintettem csírázottnak, ha a csíratömlő a konídium hosszával megegyező vagy annál hosszabb volt. A csírázó konídiumok számából kiszámítottam a két izolátum eltérő kísérlet-kombinációira vonatkozó százalékos csírázástáplási értékeiket.

5.3. Molekuláris vizsgálatok

5.3.1. Nukleinsav kivonás

A DNS-izoláláshoz a *Phyllosticta* spp. izolátumokat/törzseket malátakivonat agar táptalaj (MilliporeSigma) lemezekre oltottam át és egy hét 25 °C-on sötétben növekedés elteltével a micéliumot (kb. 100 mg) összegyűjtöttem. A kivonást Edwards *et al.* (1991) által leírt protokoll szerint végeztem, néhány módosítással: a micéliumot 0,1 és 0,5 mm átmérőjű kerámia golyócskákat tartalmazó ZR BashingBead (Zymo Research, Irvine, USA) líziscsővekbe tettem, amelyeket 500 µl SDS extrakciós pufferrel (Edwards *et al.* 1991 alapján) töltöttem meg, és FastPrep-24™ gyöngy-rázó homogenizátorral (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) tártam fel. A homogenizátumot 5 percig 65 °C-on inkubáltam annak érdekében, hogy a fehérjék (pl. hiszton) leváljanak a DNS szálról, majd 5 percig jégen hűtöttem, hogy a fehérjék kicsapódjanak az oldatból. Végül a DNS-csapadékot kétszer mostam 80%-os etanolos oldattal, majd 100 µl AccuGENE ultratiszta vízben (MBW, Lonza Group AG, Basel, CH) felfuszpendáltam.

A teljes RNS kivonását egyhetes telepekből végeztem az RNeasy Plant Mini Kittel (QIAGEN N.V., Venlo, NL) a gyártó utasításai szerint. A DNS- és RNS-kivonatok minőségét és mennyiségét a NanoDrop™ 2000/2000c spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) határoztam meg. A cDNS-t izolátumonként/törzsenként kb. 500 ng

teljes RNS-ből állítottam elő az iScript™ cDNS synthesis kittel (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) a mellékelt kézikönyv alapján. A tisztított cDNS (fungicidrezisztencia-markerek) és teljes DNS (ISSR, filogenetika és exon/intron szerkezetmeghatározás) szolgált templátként a polimeráz láncreakciós kísérletekhez.

5.3.2. ISSR genotipizálás

A 499 darab izolátumból álló *P. ampellicida* gyűjteményt a köztes egyszerű szekvenciaismétlődés (ISSR) módszerrel genotipizáltam. Ehhez összesen 89 ISSR primert (3. táblázat) teszteltem nyolc kiválasztott, Európa különböző részeiről és/vagy hazánkban különböző körülmények között gyűjtött *P. ampellicida* izolátum DNS-kivonatán (4. táblázat).

3. táblázat. A nyolc *P. ampellicida* izolátum DNS-kivonatán tesztelt ISSR-primerek neve és szekvenciája. A genotipizáláshoz kiválasztott primereket félkövérrel emeltem ki.

#	Primer neve ^a	Primer szekvenciája ^b	#	Primer neve	Primer szekvenciája	#	Primer neve	Primer szekvenciája
1	AMP1	(AG) ₈	31	UBC808	(AG) ₈ C	61	UBC852	(TC) ₈ RA
2	AMP2	(AC) ₈	32	UBC809	(AG) ₈ G	62	UBC853	(TC) ₈ RT
3	AMP3	(CCG) ₆	33	UBC810	(GA) ₈ T	63	UBC854	(TC) ₈ RG
4	AMP4	(ACG) ₆	34	UBC811	(GA) ₈ C	64	UBC856	(AC) ₈ YA
5	AMP5	(AGG) ₆	35	UBC812	(GA) ₈ A	65	UBC860	(TG) ₈ RA
6	AMP6	(AGC) ₆	36	UBC813	(CT) ₈ T	66	UBC861	(ACC) ₆
7	AMP7	(ATC) ₆	37	UBC814	(CT) ₈ A	67	UBC863	(AGT) ₆
8	AMP8	(AAC) ₆	38	UBC815	(CT) ₈ G	68	UBC864	(ATG) ₆
9	AMP9	(AAG) ₆	39	UBC817	(CA) ₈ A	69	UBC866	(CTC) ₆
10	GCA1	(GCA)₆RR	40	UBC821	(GT) ₈ T	70	UBC867	(GGC) ₆
11	GCA2	A(GCA) ₅ M	41	UBC822	(TC) ₈ A	71	UBC868	(GAA) ₆
12	GCA3	(GCA) ₅ GCY	42	UBC823	(TC) ₈ C	72	UBC869	(GTT) ₆
13	AAG1	(AAG) ₆ AAA	43	UBC824	(TC) ₈ G	73	UBC870	(TGC) ₆
14	AAG2	(AAG) ₅ AG	44	UBC825	(AC) ₈ T	74	UBC871	(TAT) ₆
15	AAG3	GA(AAG) ₅	45	UBC826	(AC) ₈ C	75	UBC872	(GATA) ₄
16	AAG4	GAG(AAG) ₅	46	UBC828	(TG) ₈ A	76	UBC873	(GACA) ₄
17	AG1	(AG) ₈ G	47	UBC829	(TG) ₈ C	77	UBC874	(CCCT) ₄
18	AG2	(AG) ₇ AH	48	UBC830	(TG) ₈ G	78	UBC875	(CTAG) ₄
19	AG3	SR(AG) ₇	49	UBC832	(AT) ₈ YC	79	UBC876	(GATA) ₂ (GACA) ₂
20	ISSR1	(GCT) ₆	50	UBC835	(AG) ₈ YC	80	UBC877	(TGCA) ₄
21	ISSR2	CT(GA) ₈	51	UBC836	(AG) ₈ YA	81	UBC878	(GGAT) ₄
22	ISSR3	BHB(GA) ₇	52	UBC837	(TA) ₈ RT	82	UBC881	(GGGTG) ₃
23	ISSR4	(AG) ₈ TA	53	UBC840	(GA) ₈ YT	83	UBC882	VBV(AT) ₇
24	ISSR5	(AG) ₈ TC	54	UBC841	(GA) ₈ YC	84	UBC884	HBH(AG) ₇
25	ISSR6	(GA) ₆ GG	55	UBC843	(CT) ₈ RA	85	UBC886	VDV(CT) ₇
26	UBC801	(AT) ₈ T	56	UBC844	(CT) ₈ RC	86	UBC887	DVD(TC) ₇

27	UBC802	(AT) ₈ G	57	UBC845	(CT) ₈ RG	87	UBC888	BDB(CA) ₇
28	UBC803	(AT) ₈ C	58	UBC846	(CA) ₈ RT	88	UBC890	VHV(GT)₇
29	UBC804	(TA) ₈ A	59	UBC848	(CA) ₈ RG			TAGATCTG
30	UBC807	(AG)₈T	60	UBC849	(GT) ₈ YA	89	UBC892	ATATCTGA ATTCCC

^a Az UBC a University of British Columbia (Vancouver, Kanada) 9. számú ISSR-primer (mikroszatellit) készletét jelöli.

^b A szekvenciaképletben az alsó index a zárójelben levő nukleotidcsoport (SSR) ismétlődéseinek számát jelöli. Az SSR-en kívül az ún. horgonyzott primerek további bázisokat is tartalmaznak, amelyekkel a primer a 3', vagy az 5' oldalon az SSR szekvencia melletti szakaszhoz kötődik. A négy hagyományos nukleotidjelölésen (A, T, G, C) felüli további betűk degenerált nukleotid pozíciókat jelölnek (R=A/G, Y=C/T, S=G/C, M=A/C, H=A/C/T, V=A/C/G, B=C/G/T, D=A/G/T).

4. táblázat. A *Vitis vinifera*-ról izolált és a 89 ISSR-primer tesztelésére kiválasztott nyolc *P. ampellicida* izolátum adatai.

#	Izolátum azonosítója	A gyűjtés helye ^a	A gyűjtés éve
1	EB1G5A	Eger, HU	2018
2	MG25	Mád, HU	2018
3	PaA1	Budapest, HU	2015
4	Gb30	Vinhos Verdes, PT	2013
5	Sárfehér	Budapest, HU	2015
6	GbC	Canneto Pavese, IT	2013
7	MG6	Mád, HU	2018
8	F15-49 R1^b	Egerszólát (Budapest), HU	2016

^a Az országok rövidítései a következők: "HU" - Magyarország, "PT" - Portugália és "IT" – Olaszország.

^b Az R1 azt jelzi, hogy bár ez az izolátum eredetileg 2015-ben Egerszóláton izoláltuk, de 2016-ban mesterséges fertőzési kísérletben használtam, majd egy kialakult lézióból újraizoláltam.

A PCR amplifikációkat, beleértve a DNS mentes negatív kontrollt is, a következő komponenseket tartalmazó, 20 µl térfogatú reakcióelegyben végeztem: 2 µl 10x DreamTaq Buffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US), 0,4 µl dNTP mix (egyenként 10 mM; Thermo Fisher Scientific), 0,5 µM a megfelelő primerből, 0,1 µl DreamTaq DNS-polimeráz (Thermo Fisher Scientific), 1 µl (kb. 30 ng) templát-DNS és ultratiszta víz 20 µl végtérfogatra kiegészítve. A PCR paraméterei a következők voltak: egy kezdeti denaturációs lépés 95 °C-on 5 percig, majd 35 ciklus, amelyek mindegyike 30 másodperc 94 °C-os denaturációból, 30 másodperc 46, 49 vagy 65 °C-os (UBC807, UBC890 és GCA1 primerkötés) illesztésből, valamint 2 perc 72 °C-os lánchosszabbításból állt, amit egy utolsó hosszabbítási lépés követett 72 °C-on 10 percig. A megbízhatóság érdekében minden mintát legalább kétszer szaporítottam fel

mindhárom kiválasztott primerrel. A PCR-termékeket 2%-os w/v agaróz gélen történő elválasztással, majd etídium-bromid (EtBr; MilliporeSigma) DNS-festéssel és ultraibolya fényel vizualizáltam, majd lefényképeztem az AlphaImager Ep Gel Documentary System-mel (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA). Végül a gélképeket minden egyes primer esetében külön-külön összehasonlítottam, és regisztráltam a megkülönböztető termékek jelenlétét vagy hiányát. Csak a 200-2500 bázispár közötti, jól reprodukálható termékeket vettem figyelembe. Ezek közül kiválasztottam azokat a termékeket, amelyek változatosságot mutattak a *P. ampellicida* izolátumok között és ezek jelenlétét vagy hiányát izolátumonként binárisan kódoltam (nyolcjegyű kód pl. GbC esetében 111000010). Ezeket az adatokat az R statisztikai számítási környezetben (RStudio Team: <http://www.rstudio.com/>) klaszterelemzésnek vettem alá, amelynek eredményeként egy UPGMA dendrogramot kaptam. Így minden izolátumot klaszterekbe soroltam az együttes ISSR-mintázatuk alapján.

5.3.3. Szőlőről és vadszőlőről származó *Phyllosticta* izolátumok/törzsek filogenetikai elemzése

Miessner *et al.* (2011) hasonló témájú, *P. ampellicida*-val kapcsolatos munkájukban összehasonlították a *V. vinifera*-ról és a *Pa. tricuspidata*-ról (CBS 237.48; lásd alább) származó *Phyllosticta* izolátumok/törzsek *citokróm b* gén és mRNS szekvenciáit, amelyeket a két izolátumban/törzsből azonosnak találtak. Mivel Zhou *et al.* (2015) a két fajt molekuláris alapon elkülönítette egymástól, valamint az előkísérleteimben különbözőnek találtam a két faj *cytb* génjének nukleinsav-szekvenciáját, ezért úgy döntöttünk, hogy egy másik lokusz vizsgálatával is megerősítjük a *cytb* gén szekvenciája által mutatott különbséget. Ezért kiválasztottam ezt a *Pa. tricuspidata*-ról (CBS 237.48) izolált törzset, valamint a *Pa. quinquefolia*-ról izolált, szintén közeli rokon faj a *P. parthenocissi* egy törzsét (CBS 111645; 1. táblázat). Másrészt az *in vitro* fungicid érzékenység felméréshez kiválasztott 48 *P. ampellicida* izolátum mindegyikét bevontuk (2. táblázat). Valamint további három nem-hazai *P. ampellicida* izolátumot vontam be földrajzi eredetük miatt (1. táblázat). Ezekből az izolátumokból DNS-t vontunk ki a fent leírt módon és a gombáknál fajszerű azonosításra használt ún. belső átíródó elválasztó (internal transcribed spacer; ITS) régió egy kb. 550 bázispár hosszúságú szakaszát is felszaporítottuk és meghatároztuk az ITS1F és ITS4 primerek használatával (Gardes és Bruns, 1993; White *et al.*, 1990). Mivel a Magyarországról izolált 48 *P. ampellicida* izolátumból

meghatározott ITS szekvenciák azonosak voltak, öt reprezentatív szekvenciát (18-3-2, 19-36, 19-40, 19-195 és 19-236) választottam ki és vontam be a filogenetikai elemzésbe. Ezeket, és a 3 nem-hazai *P. ampellicida* izolátum szekvenciáit elhelyeztük a GenBank adatbázisban is.

A kapott ITS szekvenciákkal a GenBank-ban BlastN keresést végeztem, amelynek eredményéből a legjobb találatokat (leghasonlóbb szekvenciákat), rokon *Phyllosticta* fajokból összegyűjtöttem. További szekvenciák lettek hozzáadva Zhang et al. (2013) és Zhou et al. (2015) közleményeiből. Az így összegyűjtött 131 szekvenciát kollégámmal a MAFFT online E-INS-i algoritmusával (Katoh és Standley, 2013) illesztettük egymáshoz. Az egyéb beállításokat alapértelmezettként használtuk. Az illesztésben az elő- és utóhézagokat (leading and trailing gaps) ismeretlen karakterként kódoltuk. Az illesztés hossza 601 karakter volt. A Maximum likelihood (ML) filogenetikai elemzést a GTR + G nukleotidhelyettesítési modellel, a raxmlGUI 1.5 programmal végeztük (Silvestro és Michalak, 2012; Stamatakis, 2014). A *Phyllosticta owaniana*-t, *Phyllosticta pseudotsugae*-t és a *Phyllosticta podocarpi*-t választottuk outgroup taxonnak. A kládok bootstrap-támogatásainak kiszámításához 1000 bootstrap ismétlést futtattunk. Az elemzés eredményeként kapott, legmagasabb log-likelihoodal rendelkező filogenetikai fát a TreeGraph 2.13.0 programmal jelenítettük meg (Stöver és Müller, 2010).

5.3.4. A citokróm b gén és mRNS részleges felszaporítása

A *cytb* gén exon/intron szerkezetének meghatározásához a kiválasztott izolátumok DNS kivonatából a gén fragmentumait DreamTaq™ Green PCR Master Mix-szel (2x; Thermo Fisher Scientific) amplifikáltam. A vizsgált *Phyllosticta* fajok *cytb* gén szekvenciájának fajok közötti variabilitása miatt (pl. exon/intron szerkezetbeli különbségek) különböző primerpárokat terveztem és használtam a PCR kísérletekhez (5. táblázat).

5. táblázat. A citokróm *b* gén és az mRNS molekuláris jellemzésére tervezett primerek adatai.

Primer neve	Célfaj	Cél DNS típusa	Primer szekvencia (5' > 3')
PspIntF	<i>P. partricuspidatae</i> <i>P. parthenocissi</i>	mtDNA	GAACACTTGTTTGAACATATAGG
PspIntR2	<i>P. partricuspidatae</i> <i>P. parthenocissi</i>	mtDNA	AAAATGTAGAGCGAAGAATC
GuiCytbDegF6	<i>P. gaultheriae</i> <i>P. capitalensis</i> <i>P. citricarpa</i>	mtDNA	GTCGTGTATGGTCAAATGAG
IntPozR	<i>P. gaultheriae</i> <i>P. capitalensis</i>	mtDNA	TTTGAATATGAARTAAGGAGC
GuiCytbDegR5	<i>P. citricarpa</i>	mtDNA	CCWATTCAAGGWATAGCACTC
GbCytBPwF1	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	TCCTACTATATATTAGAGTATATGC
GbCytBPwF1R	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	GCATATACTCTAATATATAGTAGGA
GbCytBPwF2	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	TAACAAGGAGTTATTGGATTTAG
GbCytBPwF2R	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	CTAAATCCAATAACTCCTTGTTA
GbCytBPwF3	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	ATAGTCCCATGAGTAATAATC
GbCytBPwF3R	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	GATTATTACTCATGGGACTAT
GbCytBPwF4	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	AAAGTCAATTAATCAAACAAG
GbCytBPwF4R	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	CTTGTTTGATTAATTGACTTT
GbCytBPwF5	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	CCCTTTATACAACATCTTGAG
GbCytBPwF5R	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	CTCAAGATGTTGTATAAAGGG
GbCytBPwF6	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	TGATCAATTTAAGGAATAAGG
GbCytBPwF6R	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	CCTTATTCCTTAAATTGATCA
GbCytBPwR5F	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	CTGAATTGCCTAAAGCTAAA
GbCytBPwR5	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	TTAGCTTTAGGCAATTCAG
GbCytBPwR4F	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	GGGATGAACAGTTAATGAGAA
GbCytbPwR4	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	TTCTCATTAACTGTTTCATCCC
GbCytBPwR3F	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	GAACATGGAGGTCCCTGCTAT
GbCytbPwR3	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	ATAGCAGGGACCTCCATGTTC
GbCytBPwR2F	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	GGAAGCAATGAATGATAAAAG
GbCytbPwR2	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	CTTTTATCATTTCATTGCTTCC
GbCytBPwR1F	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	CTACCTATATTATTAAGCTGTT
GbCytbPwR1	<i>P. ampellicida</i>	mtDNA	AACAGCTTTAATAATATAGGTAG
PampIntF	<i>P. partricuspidatae</i> <i>P. parthenocissi</i>	mtDNA	TATGTACTGCCCTACGG
PspIntR	<i>P. partricuspidatae</i> <i>P. parthenocissi</i>	mtDNA	GCACTCATTAAGTTTGTAATAACAG
Gb111PWF1	<i>P. parthenocissi</i>	mtDNA	GGTATCAAGACAACCTGGTTCTGC
Gb111PWR1	<i>P. parthenocissi</i>	mtDNA	ATCCATAACTCATATAGCTAAAG
Gb111PWF2	<i>P. parthenocissi</i>	mtDNA	CTTTAGCTATATGAGTTATGGAT
Gb111PWR2	<i>P. parthenocissi</i>	mtDNA	GCAGAACCAGTTGTCTTGATACC
Gb237PWF1	<i>P. partricuspidatae</i>	mtDNA	TTTATTAATAGTTGGTAGAGAAC
Gb237PWR1	<i>P. partricuspidatae</i>	mtDNA	AATTGATTGAGGAACTAACTTTG
Gb237PWF2	<i>P. partricuspidatae</i>	mtDNA	CAAAGTTAGTTCCTCAATCAATT
Gb237PWR2	<i>P. partricuspidatae</i>	mtDNA	GTTCTCTACCAACTATTAATAAA
Gm119PWF1	<i>P. capitalensis</i>	mtDNA	TTGTAGTAGCCGAGGGATCATTC
Gm119PWR1	<i>P. capitalensis</i>	mtDNA	AACCTTTTGTATATCTGCCTTAG
GcPWF1	<i>P. citricarpa</i>	mtDNA	AGAATGTTAAACTAATCTTGTTCT
GcPWR4	<i>P. citricarpa</i>	mtDNA	GAACAAGATTAGTTTTAACATTCT
GcPWF2	<i>P. citricarpa</i>	mtDNA	TTCTATTTCTAGCTTAGTTTCTG

GcPWR3	<i>P. citricarpa</i>	mtDNA	CAGAAACTAAGCTAGAAATAGAA
GcPWR2	<i>P. citricarpa</i>	mtDNA	ATAGCCATATAGTGAATTATCG
GcPWF3	<i>P. citricarpa</i>	mtDNA	CGATAATTCATATATGGCTAT
GcPWR1	<i>P. citricarpa</i>	mtDNA	TACACCACTATCCATAACTCAGAT
GcPWF4	<i>P. citricarpa</i>	mtDNA	ATCTGAGTTATGGATAGTGGTGTA
GuiCobCdsF (GCCF)	<i>P. ampellicida</i>	cDNA	ACCTCAACCTTCAAATATTAG
GuiCobCdsR (GCCR)	<i>P. ampellicida</i>	cDNA	AAAGGTCTGAATTGTATACC

Ezeket a primerpárokat, részben a korábbi szekvencia és exon/intron szerkezet eredmények alapján (Miessner *et al.*, 2011; Stammler *et al.*, 2013), úgy terveztem meg, hogy az exonszekvenciában a 143. kodon közvetlen közelében kötődjenek. Így, amennyiben a 143. kodont követően megtalálható az intron, akkor hosszabb, míg intron hiányában rövid terméket eredményez a PCR. A *P. parthenocissi* és a *P. partricuspidatae* törzsek esetében nem sikerült közvetlenül felszaporítanom a *cytb* gén 143. kodonját körülvevő rövidebb génszakaszt, ezért ebben a két esetben nested PCR módszert alkalmaztam. Annak érdekében, hogy az eredményeim minél inkább összehasonlíthatóak legyenek a korábban publikáltakkal (Miessner *et al.*, 2011: GenBank azonosító: JF785545), a *P. ampellicida* izolátumokból a *cytb* gén egy hosszabb szakaszt (körülbelül 8 kilobázis pár) szaporítottam fel. Ehhez specifikus primereket, majd az ún. „primer walking sequencing” technikát használtam, amely lépésről lépésre lehetővé teszi, hogy egy hosszabb nukleinsav két végéről elindulva, szekvenálás, primertervezés, szekvenálás lépéseket ismételve megismerjük a teljes szakasz nukleotidsorrendjét. A reakcióelegyek összetevői a következők voltak: 12,5 µl 2x DreamTaq™ mix, 0,4 µM minden egyes primerből, 0,6 µl dimetil-szulfoxid (DMSO, Thermo Fisher Scientific), 1 vagy 2 µl templát DNS (50-100 ng) és ultratiszta víz 25 µl végtérfogatra kiegészítve. A nested PCR-ek templátjaként az eredeti PCR-termékek 100-szoros hígításait használtam. A reakciókörülmények a következők voltak: a kezdeti denaturációs lépés 95 °C-on 5 percig, majd 35 ciklus, amelyek mindegyike 30 másodperces 95 °C-on történő denaturálásból, 30 másodperces különböző hőmérsékleten történő primer kötésből, különböző ideig 68, vagy 72 °C-on történő lánchosszabbításból és egy utolsó 10 perces 72 °C-os lánchosszabbítási lépésből állt. Az alkalmazott primerkombinációkat, kötési hőmérsékleteket (T_a), lánchosszabbítási időket (t_e), lánchosszabbítási hőmérsékleteket (T_e) és a termék hosszokat lásd a 6. táblázatban.

6. táblázat. A *cytb* gén (mtDNS) molekuláris jellemzéséhez tervezett és ebben a vizsgálatban használt primerek és PCR-ek adatai.

Törzs megnevezése ^a	Célfaj	Primerpárok	T _a / t _e / T _e ^b	Termék-hossz (bp)
Különféle	<i>P. ampelica</i>	PspIntF – PspIntR2	58 °C / 8 p / 68 °C	8605
CBS 237.48	<i>P. partricuspadatae</i>	PspIntF – PspIntR2	58 °C / 10 p / 68 °C	~9 kb
		PampIntF – PspIntR ^c	52 °C / 3 p / 68 °C	2096
CBS 111645	<i>P. parthenocissi</i>	PspIntF – PspIntR2	58 °C / 10 p / 68 °C	~10 kb
		PampIntF – PspIntR ^c	52 °C / 3 p / 68 °C	2207
CBS 119720	<i>P. capitalensis</i>	GuiCytbDegF6 – IntPozR	58 °C / 2 p / 72 °C	1530
CBS 828.97	<i>P. citricarpa</i>	GuiCytbDegF6 – GuiCytbDegR5	58 °C / 2,5 p / 72 °C	3257
CBS 447.70	<i>P. gaultheriae</i>	GuiCytbDegF6 – IntPozR	58 °C / 3 p / 72 °C	288

^a CBS: CBSeKNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Hollandia.

^b T_a a primer kötési hőmérsékletet, míg T_e és t_e a lánchosszabbítási hőmérsékletet és időt (percben megadva) jelöli.

^c A nested PCR-ben használt primerpárok.

