



A FERTŐZŐ TŐKEELHALÁSBAN RÉSZT VEVŐ GOMBÁK IZOLÁLÁSA A TOKAJI BORVIDÉKRŐL



Kovács Csilla¹; Peles Ferenc¹; Xie Hongtao^{1,2}; Bihari Zoltán²; Sándor Erzsébet¹
¹Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertudományi Intézet
²Tokaji Borvidék Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet

Bevezetés

A szőlőtöke korai elhalása a szőlőültetvények egyik legpusztítóbb betegsége, mely egyre komolyabb gazdasági károkat okoz világszerte. A szőlő fás részeiben található gombák okozta különböző betegségeket, illetve betegség típusokat összefoglalóan szőlőtöke betegségeként („Grapevine Trunk Diseases” - GTD) nevezik. Ide tartozik például az esca, a Petri betegség, a botrioszfériás elhalás, a fekete kordonkar elhalás. A GTD komplex betegség, melynek kialakításában biotikus és abiotikus tényezők is szerepet játszanak. A betegség jelentkezhet akut formában (apoplexia), illetve krónikus formában is. Kialakításában többféle kórokozó (pl. *Phaeocromonium aleophilum*, *Phaeomonilla chlamydospora*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, *Diplodia seriata*) szerepét bizonyították. A megbetegedést nemcsak egy kórokozó okozza, hanem egyszerre több faj is szerepet játszhat a kialakításában. Az abiotikus tényezők közül a csapadék, a hőmérséklet szerepét valószínűsítik.

Anyag és módszer

Patogének izolálása

Vizsgálataink célja a szőlőtöke betegségei (GTD) kialakításában szerepet játszó gombák felmérése a tokaji borvidéken, a Tokaji Borvidék Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet területéről, a Bakonyi-dűlőből négy különböző időpontban (2013.05.06., 2013.05.21., 2013.05.27., 2013.06.03.) gyűjtött mintákat az intézet munkatársai. Az izolátumokat burgonya-dextróz folyékony kultúrában (20 ml; PD-leves) szobahőmérsékleten, rotációs rázógép segítségével 3 napon át 130 rpm-en növesztettük. A feltárás előtt a mintákat *Miracloth* szűrőkendő segítségével leszűrtük, majd desztillált vízzel kétszer átmostuk. A gomba micéliumot a sejt feltárásáig -20 °C-on tároltuk.

DNS izolálása és PCR-reakció az ITS amplifikációjához

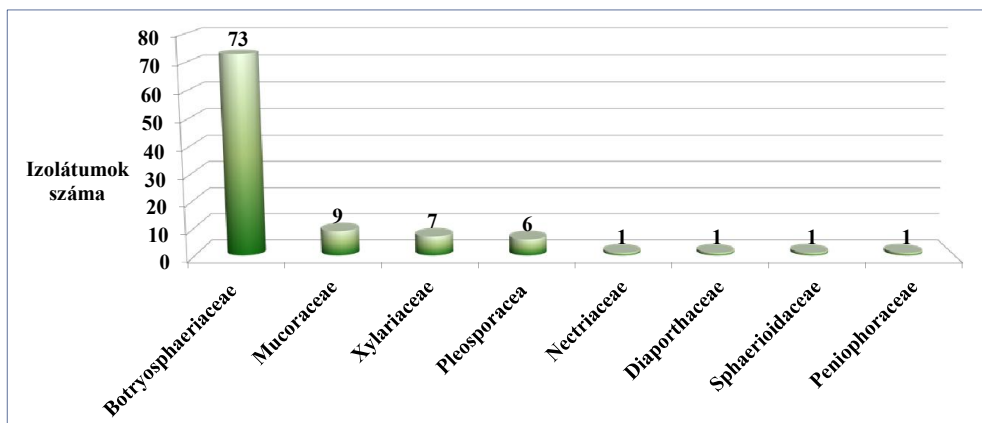
A teljes genomi DNS kinyeréséhez *NucleoSpin Plant II* (Macherey-Nagel) kitet alkalmaztunk a gyártó útmutatásai szerint. Az izolált DNS-t 0,8%-os agaróz gélben futtattuk. A DNS koncentrációkat *Nanodrop 2000* készülékkel (Thermo Scientific, USA) mértük. A PCR reakció kivitelezéséhez *MyGenie 96 Thermal Block* (Bioneer, Korea) gradiens PCR készüléket alkalmaztunk. Az ITS1 és ITS2 szakaszokat tartalmazó riboszómális DNS régiót ITS4 és ITS5 primerek (White et al., 1990) segítségével amplifikáltuk. A gradiens PCR program 12 lépésből állt. Az első denaturáció 95°C-on, 5 percig tartott, majd ötször ismétlődött a denaturáció 95°C-on 1 percig, az anelláció: 58°C-on 1 percig, végül a polimerizáció: 72°C-on, 1 perc 30 másodpercig. A *GoTaq Green Master* magas hőmérséklet hatására viszonylag gyorsan inaktiválódik, ezért a reakció kezdeti ciklusában alkalmazott 95°C denaturációs hőmérsékletet az ötödik ciklus után 90°C-ra csökkentettük, a többi körülményt pedig változatlanul hagyva, harmincszor ismételtük a PCR ciklus lépéseit. A reakciót 72°C-on, 15 percig tartó polimerizáció zárta.

