

**Doktori (PhD) értekezés**

**Kellner Nikolett**

**Gödöllő**

**2022**



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

**A szőlő (*Vitis vinifera*) feketeterohadás (*Guignardia bidwellii*) fertőzésre adott transzkriptom szintű válasza és a fertőzött bogyók finomanalitikai összetétele**

Kellner Nikolett

Budapest

2022

## **A doktori iskola**

|                       |                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>megnevezése:</b>   | Kertészettudományi Doktori Iskola                                                                                                                                                                                        |
| <b>tudományága:</b>   | Növénytermesztési és kertészeti tudományok                                                                                                                                                                               |
| <b>vezetője:</b>      | Zámboriné dr. Németh Éva<br>egyetemi tanár, DSc<br>Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem<br>Gyógy- és Aromanövények Tanszék                                                                                             |
| <b>Témavezető(k):</b> | Nyitrai dr. Sárdy Diána<br>egyetemi docens, PhD<br>Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem<br>Borászati Tanszék<br><br>Deák Tamás<br>egyetemi docens, PhD<br>Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem<br>Szőlészeti Tanszék |

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető(k) jóváhagyása

## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Jelölések, rövidítések jegyzéke .....                                                 | 5  |
| 1 Bevezetés .....                                                                     | 7  |
| 2 Célkitűzés.....                                                                     | 9  |
| 3 Irodalmi áttekintés.....                                                            | 10 |
| 3.1 A szőlő feketerothadása.....                                                      | 10 |
| 3.1.1 A kórokozó megjelenése, elterjedése.....                                        | 10 |
| 3.1.2 Gazdanövényköre.....                                                            | 11 |
| 3.1.3 A kórokozó és biológiája .....                                                  | 11 |
| 3.1.4 A <i>Guignardia bidwellii</i> által okozott tünetek .....                       | 14 |
| 3.2 A szőlő feketerothadása elleni védekezés lehetőségei .....                        | 16 |
| 3.2.1 Agrotechnikai megoldások .....                                                  | 16 |
| 3.2.2 Kémiai védekezés .....                                                          | 17 |
| 3.2.3 A kórokozó előrejelzése.....                                                    | 18 |
| 3.2.4 A szőlő rezisztencianemesítése .....                                            | 19 |
| 3.2.5 Potenciális rezisztenciaforrások a szőlő feketerothadással szemben.....         | 23 |
| 3.3 A szőlő védekezőmechanizmusai a kórokozók ellen (növény-patogén interakciók)..... | 24 |
| 3.4 Az RNS szekvenálás technológiája .....                                            | 28 |
| 3.5 Mikotoxin termelő gombák, jelentőségük.....                                       | 31 |
| 3.5.1 Mikotoxinok a borászatban.....                                                  | 34 |
| 3.5.2 Mikotoxinok detektálása .....                                                   | 38 |
| 3.6 Fiziológiailag aktív vegyületek jelentősége .....                                 | 39 |
| 3.6.1 Biogén aminok .....                                                             | 39 |
| 3.6.2 Polifenolok .....                                                               | 44 |
| 4 Anyag és módszer .....                                                              | 47 |
| 4.1 Mesterséges fertőzés.....                                                         | 47 |
| 4.1.1 A mesterséges fertőzéshez felhasznált növényanyag.....                          | 47 |
| 4.1.2 A fertőzés menete.....                                                          | 48 |
| 4.1.3 Mintavétel .....                                                                | 50 |
| 4.1.4 <i>Guignardia bidwellii</i> festés tripánkéssel.....                            | 51 |
| 4.2 RNS kivonás.....                                                                  | 51 |
| 4.3 Teljes RNS szekvenálás .....                                                      | 54 |
| 4.4 Adatelemzés, bioinformatika.....                                                  | 54 |
| 4.5 Feketerothadt szőlőbogyók kémiai összetételének finomanalitikai vizsgálata .....  | 55 |
| 4.5.1 Vizsgált növényanyag .....                                                      | 55 |
| 4.5.2 Vizsgált összetevők.....                                                        | 55 |
| 4.5.3 Az összetevők vizsgálatára alkalmazott mérési módszerek.....                    | 56 |
| 5 Eredmények és megvitatásuk.....                                                     | 60 |
| 5.1 Feketerothadás érzékenység vizsgálata .....                                       | 60 |
| 5.1.1 A szőlő-feketerothadás kapcsolat vizsgálata szűrőpapírkorongos fertőzéssel..... | 60 |
| 5.1.2 <i>Guignardia bidwellii</i> konídiumok csírázási aránya .....                   | 61 |
| 5.1.3 Csíratömlő növekedés .....                                                      | 62 |
| 5.2 A feketerothadás fertőzésre adott RNS szintű válaszreakció .....                  | 64 |
| 5.2.1 Az RNS szekvenálás eredménye.....                                               | 64 |
| 5.2.2 Az inzert méret meghatározása .....                                             | 67 |
| 5.2.3 <i>De novo</i> transzkriptom építése .....                                      | 68 |
| 5.2.4 A génexpresszió mértékének meghatározása.....                                   | 69 |

|       |                                                                           |     |
|-------|---------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.2.5 | Differenciáltan expresszálo gének .....                                   | 71  |
| 5.3   | Fiziológiailag aktív vegyületek vizsgálata .....                          | 81  |
| 5.3.1 | Feketerothadt szőlőbogyók összetétele .....                               | 81  |
| 5.3.2 | Feketerothadással fertőzött bogyók mikotoxin tartalmának vizsgálata ..... | 86  |
| 5.3.3 | Feketerothadás tüneteket mutató bogyók mikotoxin tartalma .....           | 87  |
| 6     | Következtetések .....                                                     | 88  |
| 7     | Új tudományos eredmények.....                                             | 90  |
| 8     | Összefoglalás.....                                                        | 92  |
| 9     | Summary .....                                                             | 94  |
| 10    | Mellékletek.....                                                          | 96  |
|       | M1. Irodalomjegyzék .....                                                 | 96  |
|       | M2. További mellékletek .....                                             | 111 |
| 11    | Köszönetnyilvánítás .....                                                 | 122 |

## JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A (adenine): adenin

ABA (Absciscic Acid): abszcizinsav

AFB (aflatoxin): aflatoxin

Avr (Avirulence): avirulencia

Aw (Active Water): aktív víz

C (cytosine): citozin

CA (Ciklopiazon Acid): ciklopiazonsav

cDNS (complementary DNA): komplementer DNS

CIT (Citrinin): citrin

CREA-VE (Consiglio Per La Ricerca In Agricoltura E L'analisi Del L'economia Agraria- centro di ricerca in Viticoltura ed Enologia): Agrárkutatási és Agrárgazdasági Elemző Tanács-Szőlészeti és Borászati Kutatóközpont

CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation): Nemzetközösségi Tudományos és Ipari Kutatási Szervezet

DAO (Diamine Oxidase Activity): diamin-oxidáz-aktivitás

DD (Degree Day): hőfoknap

DNS (Deoxyribonucleic acid): dezoxiribonukleinsav

DON (Deoxynivalenol): deoxinivalenol

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): enzim kapcsolt immunszorbens vizsgálat

ET (Ethylene): etilén

ETI (Effector Triggered Immunity): effektor molekulák által előidézett immunválasz

ETS (Effector-Triggered Susceptibility): effektor molekulák által kiváltott érzékenység