A *CYTB* mRNS szekvenciájában a fungicidrezisztencia-markerek ellenőrzéséhez először a kiválasztott izolátumok RNS kivonatából készítettem cDNS termékeket. Ezekből a cDNS mintákból a *CYTB* mRNS fragmentumok felszaporításához a Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix-et (2x; Thermo Fisher Scientific) használtam. A különböző *Phyllosticta* fajok *CYTB* mRNS-ének egyidejű amplifikálására terveztem egy olyan primerpárt, amely minden vizsgált faj cDNS-éhez képes kötődni: GuiCobCdsF (GCCF) és GuiCobCdsR (GCCR) (5. táblázat). A tervezéshez először a GenBank adatbázisban elérhető más tömlősgombafajok *CYTB* mRNS szekvenciáit illesztettem egymással a Mega X szoftverrel, majd ez alapján választottam ki a két legmegfelelőbb szakaszt a primerek kötődésére (Kumar *et al.*, 2018). Minden reakció 20 µl térfogatban ment végbe, amely 10 µl 2x Phusion Master Mixet, minden egyes primerből 0,4 µM-t, 2 µl templát cDNS-t és molekuláris biológiai vizet tartalmazott. A PCR-t egy kezdeti denaturációs lépéssel indítottam 5 percig 98 °C-on, majd 35 ciklust végeztem, amelyek mindegyike 10 másodperces 98 °C-on történő denaturálásból, 10 másodperces 55 °C-on történő primerkötésből és 20 másodperces 72 °C-on történő lánchosszabbításból, és egy utolsó 10 perces 72 °C-os lánchosszabbítási lépésből állt.

5.3.5. Molekuláris klónozás és szekvenciameghatározás

Az összes PCR terméket (az ISSR-termékek kivételével) 1,5% w/v agaróz gélen (Lonza) választottam el gélelektroforézissel. A termékeket kivágtam a gélből és a QIAquick Gel Extraction Kittel (Qiagen) izoláltam a gyártó utasításainak megfelelően. Ezt követően az mtDNS- és cDNS-fragmentumokat („inzertereket”) némileg eltérően klónoztam. Az mtDNS „ragadós végű” PCR termékeit (kivéve a *P. ampellicida* izolátumokból származó nyolc kb+ termékeket, lásd később) a TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing csomaggal (Thermo Fisher Scientific) építettem be a pCR™4-TOPO™ vektorba. A cDNS-amplikonokat a CloneJET™ PCR Cloning™ Kittel (Thermo Fisher Scientific) ligáltam a pJET1.2/blunt vektorba a gyártó utasításai szerint. Ezután valamennyi plazmidot One Shot™ Top10 kémiaiailag kompetens *Escherichia coli* sejtekbe (Thermo Fisher Scientific) transzformáltam 30 másodperc 42 °C-os hőszökkel, majd a baktériumokat Miller's Luria Broth (LB; VWR) tápoldatban tenyésztettem egy órán keresztül. A transzformánsokat elsődlegesen mindkét klónozási módszer esetében karbenicillin antibiotikummal (100 mg l⁻¹, Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, NL) kezelt LB lemezekre szélesztéssel szelektáltam. A két klónozó kit másodlagos szelekciós módszere abban szintén megegyezik, hogy a többszörös klónozási helyen (multiple cloning site, MCS) egy funkcionális gént kódol, amely az inzert beépülése esetén elveszti a funkcióját. Míg a Clonejet kit pJET1.2/blunt vektorjában ez a szakasz letális gént kódol, ami önmagában elegendő a sikeres transzformánsok kiválogatódásához, hiszen csak ezek maradnak életben, addig a pCR™4-TOPO™ vektorban az ún. kék-fehér szelekcióhoz a színátmenetet eredményező kémiai reakcióhoz szükséges enzim egyik alegysége (a β-galaktózidáz enzim α alegysége) kódolt a többszörös klónozási helyben. Ez az enzim alapesetben (intakt többszörös klónozási hely esetében) a kromogén szubsztrát, az X-Gal lebontásában játszik szerepet, amely reakció lejátszódása kék színű terméket eredményez. Ezt a reakciót teszi lehetetlenné az inzert beépülése és így az inzertet tartalmazó klónok telepei fehérek maradnak. A β-galaktózidáz enzim kifejeződése és így a reakció intenzitása fokozható izopropil-béta-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) jelenlétével. Ezért a TOPO klónozási módszer esetén a kék és fehér szelekcióhoz az LB-lemezek felületére plusz 40 µl 5-Bróm-4-klór-3-indolil-β-D-galaktózid (X-Gal; 40 mg ml⁻¹, Duchefa) és 40 µl IPTG-t (100 mM, Thermo Fisher Scientific) szélesztettem még a baktériumszuszpenzió szélesztése előtt. Mintánként legfeljebb 12 (fehér) kolóniát ellenőriztem "kolónia" PCR-rel, hogy megtalálható-e bennük a kívánt inzert.

A reakcióelegy a következő komponensekből állt: 12,5 µl DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X; Thermo Fisher Scientific), 0,4 µM minden egyes primerből (a gyártó által biztosított M13F és R, vagy pJet1.2F és R primerpárok) és ultratiszta víz 25 µl végtérfogatra kiegészítve. A reakciókörülmények a következők voltak: 95 °C-on 5 perc, majd 30 ciklus: 30 másodperc 95 °C-on, 30 másodperc 55 °C-on, vagy 60 °C-on (M13 illetve pJet1.2 primerpárokkal), különböző lánchosszabbítási idő 72 °C-on (6. táblázat) és végül egy utolsó hosszabbítási lépés 72 °C-on 10 percig. A kiválasztott izolátumonként/törzsenként hat-hat (cDNS), vagy egy-egy (mtDNS) ellenőrzött klónt LB szelektív táptalajon (150 µl) tenyésztettem 96 lyukú multititer lemezekben (MTP), majd elküldtem az LGC Genomics GmbH-nak (Berlin, Németország) plazmidtisztításra és Sanger-szekvenálásra. Minden klón nukleotidsorrendjét mindkét irányból meghatároztam az M13, vagy a pJet1.2 primerpárokkal. A 300 bp-nál hosszabb mtDNS inzertek nukleotidsorrendjét mindkét irányból „primer walking” technikával határoztam meg (a primereket lásd az 5. táblázatban).

A *P. ampellicida* izolátumokból felszaporított *cytb* gén (mtDNS) fragmentumból izolátumonként több párhuzamos PCR mintát készítettem, amelyeket izolátumonként egy-egy csőbe összemértem, összekevertem, majd ismét 15 µl-es porciókra osztottam. Végül elküldtem az LGC Genomics GmbH-nak szekvenálásra a megfelelő primer walking primerekkel (5. táblázat).

Az összes kapott szekvenciaprofilit a CodonCode Aligner szoftverrel (8.0.2 verzió, CodonCode Corp., Centerville, USA) vágtam le, illesztettem egymáshoz és alaposan ellenőriztem minden egyes nukleotidpolimorfizmust. Az I-es típusú önkivágódó intronokat a *cytb* génszekvenciákban a rájuk jellemző konzervált másodlagos RNS-struktúrák azonosításával az RNAweasel bioinformatikai „pipeline” segítségével fedtem fel (Lang *et al.*, 2007). A jelen dolgozatban közzétett összes cDNS-szekvenciát legalább három klónból határoztam meg. Minden nukleinsav-szekvenciát egymáshoz és a GenBank adatbázisban elérhető, korábban publikált (Hincapie *et al.*, 2013; Miessner *et al.*, 2011; Stammler *et al.*, 2013) *Phyllosticta* spp. szekvenciákhoz illesztettem a Mega X szoftver segítségével. A különböző *Phyllosticta* fajokból amplifikált *cytb* génfragmentumok exon/intron szerkezetét az adott fajból származó *cytb* gén- (mtDNS) és *CYTB* mRNS (cDNS) szekvenciák MAFFT-tal, alapértelmezett beállításokkal történő illesztésével határoztam meg (Kato *et al.*, 2019).

5.4. Statisztikai elemzések

Minden elemzést az R statisztikai számítási környezetben futtattunk (RStudio Team: <http://www.rstudio.com/>). A micéliumnövekedés százalékos gátlásának elemzéséhez lineáris vegyes kevert modellt használtunk, amelyben a fungicid kezelést (azoxistrobin és TS) és a SHAM kezelést (jelenlét vagy hiány) független változóként, az izolátumazonosságot (48 izolátum) pedig random faktorként szerepeltettük. Kezdetben a modell a fungicid és a SHAM közötti kétirányú kölcsönhatást is tartalmazta, azonban ezeket végül szignifikáns hatás hiányában kihagytuk a modellből. A konídiumcsírázás százalékos gátlásának elemzéséhez lineáris modellt használtunk, amelyben az izolátumazonosságot (19-129 vagy 18-3-9), a fungicid- és SHAM kezelést (mindkettőt az előző modellhez hasonlóan) független faktorokként vettünk figyelembe a modellben, mindezek két- és háromirányú kölcsönhatásával egyetemben. Mindkét modellben a nem szignifikáns kölcsönhatásokat fokozatosan elhagytuk, amíg a végső modellekben csak szignifikáns ($P < 0,05$) kifejezések maradtak. Az adatokat az RStudio vagy a Microsoft Office Excel 2013 szoftverrel ábráztuk. Az adatok átlaga és szórása kerül közlésre.

6. EREDMÉNYEK

6.1. ISSR genotipizálás

A 2010-2019-ig terjedő időszakban összesen 499 *P. ampellicida* izolátumból álló törzsgyűjteményt hoztunk létre (Függelék M.2.1. táblázat). Ezeknek az izolátumoknak a genotipizálására a 89 tesztelt ISSR primer közül az előállított termékek változatossága, reprodukálhatósága, mérete és agarózgélben történő megkülönböztethetősége alapján három ISSR-primer (UBC807, UBC890, GCA1) került kiválasztásra a további izolátumok elemzéséhez. A kiválasztott három „horgonyzott” primer (3. táblázat) felhasználásával létrehozott ISSR-profilok alapján a 499 *P. ampellicida* izolátumot összesen nyolc különböző klaszterbe/genotípusba tudtam besorolni az UPGMA dendrogramon (M.2.3. ábra). A törzsek többsége (98,6%) az 1. és a 2. számú klaszterbe tartozott (64,8% és 29,7%). A magyarországi borvidékekről származó izolátumok tekintetében hasonló volt ez az arány, mert a törzsek 61,7%-a tartozott az 1. klaszterbe, míg 30,5% az 2.-ba (7. táblázat és M.2.3. ábra). A 4-7. klasztereket csak egy vagy két izolátum képviselte az Egri borvidékről, míg a Tokaj-hegyaljai borvidéken csak a két domináns klaszterbe (1. és 2.) tartozó izolátumokat találtam. A horvátországi Moscenicka Draga-ból származó nyolc izolátumból hét tartozott az 1. klaszterbe, míg a nyolcadik a 3. klaszter egyedüli képviselőjének bizonyult. A portugáliai Vinhos Verdesből származó két izolátum közül az egyik a leggyakoribb, legnépesebb 1. klaszter tagja volt, míg a másik a 8. klasztert egyedülként képviseli. Végül az olaszországi Canneto Pavese-ből származó egyetlen izolátum a 2. klaszterbe tartozott.

7. táblázat. A 499 *P. ampellicida* izolátum megoszlása a helyszínek és a nyolc azonosított ISSR klaszter/genotípus között.

Származási hely ^a	Izolátumok száma (db)	ISSR (UPGMA) klaszterek ^b							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Egri borvidék	455	301	149		1	2	1	1	
Tokaj-Hegyaljai borvidék	33	25	8						
Moscenicka Draga, HR	8	7		1					
Vinhos Verdes, PT	2	1							1
Canneto Pavese, IT	1		1						

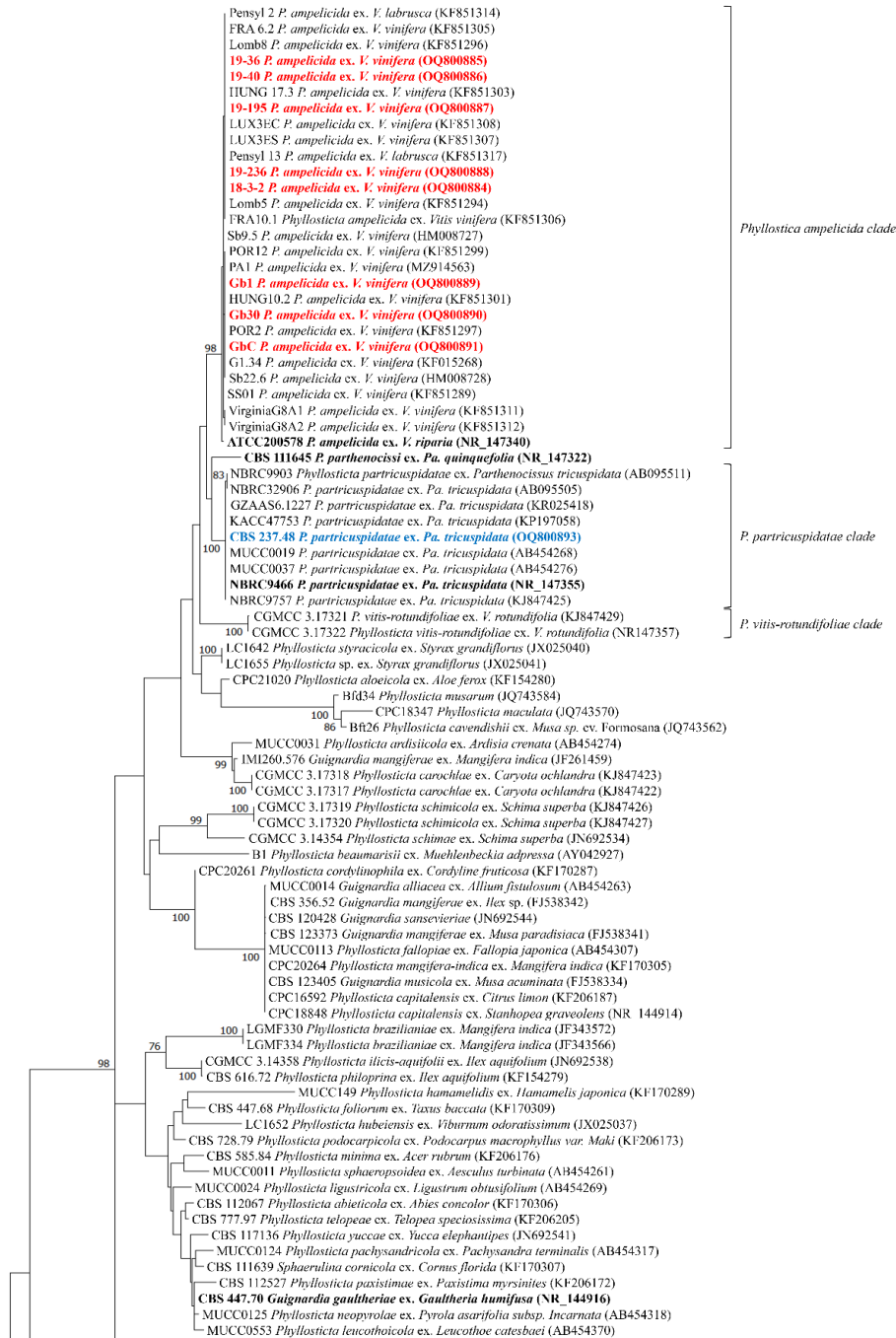
^a Az országok rövidítései a következők: "HR" Horvátország, "PT" Portugália és "IT" Olaszország.

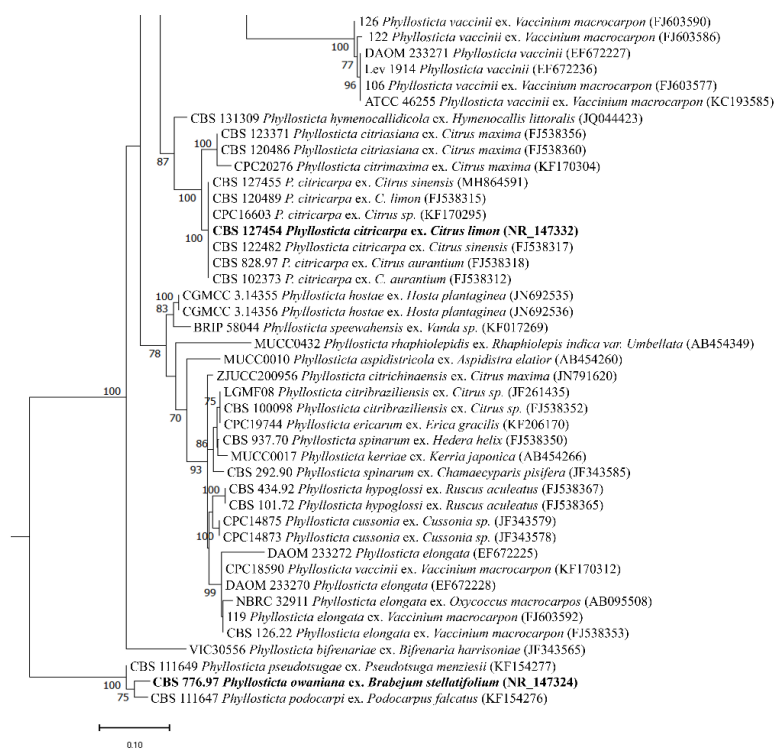
^b Az ISSR klasztereket/genotípusokat a három kiválasztott primerrel (lásd a 3. táblázatot) felszaporított és agarózgél-elektroforézissel láthatóvá tett "molekuláris ujjlenyomat" mintázatok kombinációja alapján határoztam meg.

6.2. Szőlőről és vadszőlőről származó *Phyllosticta* izolátumok/törzsek filogenetikai elemzése

2010 és 2019 között összesen 495 *P. ampellicida* izolátumot hoztunk létre *V. vinifera* mintákból. A 48 kiválasztott magyarországi *P. ampellicida* izolátumból meghatározott ITS-szekvenciák azonosak voltak. A magyar izolátumok öt reprezentatív szekvenciája mellett további három *P. ampellicida* izolátum (kettő Portugáliából és egy Olaszországból) szekvenciáit is bevontuk, mivel ezek a magyar izolátumoktól eltérő genotípust képviseltek, úgy is, hogy ugyanarról a gazdanövényről (*V. vinifera*) származtak (1. és 2. táblázat). A *Pa. tricuspidata* CBS 237.48 izolátum ITS-szekvenciája (1. táblázat) nagyfokú BlastN-hasonlóságot mutatott (99,28-100%) a nemrég *P. partricuspidatae* néven leírt izolátumok szekvenciáival (Zhou et al., 2015). Emellett Maximum likelihood (ML) elemzésünk azt is kimutatta, hogy jól alátámasztott kládot alkotott a *Pa. tricuspidata*-ról izolált *P. partricuspidatae* szekvenciáival (8. ábra). Ezért a jelen munkában ezt a törzset *P. partricuspidatae* fajba tartozónak tekintjük. Ugyanez a szekvencia csak $\leq 97,59\%$ -os hasonlóságot mutatott a *V. vinifera*-ról létrehozott *P. ampellicida* izolátumok ITS-szekvenciájával. Az ML filogenetikai elemzés eredménye azt mutatta, hogy a *P. ampellicida* nyolc újonnan meghatározott szekvenciája és a GenBankban *P. ampellicida* (vagy *G. bidwellii*) néven tárolt szekvenciák jól alátámasztott (BS = 97%) kládot alkotnak. A teljes mértékben támogatott (BS = 100%) kládot a *Vitaceae* család növényi kórokozóinak szekvenciái

(*P. partricuspidatae* és *P. vitis-rotundifoliae*) alkották. A *P. parthenocissi* törzsből (CBS 111645) nyert szekvencia megegyezett a típus törzsből származó szekvenciával (GenBank acc. No.: NR_147322.1). Ezért a filogenetikai elemzésbe csak az utóbbit vontuk be.





8. ábra. A *P. ampeliciida* és a rokon fajok ITS szekvenciáinak Maximum likelihood (ML) elemzéséből származó Highest likelihood filogenetikai fa (az izolátum/törzs azonosítószám, a gazdanövény faj (ha ismert) és a GenBank hozzáférési szám feltüntetésével).

Külcsoportként a *Phyllosticta owaniana*, *Phyllosticta pseudotsugae* és a *Phyllosticta podocarpi* ITS-szekvenciáját használtuk. Az ebben a munkában létrehozott szekvenciákat színessel és félkövérrel emeltem ki. A piros szín a *V. vinifera*-ról, míg a kék a *Pa. tricuspidata*-ról származó izolátumok/törzsek szekvenciáit jelöli. A jelen tanulmányban a *Parthenoscissus parthenocissi* CBS 111645 törzséből meghatározott szekvencia megegyezett a GenBankban elérhető szekvenciával, ezért utóbbit vontuk be az elemzésbe. A típusörzsek (TYPE) szekvenciái feketével és félkövérrel lettek kiemelve. Az ágakon az ML-analízis során 1000 ismétlésből számított Bootstrap-támogatási értékek szerepelnek (a 70% alatti értékek nem szerepelnek). A korábbi vizsgálatokból származó szekvenciák GenBank hozzáférési számai zárójelben vannak feltüntetve, míg az újonnan meghatározott szekvenciák GenBank azonosítószámát az 1. és 8. táblázatok tartalmazzák. A bal alsó sarokban látható mércé 0,05 várható változást jelez áganként és helyenként. A törzsgyűjtemények jelölései: ATCC: American Type Culture Collection, Virginia, USA; BRIP: Queensland Plant Pathology Herbarium and Insect Collection, Queensland, Australia; CBS: CBSeKNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Hollandia; CGMCC: China General Microbial Culture Collection; CPC: Culture collection of P. W. Crous, housed at CBS; DAOM: Canadian National Mycological Herbarium, Ottawa, Canada; KACC: Korean Agricultural Culture Collection; MUCC: Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie prefecture, Japán; NBRC: Biological Resource Center, the National Institute of Technology, and Evaluation, Japán;

6.3. Fungicid érzékenységi teszt

6.3.1. A micéliumnövekedés gátlása

Az *in vitro* micéliumnövekedés-gátlási kísérletben a gradients lemezek nagy száma (1440 db) miatt a kísérletet 48 darab kiválasztott *P. ampellicida* izolátumon végeztük el. Ezeket az izolátumokat több szempont együttes figyelembevételével választottam ki a 499 izolátumot tartalmazó gyűjteményből (M.2.1. táblázat). Ezen szempontok az ISSR klaszter/genotípus, az izolálást megelőző két évben végzett QoI-kezelésre vonatkozó információk, valamint a gyűjtés helye és éve voltak. A kiválasztás azt a logikát követte, hogy minél több évjárat, minél több gyűjtési hely, és minél több ISSR genotípus képviselve legyen a 48 izolátum között. Emellett pedig törekedtünk a QoI kezeléstörténet szempontjából is kiegyensúlyozott, kezelt és kezeletlen izolátumok bevonására is (8. táblázat).

Az így kiválasztott izolátumok egyike sem mutatott magasabb EC₅₀ értéket, mint a gradients felső határa (0,038 µg ml⁻¹). A mérhetetlenül kis EC₅₀ értékkel rendelkező izolátumok mind nagyon érzékenyek voltak a vizsgált kezelésekre (<0,01 µg ml⁻¹ EC₅₀ kategóriájú sávok csoportja; 9. ábra A).

8. táblázat. Az *in vitro* fungicid-érzékenységi vizsgálatokhoz kiválasztott 48 *P. ampellicida* izolátum micéliumnövekedés-gátlási százalék és az ezekből származó nukleinsav szekvenciák (*citokróm b* cDNS-mtDNS és ITS) GenBank azonosító adatai.