DNS szekvenálás

A szekvenálást az *Eurofins MWG GmbH* (Németország) végezte. Az izolátumok taxonómiai besorolását a szekvenciák adatbázisba (*GenBank*) blasztolásával határoztuk meg. A *Botryosphaeriaceae* családba tartozó minták szekvenciáit a típusörzsek deponált ITS szekvenciáival is összehasonlítottuk.

Eredmények

A tarcali területől származó minták izolátumai (99 izolátum) közül a fajok 9 családba voltak sorolhatóak. A *Botryosphaeriaceae* családba tartozók fordultak elő a legnagyobb arányban (73 faj), melyből 66 izolátumot *Diplodia seriata*nak (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) azonosítottunk. *Botryosphaeria stevensii* (anamorf: *Diplodia mutila*) 6 izolátumból lett azonosítva. A *Nectriaceae* családból csak egy *Gibberella zeae* (anamorf: *Fusarium graminearum*) fajt találtunk. A *Diaporthaceae* családból egy *Phomopsis* volt kimutatható. A *Sphaerioidaceae* családból egy *Phoma*-t találtunk. A *Pleosporaceae* családba tartozó fajok közül 2 *Alternaria alternata*, 3 egyéb *Alternaria* fajt és egy *Epicoccum nigrum* (syn: *Epicoccum purpurascens*) fajt azonosítottunk. A *Peniophoraceae* családból is előfordult egy faj. 9 *Mucor ramosissimus* is azonosítottunk a *Mucoraceae* családból. A *Xylariaceae* családba tartozó *Xylaria*-t 4 izolátum, míg egyéb családba tartozó fajt 3 izolátum esetén találtunk (1. ábra).



1. ábra: Bakonyi-dűlőből származó tarcali szőlőtökek, fás szövetekből izolált különböző endofita gombák családokba sorolása

Összefoglalás

A tőkeelhalás napjainkban a szőlőültetvények egyik legsúlyosabb betegsége világszerte, mely a magyarországi szőlőkben is megtalálható. A magyarországi borvidékeken a tőkeelhalás kialakításában szerepet játszó kórokozók előfordulásáról azonban nagyon kevés adat található. A Tokaji Borvidéken pedig nincsenek ismereteink arról, hogy jelenleg milyen kórokozók találhatók meg az ültetvényekben.

Kutatómunkánk célja a Tokaji Borvidéken észlelt fertőző tőkeelhalás néven összefoglalt egyes betegség típusok helyzetének felmérése, a helyi szakemberek közreműködésével, továbbá a beteg tőkékben izolálható kórokozók morfológiai és genetikai alapon történő azonosítása.

A vizsgált, elhalt tőkék mindegyikéből sikerült endofita gombákat kitenyészteni. Többféle gombát sikerült azonosítani. Az izolátumok között döntő többségében a *Botryosphaeriaceae* családba tartozó *Diplodia seriata* (teleomorf: *Botryosphaeria obtusa*) volt kimutatható a tenyészetek morfológiai és az rDNS régió alapján történt molekuláris azonosítás alapján. Egyéb endofita gombákat is izoláltunk a fás szövetekből, például *Alternaria*, *Epicoccum nigrum*, *Gibberella zeae* (anamorf: *Fusarium graminearum*), *Mucor ramosissimus*, *Phoma*, és *Phomopsis* fajokat.

A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával a TÁMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg. A publikáció elkészítését a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú, valamint a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 számú projekt is támogatta. Sándor Erzsébet munkáját a Debreceni Egyetem belső kutatási pályázata támogatta. A kutatások a COST FA1303 keretében zajlottak.