EU (European Union): Európai Unió

FB (fumonizine B): fumonizin B

FEM (Fondazione Edmund Mach): Edmund Mach Alapítvány

Florida AM (Florida Agricultural and Mechanical University): Floridai Mezőgazdasági és Mechanikai Egyetem

G (guanine): guanin

GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry): gázkromatográfia-tömegspektrometria

HPLC-MS (High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry): nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia-tömegspektrometria

HR (Hypersensitive Response): hiperszenzitív válaszreakció

IA (Immunoaffinity): immunaffinitás

IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin): Francia Szőlészeti és Borászati Intézet

INRA (Institut National de la Recherche Agronomique): Országos Agronómiai Kutató Intézet

ISR (Induced Systemic Resistance): indukált szisztémás rezisztencia

JA (Jasmonic Acid): jázmonsav

JKI (Julius Kühn Institut): Julius Kühn Intézet

MAB (Marker assisted backcrossing): marker támogatott visszakeresztezés

MAMP (Microbe Associated Molecular Pattern): mikrobához köthető molekuláris mintázat

MAPK(Mitogen-Activated Protein Kinases): mitogén aktivált protein kináz

MAS: (Marker Assisted Selection): marker támogatott szelekció

MLF (Malolactic Fermentation): malolaktikus fermentáció

mRNS (messenger Ribonucleic acid): hírvivő ribonukleinsav

NIV (Nivalenol): nivalenol

OEM: Oltalom alatt álló eredetmegjelöléssel ellátott borászati termékek

OFJ: Oltalom alatt álló földrajzi jelzéssel ellátott borászati termékek

OIV (International Organisation of Vine and Wine): Nemzetközi Szőlészeti és Borászati Szervezet

OTA (Ochratoxin A): ochratoxin A

PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern): patogénhez köthető molekuláris mintázat

PCR (Polymerase Chain Reaction): polimeráz láncreakció

PRR (Pattern Recognition Receptor): mintázat felismerő receptor

PTI (PAMP Triggered Immunity): PAMP molekulák által előidézett immunválasz

QoI (Quinone outside Inhibitor): kinonon kívüli inhibitor

QTL (Quantitative Trait Locus): mennyiségi tulajdonságokat meghatározó lokuszok

RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed): élelmiszerekre és takarmányokra vonatkozó gyors riasztórendszer

RNASeq (RNA sequencing): RNS szekvenálás

RNS (Ribonucleic acid): ribonukleinsav

Rpv (Resistance to Plasmopara viticola): Szőlő peronoszpóra elleni rezisztencia

SA (Salicylic Acid): szalicilsav

SAR (Systemic Acquired Resistance): szisztémás szerzett rezisztencia

SPE (Solid Phase Extraction): szilárd fázisú extrakció

T (thymine): timin

TLC (Thin layer Chromatography): vékonyréteg kromatográfia

UC Davis: University of California, Davis - Kaliforniai Egyetem, Davis

UV (Ultra Violet): ultraibolya

ZEA (Zearalenon): zearalenon

# 1 BEVEZETÉS

A kerti szőlő (*Vitis vinifera* L.) termesztése évezredek óta zajlik (Michel et al., 1993), gazdasági és kulturális szempontból nagy jelentőséggel bír. A termesztett szőlőt különösen jó íztulajdonságai miatt különféle módokon (csemegeszőlő, gyümölcsle, bor) használják fel.

A kerti szőlő minőségének és termésjellemzőinek javulását a szőlőtermesztés kezdete óta segítik a nemesítők az örökítőanyagok kombinálásával. Ez magába foglalja a növények védelmét is az Európában a 19. század óta jelen lévő kórokozók ellen. A szőlőt világszerte számos, gombák által okozott betegség támadja meg, amelyek jelentős terméskiesést és szőlőminőség romlást eredményezhetnek (Ramsdell és Milholland, 1988). A lisztharmat (*Erysiphe necator*) 1845-ben, a filoxéra (*Daktulosphaira vitifoliae*) 1863-ban és a peronoszpóra (*Plasmopara viticola*) 1878-ban, a feketerothadás (*Guignardia bidwellii*) 1885-ben jelent meg az európai szőlőtermesztésben. Az Európában termesztett szőlő nagyon érzékeny ezekre a kórokozókra (Töpfer et al., 2011).

A feketerothadás a világ szőlőterületein jelen van. Megfelelő növényvédelem hiánya mellett és az olyan szélsőséges időjárási viszonyok kialakulásakor, mint például egy túlnyomóan párás, meleg év a szőlő feketerothadásának megjelenésére kell számítanunk. A kórokozó súlyos fertőzés esetén nagy terméskiesést okozhat, valamint ronthatja a bor minőségét (Ellis et al., 1986; Funt et al., 1990; Reddick, 1911). Különösen veszélyeztetettek a meleg, nedves, kevésbé széljárta területek. Járványos években a feketerothadás miatt akár 5-80%-kal is csökkenhet a betakarított szőlő mennyisége (Ramsdell és Milholland, 1988). A súlyosan érintett szőlőültetvényekben esetenként 100%-os termésveszteség is előfordulhat (Rinaldi et al., 2013).

A szőlő feketerothadása régóta ismert hazánkban is, jelentős gazdasági károkat azonban nem minden évben okozott. 2010-től fokozódik jelenléte hazánk szőlőtermő vidékein (Dula, 2012). A betegséggel kapcsolatos tapasztalatok hiánya miatt a védekezés és a megelőzés lehetőségei korlátozottak, a rezisztenciával kapcsolatosan kevés információval rendelkezünk (Dula, 2016), ezért a szőlő rezisztencia-kutatásban az elmúlt pár évben kiemelt figyelmet kap a feketerothadással szembeni ellenállóság genetikai hátterének kutatása is.

A kórokozókkal szembeni védekezés általános és legjobb megoldása a rezisztencianemesítés (Barna, 1963). Az európai fajták szinte kivétel nélkül fogékonyak a betegségre (Demaree et al., 1937; Barrett, 1953; Hausmann et al., 2017). Az újonnan előállított, magas fokú lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciával rendelkező fajták többsége is fogékony a feketerothadás fertőzésére.



Ez a betegség az organikus/bio szőlőtermesztésben súlyos növényvédelmi problémát okozhat, gyakran megoldhatatlan feladatot jelent, ezért a feketerothadás elleni rezisztenciát be kell építeni az új, innovatív rezisztens fajtákba.

## 2 CÉLKITÚZÉS

Munkám során elsődleges célom a szőlő és a feketerothadás kapcsolat biológiai hátterének megismerése volt, ehhez a szőlő feketerothadására adott transzkriptom szintű válaszábanak vizsgálatát terveztük. A *Guignardia bidwellii* fertőzésre felül- vagy alul expresszázó gének azonosításával segíteni szeretnénk a markerfejlesztést, a marker-támogatott szelekciót.