QoI rang ^a	Izolátum-azonosító ^b	QoI kezelés-történet ^c	Micéliumnövekedés-gátlási % ^d				GenBank azonosítószám cDNS / mtDNS / ITS
			AS	AS + SH	TS	TS + SH	
1	19-129 [#]	+	88,6 ± 2,5	92,4 ± 0,5	96,2 ± 1,1	97,8 ± 0,2	OQ873630 / OQ849738 / -
2	19-69	+	83,0 ± 4,9	91,8 ± 3,4	95,3 ± 3,1	98,1 ± 1,6	
3	19-36 [▶]	+	78,7 ± 5,0	88,1 ± 2,4	93,8 ± 2,0	95,8 ± 0,7	- / - / OQ800885
4	19-47	+	84,0 ± 2,6	89,1 ± 4,5	91,3 ± 2,9	92,6 ± 2,3	
5	19-125	+	82,8 ± 1,1	86,1 ± 3,9	88,7 ± 2,2	96,2 ± 1,7	
6	EB2G1A	-	81,0 ± 0,9	82,6 ± 1,9	91,8 ± 4,6	96,2 ± 1,9	
7	19-25	+	83,5 ± 3,6	80,8 ± 3,0	93,0 ± 1,9	91,7 ± 3,0	
8	19-123	+	80,6 ± 3,4	88,3 ± 1,4	89,9 ± 3,9	94,2 ± 3,2	
9	18-4-12	-	87,3 ± 2,4	84,3 ± 2,4	90,3 ± 2,3	92,6 ± 2,5	
10	19-40 [▶]	+	87,0 ± 2,0	89,4 ± 2,0	89,5 ± 3,8	90,7 ± 2,3	- / - / OQ800886
11	BG2 [§]	+	81,6 ± 4,5	84,6 ± 4,7	90,7 ± 4,0	92,0 ± 5,0	OQ873631 / OQ849739 / -
12	19-136	+	76,5 ± 2,1	80,2 ± 3,5	92,8 ± 2,8	94,9 ± 2,2	
13	19-169	-	82,4 ± 3,2	82,2 ± 3,5	91,1 ± 0,6	93,4 ± 2,7	
14	19-195 [▶]	-	76,4 ± 2,8	84,9 ± 3,9	89,1 ± 3,1	93,2 ± 3,6	- / - / OQ800887
15	G5B	-	83,3 ± 1,9	83,5 ± 2,5	86,0 ± 1,7	90,1 ± 1,9	
16	19-119	+	75,8 ± 3,7	80,3 ± 1,3	88,9 ± 1,7	94,1 ± 1,7	
17	18-3-2 [▶]	-	80,2 ± 3,2	81,3 ± 3,8	87,9 ± 1,1	89,8 ± 3,6	- / - / OQ800884
18	F16-51	+	82,5 ± 1,3	84,8 ± 1,3	87,2 ± 0,9	88,3 ± 1,6	
19	19-210	-	76,0 ± 2,1	82,3 ± 1,1	91,2 ± 2,7	88,7 ± 2,6	
20	19-234	-	80,7 ± 4,3	81,4 ± 2,0	88,1 ± 0,9	90,0 ± 2,8	
21	MGST2	-	70,3 ± 5,7	76,9 ± 4,9	92,8 ± 4,5	93,7 ± 1,9	
22	19-116	+	74,7 ± 3,0	81,6 ± 4,4	83,8 ± 4,9	93,4 ± 2,7	
23	19-159	-	77,1 ± 4,5	81,2 ± 3,1	88,0 ± 3,4	90,3 ± 4,0	
24	18-5-2	-	79,5 ± 1,4	80,0 ± 4,0	88,4 ± 1,7	89,3 ± 2,2	
25	F 17-56	+	78,5 ± 4,8	77,1 ± 2,4	88,4 ± 1,2	85,9 ± 3,6	

QoI rang ^a	Izolátum-azonosító ^b	QoI kezelés-történet ^c	Micéliumnövekedés-gátlási % ^d				GenBank azonosítószám cDNS / mtDNS / ITS
			AS	AS + SH	TS	TS + SH	
26	19-61	+	72,3 ± 4,1	79,7 ± 6,0	86,3 ± 2,9	89,6 ± 2,4	
27	19-214	-	70,9 ± 2,5	81,1 ± 3,4	80,1 ± 4,2	91,2 ± 2,4	
28	F 17-61	+	77,9 ± 1,4	78,5 ± 3,8	86,7 ± 1,8	85,9 ± 3,5	
29	19-73	+	74,2 ± 3,3	77,3 ± 3,4	86,6 ± 1,9	89,6 ± 2,5	
30	19-17	+	74,7 ± 5,9	75,6 ± 7,4	87,3 ± 4,0	88,2 ± 7,3	
31	19-82	+	68,4 ± 5,2	73,7 ± 2,8	85,1 ± 4,9	92,6 ± 2,4	
32	19-194	-	70,6 ± 3,1	78,7 ± 1,9	88,7 ± 0,8	89,0 ± 2,1	
33	19-7	+	73,5 ± 3,7	76,3 ± 6,2	88,0 ± 3,1	89,8 ± 2,9	
34	19-97	+	69,9 ± 4,7	72,2 ± 5,8	87,2 ± 4,3	92,5 ± 1,5	
35	19-236 ▶	-	74,2 ± 4,2	81,4 ± 2,8	81,4 ± 1,8	87,9 ± 2,0	- / - / OQ800888
36	BG7	+	73,3 ± 3,5	80,7 ± 4,0	80,4 ± 3,9	88,6 ± 2,3	
37	19-54	+	68,9 ± 5,4	78,6 ± 6,5	84,6 ± 2,2	88,8 ± 3,1	
38	Fe12-101	+	63,2 ± 4,3	79,3 ± 2,7	83,3 ± 4,0	91,7 ± 1,5	
39	19-226	-	64,7 ± 4,3	75,3 ± 5,7	85,9 ± 3,5	91,9 ± 2,5	
40	19-31	+	71,9 ± 2,4	77,8 ± 4,6	83,6 ± 4,7	89,2 ± 4,6	
41	19-179	-	63,4 ± 2,9	63,6 ± 3,2	83,3 ± 3,9	89,7 ± 2,4	
42	MG25	-	70,9 ± 4,7	75,6 ± 0,9	77,3 ± 2,3	84,8 ± 2,0	
43	18-1-2M	-	68,1 ± 1,5	71,3 ± 3,4	85,2 ± 0,6	85,2 ± 3,3	
44	F15-35	+	72,6 ± 2,1	74,6 ± 1,6	75,2 ± 1,6	78,7 ± 2,9	
45	19-208 §	-	72,5 ± 3,0	71,1 ± 4,0	77,0 ± 2,8	81,9 ± 3,6	OQ873632 / OQ849740 / -
46	BG4	+	70,1 ± 1,6	73,2 ± 1,1	79,1 ± 0,7	84,8 ± 2,6	
47	19-162	-	59,8 ± 2,3	64,3 ± 4,7	81,8 ± 5,6	85,0 ± 4,9	
48	18-3-9 #	-	69,2 ± 2,8	74,4 ± 0,9	74,8 ± 2,0	75,0 ± 4,1	OQ873633 / OQ849741 / -

^a Az izolátumok az átlagos gátlási százalékok (7-10. oszlop) szerinti csökkenő sorrendben vannak rendezve.

^b A *citokrómb* gén/mRNS jellemzéséhez és/vagy a konídiumcsírázási teszthez kiválasztott négy izolátum félkövér betűvel van kiemelve.

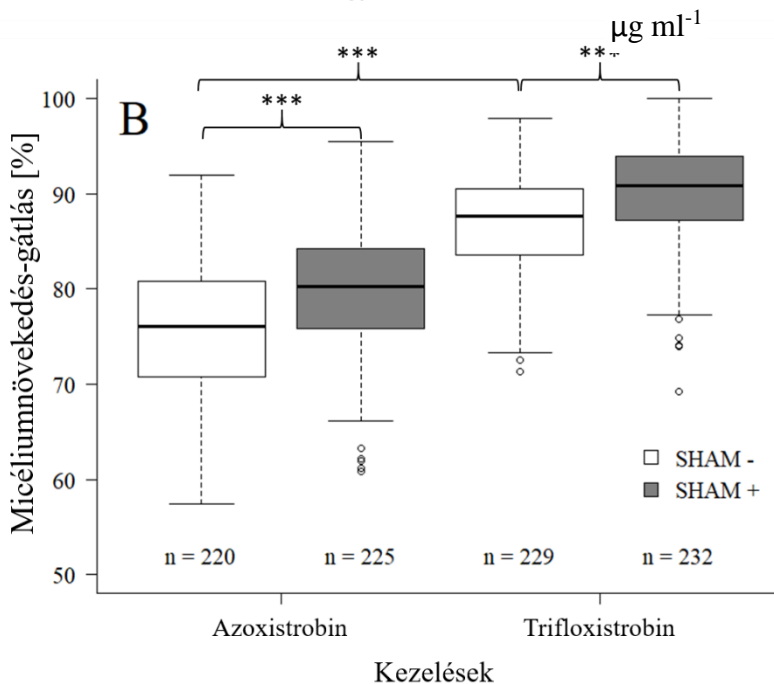
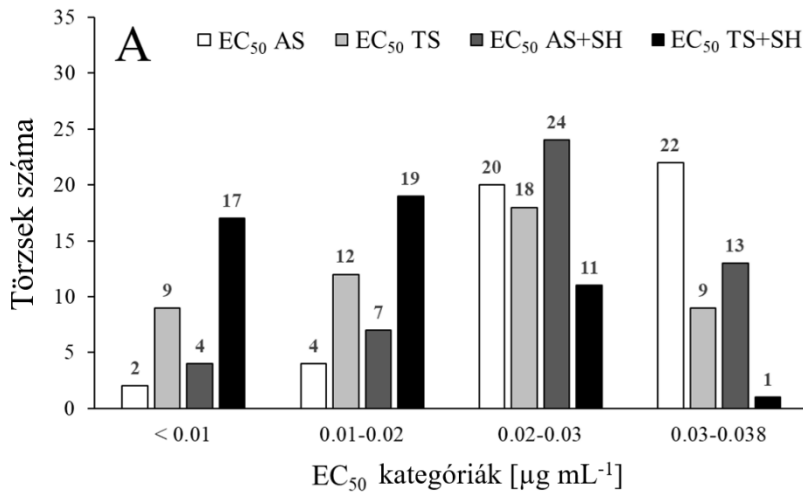
[#] A rangsor tetején és alján a *citokrómb* cDNS, mtDNS nukleotidsorrend-meghatározáshoz és a konídiumcsírázási gátlási teszthez egyaránt kiválasztott izolátumok.

[§] A rangsor felső és alsó feléből véletlenszerűen kiválasztott izolátumok, amelyeket mind a cDNS-, mind az mtDNS nukleotidsorrendjének meghatározásához felhasználtam.

▶ Az ITS filogenetikai elemzésbe bevont izolátumok.

^c QoI hatóanyagot tartalmazó fungiciddal való kezelés megelőző két szezonban; "+" QoI-val kezelt; "-" QoI-val nem kezelt.

^d A különböző kezelések százalékos gátlásának átlagértéke és szórása (n=3-5 egy adott izolátum minden egyes kezelésére). A kezelések és kezelési kombinációk kódjai a következők: "AS" az azoxistrobint, "TS" a trifloxistrobint és "SH" a SHAM-ot jelöli.



9. ábra. A 48 *P. ampellicida* izolátum azoxistrobin (AS), trifloxistrobin (TS) és a SHAM (SH) általi micéliumnövekedés-gátlásának jellemzői. **A:** Az izolátumok gyakoriságeloszlása a két hatóanyag és SHAM hozzáadásával vagy a nélkül vizsgált EC₅₀ értékeinek kategóriái között. Az egyes csoportokhoz tartozó mintaszámok (izolátumok száma) az oszlopok felett szerepelnek.

B: Az azoxistrobin (AS) és a trifloxistrobin (TS) százalékos micéliumnövekedés-gátlása SHAM jelenlétében vagy hiányában. Az egyes kezelések közötti statisztikai szignifikanciaszintek az ábra tetején kerültek feltüntetésre (***: $p < 0,001$; 9. táblázat). Minden doboz 48 *P. ampellicida* törzs 3-5 párhuzamos méréséből (össz elemszám a dobozok alatt jelölve „n=”) származó adatot képvisel (a vastag középső vonal: medián, doboz: interkvartilis tartomány; a bajuszok (whiskerek) a doboz $1,5 \times$ interkvartilis tartományán belüli legszélsőségesebb adatpontokra terjednek ki).

Mind a 48 *P. ampellicida* izolátum rendkívül érzékeny volt mind az azoxistrobinra, mind a trifloxistrobinra, az átlagos EC₅₀ értékük (átlag ± szórás) 0,029 ± 0,007, illetve 0,022 ± 0,008 µg ml⁻¹ volt. A *P. ampellicida* izolátumok nagy érzékenysége a QoI-kkal szemben a magas növekedésgátlási százalékokból is látható volt, amelyek az azoxistrobin esetében 52,23 és 88,64%, a trifloxistrobin esetében pedig 74,80 és 96,15% közötti értékeket mutattak (8. táblázat). A micéliumnövekedés százalékos gátlása szignifikánsan alacsonyabb volt az azoxistrobin esetében (átlag ± szórás: 75,37 ± 7,44%), mint a trifloxistrobin esetében (86,78 ± 5,07%; 9. ábra B; 9. táblázat).

9. táblázat. A gombaölőszer és a SHAM hatásának becsült értékei, standard hibái és *p*-értékei a *P. ampellicida* izolátumok micéliumnövekedésére és konídiumcsírázásának gátlására.

Paraméterek	Micéliumnövekedés-gátlás ^a			Konídiumcsírázás-gátlás ^b		
	Becsült érték	Standard hiba	<i>p</i> -érték	Becsült érték	Standard hiba	<i>p</i> -érték
Referencia kategória	75,88	0,7108	< 0,001	92,55	1,1930	< 0,001
TS	10,68	0,2819	< 0,001	-0,34	1,1930	0,779
+SHAM	3,76	0,2817	< 0,001	0,28	1,1930	0,814
19-129				-1,35	1,1930	0,264

Az egyes modellek első paraméterbecslése (pl. 75,88) a referencia kategória (azoxistrobinkezelés, SHAM nélkül, 18-3-9 izolátum) gátlási átlagértékét mutatja. A többi paraméterbecslés (pl. 10,68) a hatásnagyságokat mutatja, azaz a gátlási átlagérték különbségét a referencia kategória és a másik kezelési kategória, vagy izolátum között. A szignifikáns hatásokat (a csoportok közötti különbségek) félkövérrel emeltem ki.

^a 48 *P. ampellicida* izolátumok adatain alapuló elemzés, az izolátumot véletlenszerű tényezőként használva; df = 856.

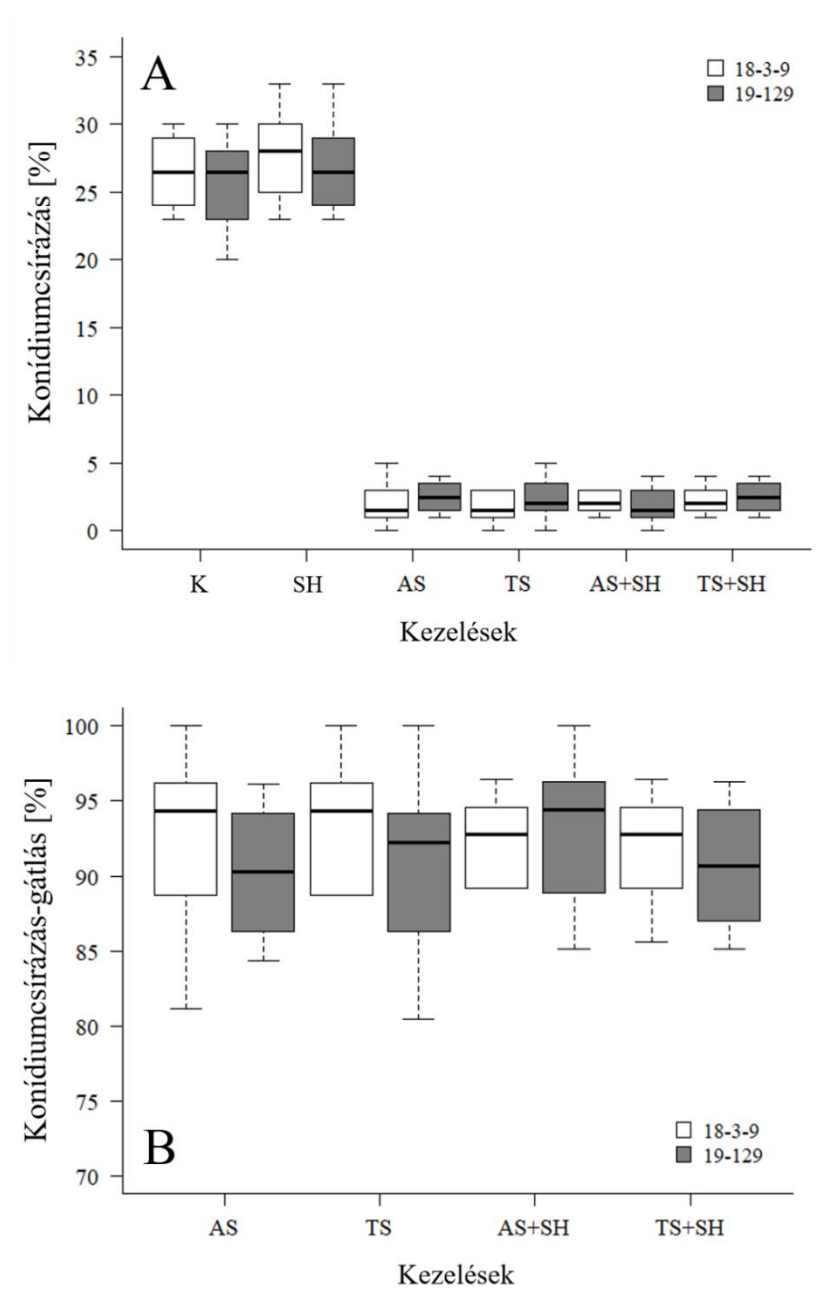
^b Két kiválasztott *P. ampellicida* izolátum (18-3-9 és 19-129) adatain alapuló elemzés, az izolátumot független változónak tekintve; df = 60.

Hogy értékelni tudjam az alternatív-oxidáz útvonal jelentőségét a *P. ampellicida* izolátumok mitokondriális légzésében a SHAM hatását is vizsgáltuk a micéliumnövekedésre. A SHAM hozzáadása egyrészt az EC₅₀ értékek esetében csökkenést eredményezett azoxistrobin + SHAM és a trifloxistrobin + SHAM esetében: 0,024 ± 0,007, illetve 0,017 ± 0,005 µg ml⁻¹ (9. ábra A). Másrészt a micéliumnövekedés-gátlási százalékokat szignifikánsan megnövelte mind az

azoxistrobin ($80,04 \pm 6,59\%$) mind pedig a trifloxistrobin ($90,29 \pm 4,52\%$) esetében (9. ábra B; 9. táblázat). A fungicid és a SHAM kezelések közötti kölcsönhatás nem volt szignifikáns ($p = 0,118$). A SHAM-ot nem használják a gyakorlati növényvédelemben, ezért a 48 *P. ampellicida* izolátum alapérzékenységét (EC_{50} és gátlási százalék mértéke) a csak fungiciddal módosított (SHAM nélküli) gradiens lemezek adatai alapján határoztam meg. Ennek eredményeit a 8. táblázatban és a 9. ábrán mutatom be. A micéliumnövekedési teszt eredményei alapján a 48 izolátumot az átlagos százalékos növekedésgátlás alapján rangsoroltam (8. táblázat).

6.3.2. A konídiumcsírázás gátlása

A konídiumok csírázásának gátlását két kiválasztott *P. ampellicida* izolátummal vizsgáltam: a micéliumnövekedés-gátlás rangsorban a legkevésbé érzékenyek bizonyult 18-3-9-es és a legérzékenyebbek bizonyult 19-129-es izolátumokkal (8. táblázat). Mindkét izolátum konídiumai gyengén csíráztak az oldószeres és SHAM kontroll lemezekon, a csíratömlő csak az esetek 26%-ban volt megfigyelhető 24 óra elteltével. Ugyanakkor a QoI-val vagy QoI+SHAM-mal módosított lemezekon csírázás alig volt megfigyelhető (10. ábra A).



10. ábra. A két kiválasztott *P. ampellicida* izolátum konídiumcsírázási eredményei.

A: A csírázás százalékos aránya kontroll (K) körülmények, azoxistrobin (AS), trifloxistrobin (TS) és/vagy SHAM jelenlétében. **B:** A konídiumcsírázás-gátlásának mértéke azoxistrobin (AS), trifloxistrobin (TS) és/vagy SHAM által. A kezelések

hatása között a két kiválasztott *P. ampellicida* izolátum százalékos csírázási gátlásában nem volt statisztikailag szignifikáns különbség (9. táblázat). A két kiválasztott izolátum egyike szürkével, a másik pedig fehérrel került jelölésre.

Minden doboz nyolc párhuzamos mérés adatait jelöli (vastag középső vonal: medián, doboz: interkvartilis tartomány; a bajuszok (whiskerek) a doboz $1,5 \times$ interkvartilis tartományán belüli legszélső adatpontokig terjednek).

A konídiumok csírázását nagymértékben gátolta az azoxistrobin és a trifloxistrobin jelenléte. Az átlagos százalékos csírázási gátlás a 18-3-9 izolátum esetében (átlag \pm szórás) $92,45 \pm 5,97\%$ illetve $93,40 \pm 4,11\%$ volt az azoxistrobin és a trifloxistrobin jelenlétében (10. ábra B). A 19-129 izolátum esetében nagyon hasonlóan alakultak ezek az értékek az azoxistrobin ($90,24 \pm 4,36\%$) illetve a trifloxistrobin ($90,73 \pm 5,83\%$) jelenlétében. Hasonlóképpen, a SHAM hozzáadása csak csekély eltérést eredményezett a két vegyület csírázásra gyakorolt hatásaiban. Ugyanakkor egyik különbség sem volt statisztikailag szignifikáns: sem a fungicid, sem a SHAM, sem pedig az izolátum hatása (10. ábra B; 9. táblázat). Valamint a független változók hatása között sem volt szignifikáns kölcsönhatás ($p \geq 0,404$ minden esetben, 9. táblázat).

6.4. A *citokróm b* gén/mRNS molekuláris jellemzése *Phyllosticta* izolátumokban/törzsekben

6.4.1. Molekuláris fungicidrezisztencia-markerek a *citokróm b* mRNS-ben

A *CYTB* mRNS (cDNS) 906 bázispár hosszúságú darabját felszaporítottam, klónoztam és meghatároztam a nukleotidsorrendjét különböző *Phyllosticta* spp. izolátumokból/törzsekben. Négy *P. ampellicida* izolátumot a micéliumnövekedésgátlási rangsor alapján választottam ki (8. táblázat), míg további négyet földrajzi eredetük alapján (1. táblázat 1-4. törzs). További kilenc *Phyllosticta* spp. törzset pedig a *P. ampellicida*-val történő összehasonlítás és a módszerünk ellenőrzése érdekében választottam ki (1. táblázat). A szekvenciák elérhetőek a GenBank-ben is az 1. és a 8. táblázatban jelzett azonosítószámok alatt.

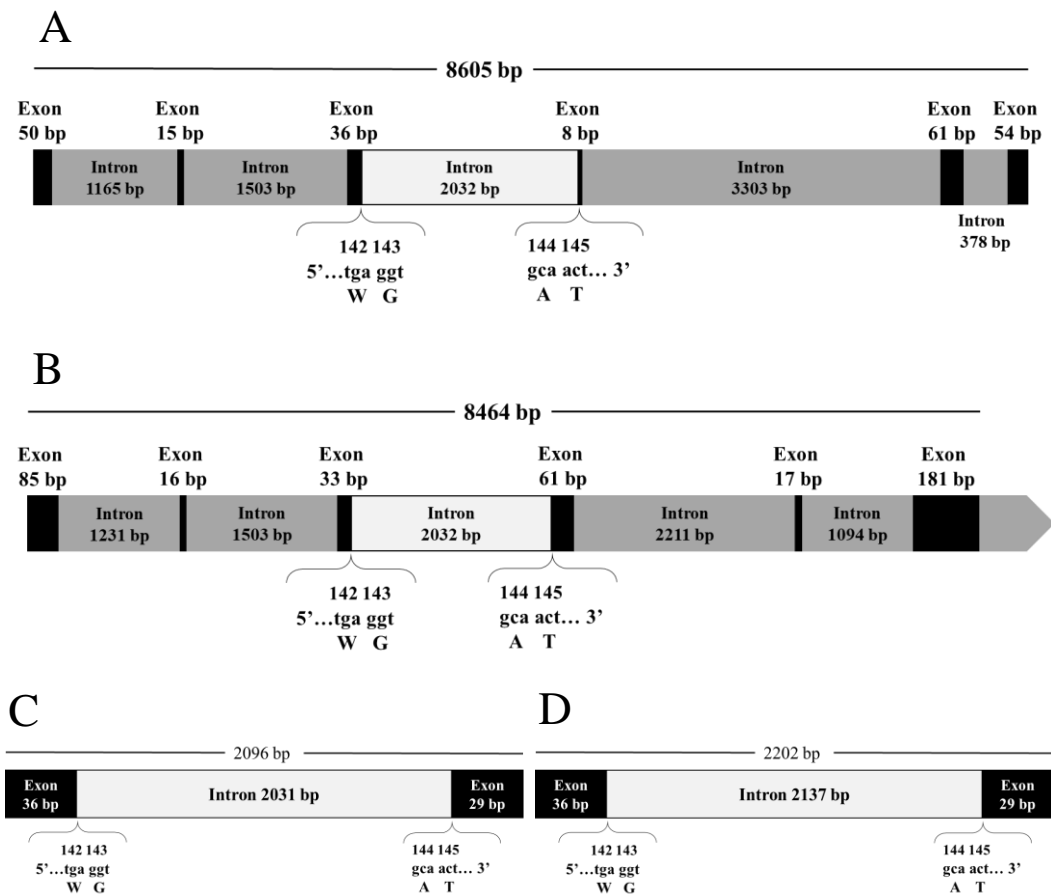
A 906 bázispáros mRNS szakaszból lefordított ORF 302 aminosavból állt és a *CYTB* fehérje 20. és 320. aminosav pozíciója közötti szakaszát fedte le. Ez a szakasz tartalmazza a QoI-val szembeni rezisztenciát biztosító lehetséges pontmutációk két „hot spot” régióját, amelyek a 120-160. és 250-300. aminosav pozíciók között helyezkednek el. Minden vizsgált mRNS-fragmentum a vad típusú kodont tartalmazta mind a 129. (TTC \rightarrow fenilalanin épül be), a 137. (GGT vagy GGG (*P. citricarpa*-ban) \rightarrow glicin épül be) mind pedig a 143. (GGT \rightarrow glicin épül be) pozíciókban. Fajon belüli különbségeket csak elvétve és csak egy-egy klónban észleltem. Ugyanabból a *P. ampellicida* izolátumból származó párhuzamos szekvenciák (klónok) között csak egy-egy bázispárnyi különbséget (SNP-t) figyeltem meg, ezeknek azonban mindegyike csak egyetlen klónban volt jelen, és egyik sem a „hot spot” régiókban jelent meg. Ezeket leszámítva a nyolc *P. ampellicida*, három *P. citricarpa* és három *P. capitalensis*

törzsből származó klónszekvenciák és az azokból képezett konszenzus szekvenciák megegyezők voltak a fajokon belül. Azonban a különböző *Phyllosticta* fajokból származó szekvenciák között találtam interspecifikus különbségeket. A *P. ampellicida* izolátumok konszenzus szekvenciájához, mint referenciához képest az SNP-k száma 8 és 46 között változott. A leghasonlóbb szekvenciát a *P. partricuspidatae* esetében találtam, ahol nyolc SNP volt kimutatható a szekvencia mentén. Figyelemre méltóan nagyobb különbséget találtam a *P. parthenocissi*-ben 27 SNP-vel. A *P. capitalensis* törzsek szekvenciái 36 SNP-t, míg a *P. gaultheriae* szekvenciái 37 SNP-t tartalmaztak. A legtöbb SNP-t és így a legnagyobb eltérést a *P. ampellicida*-tól a *P. citricarpa* törzsek szekvenciáiban találtam (46 SNP) (ezeket az adatokat nem mutatom be).

6.4.2. A citokróm b gén exon/intron szerkezete

A *cytb* gén részleges exon/intron szerkezetét a cDNS-szekvenálásra kiválasztott nyolc *P. ampellicida* izolátumban és további öt *Phyllosticta* spp. törzsben vizsgáltam (1. és 2. táblázat). A szekvenciák elérhetőek a GenBankban is az 1. és a 8. táblázatban jelzett azonosítószámok alatt.

A *P. ampellicida* esetében a *cytb* gén 8605 bázispár hosszú szakaszát szaporítottam fel nyolc kiválasztott izolátumból (1. és 2. táblázat). Ez a géndarab egy ORF-et tartalmazott hat feltételezett exonnal és öt feltételezett intronnal (11. ábra A).



11. ábra. A *cytb* gén részleges exon/intron szerkezete a 143. kodon körül a *P. ampellicida* és a közeli rokon fajok esetében. A rajz nem méretarányos. Az exonokat feketével, az intronokat szürkével jelöltem. Az 143. kodont közvetlenül/közvetve követő, I-es típusú önkivágódó intronok világosszürkével vannak jelölve. **A:** A *P. ampellicida cytb* génjében általam azonosított részleges exon/intron szerkezet (a nyolc izolátum PCR termékéből származó szekvenciák konszenzusa alapján). A 137. kodon a 143.-kal azonos exonon belül található, míg a 129. kodon egy 15 bázispár hosszú, intronokkal szegélyezett exonon belül helyezkedik el. **B:** A *P. ampellicida* (feltételezhetően inkább a *P. partricuspidatae*) részleges génszerkezetének megfelelő része Miessner *et al.* (2011) alapján. **C és D:** A *P. partricuspidatae* és a *P. parthenocissi cytb* génjében talált részleges exon/intron szerkezet. Mindkét fajban jelen volt egy I-es típusú önkivágódó intron a 143. kodont követően.

A *cytb* gén exon/intron szerkezete a nyolc vizsgált *P. ampellicida* izolátumban két kisebb eltéréstől eltekintve azonos volt (11. ábra A). Egyedül a Portugáliából származó Gb30 és az olaszországi GbC izolátumok szekvenciájában, a negyedik intronban, a 6533. és a 6551. nukleotidpozíciókban találtam eltérést. Ezekben a pozíciókban egyrészt hiányzott egy timin, illetve timin helyett adenin volt megtalálható az utóbbi

pozícióban. A feltárt exon/intron szerkezetben az első, 1165 bp hosszúságú intron a 126. pozícióban lévő alanint kódoló kodon után (A126), a második, 1503 bp hosszúságú intron pedig a 131. pozícióban lévő glicint kódoló kodon után (G131) kezdődik. A harmadik, 2032 bp hosszúságú intron a 143. pozícióban lévő glicint kódoló kodon (G143) után helyezkedik el, míg a negyedik, 3303 bp hosszúságú intron a 146. pozícióban lévő valint kódoló kódon (V146) után kezdődik. Az ötödik és legrövidebb, 378 bp hosszúságú intron a 166. pozícióban lévő triptofánt kódoló kodon után (W166; 11. ábra A) található. Az RNAweasel mindezen intronokat I-es típusú önkivágódó intronokként azonosította. Ez a 8605 bázispáros fragmentum messzemenő azonosságot, de csak 57%-os átfedést mutatott a *P. ampellicida cytb* génjének GenBank-ban elérhető szekvenciájával a BlastN illesztés során (10. táblázat).

A *Parthenocissus* spp.-ről izolált *P. partricuspidatae* (CBS 237.48) és *P. parthenocissi* (CBS 111645) törzsekben szintén közvetlenül a 143. kodon után mutattam ki egy intront, amely egy 2,1, illetve egy 2,2 kb hosszú PCR-terméket eredményezett (11. ábra C és D). Az RNAweasel mindkét intront I-es típusú önkivágódó intronnak találta. A *P. partricuspidatae* szekvenciája 100%-os azonosságot mutatott a *P. ampellicida* (JF785545) és kevesebbet a *P. citricarpa* (KC788404) Genbank-i szekvenciájának megfelelő szakaszával. A *P. parthenocissi*-ből származó fragmentum nagyobb hasonlóságot mutatott a *P. citricarpa*, mint a *P. ampellicida* GenBank-i *cytb* génszekvenciájával (10. táblázat).

10. táblázat. A különböző *Phyllosticta* spp. izolátumokból/törzsekből származó részleges *cytb* gén nukleinsav-szekvenciák BlastN eredményei a két *Phyllosticta* fajból származó két rendelkezésre álló, megfelelő fragmentummal összehasonlítva.

Faj ^a	Saját szekvencia hossza (bp)	Azonosság/Átfedés %-a az alábbi részleges <i>cytb</i> génszekvenciákhoz viszonyítva ^b	
		<i>P. ampellicida</i> ^c (CBS 237.48; JF785545)	<i>P. citricarpa</i> (isolate Gc-12; KC788404)
<i>P. ampellicida</i> (mind a nyolc vizsgált izolátum)	8605	99,19% / 57%	93,83% / 16%
<i>P. partricuspadatae</i> (CBS 237.48)	2096	100% / 100%	83,77% / 19%
<i>P. parthenocissi</i> (CBS 111645)	2207	77,74% / 47%	91,47% / 46%
<i>P. citricarpa</i> (CBS 828.97)	3257	84,10% / 13%	99,85% / 99%
<i>P. capitalensis</i> (CBS 119720)	1530	98,29% / 96%	96,45% / 16%
<i>P. gaultheriae</i> (CBS 447.70)	288	(93,97% / 97%) ^d	95,74% / 89%

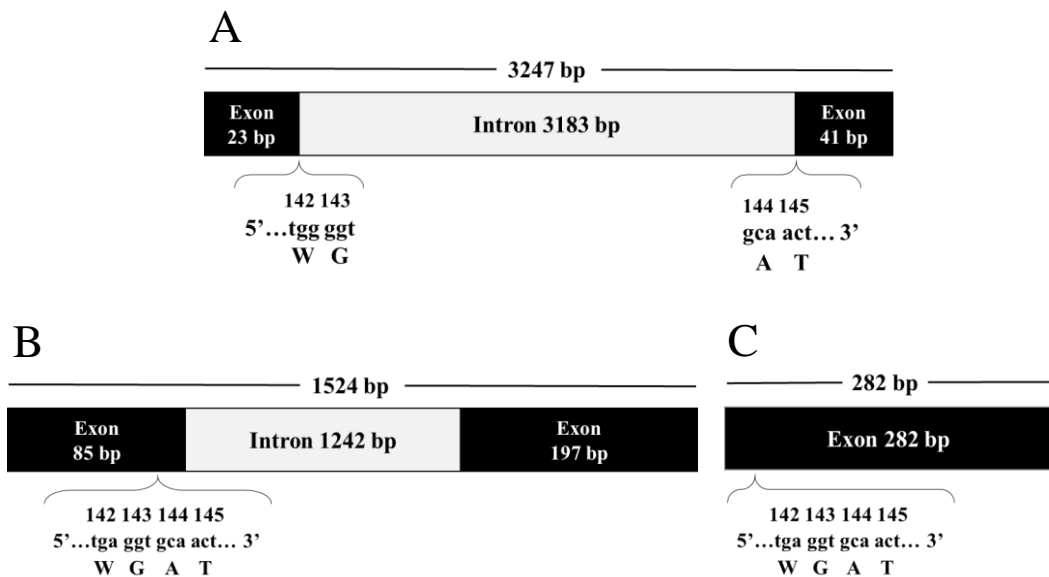
^a A fajnév után látható az izolátum/törzs megnevezése, amelyből az illesztett szekvencia származott.

^b A két leghasonlóbb, *Phyllosticta* nemzetségbe tartozó faj neve alatt zárójelben az izolátum/törzs- és szekvencia azonosítója.

^c Mivel a Genbank-i szekvencia még *P. ampellicida* néven került deponálásra, ezért itt is ezt a nevet tüntettem fel. Ugyanakkor eredményeim alapján ez feltételezhetően a *P. partricuspadatae* fajba tartozó törzs *cytb* génszekvenciája.

^d A *P. gaultheriae* szekvenciáját, amely csak exont kódol, a *P. ampellicida* részleges *CYTB* mRNS szekvenciájával hasonlítottam össze, amely a JF785546 GenBank azonosítószámon érhető el.

Az általam tervezett primerek egy 3,2 kb és egy 1,5 kb hosszú terméket szaporítottak fel a *P. citricarpa* (CBS 828.97) és a *P. capitalensis* (CBS 119720) mtDNS templátokból (12. ábra A és B). Mindkét törzs hordozott egy I-es típusú önkivágódó intront vagy a 143. (*P. citricarpa*), vagy a 163. kodon (*P. capitalensis*) után. A *P. citricarpa* 3,2 kb-os fragmentuma nagymértékű azonosságot mutatott a *P. citricarpa*- , és mérsékelt azonosságot a *P. ampellicida* GenBank-i szekvenciákkal. Míg a *P. capitalensis* szekvencia nagy hasonlóságot mutatott mind a *P. ampellicida*, mind a *P. citricarpa* GenBank-i szekvenciákkal (10. táblázat).



12. ábra. A *cytb* gén részleges exon/intron szerkezete a 143. kodon körül a *P. citricarpa*, *P. capitalensis* és *P. gaultheriae* fajokban. Az exonokat feketével, az intronokat világosszürkével jelöltem. A rajz nem méretarányos. **A:** A *P. citricarpa* CBS 828.97 törzsének *cytb* génjének részleges exon/intron szerkezete. Közvetlenül a 143. kodon után egy I-es típusú önkivágódó intron található. **B:** A *P. capitalensis* CBS 119720 törzsének *cytb* génjében található részleges exon/intron szerkezet a 143. kodon környékén. Az I-es típusú önkivágódó intron nem a 143., hanem a 163. kodon után kezdődik. **C:** A *P. gaultheriae* CBS 447.70 törzsének *cytb* génjében található részleges exon/intron szerkezet. A 143. kodon körül nem találtam intront.

A *P. gaultheriae* törzsből származó *cytb* génszakasz szekvenciája volt az egyetlen, amelyben nem találtam intront a 143. kodon közelében (12. ábra C). Ehelyett a primerpárok egy 282 bázispár hosszú exont amplifikáltak, amely a 134. és 229. aminosavpozíciók közötti szakaszt kódolja és a BlastN illesztés szerint ez a *P. ampellicida* mRNS-szekvenciájához volt a leghasonlóbb (10. táblázat).

7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A szőlő feketerothadása a 21. század eleje óta egyre növekvő problémát jelent Európa egyes területein. Bár a kórokozó jelentősége a jövőben ezeken a területeken tovább nőhet, a *P. ampellicida* izolátumok QoI-rezisztencia szempontjából átfogó vizsgálatára még nem került sor. Jelen dolgozat 48 magyarországi (ISSR módszerrel kiválasztott) *P. ampellicida* izolátum azoxistrobin és trifloxistrobin QoI hatóanyagokkal szembeni *in vitro* alapérzékenységét, valamint 8 kiválasztott *P. ampellicida* és néhány további, különböző földrajzi eredetű *Phyllosticta* faj izolátuma/törzse citokróm *b* génjének és mRNS-ének jellemzőit mutatja be.

A négy ország öt szőlőtermő vidékén gyűjtött 499 *P. ampellicida* izolátumot nyolc ISSR-klaszterbe soroltam be. Azonban az azonos földrajzi eredetű izolátumok több esetben is különböző klaszterbe kerültek, ezért a földrajzi eredet nem magyarázta meg teljes mértékben az ISSR-mintázatokban látható különbségeket. A Portugáliából származó két izolátum egyike például a legnagyobb gyakoriságú (1.), míg a másik egy egyedi klaszterhez/genotípushoz tartozott (8. klaszter; 7. táblázat). Rinaldi *et al.* (2017) mikroszatellit (nSSR) technikával összesen 421 *P. ampellicida* izolátumot elemeztek és többek között magyarországi és portugáliai populációkat is vizsgáltak, amelyekben hasonlóan az én eredményeimhez populációnként eltérő genetikai diverzitást fedeztek fel. Míg például a 33 portugál izolátumot hat haplotípusba sorolták, addig a 21 vizsgált magyar izolátumban csak egy haplotípus volt jelen. Rinaldi *et al.* (2017) azt is megállapították, hogy az általuk vizsgált portugál izolátumok két különálló, míg a magyar izolátumok egyazon szubpopulációhoz tartoztak. Ezek alapján a hazai nSSR és ISSR klaszterek/genotípusok viszonylag alacsony száma arra utalhat, hogy a kórokozó egyszeri behurcolással került Magyarországra, illetve itthon alacsony szexuális szaporodási aktivitást mutat. Mikulás és Tomcsányi (1999) már korábban felvetette a *P. ampellicida* egyszeri magyarországi behurcolásának ötletét, amit mind Rinaldi *et al.* (2017), mind pedig jelen eredmények alátámasztani látszanak.

Az ITS lókuszt filogenetikai elemzésével megvizsgáltuk a szőlőről és két vadszőlő fajról származó *Phyllosticta* spp. izolátumok/törzsek rokonsági viszonyait is. Elemzésünk megerősítette Zhang *et al.* (2013) és Zhou *et al.* (2015) eredményeit, miszerint a különböző gazdanövényekről származó, korábban egységesen *P. ampellicida* fajba sorolt izolátumok valójában jól elkülönülő kládokba, fajokba

sorolhatóak. Ez nemcsak a három faj könnyebb elkülöníthetősége szempontjából fontos, hanem további bizonyítékkal támogatja ezen fajok citokróm b szekvenciáiban (mRNS és mtDNS) mutatkozó különbségek megértését.

Vizsgálataimban a *P. ampellicida* izolátumok micéliumnövekedés-gátlásában a trifloxistrobin hatékonyabbnak bizonyult az azoxistrobinhoz képest, ami a vegyületek kémiai tulajdonságainak minimális különbségéből adódhat (Bartlett *et al.*, 2002). A 48 izolátum EC₅₀ értékeinek tartománya hasonló volt a Hoffman és Wilcox (2003) által a *P. ampellicida* esetében a miklobutanilra megállapított alapérzékenységi értékekhez (EC₅₀ = 0,04 µg ml⁻¹). Az azoxistrobin esetében ezek az átlagos EC₅₀ értékek szintén hasonlóak, de valamivel alacsonyabbak voltak, mint a *Pl. viticola* (0,04-0,78 µg ml⁻¹) és a *Colletotrichum graminicola* azoxistrobinra való érzékenységének alapértékei (0,05-0,1 µg ml⁻¹; Avila-Adame *et al.*, 2003; Wong és Wilcox 2000). A trifloxistrobin esetében a *C. graminicola* (0,02-0,05 µg ml⁻¹) és a *Sclerotinia sclerotiorum* (0,01-0,80 µg ml⁻¹) populációinak alapérzékenységi EC₅₀ értékei szintén hasonlóak voltak az eredményeinkhez (Avila-Adame *et al.*, 2003; Di *et al.*, 2016).

A gombaspórák csírázása energiaigényes folyamat, és emiatt ez a fejlődésnek a QoI-kra különösen érzékeny szakasza (Bartlett *et al.*, 2002). Mindkét vizsgált *P. ampellicida* izolátum spórái gyengén csíráztak, és szinte egyáltalán nem csíráztak a QoI vagy a QoI+SHAM jelenlétében. A vizsgált QoI fungicidek még a micéliumnövekedés átlagos százalékos gátlásánál (76,2 és 87,3% azoxistrobin és trifloxistrobin esetében) is magasabb gátlási százalékot fejtettek ki a *P. ampellicida* konídiumaival szemben. Az én eredményeim hasonlítanak Hincapie *et al.* (2013) eredményeihez is, amelyekben 90% feletti százalékos csírázási gátlási értékeket mértek *P. citricarpa* izolátumokban mind az AS, mind a piraklostrobin 1 µg ml⁻¹ koncentrációjánál. Tehát ezek a fungicidek hatékonyan gátolják a kórokozó csírázását *in vitro*.

Egyes növényi gomba eredetű kórokozók alternatív-oxidáz útvonal segítségével képesek túlélni a QoI fungicidek toxikus hatásait: pl. *Magnaporthe grisea* (Avila-Adame és Köller, 2003), *Mycosphaerella graminicola* (Miguez *et al.*, 2004) és *Colletotrichum gloeosporioides* (Piccirillo *et al.*, 2018). Ezeknél a fajoknál SHAM jelenlétében emelkedett micélium növekedési- és konídiumcsírázás-gátlási szintekről számoltak be. Hasonló adatokat kaptunk a *P. ampellicida* izolátumok esetében is, ahol a SHAM hozzáadása jelentősen növelte a micélium növekedésének százalékos gátlását és ennek megfelelően csökkentette az EC₅₀ értékeket. Ezzel szemben egy másik vizsgálat azt találta, hogy a *P. citricarpa* izolátumokban nem érvényesül a fungicid és

a SHAM szinergista hatása (Hincapie *et al.*, 2013). Ugyanakkor Piccirillo *et al.* (2018) a SHAM hozzáadásának az általam bemutatottnál erősebb hatását találták a *C. gloeosporioides* izolátumokban: a SHAM hozzáadásával a medián EC₅₀ érték 102 µg ml⁻¹-ről (AS) 0,36 µg ml⁻¹-re (AS+SHAM) csökkent.

A konídiumok esetében a SHAM hozzáadása nem volt jelentős hatással az azoxistrobin vagy a trifloxistrobin által okozott csírázási gátlásra. SHAM hozzáadása a *C. graminicola* és a *Penicillium digitatum* spórák csírázásának gátlási kísérleteihez hasonló eredményeket mutatott, mert az azoxistrobin csírázási gátlását nem befolyásolta (Avila-Adame *et al.*, 2003; Kanetis *et al.*, 2008). Ezzel szemben Avila-Adame *et al.* (2003) a *M. grisea* konídiumok csírázásának közel 100%-os gátlását tapasztalták, amikor SHAM-ot adtak azoxistrobint tartalmazó táptalajhoz. Fontos megemlíteni azonban, hogy ők 5-ször nagyobb SHAM, és 10-szer kisebb fungicid koncentrációt alkalmaztak. Ezen adatok alapján a *P. ampellicida* esetében lehetséges, hogy az alternatív-oxidáz útvonal nem pótolja megfelelően a mitokondriális légzést a konídiumok csírázása során, ezért gátolják a QoI fungicidek hatékonyan a folyamatot. Ezek az eredmények, valamint egyes növényi antioxidánsok (pl. flavonok; Avila-Adame *et al.*, 2003), amelyek a szabadföldi körülmények között feltételezhetően hasonló szerepet játszanak, mint a SHAM *in vitro*, azt feltételezi, hogy a *P. ampellicida* részlegesen gátolt növekedése és így túlélése az alternatív-oxidáz útvonal segítségével szabadföldi körülmények között valószínűtlennek tűnik.

Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy a *P. ampellicida* izolátumok magas érzékenységet mutattak mind az azoxistrobinnal, mind a trifloxistrobinnal szemben. A fungicidek *in vitro* erősen gátolták mind a micélium növekedését, mind pedig a konídiumok csírázását. A SHAM hozzáadása szignifikánsan csökkentette a micéliumnövekedés mértékét, míg a már erősen gátolt konídiumcsírázásra nem volt egyértelmű hatása.

A gombakórokozók QoI-val szembeni rezisztenciáját gyakran a *cytb* gén bizonyos mutációihoz (F129L, G137R és G143A) kapcsolják, amely mutációk (fungicidrezisztencia-markerek) aminosavcserét okoznak a fehérje szintjén (Sierotzki *et al.*, 2007; Olaya *et al.*, 2012). Emellett Fernández-Ortuño *et al.* (2008) számos nem tipikus rezisztenciamarkert/aminosavcserét írtak le a *Podosphaera fusca cytb* génjének Qo-t kódoló régiójában, amelyek bizonyos kombinációkban a QoI-érzékenység csökkenéséhez vezetnek. Az itt vizsgált *P. ampellicida* és más *Phyllosticta* spp. izolátumokban/törzsekben azonban nem volt jelen ilyen pontmutáció, ami egybecseng

a korábbi, *P. ampellicida*, *P. citricarpa* és *P. capitalensis* izolátumokból származó szekvenciaeredményekkel (Miessner *et al.*, 2011; Hincapie *et al.*, 2013; Stammler *et al.*, 2013). A *CYTB* mRNS ezen fragmentumában található elszórt (nem minden klónban megtalálható) SNP-k nem voltak összefüggésbe hozhatóak a *P. ampellicida* izolátumok közötti EC₅₀-értékek kis, bár kimutatható eltéréseivel. Ezek az eredmények azonban összhangban vannak várakozásainkkal, mert az EC₅₀ variabilitás ilyen mértékű változékonysága általában még az alapérzékenységet mutató populációkban is kimutatható (Avila-Adame *et al.*, 2003; Di *et al.*, 2016; Hincapie *et al.*, 2013; Hoffman és Wilcox, 2003). Továbbá a *cytb* gén kódoló régióiban található SNP-k következtében bekövetkező aminosavcserek jelentősen megemelkedett EC₅₀ értékekhez vezethetnek, ahogyan azt például a *Botrytis cinerea* és az *Alternaria alternata* esetében is kimutatták (Veloukas *et al.*, 2014; Vega és Dewdney, 2014). A kiválasztott nyolc *P. ampellicida* izolátum konszenzusos *CYTB* cDNS-szekvenciájának megfelelő fragmentumát összehasonlítva a Miessner *et al.* (2011; GenBank azonosító: JF785546) által publikált szekvenciával, nagyfokú hasonlóságot találtam: csupán két SNP-ben különbözött a saját konszenzus szekvenciámtól. Ugyanakkor azonban Miessner *et al.* (2011) szekvenciája megegyezett a *P. partricuspidatae* (CBS 237.48) *CYTB* cDNS-szekvenciájának megfelelő fragmentumával, amely törzset ők is vizsgálták.