Megoldandó elméleti problémák, tudományos célok:

- A szőlő feketerothadásra adott transzkriptom szintű válaszábanak vizsgálata
  - Fertőzött és mock (kontroll) inokulált, ellenálló és fogékony növények teljes RNS szekvenálása új generációs szekvenálással a különbözőképpen kifejeződő gének azonosítása érdekében
  - A kórokozó és a növény közti kapcsolatban specifikus szerepet betöltő gének azonosítása

A tudományos célok elérése érdekében megvalósítandó feladatok:

- Fertőzési kísérletek beállítása, a fertőzések elvégzése
- Új generációs szekvenálás könyvtárainak létrehozásához megfelelő minőségű teljes RNS kivonatok készítése
- A szekvencia adatok feldolgozására alkalmas pipeline kidolgozása, adaptálása
- Fiziológiailag aktív vegyületek vizsgálata fertőzött mintákból:
  - A feketerothadt szőlőbogyók kémiai összetételének vizsgálata
  - Az egyes biológiailag aktív vegyületek kialakulásának vizsgálata a feketerothadás hatására
  - Mindezek alapján célunk volt meghatározni, hogy mekkora százalékos arányban fertőzött fürt dolgozható fel és használható a minőségi bor készítés során, azaz, egyáltalán milyen mértékű rothadás esetén nem kell válogatni

### 3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1 A szőlő feketerothadása

##### 3.1.1 A kórokozó megjelenése, elterjedése

A szőlő guignardiás feketerothadását a *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala et Ravaz pseudotéciumos gomba okozza. A kórokozó Észak-Amerikában őshonos. Az általa okozott veszteségeket először 1804-ben írták le Kentucky-ban (Reddick, 1911). Az Amerikai Egyesült Államokban jelentős mértékű károkat először 1848-ban okozott Ohióban, majd 1867-ben az ország több nyugati államában is (Scribner, 1886). A szőlő feketerothadását valószínűleg fertőzött szaporítóanyaggal vihették be a világ más bortermelő régióiba, így juthatott el Európába és Dél-Amerikába (Ramsdell és Milholland, 1988). Európában először Dél-Franciaországban számoltak be a feketerothadásról 1885-ben (Viala és Ravaz, 1886). Ezt követően a betegség gyorsan elterjedt a szomszédos szőlőtermő vidékeken, Németországban és Olaszországban (Reddick, 1911). Olaszországban 1891-ből származik az első jelentés a betegségről, amiben leveleken megfigyelt tünetekről számoltak be (Martelli, 1891). Később, mikor Olaszország északkeleti régióinak szőlőterületein is megjelent, azt feltételezték, hogy a kórokozó a szomszédos kelet-európai országokból érkezett, valószínűleg a volt Jugoszlávia területéről, ahol a betegség már 1935 óta ismert volt (Rui, 1935). Németországban a feketerothadás jelenlétét az 1930-as években dokumentálták (Lüstner, 1935), de csak a 20. század végén jelentettek nagyobb járványokat (Harms et al., 2005). 2002 óta Németország északi bortermő területein is egyre inkább megfigyelhető volt a feketerothadás (Harms et al., 2005). Svájcban, Ticinóban 1988-ban számoltak be a betegség súlyos kitöréséről (Jermini és Gessler, 1996). A 21. század elején a kórokozó fokozott előfordulásáról számoltak be Németország, Svájc, Ausztria, Luxemburg (Rinaldi et al., 2013) és Románia területéről (Tomoiağa és Comsa, 2010). Európában a betegség 2010 óta a melegebb, mediterrán országokban, Olaszországban és Portugáliában is gyakrabban jelenik meg (Rinaldi et al., 2013). Észak-Amerika és Európa mellett a szőlő feketerothadását megfigyelték már Dél-Amerikában és Ázsiában is, így szinte globális elterjedéssel rendelkezik (Wilcox, 2003).

Eddig csak elvétve figyeltek meg a *Guignardia bidwellii* kórokozót Ausztrália főbb szőlőtermesztési régióiban, de felismerve jelentőségét az ausztrál boripart fenyegető kiemelt veszélyek közé sorolják (Sosnowski et al., 2012).

Magyarországon a kórokozót elsőként Kecskemét környékén találták meg 1999 nyarán, majd Pécsen, Sopronban, Tokaj-Hegyalján figyeltek fel rá, de már ugyanebben az évben a Balaton felvidéken is elterjedt (Mikulás és Tomcsányi, 1999). A szőlő guignardiás feketerothadása a magyarországi borvidékeken igazoltan jelen van, eddig többször okozott jelentős mértékű gazdasági károkkal járó járványt. A 2010-es évben súlyos feketerothadás epidémia lépett fel az Északi-középhegység borvidégein, amely nem érkezett váratlanul, hisz 2005 óta évről évre fokozódik a fertőzés mértéke a borvidékeken (Váczy et al., 2012). 2014 óta jelentős méretű kártétellel jelentkezett a hazai ültetvényekben (Dula et al., 2016).

### 3.1.2 Gazdanövényköre

Gazdanövény körébe a *Vitis*, *Parthenocissus*, *Cissus* és *Ampelopsis* nemzetségek különböző fajai tartoznak (Kövics, 2000; Wikee et al., 2011). Az európai termesztett szőlő, a *Vitis vinifera* (Linné) a leginkább fogékony, érzékenyek továbbá a *Vitis labrusca* (Linné), *Vitis rotundifolia* (Michaux) és *Vitis arizonica* (Engelmann) fajok. További alternatív gazdanövényei a *Vitis amurensis* (Ruprecht), a *Vitis californica* (Bentham), a *Parthenocissus quinquefolia* (Linné), a *Parthenocissus tricuspidata* (Siebold et Zuccarini), a *Cissus spp.* fajok. A kártétel a *Parthenocissus tricuspidata* és a *Parthenocissus quinquefolia* fajokon nem jelentős (Eyres et al., 2006). Az amerikai alanszőlők, a *Vitis riparia* (Michaux), a *Vitis rupestris* (Scheele), a *Vitis candicans* (Engelmann) és a *Vitis cordifolia* (Michaux) csaknem ellenállóak (Sosnowski és Tan, 2017). A szőlő feketerothadása támadja még a *Parthenocissus*-okhoz hasonlóan falak befuttatására ültetett vadszőlőt, a borostyánszőlőt (*Ampelopsis spp.*) is (Linhart és Mezey, 1885). Wilcox (2003) szerint az összes *Vitis vinifera* (Linné) faj a fertőzőképesség szempontjából veszélyeztetett kategóriába sorolható, azonban a fajok fogékonyságában eltérések lehetnek. A feketerothadással fertőzött *Vitaceae* család tagjai között érzékenységi különbségek mutatkoznak, Kong (2009) e szerint az érzékenységi szint szerint osztályozza a fajtákat. A fajták érzékenységeiben mutatkozó különbségek oka lehet a földrajzi elterjedés is, mivel az egyes területeken a kórokozó különböző rasszai zavartalanul kialakulhatnak (Kong, 2009).

### 3.1.3 A kórokozó és biológiája

A szőlő guignardiás feketerothadását a *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala et Ravaz pszeudotéciumos gomba okozza. Píknídiumos alakja a *Phyllosticta ampellicida* (Engelmann) van der Aa. A gomba az *Ascomycota* törzsbe, a *Dothideomycetes* osztályába, a *Botryosphaeriales*

rendbe, a *Botryosphaericaceae* családba és a *Guignardia* nemzetségbe tartozik (Schoch et al., 2006).

A kórokozó egy hemibiotróf endoparazita, amely ivartalan és ivaros életcikluson megy keresztül (1. ábra). A gomba piknídium vagy pszeudotécium formában telel át a növény számos részén, különösen a gyümölcsmúmiákon, rügyekben, vesszőalapban, a tőkén vagy a talajon maradt fertőzött növényi részeken. Tavasszal a piknídium konídiumokat, a pszeudotécium pedig aszkospórákat hoz létre. Ezek okozzák a fiatal levelek vagy bogyók elsődleges fertőzését (Wilcox et al., 2015). Ily módon a gomba a fertőzött növényi maradványokban 2 évig is fennmaradhat (Sosnowski et al., 2012). A tavaszi esőzések felszabadítják az áttelelő struktúrákban található aszkospórákat és konídiumokat. Az aszkospórák lassan csíráznak (a csírázás 36–48 órát vesz igénybe), majd behatolnak a fiatal növényi sejtekbe. Fertőzés csak heves, tartós esőzések és 15 óránál hosszabb ideig tartó levélfelület nedvesség esetén lehetséges (Müller et al., 1930).