További tényező, amely az „intron elmélet” szerint a kórokozókban a G143A aminosavcsere kialakulását befolyásolja, a *cytb* gén exon/intron szerkezete. A nyolc *P. ampellicida* izolátum *cytb* génszakasz konszenzusszekvenciájában mind az öt intron az I-es típusú önkivágódó introncsaládba tartozott, és a harmadik intron közvetlenül a 143. kodon után kezdődött. Ez utóbbi exon/intron határhoz számos más növényi kórokozóban találtak hasonlót, amelyekből a G143A pontmutációt még nem írták le pl. *Monilinia fructicola* (Hily *et al.*, 2011), *B. cinerea* (Banno *et al.*, 2009) és rozsda fajok (Grasso *et al.* 2006). Miessner *et al.* (2011) hasonló exon/intron szerkezetet találtak két különböző gazdaszervezetből (*Pa. tricuspidata* és *V. vinifera*) izolált, de a *P. ampellicida*-hoz sorolt izolátumban. Mint fentebb részletesen kifejtettem, a 19. században leírt *P. ampellicida* fajt molekuláris bizonyítékok alapján négy fajra osztották fel. Ezek az új fajok (*P. ampellicida*, *P. partricuspidatae*, *P. patrthenocissi* és *P. vitis-rotundifoliae* N. Zhou és L. Cai) szűk gazdanövénykörrel és egyértelmű különbségekkel rendelkeznek mind az ITS, mind pedig más (pl. aktin (*act*), translációs elongációs faktor 1-alfa (*ef-1α*) és gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

(*gapdh*) szekvenciákban (Zhang *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015). Ezen elvek és a jelen dolgozatban meghatározott ITS-szekvencia alapján a Miessner *et al.* (2011) által is vizsgált, *P. ampellicida*-nak tekintett izolátumok/törzsek egyike (CBS 237.48) a *P. partricuspidatae* fajhoz tartozhat, mert az ITS-szekvenciák bizonyítottan különböznek e fajok között (Zhou *et al.*, 2015). Ez az információ, valamint a *Phyllosticta* fajok között az exon/intron szerkezetben talált különbségek (Stammler *et al.*, 2013) teszik megkérdőjelezhetővé, hogy Miessner *et al.* (2011) azonos szekvenciát és exon/intron szerkezetet találtak a *P. ampellicida* és a *P. partricuspidatae* izolátumokba/törzsekben (11. ábra B). Ezzel szemben a jelen vizsgálatban a különböző földrajzi származás és QoI-érzékenység alapján kiválasztott nyolc *P. ampellicida* izolátum (1. és 2. táblázat) *cytb* génszakasz szekvenciái egymással szinte teljes egyezést mutattak, de csak 57%-os átfedést mutattak Miessner *et al.* (2011; GenBank azonosító: JF785545) *cytb* génszekvenciájával. A legnagyobb azonosságot mutató régió a szekvencia upstream, 5' részén volt megtalálható. A két konszenzusszekvenciát (saját *P. ampellicida* és JF785545) az elsőtől a negyedik exonig (4910. nukleotid a JF785545 azonosítószámú GenBank-i szekvenciában) lehetett illeszteni, bár az intronszekvenciákban így is jelen volt néhány száz SNP, egy deléció és három inzerció (a leghosszabb 48 bp). Az egyetlen hasonlóság, amelyet a negyedik exontól downstream találtam, a szekvencia 3' vége körül volt mindkét szekvencia 5. exonjában, a JF785545 8283. és 8327. nukleotidpozíciója között. A szekvenciák ezen „alsó” 3' felén nemcsak az intronszekvenciák többsége különbözött a Miessner *et al.* (2011) által meghatározottaktól, hanem az exon/intron határok is eltérőek voltak, így az exonok hossza és eloszlása is bizonyos mértékben eltért (11. ábra A és B). Az egyetlen kivételt pont a harmadik, 143. kodont követő intron és az azt körülvevő exon/intron határok jelentették, ezek mindkét konszenzus szekvenciában közel azonosak voltak. Azonban még ebben az intronszekvenciában is hét véletlenszerűen eloszló SNP volt (a szekvenciákat lásd a csatolt dokumentumban). Ugyanakkor a jelen munkában és Miessner *et al.* (2011) által is vizsgált *P. partricuspidatae* törzsből (CBS 237.48 = DSM 3513) kapott szekvencia teljesen megegyezett a JF785545 sz. szekvencia ezen töredékével: 2074 bp: harmadik exon, harmadik intron és a negyedik exon eleje (11. ábra B és D). Ez további bizonyítékként szolgálhat a CBS 237.48-as törzsének és az általunk *Vitis vinifera*-ról izolált *P. ampellicida* izolátumoknak eltérő fajba tartozásához.

A másik *Parthenocissus* fajról származó gombafajban, a *P. parthenocissi*-ben a *cytb* gén szekvenciája szintén tartalmazott egy intront közvetlenül a 143. kodon után, amely hosszában és exon/intron szerkezetében hasonló volt a *P. ampellicida* megfelelő génszakaszához (11. ábra C). Ez a szekvencia azonban jobban hasonlít a *P. citricarpa*, mint a *P. ampellicida*, vagy a *P. partricuspidatae* szekvenciájához. Ezek az eredmények egyrészt azt jelzik, hogy a G143A aminosavcserének megjelenése nem valószínű ebben a három fajban az I-es típusú önkivágódó intron jelenléte miatt. Másrészt a *cytb* génszekvencia-különbségei további molekuláris bizonyítékkal szolgálnak a *Phyllosticta* spp. gazdanövényfaj-szintű specializálódására a *Vitaceae* család különböző fajaihoz (Zhou *et al.*, 2015; Wicht *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Luttrell, 1946).

A *P. citricarpa* és a *P. capitalensis* törzsek *cytb* génszekvenciáiban szintén kimutatható volt az I-es típusú intron a 143. kodon után. Ezek a törzsek nagyon hasznosnak bizonyultak a molekuláris módszereim validálása szempontjából, mert a *cytb* gén megfelelő fragmentumának szekvenciája és exon/intron szerkezete már ismert volt. A *cytb* gén e fragmentumának ezekben a fajokban talált exon/intron szerkezete megegyezett a Hincapie *et al.* (2013) és Stammler *et al.* (2013) által bemutatottakkal. Ez az "intron hipotézis" szerint azt jelenti, hogy a G143A aminosavcsere ezekben a fajokban is valószínűtlen. A *P. citricarpa* szekvenciái között azonban volt néhány nukleotidbeli különbség. Hincapie *et al.* (2013) és Stammler *et al.* (2013) szekvenciája azonos volt a 3258 bp fragmentum mentén, míg az én szekvenciám három SNP-ben és három bázispár inzercióban különbözött azoktól.

Kivételes exon/intron szerkezetet csak a *P. gaultheriae* törzsben találtam: a 143. kodon után intron nem volt azonosítható, ami arra utal, hogy a G143A pontmutáció ebben a fajban előfordulhat. Ennek elterjedése azonban nagyon valószínűtlen, hiszen e kórokozó ellen nem végeznek kémiai védekezést, lévén, hogy egy invazív, a helyi növényi diverzitást csökkentő cserje, a *Gaultheria shallon* elleni természetes ellenségként alkalmazzák (Prescott *et al.*, 1993).

Érdekes módon Banno *et al.* (2009) azt találták, hogy a *B. cinerea* esetében kétféle exon/intron struktúra, egy a 143. kodon utáni intronnal és egy anélkül is létezhet ugyanabban a populációban. Vallières *et al.* (2011) pedig a *Saccharomyces cerevisiae* laboratóriumi mutánsaival bizonyították, hogy egy másodlagos mutáció (143. pozíció mutációján túl) olyan kikerülő-mechanizmusként szolgálhat, amely helyreállítja a rezisztens mutáns légzését és fittségét. Azt is megállapították, hogy egyes sejtmagi

gének túlexpressziója részben helyreállíthatja a G143A mutáns légzési növekedését. A kiválasztott *P. ampellicida* izolátumok magas érzékenysége és egységes exon/intron szerkezete alapján azonban egyik potenciális menekülési/rezisztencia mechanizmus jelenléte sem valószínű. Ugyanakkor a *cytb* génben az F129L, G137R és több más mutáció előfordulása a 143. kodon utáni intron jelenlétében is lehetséges, de szerencsére ezek a mutációk nem befolyásolják jelentősen a QoI fungicidek hatékonyságát a kórokozó elleni védekezésben sem üvegházban sem pedig szabadföldön (Pasche *et al.*, 2005).

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Több mint 70 izolátummal hozzájárultam a hazánkban elsőként többszáz izolátumból létrehozott *P. ampellicida* törzsgyűjtemény felállításához és fenntartásához.
2. Genotipizáltam 499, főként hazai *P. ampellicida* izolátumot az ISSR módszerrel három primer használatával, amelynek eredményeként az izolátumokat nyolc klaszterbe/genotípusba soroltam. Az izolátumok több mint 98 %-a két genotípushoz tartozott.
3. ITS alapú maximum likelihood elemzéssel ellenőriztük a *P. ampellicida*, *P. partricuspidatae* és *P. parthenocissi* fajok közötti filogenetikai kapcsolatokat, amelynek eredményeként megállapítottuk, hogy a CBS 237.48 számú törzse feltételezhetően nem a *P. ampellicida*, hanem a *P. partricuspidatae* fajba sorolható be.
4. Meghatároztam 48 *P. ampellicida* izolátum *in vitro* alapérzékenységét két QoI fungiciddel, az azoxistrobinnal és a trifloxistrobinnal szemben. Megállapítottam, hogy a trifloxistrobin *in vitro* hatásosabbnak bizonyult az azoxistrobinnál, mivel szignifikánsan alacsonyabb EC₅₀, illetve magasabb gátlási százaléktételeket mutat.
5. Kimutattam, hogy a citokróm-c-oxidáz útvonal gátlása esetén az alternatív-oxidáz útvonal kimutatható, bár nem jelentős szerepet játszik a *P. ampellicida* légzésében.
6. Megállapítottam, hogy a két kiválasztott *P. ampellicida* izolátum konídiumainak csírázását *in vitro* nagyon nagymértékben (90-95 %-ban) gátolja mind az azoxistrobin, mind pedig a trifloxistrobin jelenléte (100 µg ml⁻¹). Az alternatív légzési útvonalnak nem volt kimutatható hatása a konídiumok csírázására a vizsgált időszakban/körülmények között.
7. Meghatároztam a *CYTB* mRNS egy 906 bázispáros szakaszának szekvenciáját 8 *P. ampellicida* izolátumban és a *P. partricuspidatae*, *P. parthenocissi*, *P. citricarpa*, *P. gaultheriae* és a *P. capitalensis* fajok egy-egy törzsében. Megállapítottam, hogy a három leggyakrabban előforduló fungicidrezisztencia-markerek (F129L, G137R és G143A) kodonjai vad típusú aminosavat kódolnak minden általam vizsgált izolátumban/törzsben.
8. Meghatároztam a *cytb* gén 143. kodont körülvevő szakaszának szekvenciáját 8 *P. ampellicida* izolátumban és a *P. partricuspidatae*, *P. parthenocissi*, *P. citricarpa*, *P. gaultheriae* és a *P. capitalensis* fajok egy-egy törzsében (a *P.*

partricuspidatae, *P. citricarpa* és a *P. capitalensis* esetében csupán megerősítettem a korábbi szakirodalmi eredményeket). Megállapítottam, hogy a *P. gaultheriae* és a *P. capitalensis* kivételével minden vizsgált faj izolátumaiban/törzseiben megtalálható egy I-es típusú önkivágódó intron közvetlenül a 143. kodont követően. Ez az „intron elmélet” értelmében megakadályozza a G143A pontmutáció elterjedését e fajok populációiban.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Phyllosticta ampellicida* (Engelm.) Aa által okozott szőlő-feketerothadás az elmúlt egy-két évtizedben Európa több borvidékén a jelentősebb járványos betegségek közé lépett elő. A kórokozó elleni védekezés az agrotechnikai megoldások mellett elsősorban kémiai növényvédelemre támaszkodik. A kórokozó ellen hatékonynak bizonyultak a ditiokarbamát, a demetiláz inhibitor (DMI) és a quinone outside inhibitor (QoI) fungicidek. Az első két csoport számos vegyületének közelmúltbeli visszavonásával az EU-ban a QoI-k jelentősége a szőlő védelmében újra megnőhet. Ezért elsődleges célom a *P. ampellicida* izolátumok *in vitro* QoI fungicid hatóanyagokkal szembeni érzékenységének és citokróm b (*cytb*) gén jellemzőinek vizsgálata volt.

Ehhez a kollégáimmal 2010 és 2019 között felállított törzsgyűjtemény jelentette az alapot. Ezt a 499 izolátumot először ISSR módszerrel genotipizáltam, majd ennek eredménye és más szempontok (pl. kezelési, gyűjtési adatok) alapján kiválasztottam 48 *P. ampellicida* izolátumot a részletesebb vizsgálatokhoz. A *P. ampellicida* nemrégiben még fajkomplexet alkotott a vadszőlőről izolált *P. parthenocissi* és *P. partricuspidatae* fajokkal, ezért ezeknek és három másik rokon *Phyllosticta* fajnak (*P. citricarpa*, *P. capitalensis* és *P. gaultheriae*) egy-két törzsét is bevontam a vizsgálataimba. A kiválasztott 48 *P. ampellicida* izolátumnak meghatároztuk az érzékenységét az azoxistrobinnal (AS), a trifloxistrobinnal (TS) szemben szalicil-hidroxámsav (SHAM) jelenlétében és anélkül. Valamennyi vizsgált izolátum érzékenynek bizonyult mindkét QoI vegyületre: a félhatásos koncentráció (EC₅₀) átlagértékei 0,029 és 0,022 µg ml⁻¹ voltak azoxistrobin és trifloxistrobin egyedüli hozzáadásával, illetve alacsonyabbak, 0,024 és 0,017 µg ml⁻¹ fungicid és SHAM együttes hozzáadásával. A QoI fungicidrezisztenciával összefüggő citokróm b mRNS és gén szekvenciaelemzése azt mutatta, hogy a QoI-val szembeni rezisztenciát okozó tipikus pontmutációk egyike sincs jelen a nyolc kiválasztott *P. ampellicida* és az egyéb *Phyllosticta* spp. izolátumokban/törzsekben. Ugyanakkor a gyakorlati rezisztenciát okozó G143A pontmutáció/aminosavcsere kilakulását a *cytb* gén exon/intron szerkezete is befolyásolhatja, ezért a 143. kodon környezetében ezt is megvizsgáltam több *Phyllosticta* faj izolátumaiban/törzseiben. A *P. capitalensis*-t és a *P. gaultheriae*-t leszámítva minden vizsgált fajban egy I.-es típusú önkivágódó intront találtam a *cytb*

génben közvetlenül a 143. kodon után. A *P. parthenocissi* és a *P. gaultheriae cytb* génjének szekvenciainformációit itt mutatom be először.

Összességében kijelenthető, hogy a vizsgált *P. ampellicida* izolátumok *in vitro* érzékenyek a QoI fungicidekre, ráadásul az intron elmélet értelmében az I-es típusú önkivágódó intron jelenléte a *cytb* génben a 143. kodont követően a QoI-rezisztencia alacsony kockázatát jelzi a *P. ampellicida*-ban. Így a *P. ampellicida* elleni védekezésben ez a hatóanyagcsoport még hasznos lehet a jövőben.

10. SUMMARY

Black rot of grapevine caused by *Phyllosticta ampellicida* (Engelm.) Aa has become one of the major epidemic diseases in several wine regions of Europe over the last two decades. Control of the pathogen relies mainly on chemical plant protection in addition to agrotechnical solutions. Fungicides such as dithiocarbamates, demethylase inhibitors (DMIs) and quinone outside inhibitors (QoIs) have proven effective against the pathogen. With the recent withdrawal of several compounds from the first two groups in the EU, the importance of QoIs for the protection of grapes may increase again. Therefore, my primary objective was to investigate the *in vitro* QoI fungicide susceptibility and cytochrome b (*cytb*) gene characteristics of *P. ampellicida* isolates. A culture collection containing 499 *P. ampellicida* isolates served as a solid basis for these experiments. These isolates were genotyped using ISSR and based on the results and other aspects (e.g. treatment-, collection data), 48 isolates were selected for further studies. Since *P. ampellicida* recently formed a species complex with *P. parthenocissi* and *P. partricuspidatae* isolated from wild grapes, one or two strains of these species and three other related *Phyllosticta* species (*P. citricarpa*, *P. capitalensis* and *P. gaultheriae*) were also included in my studies. The susceptibility of the selected 48 *P. ampellicida* isolates to azoxystrobin, trifloxystrobin in the presence and absence of salicylhydroxamic acid (SHAM) was determined. All tested isolates were found to be sensitive to both QoI compounds: the average half-effective concentration (EC_{50}) values were 0.029 and 0.022 $\mu\text{g ml}^{-1}$ with the addition of azoxystrobin and trifloxystrobin alone, and lower with the addition of fungicide and SHAM together at 0.024 and 0.017 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. Sequence analysis of cytochrome b mRNA and gene showed that none of the typical point mutations causing resistance to QoI were present in the eight selected *P. ampellicida* and other *Phyllosticta* spp. isolates/strains tested. However, the occurrence of the G143A point mutation/amino acid substitution causing practical resistance may also be influenced by the exon/intron structure of the *cytb* gene. Therefore, I also investigated this aspect in isolates/strains of several *Phyllosticta* species. I found a type I self-expressing intron in the *cytb* gene right after codon 143 in all species studied except *P. capitalensis* and *P. gaultheriae*. The sequence information of the *cytb* genes of *P. parthenocissi* and *P. gaultheriae* is presented here for the first time.

Overall, it can be concluded that the studied *P. ampellicida* isolates are susceptible to QoI fungicides *in vitro*, and in addition, according to the intron theory, the presence of

a type I self-expressing intron in the *cytb* gene after codon 143 indicates a low risk of QoI resistance in *P. ampellicida*. Thus, QoI fungicides may represent a useful tool in the future for the control of *P. ampellicida*.

11. MELLÉKLETEK

M.1. Irodalomjegyzék

- van der Aa, H. A. (1973) 'Studies in *Phyllosticta* I' In: *Studies in Mycology* 5 pp.1-110.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2003) *Molecular biology of the cell*. (4th edn.) Oxford: Oxford University Press.
- Arif, I. A., Khan, H. A., Bahkali, A. H., Al Homaidan, A. A., Al Farhan, A. H., Al Sadoon, M. and Shobrak, M. (2011) 'DNA marker technology for wildlife conservation' In: *Saudi Journal of Biological Sciences* 18 (3) pp.219–225.
- Avila-Adame, C. and Köller, W. (2003) 'Impact of alternative respiration and target-site mutations on responses of germinating conidia of *Magnaporthe grisea* to QoI-inhibiting fungicides' In: *Pest Management Science* 59 (3) pp.303–309.
- Avila-Adame, C., Olaya, G. and Köller, W. (2003) 'Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobilurin-related QoI fungicides' In: *Plant Disease* 87 (12) pp.1426–1432.
- Banno, S., Yamashita, K., Fukumori, F., Okada, K., Uekusa, H., Takagaki, M., Kimura, M. and Fujimura, M. (2009) 'Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome *b* gene' In: *Plant Pathology* 58 (1) pp.120–129.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M. and Parr-Dobrzanski, B. (2002) 'The strobilurin fungicides' In: *Pest Management Science* 58 (7) pp.649–662.
- Becker, C. M. and Pearson, R. C. (1996) 'Black rot lesions on overwintered canes of Euvitis supply conidia of *Guignardia bidwellii* for primary inoculum in spring' In: *Plant Disease* 80 (1) p.24.
- Bolton, M. D., Rivera, V. and Secor, G. (2013) 'Identification of the G143A mutation associated with QoI resistance in *Cercospora beticola* field isolates from Michigan, United States' In: *Pest Management Science* 69 (1) pp.35–39.
- Bornet, B. and Branchard, M. (2001) 'Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting' In: *Plant molecular biology reporter* 19 (3) pp.209–215.
- Brent, K. J. and Hollomon, D. W. (2007) *Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?.* (2.) Brussels: Fungicide Resistance Action Committee.
- Burke, J. M. (1988) 'Molecular genetics of group I introns: RNA structures and protein factors required for splicing — a review' In: *Gene* 73 (2) pp.273–294.
- Cech, T. R. (1988) 'Conserved sequences and structures of group I introns: building an active site for RNA catalysis — a review' In: *Gene* 73 (2) pp.259–271.
- Cheval, P., Siah, A., Bomble, M., Popper, A. D., Reignault, P. and Halama, P. (2017) 'Evolution of QoI resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France' In: *Crop protection* 92 pp.131–133.
- Chin, K. M., Chavaillaz, D., Kaesbohrer, M., Staub, T. and Felsenstein, F. G. (2001) 'Characterizing resistance risk of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* to strobilurins' In: *Crop Protection* 20 (2) pp.87–96.
- Colson, A.-M. (1993) 'Random mutant generation and its utility in uncovering structural and functional features of cytochrome *b* in *Saccharomyces cerevisiae*' In: *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 25 (3) pp.211–220.
- De La Salle, H., Jacq, C. and Slonimski, P. P. (1982) 'Critical sequences within mitochondrial introns: Pleiotropic mRNA maturase and cis-dominant signals of the box intron controlling reductase and oxidase' In: *Cell* 28 (4) pp.721–732.

- Di, Y.-L., Zhu, Z.-Q., Lu, X.-M. and Zhu, F.-X. (2016) 'Baseline sensitivity and efficacy of trifloxystrobin against *Sclerotinia sclerotiorum*' In: *Crop Protection* 87 pp.31–36.
- Distribution map - Guignardia bidwellii* (1991) At: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20046500081> (Accessed 10/04/2024).
- Dula, B. (2012) 'Milyen kihívásokra készülünk 2012-ben?' In: *Agrofórum: a növényvédők és növénytermesztők havilapja* 46. évf. pp.5–8.
- Dula, B. (2017) *A szőlő feketerothadása - Agrofórum Online*. At: <https://agroforum.hu/szakcikkek/szolo-bor-szakcikkek/a-szolo-feketerothadasa/> (Accessed 10/04/2024).
- Edwards, J. D. and McCouch, S. R. (2007) 'Molecular markers for use in plant molecular breeding and germplasm evaluation' In: *MARKER-ASSISTED SELECTION: Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish*. Rome: FAO. pp.29-49.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991) 'A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis.' In: *Nucleic Acids Research* 19 (6) p.1349.
- EU Pesticides Database (v.2.2) Search Active substances, safeners and synergists* (2022) At: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/active-substances/index.cfm?event=search.as&t=3&s=4&a_from=&a_to=&e_from=&e_to=&additionalfilter__class_p1=&additionalfilter__class_p2=&string_tox_1=&string_tox_1=&string_tox_2=&string_tox_2=&string_tox_3=&string_tox_3=&string_tox_4=&string_tox_4= (Accessed 01/04/2022).
- Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., de Vicente, A. and Pérez-García, A. (2008) 'Field resistance to QoI fungicides in *Podosphaera fusca* is not supported by typical mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene' In: *Pest Management Science* 64 (7) pp.694–702.
- Ferrin, D. M. and Ramsdell, D. C. (1977) 'Ascospore dispersal and infection of grapes by *Guignardia bidwellii*, the causal agent of grape black rot disease.' In: *Phytopathology* 67 (12) pp.1501–1505.
- Flint Max* (2022) At: https://agro.bayer.co.hu/termekek/novenyvedelmi_termekek/gombaolo_szerek/index.php?id=27 (Accessed 10/04/2024).
- Forcelini, B. B. and Peres, N. A. (2018) 'Widespread resistance to QoI fungicides of *Colletotrichum acutatum* from strawberry nurseries and production fields' In: *Plant Health Progress* 19 (4) pp.338–341.
- FRAC | Monitoring Methods* (s.d.) At: <https://www.frac.info/knowledge-database/monitoring-methods> (Accessed 10/04/2024).
- Fuentes, S., Sullivan, W., Tilbrook, J. and Tyerman, S. (2010) 'A novel analysis of grapevine berry tissue demonstrates a variety-dependent correlation between tissue vitality and berry shrivel' In: *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16 (2) pp.327–336.
- Gadoury, D. M., Seem, R. C., Ficke, A. and Wilcox, W. F. (2003) 'Ontogenic resistance to powdery mildew in grape berries' In: *Phytopathology* 93 (5) pp.547–555.
- Gardes, M. and Bruns, T. D. (1993) 'ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts' In: *Molecular Ecology* 2 (2) pp.113–118.