Körülbelül 14 nappal később barnás elváltozások figyelhetők meg a leveleken, amelyeken a fekete, ivartalan termőtestek, a piknídiumok jelennek meg (Hoffman et al., 2002; Dula, 2012). A piknídiumok körkörös alakban a fertőzött hajtásokon vagy bogyókon is megtalálhatók. A piknídiumokban aszexuális spórák, piknokonídiumok képződnek, amelyek a növény minden részét megtámadhatják (Agrios, 2005). Ahol egy levél vagy bogyó megfertőződik, ott piknídiumok képződnek, amik konídiumokat termelnek, hozzájárulva a nyári esőzések során az ismétlődő fertőzési ciklusokhoz (Wilcox et al., 2015). A nekrosis túlnyomórészt azokon a szöveteken jelentkezik, amelyek a növekedési fázisban vannak (Jabco et al., 1985). A fertőzés július végén kezd csökkenni és augusztus végén eltűnik (Spotts, 1980).

A gazdaszervezet feketerothadás kórokozó általi sikeres fertőzéséhez a konídiumok kötődése előfeltétel (Kuo és Hoch, 1996), továbbá megfelelő hőmérséklet és páratartalom szükséges (Spotts, 1977).

Az aszexuális spórák tapadását a növényfelület nedvességének viselkedése határozza meg. Erős összefüggés van a csírázási sebesség és a növényi felület hidrofób jellege között (Shaw et al., 2006). Ugyanakkor a  $\text{Ca}^{2+}$  jelenléte is döntően befolyásolja a spórák csírázását. Ha az ioncsatornákon keresztül nem jut  $\text{Ca}^{2+}$  a spórába, akkor a csírázás nem megy végbe (Shaw és Hoch, 2000).

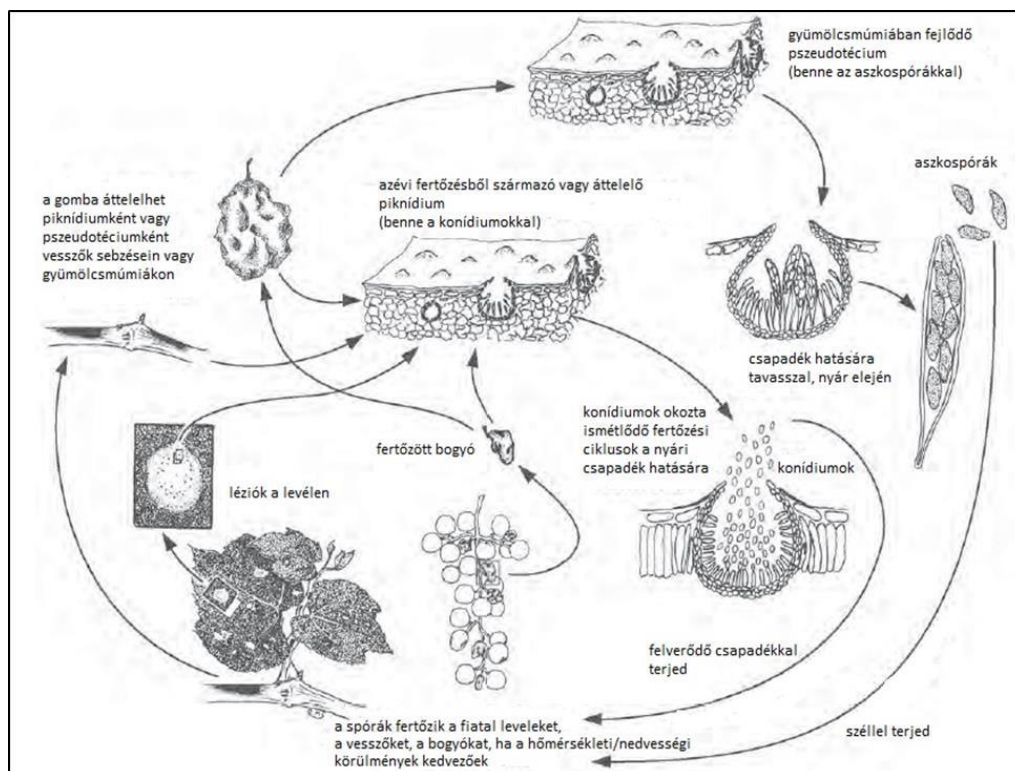
A fertőzés lokalizálásán kívül fontosak a környezeti feltételek is. A feketerothadás fertőzéshez folyamatosan nedves levélfelületre van szükség, minél alacsonyabb a hőmérséklet, annál hosszabb

ideig (1. táblázat). A nedves levélfelület egyben azzal is jár, hogy a levélen kialakuló vízcseppek megfolynak és ekkor a spórákat is magukkal viszik.

1. táblázat: A feketeerőthadás fertőzéshez szükséges folyamatos levélfelület-nedvesség időtartama a hőmérséklet függvényében (Dula, 2012)

| Hőmérséklet (°C) | Folyamatos levélfelület<br>nedvesség (h) |
|------------------|------------------------------------------|
| 10               | 24                                       |
| 13               | 12                                       |
| 15               | 9                                        |
| 18               | 8                                        |
| 21               | 7                                        |
| 24               | 7                                        |
| 27               | 6                                        |
| 30               | 9                                        |
| 32               | 12                                       |

A csírázás során egy apresszórium képződik, amelynek segítségével a gomba a kutikulán keresztül behatol a levélbe és addig nő a felső epidermisz sejtfalai között, amíg a sejtek körülbelül 14 nap múlva össze nem omlanak (Luttrell, 1946; Ullrich et al., 2009). A kórokozó biológiájáról már sok ismeret felhalmozódott. Ullrich és munkatársai (2009) mikroszkópos vizsgálatokkal követték a gomba életciklusát a növényen és a növényben. Arra vonatkozóan, hogy csíratömlők növekedése a fogékony és az ellenálló genotípusok levelén mennyire eltérő, még nem közöltek eredményeket.



1. ábra: A *Guignardia bidwellii* kórokozó ivaros és ivartalan fertőzési ciklusának menete (Wilcox, 2003 nyomán)

### 3.1.4 A *Guignardia bidwellii* által okozott tünetek

A kórokozó a szőlő növekvő zöld részein (levél, hajtás, fürt) mutat tüneteket, azonban nem egyenlő mértékben (Molitor és Berkelmann-Loehnertz, 2011). A leveleken tavasszal és nyár elején 1-2 héttel a fertőzés után apró, kerekded vagy kissé szegletes, barnás-vöröses foltok válnak láthatóvá sötét szegéllyel (2. ábra). Az eredetileg krémszínű elváltozások fokozatosan sötétednek és végül a levél felső oldalán vörösesbarna színt kapnak (Kong, 2009). A levél színén található foltok szélén fekete, esetenként koncentrikus körökben elhelyezkedő piknidiumok (átmérője 59–196  $\mu\text{m}$ ) jelennek meg. Egy levélen több folt is kialakulhat, melyek néha összefolynak. Olykor a levélnyél is fertőződhet. Ekkor ovális barna foltok mutatkoznak rajtuk, bennük piknidiumok fejlődhetnek. A hajtásokon nagyobb, sötétebb, ovális, enyhén besüppedő foltok jelennek meg, a szakadozott bőrszövet felületén piknidiumok láthatóak. A kacson és a fürtkocsányon is kialakulhatnak apró foltok (Molitor et al., 2015).



2. ábra: *Guignardia bidwellii* okozta tünet Kékfrankos szőlő levelén (Saját felvétel, 2020)

A kórokozó jelentőségét növeli, hogy teljes fürtpusztulást okozhat, bár a fürt ritkán fertőződik teljes egészében (3. ábra). A fürt korán, akár a sapka lehullása után röviddel megfertőződhet. A legnagyobb kár a szőlőszemeket éri, ahol először fakó színű foltok jelennek meg, melyek rövid időn belül (24-48 óra alatt) megbarnulnak. A bogyók néhány nap alatt dehidratálódnak, felszínük ráncosodik, végül a termés 1-2 hét alatt szénfeketére mumifikálódik. A töppedt bogyók felülete érdes tapintású a bőrszövet alatt képződő fekete piknídiumok tömegétől. Jellemző, hogy a fürt bogyóit a kórokozó nem egyszerre támadja meg, ezért a beteg fürtön szabálytalanul váltakoznak az egészséges, a betegség kezdetét tükröző, a ráncosodni kezdő, végül az összetöppedt, elszáradt bogyók. A mumifikált bogyók általában erősen kötődnek a fűrthöz (Wilcox és Hoffman, 2015). A szőlőtőkék az időjárási körülményektől függően a virágzás után 1–5 héttel a leginkább fogékonyak a feketerothadásra (Hoffman és Wilcox, 2002).





3. ábra: Feketerothadás tünet Danubius szőlőfajta fürtjén (Saját felvétel, 2020)

### **3.2 A szőlő feketerothadása elleni védekezés lehetőségei**

A szőlő növényvédelmét a feketerothadás ellen integrált módon kell végrehajtani, kiemelten kezelve a természetes szabályozó tényezők alkalmazását. Az integrált betegség-kezelésben előtérbe kerülnek azok a megelőző intézkedések, amelyek pozitívan befolyásolják a növények állapotát és az agroökoszisztéma stabilitását. Különösen olyan megelőző lépésekre van szükség, amelynek célja a növekedés optimalizálása és ezáltal a szőlőnövény megbetegedésre való hajlamának csökkentése, a fertőzés terjedéséhez szükséges kedvező feltételek korlátozása.

#### **3.2.1 Agrotechnikai megoldások**

Az integrált szőlőtermesztés során fontos a megfelelő agrotechnikai intézkedések alkalmazása, melyek korlátozzák a betegség terjedésének lehetőségeit. Így a feketerothadás elleni védekezésben a termőhely megválasztása, a fajta, a sorirányok kialakítása, szellős tőkeforma és ültetvény kialakítása, a zöldmunkák időben történő elvégzése, az ültetvény, és az azt körülvevő terület gyommentesen tartása, valamint a metszés után keletkezett növényi maradványok azonnali megsemmisítése nyújthat védelmet (Glits és Folk, 2000).

Egyéb termesztési gyakorlatok szerint az elsődleges fertőzési forrás csökkentésére ajánlott a mumifikálódott fürtök eltávolítása a téli metszés során (Gadoury, 1993). Becker és Pearson (1993) 25-35%-kal csökkentette a fürtfertőzés súlyosságát, amikor a bogyómúmiákat eltávolították a vesszőkről. Emele és munkatársai (1999), valamint Hoffman és munkatársai (2004) szintén megfigyelték, hogy a gyümölcsfertőzés jelentősen megnő, mikor a múmiákat a tőkén hagyták, összehasonlítva azokkal a parcellákkal, ahol ezeket eltávolították. Emiatt ajánlott a fertőzött múmiák talajba forgatása, főként azokban a szőlőültetvényekben, amelyekben gyakran lép fel feketerothadás fertőzés, vagy amelyeket organikusán művelnek (Myers, 2006; Sosnowski et al., 2012). A szőlőterületek fertőzésének csökkentése érdekében az elhagyott szőlőültetvényeket kezelni kell, vagy fel kell számolni (Harms et al., 2005; Gessler és Jermini, 2009).

A szőlőnövény betegség iránti fogékonyságát csökkenti a kiegyensúlyozott tápanyagbevitel és a nitrogéntúladagolás kerülése. Továbbá minden olyan intézkedés fontos, ami korlátozza vagy megakadályozza a szőlőbogyók, fürtök fizikai károsodását.

### **3.2.2 Kémiai védekezés**

A vegyszeres védekezésre a peronoszpóra és lisztharmat ellen is alkalmazott hatóanyagcsoportok általában eredményesen alkalmazhatók. A feketerothadás ellen jóváhagyott peszticidek a strobilurinok, triazolok és ditiokarbamátok hatóanyagcsoportjába tartoznak (Molitor, 2009). Az alkalmazott hatóanyag és kijuttatásuk időzítése befolyásolja a feketerothadás elleni küzdelem hatékonyságát (Ramsdell és Milholland, 1988; Emele et al., 1998; Hoffman et al., 2002). A *Guignardia bidwellii* elleni védekezés szempontjából a legkritikusabb időszak a nagyjából 10 cm-es hajtáshossztól kezdve a bogyók zsendüléséig tart (Ramsdell és Milholland, 1988). Emele és munkatársai (1998) kéthetes időközönként végeztek fungicides kezelést a virágzás előtti 4. héttől a virágzás utáni 8. hétig. Megfigyelték, hogy a virágzás utáni első 4 hét a kritikus időszak a fertőzés visszaszorítása szempontjából. Hoffmann és munkatársai (2004) a gombaölőszerek alkalmazásának különböző stratégiáit értékelte a feketerothadás által súlyosan érintett amerikai szőlőültetvényeken. A kezeléseket 25 cm-es hajtáshosszon, közvetlenül a virágzás előtt, valamint 2 és 4 héttel a virágzás után hajtották végre, amivel a kórokozót sikerült teljesen visszaszorítani. Gessler és Jermini (2009) megerősítették, hogy két, jól időzített permetezés megfelelő gombaölővel elegendő ahhoz, hogy a fürtökön teljes mértékben megelőzzék a fertőzés kialakulását és elkerüljék a termésveszteségeket. Harms és munkatársai (2005) megfigyelték, hogy az 5-7 kiterült levél állapottól kezdődő, a fürtzáródásáig tartó fungicides kezelés megfelelő védelmet biztosított a feketerothadás ellen. Ramsdell és Milholland (1988) szerint a feketerothadás elleni

gombaölő szerek alkalmazása nem szükséges, ha a szőlőbogyóban már több mint 5% cukor halmozódott fel.