- Gessler, C., Blaise, P. and Jermini, M. (2006) 'Blackrot on the hybrid vitis cultivar Isabella' In: *IOBC/WPRS Bull.* 29 pp.95-102.
- Gessler, C., Foiada, F., Jermini, M. and Pertot, I. (2008) 'Control of Blackrot (*Guignardia bidwellii*) on the hybrid vitis cultivar Isabella' In: *IOBC/WPRS Bull.* 36 pp.101-106.
- Godwin, I. D., Aitken, E. A. and Smith, L. W. (1997) 'Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics' In: *Electrophoresis* 18 (9) pp.1524–1528.
- Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A. and Gisi, U. (2006a) 'Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens' In: *Pest Management Science* 62 (6) pp.465–472.
- Grasso, V., Sierotzki, H., Garibaldi, A. and Gisi, U. (2006b) 'Characterization of the cytochrome *b* gene fragment of *Puccinia* species responsible for the binding site of QoI fungicides' In: *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84 (2) pp.72–82.
- Grünig, C. R., Sieber, T. N. and Holdenrieder, O. (2001) 'Characterisation of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification' In: *Mycological Research* 105 (1) pp.24–32.
- Gupta, P. K. and Varshney, R. K. (eds.) (2013) *Cereal Genomics II*. (2nd ed.) Dordrecht: Springer Netherlands.
- Harms, M., Holz, B., Hoffmann, C., Lipps, H. P. and Silvanus, W. (2005) 'Occurrence of *Guignardia bidwellii*, the causal fungus of black rot on grapevine, in the vine-growing areas of Rhineland-Palatinate, Germany.' In: *Symposium Proceedings No. 81*. Plant protection and plant health in Europe: introduction and spread of invasive species. Berlin: British Crop Protection Council. pp.127–132.
- Hassel, K. and Gunnarsson, U. (2003) 'The Use of Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) in Bryophyte Population Studies' In: *Lindbergia* 28 (3) pp.152–157.
- Heaney, S. P., Hall, A. A., Davies, S. A. and Olaya, G. (2000) 'Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspectives.' In: *Proceedings of an international conference held at the Brighton Hilton Metropole Hotel Vol. 2*. The BCPC Conference: Pests and diseases. Brighton: British Crop Protection Council. pp.755–762.
- Hily, J.-M., Singer, S. D., Villani, S. M. and Cox, K. D. (2011) 'Characterization of the cytochrome *b* (*cyt b*) gene from *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruit and its significance in the development of QoI resistance' In: *Pest Management Science* 67 (4) pp.385–396.
- Hincapie, M., Wang, N.-Y., Peres, N. A. and Dewdney, M. M. (2013) 'Baseline sensitivity of *Guignardia citricarpa* isolates from Florida to azoxystrobin and pyraclostrobin' In: *Plant Disease* 98 (6) pp.780–789.
- Hoffman, L. E. and Wilcox, W. F. (2003) 'Factors influencing the efficacy of myclobutanil and azoxystrobin for control of grape black rot' In: *Plant Disease* 87 (3) pp.273–281.
- Hoffman, L. E., Wilcox, W. F., Gadoury, D. M. and Seem, R. C. (2002) 'Influence of grape berry age on susceptibility to *Guignardia bidwellii* and its incubation period length' In: *Phytopathology* 92 (10) pp.1068–1076.
- Hoffman, L. E., Wilcox, W. F., Gadoury, D. M., Seem, R. C. and Riegel, D. G. (2004) 'Integrated Control of Grape Black Rot: Influence of Host Phenology, Inoculum Availability, Sanitation, and Spray Timing' In: *Phytopathology* 94 (6) pp.641–650.
- Hollomon, D. W. (2015) 'Fungicide resistance: facing the challenge-a review' In: *Plant protection science* 51 (4) pp.170–176.

- Holz, B., Hoffmann, C. and Nachtigall, G. (2005) 'Schwarzfäule der Rebe (Black Rot)' In: *Informationsblatt der BBA* pp.1–2.
- Hunt, D. E. and Sandham, H. J. (1969) 'Improved agar gradient-plate technique' In: *Applied Microbiology* 17 (2) pp.329–330.
- Ishii, H., Fountaine, J., Chung, W.-H., Kansako, M., Nishimura, K., Takahashi, K. and Oshima, M. (2009) 'Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry' In: *Pest Management Science* 65 (8) pp.916–922.
- Ishii, H., Fraaije, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T. and Hollomon, D. W. (2001) 'Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew' In: *Phytopathology* 91 (12) pp.1166–1171.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R. and Dhawan, A. K. (2011) 'Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants' In: *Euphytica* 177 (3) pp.309–334.
- Kanetis, L., Förster, H. and Adaskaveg, J. E. (2008) 'Baseline sensitivities for new postharvest fungicides against *Penicillium* spp. on citrus and multiple resistance evaluations in *P. digitatum*' In: *Plant Disease* 92 (2) pp.301–310.
- Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K. D. (2019) 'MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization' In: *Briefings in Bioinformatics* 20 (4) pp.1160–1166.
- Katoh, K. and Standley, D. M. (2013) 'MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability' In: *Molecular Biology and Evolution* 30 (4) pp.772–780.
- Kendrick, B. (2017) *The fifth kingdom*. Cambridge: Hackett Publishing.
- Kim, Y.-S., Dixon, E. W., Vincelli, P. and Farman, M. L. (2003) 'Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene' In: *Phytopathology* 93 (7) pp.891–900.
- Koelling, J., Coles, M. C., Matthews, P. D. and Schwekendiek, A. (2012) 'Development of new microsatellite markers (SSRs) for *Humulus lupulus*' In: *Molecular breeding* 30 (1) pp.479–484.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C. and Tamura, K. (2018) 'MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms' In: *Molecular Biology and Evolution* 35 (6) pp.1547–1549.
- Kuo, K. and Hoch, H. C. (1996a) 'Germination of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores: prerequisite of adhesion to the substratum and the relationship of substratum wettability' In: *Fungal Genetics and Biology* 20 (1) pp.18–29.
- Kuo, K. and Hoch, H. C. (1996b) 'The parasitic relationship between *Phyllosticta ampellicida* and *Vitis vinifera*' In: *Mycologia* 88 (4) pp.626–634.
- Lamson-Scribner, F. and Viala, P. (1888) *Black rot (Laestadia bidwellii)*. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office.
- Lang, B. F., Laforest, M.-J. and Burger, G. (2007) 'Mitochondrial introns: a critical view' In: *Trends in Genetics* 23 (3) pp.119–125.
- Lateef, D. D. (2015) 'DNA Marker Technologies in Plants and Applications for Crop Improvements' In: *Journal of Biosciences and Medicines* 3 (05) p.7.
- Lesniak, K. E., Proffer, T. J., Beckerman, J. L. and Sundin, G. W. (2011) 'Occurrence of QoI resistance and detection of the G143A mutation in Michigan populations of *Venturia inaequalis*' In: *Plant Disease* 95 (8) pp.927–934.
- Lim, S., Notley-McRobb, L., Lim, M. and Carter, D. A. (2004) 'A comparison of the nature and abundance of microsatellites in 14 fungal genomes' In: *Fungal Genetics and Biology* 41 (11) pp.1025–1036.

- Linhart, G. and Mezey, G. (1895) *Szőlőbetegségek*. Mosonmagyaróvár: Czéh Sándor-Féle Könyvnyomda.
- Liu, M. and Guo, X. (2017) 'A novel and stress adaptive alternative oxidase derived from alternative splicing of duplicated exon in oyster *Crassostrea virginica* OPEN' In: *Scientific Reports* 7 p.10785.
- Loskill, B., Molitor, D., Koch, E., Harms, M., Berkelmann-Löhnertz, B., Hoffmann, C., Kortekamp, A., Porten, M., Louis, F. and Maixner, M. (2009) *Strategien zur regulation der Schwarzfäule (Guignardia bidwellii) im ökologischen Weinbau*. [Report] Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, D-Bernkastel-Kues. At: <https://orgprints.org/id/eprint/17072/> (Accessed 10/04/2024).
- Luttrell, E. S. (1946) 'Black rot of muscadine grapes' In: *Phytopathology* 36 (11) pp.905–924.
- Luttrell, E. S. (1948) 'Physiologic specialization in *Guignardia bidwellii*, cause of black rot of *Vitis* and *Parthenocissus* species.' In: *Phytopathology* 38 (9) pp.716–723.
- Luttrell, E. S. (1974) 'Parasitism of fungi on Vascular Plants' In: *Mycologia* 66 (1) pp.1–15.
- Ma, Z., Felts, D. and Michailides, T. J. (2003) 'Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California' In: *Pesticide Biochemistry and Physiology* 77 (2) pp.66–74.
- Maciaszczyk, E., Ulaszewski, S. and Lazowska, J. (2004) 'Intragenic suppressors that restore the activity of the maturase encoded by the second intron of the *Saccharomyces cerevisiae* *cyt b* gene' In: *Current Genetics* 46 (2) pp.67–71.
- McGrew, J. R. and Still, G. W. (1961) *Control of Grape Diseases and Insects in the Eastern United States*. Vol. 1893. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture Farmers Bulletin.
- Miessner, S., Mann, W. and Stammler, G. (2011) '*Guignardia bidwellii*, the causal agent of black rot on grapevine has a low risk for QoI resistance' In: *Journal of Plant Diseases and Protection* 118 (2) pp.51–53.
- Miguez, M., Reeve, C., Wood, P. M. and Hollomon, D. W. (2004) 'Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QOI fungicides' In: *Pest Management Science* 60 (1) pp.3–7.
- Mikulás, J. (2015) 'Május vége óta feketetrohadás' In: *Kertészet és Szőlészet* 64 (27) pp.16-17.
- Mikulás, J. and Tomcsányi, E. (1999) 'Megjelent hazánkban is a feketetrohadás' In: *Kertészet és Szőlészet* 48 (49) p.11–12.
- Molitor, D. (2009) 'Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) an Weinreben' In: *Geisenheimer Berichte* 65 pp.1–154.
- Molitor, D., Baus, O. and Berkelmann-Löhnertz, B. (2011) 'Protective and curative grape black rot control potential of pyraclostrobin and myclobutanil' In: *Journal of Plant Diseases and Protection* 118 (5) pp.161–167.
- Molitor, D. and Berkelmann-Loehnertz, B. (2011) 'Simulating the susceptibility of clusters to grape black rot infections depending on their phenological development' In: *Crop Protection* 30 (12) pp.1649–1654.
- Molitor, D. and Beyer, M. (2014) 'Epidemiology, identification and disease management of grape black rot and potentially useful metabolites of black rot pathogens for industrial applications – a review' In: *Annals of Applied Biology* 165 (3) pp.305–317.

- Northover, P. (2009) *Black rot of grape (Vitis spp.): environmental influences on the infection of grape shoot tissue by Guignardia bidwellii conidia*. Saarbrücken: VDM Verlag Dr. Müller.
- Olaya, G., Buitrago, C., Pearsaul, D., Sierotzki, H. and Tally, A. (2012) *Detection of resistance to QoI fungicides in Rhizoctonia solani isolates from rice*. [Providence, RI 2012]. At: https://www.apsnet.org/meetings/Documents/2012_Meeting_Abstracts/aps12abP241.htm (Accessed 10/04/2024).
- Olaya, G. and Köller, W. (1999) 'Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl' In: *Plant Disease* 83 (3) pp.274–278.
- Oliveira, M. and Azevedo, L. (2022) 'Molecular markers: an overview of data published for fungi over the last ten years' In: *Journal of Fungi* 8 (8) p.803.
- Onesti, G., González-Domínguez, E. and Rossi, V. (2016) 'Accurate prediction of black rot epidemics in vineyards using a weather-driven disease model' In: *Pest Management Science* 72 (12) pp.2321–2329.
- Onesti, G., González-Domínguez, E. and Rossi, V. (2017) 'Production of pycnidia and conidia by *Guignardia bidwellii*, the causal agent of grape black rot, as affected by temperature and humidity' In: *Phytopathology* 107 (2) pp.173–183.
- Pasche, J. S., Piche, L. M. and Gudmestad, N. C. (2005) 'Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration' In: *Plant Disease* 89 (3) pp.269–278.
- Piccirillo, G., Carrieri, R., Polizzi, G., Azzaro, A., Lahoz, E., Fernández-Ortuño, D. and Vitale, A. (2018) '*In vitro* and *in vivo* activity of QoI fungicides against *Colletotrichum gloeosporioides* causing fruit anthracnose in *Citrus sinensis*' In: *Scientia Horticulturae* 236 pp.90–95.
- Pintye, A., Bereczky, Z., Kovács, G. M., Nagy, L. G., Xu, X., Legler, S. E., Váczy, Z., Váczy, K. Z., Caffi, T., Rossi, V. and Kiss, L. (2012) 'No indication of strict host associations in a widespread mycoparasite: grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) is attacked by phylogenetically distant *Ampelomyces* strains in the field' In: *Phytopathology* 102 (7) pp.707–716.
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N. and Siddiq, E. A. (2002) 'Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding' In: *Euphytica* 128 (1) pp.9–17.
- Prescott, C. E., Coward, L. P., Weetman, G. F. and Gessel, S. P. (1993) 'Effects of repeated nitrogen fertilization on the ericaceous shrub, salal (*Gaultheria shallon*), in two coastal Douglas-fir forests' In: *Forest Ecology and Management* 61 (1) pp.45–60.
- Quadris (2022) At: <https://www.syngenta.hu/gombaolo-szer-quadris> (Accessed 10/04/2024).
- di Rago, J. P., Coppée, J. Y. and Colson, A. M. (1989) 'Molecular basis for resistance to myxothiazol, mucidin (strobilurin A), and stigmatellin. Cytochrome *b* inhibitors acting at the center of the mitochondrial ubiquinol-cytochrome *c* reductase in *Saccharomyces cerevisiae*.' In: *Journal of Biological Chemistry* 264 (24) pp.14543–14548.
- Ramsdell, D. C. and Milholland, R. D. (1988) 'Black rot' In: Pearson, R. C. and Goheen, A. C. (eds.) *Compendium of grape diseases*. St. Paul: American Phytopathological Society Press. pp.15–17.
- Rinaldi, P. A. and Mugnai, L. (2012) 'Marciume nero degli acini, potenziale pericolo in viticoltura' In: *Informatore Agrario* 15 pp.68–71.

- Rinaldi, P. A., Paffetti, D., Comparini, C., Brogгинi, G. A. L., Gessler, C. and Mugnai, L. (2017) 'Genetic variability of *Phyllosticta ampellicida*, the agent of black rot disease of grapevine' In: *Phytopathology* 107 (11) pp.1406–1416.
- Rinaldi, P., Broggini, G. A. L., Gessler, C., Molitor, D., Sofia, J. and Mugnai, L. (2013) '*Guignardia bidwellii*, the agent of grape black rot of grapevine, is spreading in European vineyards' In: *Book of abstracts*. Vol. 211. 10th International Congress of Plant Pathology. Beijing: (s.n.).
- Russel, P. E. (2014) *Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management*. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee.
- Schonbaum, G. R., Bonner, W. D., Storey, B. T. and Bahr, J. T. (1971) 'Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids' In: *Plant Physiology* 47 (1) pp.124–128.
- Semar, M., Strobel, D., Koch, A., Klappach, K. and Stammli, G. (2007) 'Field efficacy of pyraclostrobin against populations of *Pyrenophora teres* containing the F129L mutation in the cytochrome *b* gene' In: *Journal of Plant Diseases and Protection* 114 (3) pp.117–119.
- Sierotzki, H., Frey, R., Wullschlegel, J., Palermo, S., Karlin, S., Godwin, J. and Gisi, U. (2007) 'Cytochrome *b* gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance' In: *Pest Management Science* 63 (3) pp.225–233.
- Sierotzki, H., Wullschlegel, J. and Gisi, U. (2000) 'Point mutation in cytochrome *b* gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates' In: *Pesticide Biochemistry and Physiology* 68 (2) pp.107–112.
- Silvestro, D. and Michalak, I. (2012) 'raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML' In: *Organisms Diversity & Evolution* 12 (4) pp.335–337.
- Spotts, R. A. (1977) 'Chemical eradication of grape black rot caused by *Guignardia bidwellii*.' In: *Plant Disease Reporter* 61 (2) pp.125–128.
- Stamatakis, A. (2014) 'RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies' In: *Bioinformatics* 30 (9) pp.1312–1313.
- Stammli, G., Schutte, G. C., Speakman, J., Miessner, S. and Crous, P. W. (2013) '*Phyllosticta* species on citrus: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome *b* gene sequences' In: *Crop Protection* 48 pp.6–12.
- Stöver, B. C. and Müller, K. F. (2010) 'TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses' In: *BMC Bioinformatics* 11 (1) pp.1–9.
- Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H. and Bonierbale, M. W. (1989) 'RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science' In: *Nature Biotechnology* 7 (3) pp.257–264.
- Thom, C. and Church, M. B. (1926) *The Aspergilli*. Baltimore, Maryland, USA: Williams & Wilkins.
- Torriani, S. F., Brunner, P. C., McDonald, B. A. and Sierotzki, H. (2009) 'QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*' In: *Pest Management Science* 65 (2) pp.155–162.
- Tron, T., Crimi, M., Colson, A.-M. and Degli Esposti, M. (1991a) 'Structure/function relationships in mitochondrial cytochrome *b* revealed by the kinetic and circular dichroic properties of two yeast inhibitor-resistant mutants' In: *European Journal of Biochemistry* 199 (3) pp.753–760.
- Tron, T., Infossi, P., Coppee, J.-Y. and Colson, A.-M. (1991b) 'Molecular analysis of revertants from a respiratory-deficient mutant affecting the center o domain of cytochrome *b* in *Saccharomyces cerevisiae*' In: *FEBS Letters* 278 (1) pp.26–30.

- Tron, T. and Lemesle-Meunier, D. (1990) 'Two substitutions at the same position in the mitochondrial cytochrome *b* gene of *S. cerevisiae* induce a mitochondrial myxothiazol resistance and impair the respiratory growth of the mutated strains abbeit maintaining a good electron transfer activity' In: *Current Genetics* 18 (5) pp.413–419.
- Ullrich, C. I., Kleespies, R. G., Enders, M. and Koch, E. (2009) 'Biology of the black rot pathogen, *Guignardia bidwellii*, its development in susceptible leaves of grapevine *Vitis vinifera*.' In: *Journal für Kulturpflanzen* 61 (3) pp.82–90.
- Vallières, C., Trouillard, M., Dujardin, G. and Meunier, B. (2011) 'Deleterious effect of the Qo inhibitor compound resistance-conferring mutation G143A in the intron-containing cytochrome *b* gene and mechanisms for bypassing it' In: *Applied and Environmental Microbiology* 77 (6) pp.2088–2093.
- Vega, B. and Dewdney, M. M. (2014) 'Distribution of QoI resistance in populations of tangerine-infecting *Alternaria alternata* in Florida' In: *Plant Disease* 98 (1) pp.67–76.
- Veloukas, T., Kalogeropoulou, P., Markoglou, A. N. and Karaoglanidis, G. S. (2014) 'Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdh B* and the *cyt b* G143A mutations' In: *Phytopathology* 104 (4) pp.347–356.
- Viala, P. and Ravaz, L. (1886) *Mémoire sur une nouvelle maladie de la vigne: Le Black rot (pourriture noire)*. Montpellier: Aux bureaux du Progres Agricole et Viticole.
- Von Jagow, G., Gribble, G. W. and Trumpower, B. L. (1986) 'Mucidin and strobilurin A are identical and inhibit electron transfer in the cytochrome *bcl* complex of the mitochondrial respiratory chain at the same site as myxothiazol' In: *Biochemistry* 25 (4) pp.775–780.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. van de, Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995) 'AFLP: a new technique for DNA fingerprinting' In: *Nucleic Acids Research* 23 (21) pp.4407–4414.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) 'Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics' In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press, Inc. pp.315–322.
- Wicht, B., Petrini, O., Jermini, M., Gessler, C. and Broggini, G. A. L. (2012) 'Molecular, proteomic and morphological characterization of the ascomycete *Guignardia bidwellii*, agent of grape black rot: a polyphasic approach to fungal identification' In: *Mycologia* 104 (5) pp.1036–1045.
- Wikee, S., Lombard, L., Crous, P. W., Nakashima, C., Motohashi, K., Chukeatirote, E., Alias, S. A., McKenzie, E. H. C. and Hyde, K. D. (2013) '*Phyllosticta capitalensis*, a widespread endophyte of plants' In: *Fungal Diversity* 60 (1) pp.91–105.
- Wilcox, W. F. (2003) *Black rot*. 2003. At: <https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/43076/black-rot-grapes-FS-NYSIPM.pdf?sequence=1> (Accessed 10/04/2024).
- Wilcox, W. F., Gubler, W. D. and Uyemoto, J. K. (2015) *Compendium of grape diseases, disorders, and pests*. St. Paul: American Phytopathological Society Press.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990) 'DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers' In: *Nucleic Acids Research* 18 (22) pp.6531–6535.

- Wong, F. P. and Wilcox, W. F. (2000) 'Distribution of baseline sensitivities to azoxystrobin among isolates of *Plasmopara viticola*' In: *Plant Disease* 84 (3) pp.275–281.
- Zhang, K., Zhang, N. and Cai, L. (2013) 'Typification and phylogenetic study of *Phyllosticta ampellicida* and *P. vaccinii*' In: *Mycologia* 105 (4) pp.1030–1042.
- Zhou, N., Chen, Q., Carroll, G., Zhang, N., Shivas, R. G. and Cai, L. (2015) 'Polyphasic characterization of four new plant pathogenic *Phyllosticta* species from China, Japan, and the United States' In: *Fungal Biology* 119 (5) pp.433–446.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994) 'Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification' In: *Genomics* 20 (2) pp.176–183.
- Ziogas, B. N., Baldwin, B. C. and Young, J. E. (1997) 'Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*' In: *Pesticide Science* 50 (1) pp.28–34.

M.2. Egyéb mellékletek

M.2.1. táblázat. A *Vitis vinifera*-ról izolált és ISSR módszerrel és klaszterelemzéssel genotipizált 499 *P. ampellicida* izolátum gyűjtési és klaszterbesorolási adatai.

#	Izolátum-azonosító	Borvidék	Gyűjtés helye ^a	Gyűjtés éve	ISSR Klaszter
1	F1	Egri	Eger	2010	1
2	F7	Egri	Eger	2010	1
3	F13	Egri	Eger	2010	2
4	F15	Egri	Eger	2010	1
5	F19	Egri	Andornaktálya	2010	2
6	F24	Egri	Demjén	2010	1
7	F27	Egri	Verpelét	2010	1
8	F29	Egri	Eger	2010	1
9	F30	Egri	Eger	2010	1
10	F35	Egri	Eger	2010	1
11	F36	Egri	Eger	2010	1
12	F42	Egri	Verpelét	2010	1
13	F49	Egri	Eger	2010	2
14	F58	Egri	Andornaktálya	2010	2
15	F60	Egri	Andornaktálya	2010	1
16	F11–5	Egri	Eger	2011	1
17	F11–7	Egri	Eger	2011	1
18	F11–9	Egri	Eger	2011	2
19	F11–10	Egri	Eger	2011	1
20	F11–18	Egri	Eger	2011	1
21	F11–21	Egri	Eger	2011	1
22	F11–23	Egri	Eger	2011	1
23	F11–27	Egri	Eger	2011	2
24	F12–1	Egri	Demjén	2012	1
25	F12–8	Egri	Demjén	2012	2
26	F12–11	Egri	Demjén	2012	1
27	F12–15	Egri	Demjén	2012	2
28	F12–19	Egri	Demjén	2012	2
29	F12–27	Egri	Demjén	2012	1
30	F12–30	Egri	Demjén	2012	1
31	F12–35	Egri	Demjén	2012	1
32	F12–37	Egri	Demjén	2012	1
33	F12–39	Egri	Demjén	2012	1
34	F12–40	Egri	Demjén	2012	2
35	F12–44	Egri	Demjén	2012	2
36	F12–48	Egri	Demjén	2012	2
37	F12–49	Egri	Demjén	2012	2
38	F12–50	Egri	Demjén	2012	2

#	Izolátum- azonosító	Borvidék	Gyűjtés helye ^a	Gyűjtés éve	ISSR Klaszter
39	F12-64	Egri	Demjén	2012	1
40	F12-71	Egri	Demjén	2012	2
41	F12-78	Egri	Demjén	2012	1
42	F12-82	Egri	Demjén	2012	2
43	F12-98	Egri	Demjén	2012	2
44	F12-101	Egri	Eger	2012	1
45	F13-6	Egri	Eger	2013	2
46	F13-8	Egri	Eger	2013	2
47	F13-9	Egri	Eger	2013	2
48	F13-10	Egri	Eger	2013	2
49	F13-11	Egri	Eger	2013	7
50	F13-31	Egri	Eger	2013	2
51	F14-19	Egri	Eger	2014	2
52	F14-22	Egri	Eger	2014	2
53	F15-1	Egri	Szomolya	2015	2
54	F15-2	Egri	Szomolya	2015	1
55	F15-3	Egri	Szomolya	2015	1
56	F15-4	Egri	Szomolya	2015	1
57	F15-5	Egri	Szomolya	2015	2
58	F15-8	Egri	Szomolya	2015	1
59	F15-9	Egri	Szomolya	2015	2
60	F15-10	Egri	Szomolya	2015	2
61	F15-12	Egri	Szomolya	2015	2
62	F15-15	Egri	Szomolya	2015	2
63	F15-18	Egri	Szomolya	2015	2
64	F15-19	Egri	Szomolya	2015	1
65	F15-20	Egri	Szomolya	2015	2
66	F15-22	Egri	Szomolya	2015	1
67	F15-23	Egri	Szomolya	2015	2
68	F15-25	Egri	Szomolya	2015	2
69	F15-27	Egri	Szomolya	2015	1
70	F15-28	Egri	Szomolya	2015	1
71	F15-29	Egri	Szomolya	2015	1
72	F15-30	Egri	Szomolya	2015	1
73	F15-31	Egri	Szomolya	2015	1
74	F15-33	Egri	Szomolya	2015	1
75	F15-35	Egri	Szomolya	2015	1
76	F15-37	Egri	Andornaktálya	2015	2
77	F15-39	Egri	Andornaktálya	2015	2
78	F15-41	Egri	Andornaktálya	2015	2
79	F15-42	Egri	Andornaktálya	2015	2
80	F15-43	Egri	Egerszólát	2015	1
81	F15-44	Egri	Egerszólát	2015	1

#	Izolátum- azonosító	Borvidék	Gyűjtés helye ^a	Gyűjtés éve	ISSR Klaszter
82	F15-45	Egri	Egerszólát	2015	1
83	F15-46	Egri	Egerszólát	2015	1
84	F15-47	Egri	Egerszólát	2015	1
85	F15-48	Egri	Egerszólát	2015	1
86	F15-49R1	Egri	Egerszólát	2015	1
87	PaA2	Etyek-budai	Budapest	2015	1
88	PaL2	Etyek-budai	Budapest	2015	1
89	Sarfeher	Etyek-budai	Budapest	2015	1
90	F16-1	Egri	Demjén	2016	1
91	F16-2	Egri	Demjén	2016	1
92	F16-3	Egri	Demjén	2016	1
93	F16-4	Egri	Demjén	2016	5
94	F16-5	Egri	Demjén	2016	1
95	F16-6	Egri	Demjén	2016	1
96	F16-7	Egri	Demjén	2016	1
97	F16-8	Egri	Demjén	2016	1
98	F16-9	Egri	Demjén	2016	1
99	F16-10	Egri	Demjén	2016	1
100	F16-11	Egri	Demjén	2016	1
101	F16-12	Egri	Demjén	2016	1
102	F16-13	Egri	Demjén	2016	1
103	F16-14	Egri	Demjén	2016	1
104	F16-15	Egri	Demjén	2016	1
105	F16-16	Egri	Demjén	2016	1
106	F16-17	Egri	Demjén	2016	1
107	F16-18	Egri	Demjén	2016	1
108	F16-19	Egri	Demjén	2016	1
109	F16-20	Egri	Demjén	2016	1
110	F16-21	Egri	Demjén	2016	1
111	F16-22	Egri	Demjén	2016	1
112	F16-23	Egri	Demjén	2016	1
113	F16-24	Egri	Demjén	2016	1
114	F16-25	Egri	Demjén	2016	1
115	F16-26	Egri	Demjén	2016	1
116	F16-27	Egri	Demjén	2016	1
117	F16-28	Egri	Demjén	2016	2
118	F16-29	Egri	Demjén	2016	2
119	F16-30	Egri	Demjén	2016	2
120	F16-31	Egri	Demjén	2016	2
121	F16-32	Egri	Demjén	2016	1
122	F16-33	Egri	Demjén	2016	1
123	F16-34	Egri	Demjén	2016	1
124	F16-35	Egri	Demjén	2016	1

#	Izolátum- azonosító	Borvidék	Gyűjtés helye ^a	Gyűjtés éve	ISSR Klaszter
125	F16-36	Egri	Demjén	2016	1
126	F16-37	Egri	Demjén	2016	1
127	F16-38	Egri	Demjén	2016	1
128	F16-39	Egri	Demjén	2016	1
129	F16-40	Egri	Demjén	2016	1
130	F16-41	Egri	Demjén	2016	1
131	F16-42	Egri	Demjén	2016	1
132	F16-43	Egri	Demjén	2016	1
133	F16-44	Egri	Demjén	2016	2
134	F16-45	Egri	Demjén	2016	1
135	F16-46	Egri	Demjén	2016	1
136	F16-47	Egri	Maklár	2016	2
137	F16-48	Egri	Maklár	2016	2
138	F16-49	Egri	Maklár	2016	2
139	F16-50	Egri	Maklár	2016	2
140	F16-51	Egri	Maklár	2016	2
141	F16-52	Egri	Demjén	2016	2
142	F16-53	Egri	Demjén	2016	2
143	F16-54	Egri	Demjén	2016	2
144	F16-55	Egri	Demjén	2016	2
145	F16-56	Egri	Demjén	2016	2
146	F16-57	Egri	Demjén	2016	2
147	F16-58	Egri	Demjén	2016	2
148	F16-59	Egri	Demjén	2016	2
149	F16-60	Egri	Demjén	2016	2
150	F16-61	Egri	Demjén	2016	2
151	F17-1	Egri	Szomolya	2017	1
152	F17-2	Egri	Szomolya	2017	1
153	F17-3	Egri	Szomolya	2017	1
154	F17-4	Egri	Szomolya	2017	1
155	F17-6	Egri	Eger	2017	1
156	F17-7	Egri	Eger	2017	1
157	F17-8	Egri	Eger	2017	1
158	F17-9	Egri	Eger	2017	1
159	F17-10	Egri	Eger	2017	2
160	F17-11	Egri	Kerecsend	2017	2
161	F17-12	Egri	Kerecsend	2017	2
162	F17-13	Egri	Kerecsend	2017	2
163	F17-14	Egri	Kerecsend	2017	2
164	F17-15	Egri	Kerecsend	2017	2
165	F17-16	Egri	Kerecsend	2017	2
166	F17-17	Egri	Kerecsend	2017	2
167	F17-18	Egri	Kerecsend	2017	2

#	Izolátum- azonosító	Borvidék	Gyűjtés helye ^a	Gyűjtés éve	ISSR Klaszter
168	F17-19	Egri	Kerecsend	2017	1
169	F17-20	Egri	Kerecsend	2017	1
170	F17-21	Egri	Kerecsend	2017	2
171	F17-22	Egri	Kerecsend	2017	1
172	F17-23	Egri	Kerecsend	2017	1
173	F17-24	Egri	Kerecsend	2017	1
174	F17-25	Egri	Kerecsend	2017	1
175	F17-26	Egri	Kerecsend	2017	2
176	F17-27	Egri	Kerecsend	2017	2
177	F17-28	Egri	Kerecsend	2017	2
178	F17-29	Egri	Kerecsend	2017	1
179	F17-30	Egri	Kerecsend	2017	1
180	F17-31	Egri	Kerecsend	2017	1
181	F17-32	Egri	Kerecsend	2017	1
182	F17-33	Egri	Kerecsend	2017	1
183	F17-35	Egri	Kerecsend	2017	1
184	F17-36	Egri	Kerecsend	2017	1
185	F17-37	Egri	Kerecsend	2017	1
186	F17-38	Egri	Kerecsend	2017	1
187	F17-39	Egri	Kerecsend	2017	1
188	F17-40	Egri	Kerecsend	2017	2
189	F17-41	Egri	Kerecsend	2017	2
190	F17-42	Egri	Kerecsend	2017	2
191	F17-43	Egri	Kerecsend	2017	6
192	F17-44	Egri	Kerecsend	2017	2
193	F17-45	Egri	Kerecsend	2017	2
194	F17-47	Egri	Kerecsend	2017	2
195	F17-48	Egri	Eger	2017	1
196	F17-49	Egri	Eger	2017	1
197	F17-50	Egri	Eger	2017	1
198	F17-51	Egri	Eger	2017	1
199	F17-52	Egri	Eger	2017	1
200	F17-53	Egri	Eger	2017	1
201	F17-54	Egri	Eger	2017	2
202	F17-55	Egri	Eger	2017	2
203	F17-56	Egri	Eger	2017	2
204	F17-57	Egri	Eger	2017	2
205	F17-58	Egri	Maklár	2017	1
206	F17-59	Egri	Maklár	2017	1
207	F17-60	Egri	Maklár	2017	1
208	F17-61	Egri	Maklár	2017	1
209	F17-62	Egri	Maklár	2017	1
210	F17-64	Egri	Maklár	2017	1

#	Izolátum- azonosító	Borvidék	Gyűjtés helye ^a	Gyűjtés éve	ISSR Klaszter
211	F17-65	Egri	Maklár	2017	1
212	F17-66	Egri	Maklár	2017	1
213	F17-67	Egri	Maklár	2017	1
214	F17-68	Egri	Maklár	2017	1
215	18-1-1	Egri	Eger	2018	1
216	18-1-2	Egri	Eger	2018	1
217	18-1-4	Egri	Eger	2018	1
218	18-1-5	Egri	Eger	2018	1
219	18-1-6	Egri	Eger	2018	1
220	18-2-1	Egri	Eger	2018	1
221	18-3-1	Egri	Eger	2018	1
222	18-3-2	Egri	Eger	2018	5
223	18-3-3	Egri	Eger	2018	1
224	18-3-4	Egri	Eger	2018	1
225	18-3-5	Egri	Eger	2018	1
226	18-3-6	Egri	Eger	2018	1
227	18-3-7	Egri	Eger	2018	1
228	18-3-8	Egri	Eger	2018	1
229	18-3-9	Egri	Eger	2018	1
230	18-3-10	Egri	Eger	2018	1
231	18-3-11	Egri	Eger	2018	1
232	18-3-12	Egri	Eger	2018	1
233	18-3-13	Egri	Eger	2018	1
234	18-3-14	Egri	Eger	2018	1
235	18-3-15	Egri	Eger	2018	1
236	18-3-16	Egri	Eger	2018	1
237	18-3-17	Egri	Eger	2018	1
238	18-3-18	Egri	Eger	2018	1
239	18-3-19	Egri	Eger	2018	1
240	18-3-20	Egri	Eger	2018	1
241	18-3-21	Egri	Eger	2018	1
242	18-3-22	Egri	Eger	2018	1
243	18-3-23	Egri	Eger	2018	1
244	18-3-24	Egri	Eger	2018	1
245	18-3-25	Egri	Eger	2018	2
246	18-3-26	Egri	Eger	2018	1
247	18-3-27	Egri	Eger	2018	1
248	18-3-28	Egri	Eger	2018	1
249	18-3-29	Egri	Eger	2018	1
250	18-3-30	Egri	Eger	2018	1
251	18-3-31	Egri	Eger	2018	1
252	18-3-32	Egri	Eger	2018	1
253	18-3-34	Egri	Eger	2018	1

#	Izolátum-azonosító	Borvidék	Gyűjtés helye ^a	Gyűjtés éve	ISSR Klaszter
254	18-3-35	Egri	Eger	2018	1
255	18-3-36	Egri	Eger	2018	1
256	18-3-37	Egri	Eger	2018	1
257	18-3-38	Egri	Eger	2018	1
258	18-3-39	Egri	Eger	2018	2
259	18-3-40	Egri	Eger	2018	1
260	18-3-41	Egri	Eger	2018	1
261	18-3-42	Egri	Eger	2018	1
262	18-3-43	Egri	Eger	2018	2
263	18-3-44	Egri	Eger	2018	2
264	18-3-45	Egri	Eger	2018	1
265	18-3-46	Egri	Eger	2018	1
266	18-3-47	Egri	Eger	2018	1
267	18-3-48	Egri	Eger	2018	1
268	18-3-49	Egri	Eger	2018	1
269	18-3-50	Egri	Eger	2018	1
270	18-3-51	Egri	Eger	2018	1
271	18-3-52	Egri	Eger	2018	1
272	18-3-53	Egri	Eger	2018	1
273	18-3-54	Egri	Eger	2018	1
274	18-4-1	Egri	Eger	2018	1
275	18-4-2	Egri	Eger	2018	1
276	18-4-3	Egri	Eger	2018	1
277	18-4-4	Egri	Eger	2018	1
278	18-4-5	Egri	Eger	2018	1
279	18-4-6	Egri	Eger	2018	1
280	18-4-7	Egri	Eger	2018	1
281	18-4-8	Egri	Eger	2018	1
282	18-4-9	Egri	Eger	2018	1
283	18-4-10	Egri	Eger	2018	1
284	18-4-11	Egri	Eger	2018	1
285	18-4-12	Egri	Eger	2018	1
286	18-4-13	Egri	Eger	2018	1
287	18-4-14	Egri	Eger	2018	1
288	18-5-1	Egri	Eger	2018	2
289	18-5-2	Egri	Eger	2018	2
290	18-6-1	Egri	Eger	2018	1
291	18-6-2	Egri	Eger	2018	1
292	18-6-3	Egri	Eger	2018	1
293	18-6-4	Egri	Eger	2018	1
294	18-6-5	Egri	Eger	2018	1
295	18-6-6	Egri	Eger	2018	1
296	18-6-7	Egri	Eger	2018	1

#	Izolátum- azonosító	Borvidék	Gyűjtés helye ^a	Gyűjtés éve	ISSR Klaszter
297	18-6-8	Egri	Eger	2018	1
298	18-6-9	Egri	Eger	2018	1
299	18-6-10	Egri	Eger	2018	1
300	18-6-11	Egri	Eger	2018	1
301	18-6-12	Egri	Eger	2018	1
302	18-6-13	Egri	Eger	2018	1
303	18-6-14	Egri	Eger	2018	1
304	18-6-15	Egri	Eger	2018	1
305	18-6-16	Egri	Eger	2018	1
306	18-6-17	Egri	Eger	2018	1
307	18-6-18	Egri	Eger	2018	1
308	18-6-19	Egri	Eger	2018	1
309	18-6-20	Egri	Eger	2018	1
310	18-6-21	Egri	Eger	2018	1
311	18-6-22	Egri	Eger	2018	1
312	18-6-23	Egri	Eger	2018	1
313	18-6-24	Egri	Eger	2018	1
314	18-6-25	Egri	Eger	2018	1
315	18-6-26	Egri	Eger	2018	1
316	18-6-27	Egri	Eger	2018	1
317	18-6-28	Egri	Eger	2018	1
318	18-7-1	Egri	Eger	2018	2
319	18-7-2	Egri	Eger	2018	2
320	18-7-3	Egri	Eger	2018	2
321	18-7-4	Egri	Eger	2018	2
322	18-7-5	Egri	Eger	2018	2
323	18-7-6	Egri	Eger	2018	2
324	18-8-1	Egri	Eger	2018	2
325	18-8-2	Egri	Eger	2018	2
326	18-8-3	Egri	Eger	2018	1
327	18-8-4	Egri	Eger	2018	1
328	18-8-5	Egri	Eger	2018	1
329	18-8-6	Egri	Eger	2018	1
330	18-8-7	Egri	Eger	2018	2
331	18-8-9	Egri	Eger	2018	1
332	18-8-10	Egri	Eger	2018	2
333	18-8-11	Egri	Eger	2018	1
334	18-8-12	Egri	Eger	2018	1
335	18-8-13	Egri	Eger	2018	1
336	18-8-14	Egri	Eger	2018	1
337	18-8-15	Egri	Eger	2018	1
338	18-8-16	Egri	Eger	2018	1
339	18-8-17	Egri	Eger	2018	1

#	Izolátum- azonosító	Borvidék	Gyűjtés helye ^a	Gyűjtés éve	ISSR Klaszter
340	18-8-18	Egri	Eger	2018	1
341	18-8-19	Egri	Eger	2018	1
342	18-9-1	Egri	Eger	2018	1
343	18-9-2	Egri	Eger	2018	1
344	18-9-3	Egri	Eger	2018	2
345	18-9-4	Egri	Eger	2018	1
346	18-9-5	Egri	Eger	2018	1
347	18-9-6	Egri	Eger	2018	1
348	18-9-7	Egri	Eger	2018	1
349	18-9-8	Egri	Eger	2018	2
350	18-9-9	Egri	Eger	2018	2
351	18-9-10	Egri	Eger	2018	2
352	18-9-11	Egri	Eger	2018	1
353	18-9-12	Egri	Eger	2018	1
354	18-9-13	Egri	Eger	2018	1
355	18-9-14	Egri	Eger	2018	1
356	18-9-15	Egri	Eger	2018	2
357	18-9-16	Egri	Eger	2018	2
358	18-9-17	Egri	Eger	2018	1
359	18-9-18	Egri	Eger	2018	1
360	18-9-19	Egri	Eger	2018	1
361	18-10-1	Egri	Eger	2018	1
362	18-10-2	Egri	Eger	2018	2
363	18-10-3	Egri	Eger	2018	2
364	18-10-4	Egri	Eger	2018	2
365	18-10-5	Egri	Eger	2018	2
366	18-10-6	Egri	Eger	2018	2
367	18-10-7	Egri	Eger	2018	2
368	18-8-1E	Egri	Eger	2018	2
369	18-9-1E	Egri	Eger	2018	1
370	18-9-2E	Egri	Eger	2018	1
371	18-9-3E	Egri	Eger	2018	2
372	18-9-4E	Egri	Eger	2018	1
373	18-9-5E	Egri	Eger	2018	2
374	18-9-6E	Egri	Eger	2018	1
375	18-13-1E	Egri	Eger	2018	4
376	18-13-2E	Egri	Eger	2018	1
377	18-13-3E	Egri	Eger	2018	1
378	18-13-4E	Egri	Eger	2018	1
379	18-13-5E	Egri	Eger	2018	1
380	18-13-6E	Egri	Eger	2018	1
381	18-13-7E	Egri	Eger	2018	1
382	18-13-8E	Egri	Eger	2018	1

#	Izolátum- azonosító	Borvidék	Gyűjtés helye ^a	Gyűjtés éve	ISSR Klaszter
383	18-15-1E	Egri	Eger	2018	1
384	18-16-1E	Egri	Eger	2018	1
385	FB18-3-1E	Egri	Eger	2018	1
386	FB18-4-1E	Egri	Eger	2018	1
387	FB18-4-2E	Egri	Eger	2018	1
388	FB18-6-1E	Egri	Eger	2018	1
389	FB18-6-2E	Egri	Eger	2018	1
390	18-1-2M	Bükk	Miskolc	2018	1
391	EB1G1	Egri	Eger	2018	1
392	EB1G5A	Egri	Eger	2018	1
393	EB1G5B	Egri	Eger	2018	1
394	EB1G5C	Egri	Eger	2018	1
395	EB2G1A	Egri	Eger	2018	2
396	EB2G3C	Egri	Eger	2018	1
397	EB2G4C	Egri	Eger	2018	2
398	EB2G5B	Egri	Eger	2018	2
399	EB3G3	Egri	Eger	2018	1
400	EB3G4	Egri	Eger	2018	2
401	MG3	Tokaji	Mád	2018	1
402	MG6	Tokaji	Mád	2018	1
403	MG8	Tokaji	Mád	2018	2
404	MG10	Tokaji	Mád	2018	1
405	MG12	Tokaji	Mád	2018	2
406	MG13	Tokaji	Mád	2018	1
407	MG14	Tokaji	Mád	2018	1
408	MG15	Tokaji	Mád	2018	1
409	MG16	Tokaji	Mád	2018	1
410	MG17	Tokaji	Mád	2018	1
411	MG18	Tokaji	Mád	2018	1
412	MG19	Tokaji	Mád	2018	1
413	MG24	Tokaji	Mád	2018	1
414	MG25	Tokaji	Mád	2018	2
415	MG27	Tokaji	Mád	2018	2
416	MG28	Tokaji	Mád	2018	1
417	MG30	Tokaji	Mád	2018	2
418	MG31	Tokaji	Mád	2018	1
419	MG34	Tokaji	Mád	2018	1
420	MG35	Tokaji	Mád	2018	1
421	G1C	Tokaji	Mád	2018	1
422	G3A	Tokaji	Mád	2018	1
423	G4A	Tokaji	Mád	2018	1
424	G4B	Tokaji	Mád	2018	1
425	G5B	Tokaji	Mád	2018	1

#	Izolátum- azonosító	Borvidék	Gyűjtés helye ^a	Gyűjtés éve	ISSR Klaszter
426	G6A	Tokaji	Mád	2018	2
427	G6B	Tokaji	Mád	2018	2
428	19-7	Egri	Andornaktálya	2019	2
429	19-17	Egri	Andornaktálya	2019	2
430	19-25	Egri	Andornaktálya	2019	2
431	19-31	Egri	Andornaktálya	2019	2
432	19-36	Egri	Andornaktálya	2019	2
433	19-40	Egri	Andornaktálya	2019	2
434	19-47	Egri	Andornaktálya	2019	2
435	19-54	Egri	Andornaktálya	2019	2
436	19-61	Egri	Andornaktálya	2019	2
437	19-69	Egri	Andornaktálya	2019	2
438	19-73	Egri	Andornaktálya	2019	2
439	19-82	Egri	Andornaktálya	2019	1
440	19-97	Egri	Andornaktálya	2019	1
441	19-107	Egri	Andornaktálya	2019	2
442	19-116	Egri	Andornaktálya	2019	2
443	19-119	Egri	Andornaktálya	2019	1
444	19-122	Egri	Andornaktálya	2019	1
445	19-123	Egri	Andornaktálya	2019	2
446	19-125	Egri	Andornaktálya	2019	2
447	19-129	Egri	Andornaktálya	2019	1
448	19-136	Egri	Andornaktálya	2019	1
449	19-159	Egri	Eger	2019	1
450	19-162	Egri	Eger	2019	1
451	19-169	Egri	Eger	2019	2
452	19-172	Egri	Eger	2019	2
453	19-179	Egri	Eger	2019	1
454	19-188	Egri	Eger	2019	1
455	19-192	Egri	Eger	2019	1
456	19-194	Tokaji	Mád	2019	1
457	19-195	Tokaji	Mád	2019	1
458	19-208	Egri	Eger	2019	1
459	19-210	Egri	Eger	2019	2
460	19-214	Egri	Eger	2019	2
461	19-216	Egri	Eger	2019	2
462	19-226	Egri	Eger	2019	1
463	19-227	Egri	Eger	2019	1
464	19-229	Egri	Eger	2019	2
465	19-234	Egri	Eger	2019	1
466	19-236	Egri	Eger	2019	2
467	19-238	Egri	Eger	2019	2
468	19-240	Egri	Eger	2019	2

#	Izolátum- azonosító	Borvidék	Gyűjtés helye ^a	Gyűjtés éve	ISSR Klaszter
469	BG1	Egri	Andornaktálya	2019	1
470	BG2	Egri	Andornaktálya	2019	2
471	BG3	Egri	Andornaktálya	2019	1
472	BG4	Egri	Andornaktálya	2019	2
473	BG5	Egri	Andornaktálya	2019	2
474	BG6	Egri	Andornaktálya	2019	2
475	BG7	Egri	Andornaktálya	2019	1
476	BG8	Egri	Andornaktálya	2019	2
477	BG9	Egri	Andornaktálya	2019	2
478	BmG1	Egri	Andornaktálya	2019	1
479	BmG2	Egri	Andornaktálya	2019	1
480	BmG3	Egri	Andornaktálya	2019	1
481	BmG5	Egri	Andornaktálya	2019	2
482	BmG8	Egri	Andornaktálya	2019	2
483	BmG9	Egri	Andornaktálya	2019	1
484	BmG10	Egri	Andornaktálya	2019	2
485	MGSt1	Tokaji	Mád	2019	1
486	MGSt2	Tokaji	Mád	2019	1
487	MGU1	Tokaji	Mád	2019	2
488	MGU2	Tokaji	Mád	2019	1
489	Gb1	Dão	NA, Portugália	2011	8
490	Gb30	Vinhos Verdes	NA, Portugália	2013	1
491	GbC	Lombardia	Canneto Pavese, Olaszország	2013	2
492	HrG1	Kelet-Istria (Istočna Istra)	Moscenicka Draga, Horvátország	2019	1
493	HrG2	Kelet-Istria (Istočna Istra)	Moscenicka Draga, Horvátország	2019	1
494	HrG3	Kelet-Istria (Istočna Istra)	Moscenicka Draga, Horvátország	2019	1
495	HrG4	Kelet-Istria (Istočna Istra)	Moscenicka Draga, Horvátország	2019	1
496	HrG5	Kelet-Istria (Istočna Istra)	Moscenicka Draga, Horvátország	2019	1
497	HrG6	Kelet-Istria (Istočna Istra)	Moscenicka Draga, Horvátország	2019	1
498	HrG7	Kelet-Istria (Istočna Istra)	Moscenicka Draga, Horvátország	2019	3
499	HrG8	Kelet-Istria (Istočna Istra)	Moscenicka Draga, Horvátország	2019	1

^a Minden izolátumot hazai borvidékről hoztunk létre, kivéve az utolsó 11-et, amelyeknél feltüntettem a származási országot.

M.2.2. táblázat. A gombatelek növekedésének *.jpg képekből történő mérésére használt MATLAB® szkript kódja.