Az organikus szőlőültetvényekben réz alapú készítményeket vagy réz és kén vegyületeket, például Bordóilé-keveréket alkalmaztak a feketerothadás megelőzésére, valamint a lisztharmat és a peronoszpóra visszaszorítására (Dufour, 2006). A réz- és kénvegyületeket preventív jelleggel lehet alkalmazni úgy, hogy a fertőzési periódus előtt jelen legyenek a növény felszínén. Luttrell (1946) megállapította, hogy négy Bordóilé-keverékkel végzett kezelés (kettő virágzás előtt, egy a kötődés után és egy, amikor a gyümölcsök zöldborsó nagyságúak) elegendő volt a termésveszteség elkerülésére. Hoffman és Wilcox (2003) mesterségesen fertőzött dugványokkal végzett *in vitro* kísérletben értékelték a miklobutanil és az azoxistrobin fertőzés utáni aktivitását. Megfigyelték, hogy míg az azoxistrobin esetében a fertőzés utáni hatékonyság 60% volt, a miklobutanil a fertőzést követő 6 napban alkalmazva a léziók kialakulását teljesen megakadályozta. Ditiokarbamátok (mankoceb és metiram) alkalmazásakor 77-98%-os, strobilurinoknál (azoxistrobin, kreloxim, piraklostrobin és trifloxistrobin) 95-100%-os, az azolok (penconazol, tebukonazol, fluquinkonazol, miklobutanil) alkalmazásánál 91-100% közötti hatékonyságot figyeltek meg (Harms et al., 2005).

Rinaldi és munkatársai (2012) azt feltételezték, hogy a kórokozó hirtelen terjedése azokon a területeken, ahol korábban szinte ismeretlen volt, összefüggésben lehet a fungicidek alkalmazási intervallumainak változásával, az alkalmazott fungicidek típusával vagy az elhagyott szőlőültetvények növekvő számával. A betegség növekvő előfordulása miatti aggodalom nemrégiben arra készítette az európai kutatókat, hogy növényvédelmi előrejelző rendszereket hozzanak létre a betegség jobb kontrollja érdekében (Molitor et al., 2016; Onesti et al., 2016).

### 3.2.3 A kórokozó előrejelzése

Védekezés szempontjából fontos tényező a betegség előrejelzése, amelyhez ismerni kell a lappangási időt, valamint a fertőzéshez szükséges környezeti faktorokat.

Maurin és munkatársai (1991) kifejlesztettek egy előrejelzési modellt, hogy megóvják a szőlőt a *Guignardia bidwellii* fertőzésekkel szemben Franciaországban. A modell a relatív páratartalom, a csapadékmennyiség és a hőmérséklet adatait használja a feketerothadás kockázati szintjének előrejelzésére, két tesztév során képes volt előrejelezni a betegség kialakulása számára kedvező időszakokat. Amerikában az előrejelzéshez kidolgoztak egy szabadföldi körülményekre érvényes hőfoknap modellt, mely a napi középhőmérsékletet veszi alapul (a hőmérséklet minimumából és

maximumából számítva) 7°C és 26°C hőmérsékleti küszöbvel. A fertőzéstől az újabb inokulum kialakulásához szükséges időtartamot hőfoknapokban (DD) határozták meg a tenyészidő különböző szakaszaiban. Meghatározták, hogy a levéltünet megjelenéséig 196-248 DD szükséges, valamint a levélfoltokból történő spóra kiszóródás 400 DD értéken érte el a maximumot (Northover et al., 1997). Smith (2009) egy tanácsadó rendszert dolgozott ki a szőlő növekedési stádiumához kapcsolódó érzékenység alapján. A rendszer alkalmazása átlagosan körülbelül 45%-kal csökkentette a fungicid kezelések számát. Smith (2012) tovább fejlesztette a rendszert egy másodfokú egyenlet kidolgozásával, amely kiszámította a feketerothadás fertőzéséhez szükséges párás órák számát (relatív páratartalom > 85%) a napi hőmérséklet függvényében. Magyarországon a feketerothadás fertőzések előrejelzéséhez a BASF által működtetett előrejelzési rendszer ad információt (<https://defenso.hu/szolo>)

### **3.2.4 A szőlő rezisztencianemesítése**

Új rezisztenciaforrások azonosítása és felhasználása elengedhetetlen a rezisztencianemesítéshez. Az azonosított rezisztenciaforrások segítségével támogathatjuk többek között a feketerothadásra toleráns vagy rezisztens szőlőfajták nemesítését és ezáltal növelhetjük a szőlő védekezőképességét.

A szőlő rezisztencianemesítése Észak-Amerikában indult el, az ott őshonos, helyi károsítóknak ellenálló szőlőfajták szelektálásával. Az amerikai fajok mind az egymás közötti, mind az európai fajtákkal való keresztezésével fajhibrideket, úgynevezett interspecifikus hibrideket állítottak elő. A *Vitis vinifera* L. Eurázsiaiában a jelenlegi növényvédelmet meghatározó kórokozók (lisztharmat, peronoszpóra, szürkerothadás, feketerothadás stb.) nélküli környezetben fejlődött ki, ezért alig képes ellenállni ezeknek a számára ismeretlen betegségeknek, amelyek az amerikai hibridek vesszőivel érkezhettek Európába.

Ezek a kártevők és kórokozók drámai módon megváltoztatták az európai szőlőtermesztés sokezer éves gyakorlatát. Megjelenésük következtében jelentős nemesítési tevékenység indult meg. A 19. század első felében az Amerikában előállított filoxéra, peronoszpóra és lisztharmat ellen ellenálló *Vitis labrusca* fajták Európában direkttermő néven váltak ismertté. Ezek a direkt termők (Delaware, Elvira, Izabella, Othello, stb.) nevüket onnan kapták, hogy a filoxéra elterjedését követően saját gyökéren is megéltek, szemben az európai fajtákkal, amik csak oltványként voltak termeszthetők. E fajták nagy része közepes borminőséget mutatott, magas rezisztencia-jellemzőkkel kombinálva (Reynolds, 2015).

A 19. század végén a kártevők és kórokozók elleni küzdelemben megkezdett tevékenységek mellett elkötelezett szőlészek is megkezdtek saját nemesítési programjaikat a direkttermő fajták minőségének javítása és a filoxéra okozta problémák megoldása érdekében. A nemesítési tevékenység évtizedekig tartó folytatása következtében, Husfeldt volt az első, aki bebizonyította, hogy az ellenálló képesség és a minőség kombinálható (Alleweldt, 1977). A 19. század végén, a 20. század első felében az alanynemesítéshez és a gombabetegségekkel szemben ellenálló fajtáknál amerikai szőlőfajokat használtak rezisztenciaforrásnak. Az alanynemesítésben elsősorban a *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, valamint a *V. cinerea* és a *V. monticola* fajokat használták fel (Alleweldt és Possingham 1988). Az ázsiai génállomány, amely nehezen hozzáférhető volt, szintén felhasználható az ellenálló képesség javítására. Különösen a *V. amurensis*-t alkalmazták a nemesítési programokban, de más kelet-ázsiai szőlőfajokról is kiderült, hogy számos kórokozóval szemben jelentős mértékű rezisztenciával rendelkeznek (He és Wang, 1986, Wan et al., 2007). A 19. század közepéig főként francia szőlőnemesítők (Seibel, Couderc, Seyve-Villard, Baco) foglalkoztak az észak-amerikai szőlőfajták és az európai fajok keresztezésére alapozott ellenálló fajták létrehozásával. A legismertebbek közülük a Baco 1, Couderc 503 (Százszoros), Seyve-Villard 5276 (Seyval blanc), Seyve-Villard 12375 (Villard blanc), Seyve-Villard 18315 (Villard noir). Az általuk létrehozott számos fajtát franko-amerikai hibrideknek nevezzük. Ezekre a hibridekre alapozva indult a 20. század második felében a rezisztencia nemesítés újabb korszaka, többek között Magyarországon is. Ebben az időben olyan fajták születtek, mint a Pölöskei muskotály, Teréz (Hajdu és Ésik, 2001), a Csillám, Duna gyöngye, Palatina, Viktória (Kozma et al., 1986), vagy a Bianca, Medina, Nero és Zalagyöngye fajták (Csizmazia és Bereznai, 1968). Ezeknek a hibrideknek a betegség-ellenállósága elmaradt az amerikai ősök rezisztenciájától, ráadásul termésminőségük sem érte el a kívánt színvonalat. Az amerikai vad fajok gombabetegségekkel szembeni rezisztenciája ugyanis poligénes öröklődésű, és a rezisztencia szintje a rezisztenciát befolyásoló gének együttes jelenlététől függ. A keresztezés során a gének véletlenszerű kombinációjának csak kicsi az esélye olyan nagy ellenállóságú utódok előállítására, amik még a minőségi elvárásoknak is megfelelnek (Boubals, 1961).

A klasszikus nemesítésben az utódokat fenotípusuk alapján választják ki. Az értékelés azonban nagyon időigényes és költséges. A hagyományos fenotipizálás a leveleken vagy levélkorongokon történő természetes vagy mesterséges fertőzés utáni rezisztencia értékelésén alapul. Általában a peronoszpórával szembeni részleges rezisztencia *in vitro* szűrése a levéllemez biológiai vizsgálatain (Bavaresco és Eibach, 1987), valamint a rezisztencia mértékének vizuális pontszám alapján történő értékelésén (OIV-skála: OIV 452-1 szerint) alapul. A szőlő *Plasmopara viticola*-

tól eltérő gazda-patogén rendszerekben, a rezisztencia-komponensek mérése hatékonyan támogatja a részleges rezisztenciát mutató növényi genotípusok értékelését, egy olyan rezisztenciát, amely a fertőzési ciklus több szakaszát érinti (Schwanck et al., 2016). A rezisztencia-komponensek elemzése a rezisztencia fenotípusos elemzésén alapszik, amely klasszikusan magában foglalja a spórafertőzések hatékonyságát, a látens periódus időtartamát (azaz a fertőzéstől a sporuláció kezdetéig eltelt idő), az elváltozás méretét és a spórák termelését (Van der Plank, 1963; Zadoks, 1972).

Bár a hagyományos nemesítést alkalmazó hibridizációs folyamat több évet igényel, de a genetika, a marker támogatott szelekció (MAS), a genetikai kapcsoltsági térképek, a *Vitis vinifera* L. genomszekvencia elérhetősége és a rezisztencia gének ismerete mind segítik a nemesítőket az új rezisztens fajták kiválasztásában. Ezen módszerek mellett a hatékony fenotipizáló eszközöknek is döntő szerepük van (Eibach et al., 2007; Töpfer et al., 2011).

A marker támogatott szelekció (MAS) egy modern eszköz, amelyet a nemesítők a kívánt tulajdonságokkal társított bizonyos genotípusú utódok szűrésére használnak (Boopathi, 2013a). A csemegeszőlőben a MAS-t alkalmazták az utódok magtalanságának kiválasztására (Karaagac et al., 2012). A MAS-nak számos előnye van a hagyományos növénynemesítési megközelítésekkel szemben. Csíranövényeken is elvégezhető, hogy csökkentse az utódok genotipizálásának idejét (Boopathi, 2013b). A hagyományos nemesítési programokban az egymást követő nemzedékek között eltelt idő költséges és korlátozó tényező lehet. Ez különösen igaz a hosszú életű, évelő növényekre, mint például a szőlő, amelynek gyümölcsét az ültetés után 3-7 évig nem lehet értékelni (Myles et al., 2011). A MAS alkalmazható a növény kórokozókkal szembeni, környezeti feltételektől független rezisztenciájának értékelésére is. Ehhez az értékes rezisztencia tulajdonságú jelölteknek rendelkezésre kell állniuk (Boopathi, 2013b). Ez fontos, hisz az a cél, hogy a szőlőnemesítési program javítsa a gombarezisztenciát (Reisch et al., 2012). Az egy populációra kifejlesztett markerek nem feltétlenül vihetők át más genetikai háttérbe (Boopathi, 2013b; Myles et al., 2011). A MAS sokféle módon beépíthető a növénynemesítési programokba. A marker támogatott génpiramidálás az a folyamat, amikor több különböző (két vagy több forrásból származó) allélt visznek a genomba ugyanazon célból (például egy adott kórokozóval szembeni több különböző rezisztencia gént). Az utódpopulációkat genotipizálják és szelektálják, hogy az összes kívánt markert hordozzák-e az egyedek (Boopathi, 2013b). A kórokozók képesek áttörni egy rezisztencia gént, ezért a génpiramidálás széles spektrumú, de elsősorban tartós ellenállóképességet tudnak biztosítani azáltal, hogy a kórokozóban kialakuló esetleges

rezisztenciatoró mutáció a másik rezisztencia génnek köszönhetően nem jelent szelekciós előnyt a rezisztenciatoró törzs számára, ezért a populációgenetika törvényei szerint a gomba populációból pár nemzedéket követően akár el is tűnhet. A leghatékonyabb génpiramidálási programokban a rezisztencia géneket több QTL-lel (quantitative trait locus - mennyiségi tulajdonságokat meghatározó lokuszok) kombinálják, amelyek további biztosítékot adnak a magas szintű tartós rezisztencia kialakításához (Collard és Mackill, 2008). Az ázsiai szőlőfaj, a *Vitis amurensis* rendelkezik pl. a peronoszpóra ellenálló képességet meghatározó *Rpv10* és *Rpv12* rezisztencia lókuszokkal, és arra használták, hogy ezt a rezisztenciát az észak-amerikai vadfajokból származó *Rpv3* lókuszokkal kombinálva fokozzák az ellenálló képességet *Vitis vinifera* fajtákban (Venuti et al., 2013; Schwander et al., 2012; Di Gaspero et al., 2012).

A legtöbb gombarezisztencia és sok más agronómiai tulajdonság kvantitatív tulajdonság (Doligez et al., 2002). A szőlő genom számos olyan gént hordoz, amelyek összefüggenek a rezisztenciával (Velasco et al., 2007). A rezisztenciát okozó QTL azonosításával lehetőség van összehasonlítani a rezisztencia lókuszokat a referencia genommal. Ezenkívül a QTL régió szekvenálásával és az azt követő gén annotációval a védekezési mechanizmusokban fontos génjelöltek nyerhetők. A szőlő két legfontosabb kórokozójával (lisztharmat és peronoszpóra) szembeni rezisztenciájával kapcsolatban már nagyszámú QTL-t azonosítottak, és kapcsolt molekuláris markereket fejlesztettek ki. Ezen markerek közül sokat már sikeresen alkalmaznak a rezisztencia tulajdonságok korai kiválasztásához (Eibach et al., 2007). A feketerothadással szembeni ellenállás kvantitatív jellemző. Az expresszió nemcsak két formában, hanem fokozatosan változó fenotípusokban fordul elő (Mackay, 2001). A feketerothadás ellenálló képesség tekintetében QTL-elemzéseit Rex már 2012-ben elvégezte. Munkájában sikeresen igazolta a feketerothadás rezisztencia QTL-k jelenlétét a 'Börner' fajtában. A QTL-eket térképezés segítségével a 14-es és 16-os kromoszómán helyezték el, majd a közeli kapcsolt markerek fejlesztésébe kezdtek. A *Guignardia bidwellii* kórokozóval fertőzött térképezési családot a fogékony *Vitis vinifera* L. hibrid, a 'V3125' ('Schiava grossa' x 'Rajnai rizling') és a rezisztens 'Börner' keresztezéséből állítottak elő. Az elvégzett rezisztencia tesztek és szabadföldi fertőzések segítségével készített genetikai térkép alapján megállapították, hogy az egyik QTL a 14-es kapcsoltsági csoportban helyezkedik el (*Rgb1*). Ez 21,8%-ban magyarázza a fenotípusos variációt (LOD 10.5). Egy másik QTL pedig a 16-os kapcsoltsági csoportban helyezkedik el (*Rgb2*; LOD 4.2), ami 8,5%-át magyarázza a fenotípusos variációt. A térképezési családban megfigyelt két fő QTL és több kis QTL együtt arra enged következtetni, hogy az ellenálló 'Börner' fajta a *Guignardia bidwellii*-vel szemben poligénes rezisztenciával rendelkezik (Rex et al., 2014). Ugyanakkor Farkas és munkatársai (2018) vizsgálatai alapján a differenciált expressziót mutató gének között egy sem