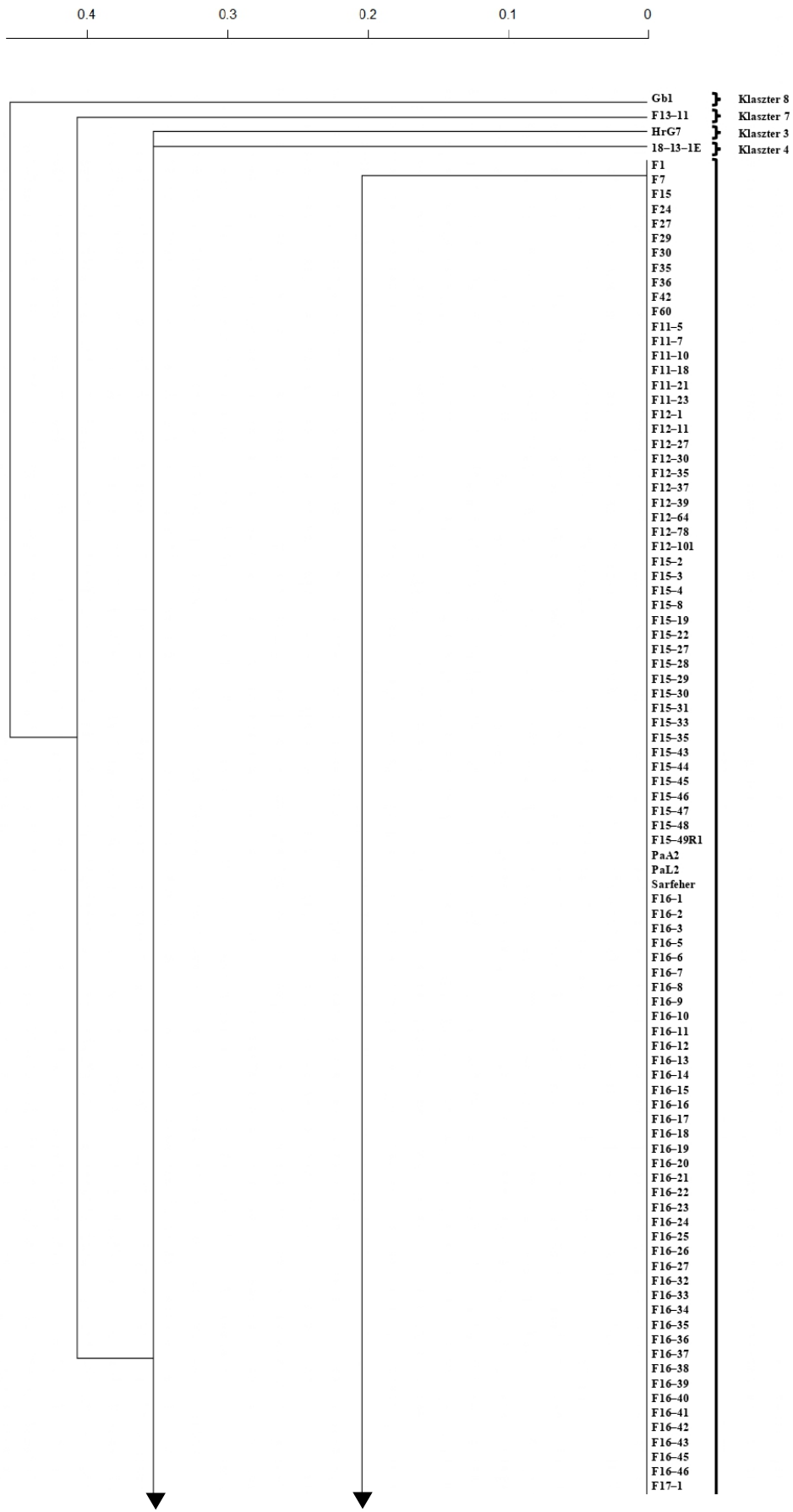
#	Kód	Megjegyzések
1	<code>data1 = dir('Custom access path*.jpg');</code>	Betöltés: A képek fájlnevei (*.jpg) a dedikált mappából kerülnek beolvasásra, majd a képek egyenként betöltődnek az elemzéshez.
2	<code>filenames = {data1.name};</code>	
3	<code>serialnumber=1;</code>	
4	<code>for K = 1 : length(filenames)</code>	
5	<code>load_images{K} = imread(filenames{K});</code>	
6	<code>in=load_images{K};</code>	
46	<code>IN = imcrop(in, [1200 700 1550 1600]);</code>	Kivágás: A kisebb (1550x1600), elemezni kívánt kép kivágásra kerül az eredeti képből, és mérete meghatározásra kerül.
7	<code>d=size(IN);</code>	
	<code>d2 = [1 1 0];</code>	
	<code>d3 = d+d2;</code>	
8	<code>w=1;z=1;</code>	Előkészítés: a kép összes pixelének elemzéséhez két egymásba ágyazott "while" ciklus kerül létrehozásra (pixeloszlopokhoz és -sorokhoz).
9	<code>while (w<d3(1))</code>	
10	<code>z=1;</code>	
11	<code>while (z<d3(2))</code>	
12	<code>if (IN(w,z,1) >= X)</code>	Pixelszín meghatározás és véglegesítés: A gombatelep különböző részeihez tartozó különböző színes pixelek (fehér/fekete/barna stb. micélium és
13	<code>IN(w,z,1)=256;</code>	
14	<code>IN(w,z,2)=256;</code>	
15	<code>IN(w,z,3)=256;</code>	
16	<code>elseif (IN(w,z,1) <= X)</code>	
17	<code>IN(w,z,1)=256;</code>	
18	<code>IN(w,z,2)=256;</code>	
19	<code>IN(w,z,3)=256;</code>	
20	<code>elseif (IN(w,z,1) >= X) && (IN(w,z,1) <= X) && (IN(w,z,3) >= X) && (IN(w,z,3) <= X)</code>	

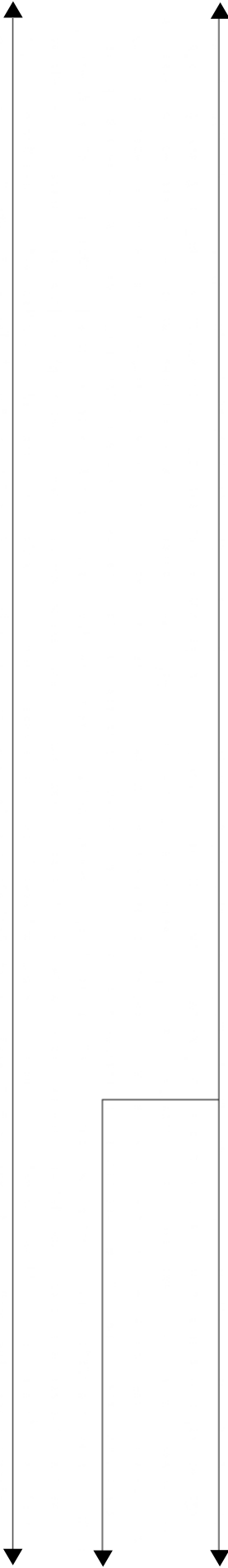
21	<code>IN(w, z, 1)=256;</code>	<p>sárgás micélium a telep szélein) észlelésére szolgáló, előre beállított paraméterek meghatározása a pixelek mérésével az adott kép piros-zöld-kék (RGB) színterének egy vagy több rétegén. Változó számú „elseif” paraméter állítható be (pl. egy a fehér, egy a sárga, egy a fekete kolónia részleteihez). X bármilyen szám lehet 0 és 255 között. A vörös ("w,z,1"), a zöld ("w,z,2") és a kék ("w,z,3") színrétegek pixelei kerülnek átvizsgálásra, és ha megfelelnek az előre beállított paraméterek bármelyikének, akkor az egyes színrétegeken fehérre alakulnak (256-os értéket vesznek fel). Ha a pixelek nem felelnek meg az előre beállított paraméterek egyikének sem, akkor minden egyes színrétegben feketévé válnak (0-s értéket vesznek fel). A megfelelő előre beállított paraméterek használatával lehetőség van arra, hogy a gombatelephez tartozó pixelek elkülönüljenek a táptalajhoz tartozó pixelektől és így fehérre vagy feketévé váljanak.</p>
22	<code>IN(w, z, 2)=256;</code>	
23	<code>IN(w, z, 3)=256;</code>	
24	<code>elseif (IN(w, z, 1) >= X) && (IN(w, z, 1) <= X) && (IN(w, z, 3) >= X) && (IN(w, z, 3) <= X)</code>	
25	<code>IN(w, z, 1)=256;</code>	
26	<code>IN(w, z, 2)=256;</code>	
27	<code>IN(w, z, 3)=256;</code>	
28	<code>elseif (IN(w, z, 1) >= X) && (IN(w, z, 1) <= X) && (IN(w, z, 3) >= X) && (IN(w, z, 3) <= X)</code>	
29	<code>IN(w, z, 1)=256;</code>	
30	<code>IN(w, z, 2)=256;</code>	
31	<code>IN(w, z, 3)=256;</code>	
32	<code>elseif (IN(w, z, 2) >= 70) && (IN(w, z, 2) <= 90) && (IN(w, z, 3) >= 70) && (IN(w, z, 3) <= 90)</code>	
33	<code>IN(w, z, 1)=256;</code>	
34	<code>IN(w, z, 2)=256;</code>	
35	<code>IN(w, z, 3)=256;</code>	
36	<code>else</code>	
37	<code>IN(w, z, 1)=0;</code>	
38	<code>IN(w, z, 2)=0;</code>	
39	<code>IN(w, z, 3)=0;</code>	
40	<code>end</code>	
41	<code>z=z+1;</code>	
42	<code>end</code>	
43	<code>w=w+1;</code>	
44	<code>end</code>	

45	<code>inoneplane = uint8((1/3)*(double(IN(:, :,1))+double(IN(:, :, 2))+d ouble(IN(:, :, 3))));</code>	Rétegek összevonása: Az piros- zöld-kék (RGB) szintér rétegei (amelyek már csak fehér és fekete pixeleket tartalmaznak) egyetlen fehér vagy fekete pixeles réteggé olvadnak össze. A kivágott fekete- fehér képeket (1550x1600 pixel), amelyeket az alábbi mérésekhez használunk, *.jpg formátumban, egy külön mappába mentjük, hogy az előre beállított paraméterek eredményét összehasonlíthassuk, és szükség esetén finomíthassuk.
47	<code>imwrite(inoneplane, ['Custom access path\Int_', filenames{K}])</code>	
48	<code>se = strel('disk', 3);</code>	
49	<code>closeimage=imclose(inonep lane, se);</code>	Simítás: A kis "felismerési hiányosságok" kitöltésre kerülnek, a kolónián kívüli szigetszerű fehér műtermékek törlődnek, és a végleges képek *.jpg formátumban, egy külön mappába mentésre kerülnek.
50	<code>binar2 = bwareaopen(closeimage, 200 000);</code>	
51	<code>imwrite(binar2, ['Custom access path\Fin_', filenames{K}])</code>	
52	<code>ININ=1;</code>	
53	<code>for i=1:1600</code>	
54	<code>onestring=binar2(i:i, 1:15 50);</code>	Mérés (bal oldal): Az egyes pixelsorok első fehér képpontjainak sorszámát (balról jobbra) egyenként regisztráljuk a nyolc bites kép bal felének tetejétől az aljáig. Az eredmények az "eredmények" táblázat páratlan soraiba (1., 3. stb.) kerülnek kiírásra.
55	<code>hit = find(onestring==true);</code>	
56	<code>if isempty(hit)</code>	
57	<code>hit(1)=1;</code>	
58	<code>else</code>	
59	<code>end</code>	
60	<code>coledge(i, :)=hit(1);</code>	

61	<code>results(i, ININ) = coledge(i, :);</code>	
62	<code>end</code>	
63	<code>reverse=flipdim(binar2, 2) ;</code>	Mérés (jobb oldal): A képet tükrözzük a függőleges tengelyen, és ugyanezt a mérést végezzük el a kép (eredetileg) jobb oldalán.
64	<code>for i=1:1600</code>	
65	<code>onestring=reverse(i:i, 1:1 550);</code>	
66	<code>hit=find(onestring==true) ;</code>	
67	<code>if isempty(hit)</code>	
68	<code>hit(1)=1;</code>	
69	<code>else</code>	
70	<code>end</code>	
71	<code>coledge(i, :) = hit(1);</code>	
72	<code>results2(i, ININ) = coledge(i, :);</code>	
73	<code>end</code>	
	<code>end</code>	

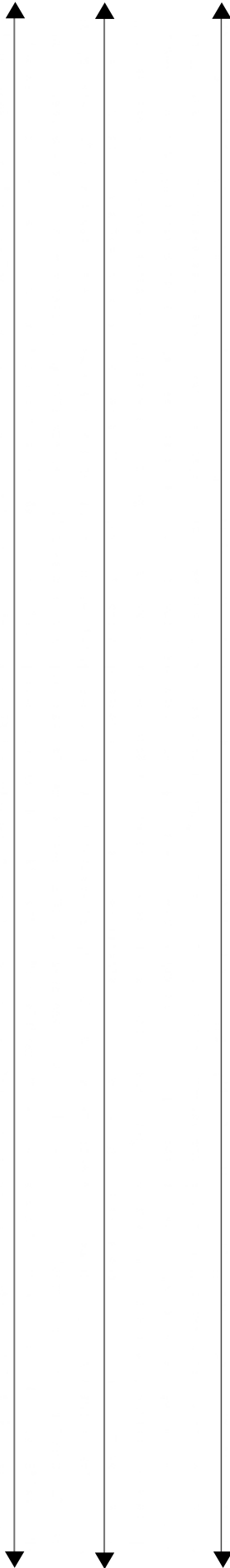
Távolság skála *



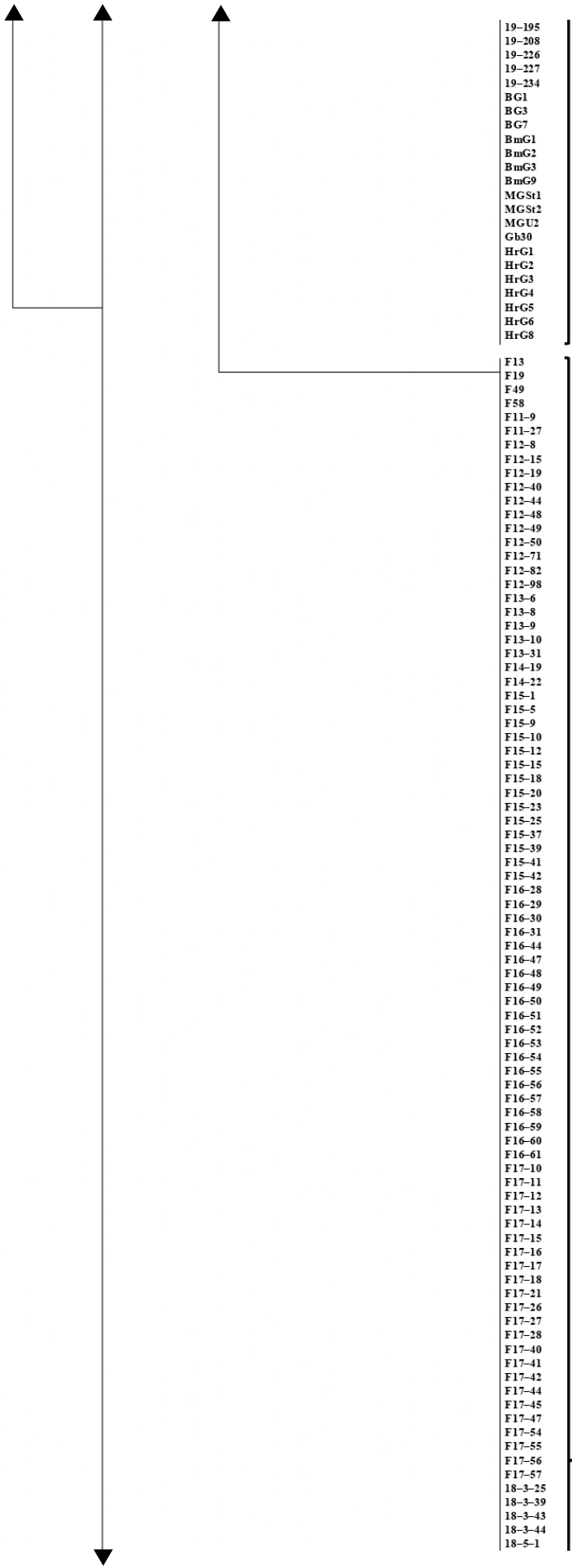


- F17-2
- F17-3
- F17-4
- F17-6
- F17-7
- F17-8
- F17-9
- F17-19
- F17-20
- F17-22
- F17-23
- F17-24
- F17-25
- F17-29
- F17-30
- F17-31
- F17-32
- F17-33
- F17-35
- F17-36
- F17-37
- F17-38
- F17-39
- F17-48
- F17-49
- F17-50
- F17-51
- F17-52
- F17-53
- F17-58
- F17-59
- F17-60
- F17-61
- F17-62
- F17-64
- F17-65
- F17-66
- F17-67
- F17-68
- 18-1-1
- 18-1-2
- 18-1-4
- 18-1-5
- 18-1-6
- 18-2-1
- 18-3-1
- 18-3-3
- 18-3-4
- 18-3-5
- 18-3-6
- 18-3-7
- 18-3-8
- 18-3-9
- 18-3-10
- 18-3-11
- 18-3-12
- 18-3-13
- 18-3-14
- 18-3-15
- 18-3-16
- 18-3-17
- 18-3-18
- 18-3-19
- 18-3-20
- 18-3-21
- 18-3-22
- 18-3-23
- 18-3-24
- 18-3-26
- 18-3-27
- 18-3-28
- 18-3-29
- 18-3-30
- 18-3-31
- 18-3-32
- 18-3-34
- 18-3-35
- 18-3-36
- 18-3-37
- 18-3-38
- 18-3-40
- 18-3-41
- 18-3-42
- 18-3-45
- 18-3-46
- 18-3-47
- 18-3-48
- 18-3-49
- 18-3-50
- 18-3-51
- 18-3-52
- 18-3-53
- 18-3-54
- 18-4-1
- 18-4-2
- 18-4-3
- 18-4-4
- 18-4-5
- 18-4-6
- 18-4-7
- 18-4-8
- 18-4-9
- 18-4-10
- 18-4-11
- 18-4-12
- 18-4-13
- 18-4-14
- 18-6-1
- 18-6-2
- 18-6-3

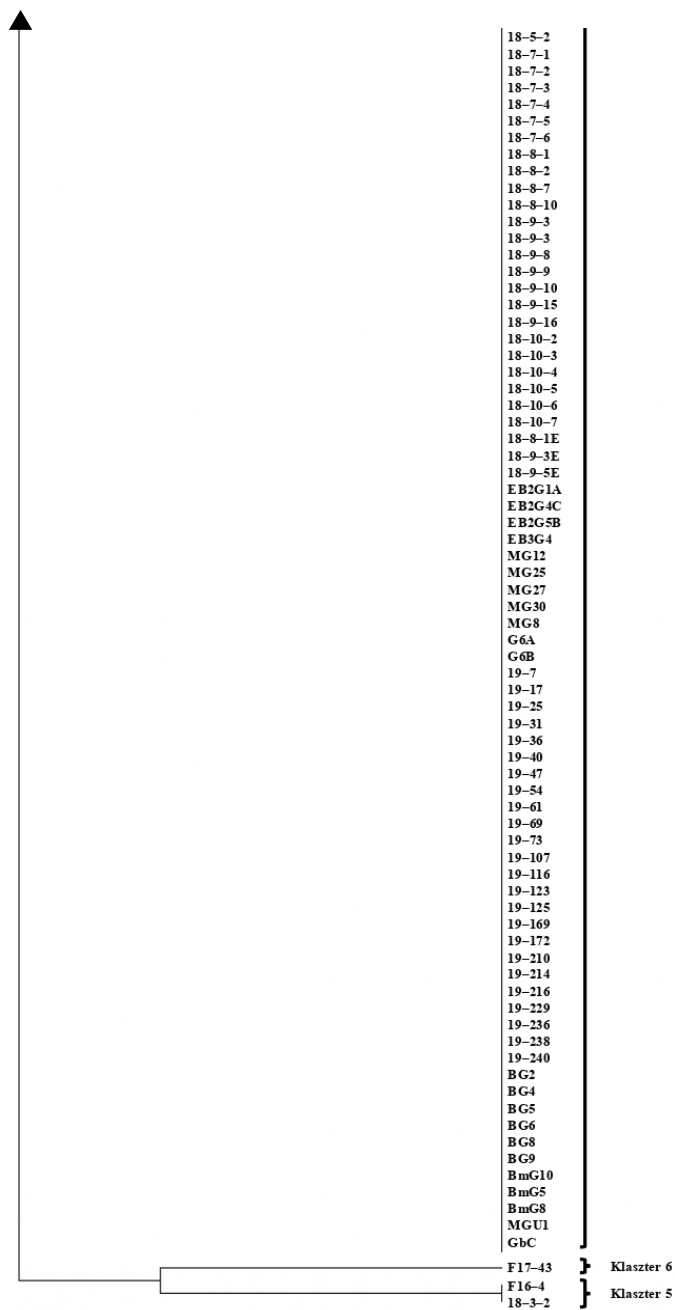
Klaszter 1



18-6-4
18-6-5
18-6-6
18-6-7
18-6-8
18-6-9
18-6-10
18-6-11
18-6-12
18-6-13
18-6-14
18-6-15
18-6-16
18-6-17
18-6-18
18-6-19
18-6-20
18-6-21
18-6-22
18-6-23
18-6-24
18-6-25
18-6-26
18-6-27
18-6-28
18-8-3
18-8-4
18-8-5
18-8-6
18-8-9
18-8-11
18-8-12
18-8-13
18-8-14
18-8-15
18-8-16
18-8-17
18-8-18
18-8-19
18-9-1
18-9-2
18-9-4
18-9-5
18-9-6
18-9-7
18-9-11
18-9-12
18-9-13
18-9-14
18-9-17
18-9-18
18-9-19
18-10-1
18-9-1E
18-9-2E
18-9-4E
18-9-6E
18-13-2E
18-13-3E
18-13-4E
18-13-5E
18-13-6E
18-13-7E
18-13-8E
18-15-1E
18-16-1E
FB18-3-1E
FB18-4-1E
FB18-4-2E
FB18-6-1E
FB18-6-2E
18-1-2M
EBIG1
EBIG5A
EBIG5B
EBIG5C
EB2G3C
EB3G3
MG10
MG13
MG14
MG15
MG16
MG17
MG18
MG19
MG24
MG28
MG3
MG31
MG34
MG35
MG6
G1C
G3A
G4A
G4B
G5B
19-82
19-97
19-119
19-122
19-129
19-136
19-159
19-162
19-179
19-188
19-192
19-194



Klaszter 2



M.2.3. ábra. A 499 *P. ampellicida* izolátum három ISSR-marker segítségével meghatározott ISSR-mintázata alapján készült Unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) dendrogram.

*: A távolság az egyes izolátumok ISSR profiljaiban található egyedibb markerek (termékek) között mutatkozó jelenlét- vagy hiányeltérésből számított becslött érték.

Az izolátumokra vonatkozó információkat az M.2.1. táblázat tartalmazza.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, **Bereczky Zsoltnak**, hogy biztatott az önálló gondolkodásra és kutatásra, és hogy próbálta átadni végtelen realizmusát az étellel szemben.

Köszönöm társtémavezetőmnek, **Palkovics László Amandnak**, hogy munkám során mindig tettekkkel és tanácsokkal is segített és támogatott.

Köszönöm tiszteletbeli témavezetőimnek **Kovács M Gábornak** és **Kiss Leventének**, hogy (hallgatói és) doktoranduszi munkámat lehetővé tették és minden téren segítettek.

Köszönöm **Kiss Leventének**, **Kontschán Jenőnek** és a **Növényvédelmi Intézet minden munkatársának**, hogy kutatómunkámat és tanulmányomat ebben az Intézetben és támogató atmoszférában végezhettem el.

Külön köszönöm **Molnár Orsolya**, **Hegedűsné Pintye Alexandra** és **Németh Márk** kollégáimnak az izolátumok létrehozásában, a Gradiens lemezek készítésében és a filogenetikai elemzésben nyújtott segítségét. Valamint a jó hangulatban eltöltött labor-, terep- és irodai munkát.

Köszönöm **Váczy Kálmánnak**, **Spitzmüller Zsoltnak**, **Váczy Zsuzsannának**, **Szalóki Nikolettának**, **Molnár Eszternek** és minden EKKE-s kollégáimnak a segítséget, valamint a szőlő-bor-kultúrába való gyakorlati bevezetést.

Köszönöm **Onesti Giovanninak** az olaszországi izolátumot, a sok segítséget és a jó hangulatot, **Cecilia Regonak** a portugál izolátumokat, **Dankó Tamásnak** pedig a képelemzésben nyújtott segítségét.

Köszönöm **Bókony Veronikának** és **Ladányi Mártának** a statisztika világában nyújtott útmutatásukat, tanításukat és segítségüket.

Köszönöm **Rohm Csilla** segítségét az izolátumok fenntartásában és a mindennapi labormunkában.

Köszönöm együttműködő partnereinknek, Tempfli Baláznak, Schmidt Ágnesnek, Hoffmann Péternek, ifj. Szepsy Istvánnak, Füzi Istvánnak, a Hilltop kft.-nek és a Laposa Birtoknak, hogy lehetőséget biztosítottak mintagyűjtésre és tudásszerzésre ültetvényeikben.

Köszönet az NKFIH-OTKA 100724 sz. (*Guignardia bidwellii* - betekintés a feketerothadás fekete dobozába) és a GINOP-2.3.2-15-2016-00061 (Szőlő-bor kutatás fejlesztési kiválósági központ létrehozása) projektek anyagi támogatásáért.