található a szőlő 14. kapcsoltsági csoportjának korábban azonosított QTL régiójában. Kutatók összefüggést találtak a feketerothadással szembeni QTL és a liztharmattal szembeni ellenállás, valamint a fitoalexinek szintézise között (Dalbó, 1998).

A peronoszpórával (*Plasmopara viticola*) szembeni rezisztencia források felfedezése óta (Munson, 1909; Olmo, 1971) számos nemesítési programot fejlesztett ki annak érdekében, hogy olyan szőlőhibrideket hozzanak létre, amelyek a vad szőlőfajok betegségellenálló génjeit kombinálják azokkal a kívánt agronómiai és szőlőminőségi tulajdonságokkal, amelyeket a *Vitis vinifera* L. fajták hordoznak. A 20. század elejétől számos betegségellenálló, jó termésminőséggel rendelkező szőlőfajta lett kiválasztva nemesítők által (Golodriga, 1978; Alleweldt, 1980; Bouquet, 1980; Kozma, 2002). Néhány intézmény világszerte aktívan részt vesz ezekben a nemesítési programokban. Többek között a Cornell Egyetem, az UC Davis és a Florida AM Egyetem az Egyesült Államokban, több tudományos intézmény Kínában, a CSIRO Ausztráliában, a Krasznodari Egyetem Oroszországban, a JKI Gelweilerhof Németországban, INRA és IFV Franciaországban, az Udine Egyetem, a FEM és CREA-VE Olaszországban, valamint a Pécsi Tudományegyetem Magyarországon (Bavaresco, 2019). A rezisztens genotípusok használata azonban még mindig kis területre korlátozódik. Jelenleg a rezisztens szőlőhibridek a világ szőlőtermesztési felületének körülbelül 6% -át teszik ki.

Bár kezdetben a nemesítési programok eredményeként előállított fajták borminősége nem volt kielégítő a borászok számára, a kitartó nemesítési munka a komplex rezisztencia kialakítása mellett a borminőség jelentős javulását hozta. Az Európai Unióban (EU) az 1308/2013/EK rendelet kimondja, hogy lehet termesztetni rezisztens fajtákat asztali és OFJ borok előállításához, de OEM borok esetében csak *Vitis vinifera* L. a megengedett. Ebben a tekintetben, az EU-ban a helyzet nem egységes. Például Németország az új, betegségekkel szemben ellenálló fajtákat az *Vitis vinifera* L. fajhoz sorolja, ellentétben Olaszországgal és Franciaországgal. Ez a helyzet minden bizonnyal belátható időn belül meg fog változni. Az interspecifikus rezisztens fajtákat nem származásuk, hanem kizárólag minőségük alapján kellene megítélni (Myles, 2013).

### **3.2.5 Potenciális rezisztenciaforrások a szőlő feketerothadással szemben**

Napjainkban a szőlő rezisztenciakutatások többnyire a vad *Vitis* fajokra irányulnak. Ezek a növények a kórokozókkal való koevolúció eredményeként értékes ellenálló képességért felelős géneket hordoznak. Rezisztencia-forrásként elsősorban az észak-amerikai *Vitis* fajok, valamint ezek rezisztenciáját még hordozó interspecifikus hibridek jöhetnek számításba (Barrett, 1955;

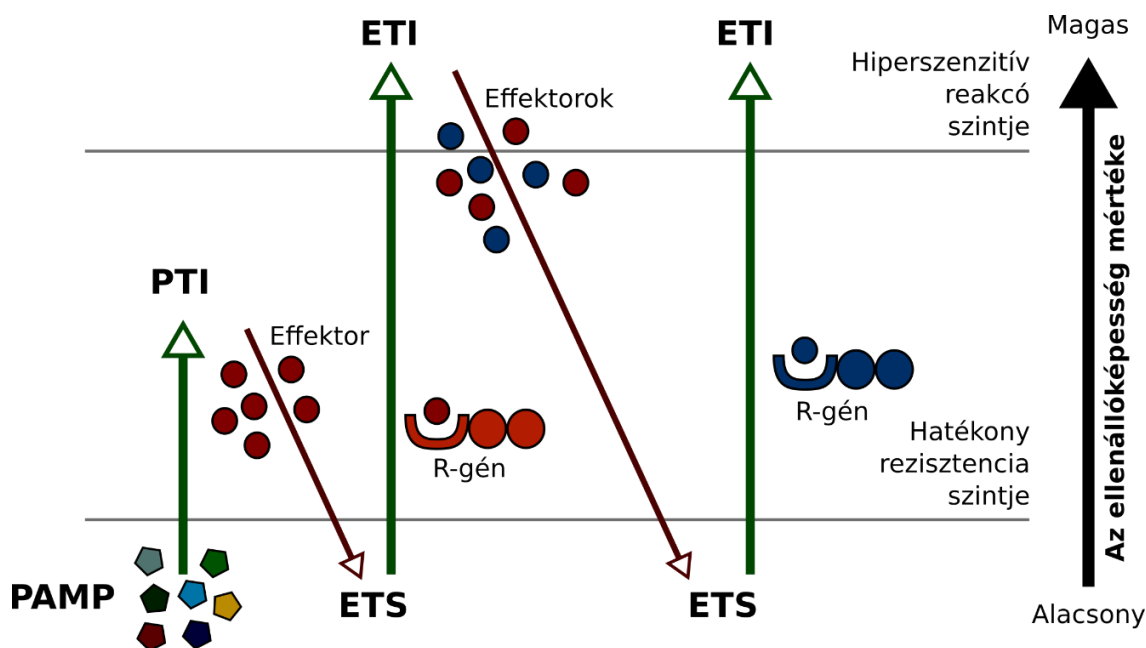


Hausmann et al., 2017). A feketerothadással szemben ellenálló szőlőfajták és szőlőfajok a 'Börner' (*Vitis riparia* Gm x *Vitis cinerea* Arnold), az 'Illinois 547-1' (*V. rupestris* B38 x *V. cinerea* B9) a 'Merzling' (Seywal x Freiburg 379-52) és a 'Seibel 7053' (Seibel 5163 x Seibel 880) (Dalbó et al., 2001; Kiss et al., 2017). Már a 2010-es hazai járvány után kiderült, hogy az id. Dr. Kozma Pál és munkatársai által a Kertészeti Egyetemen nemesített 'Csillám' szőlőfajta magas fokú feketerothadás ellenállóképességgel rendelkezik. Az eredeti források szerint Rayon d'or (Seibel 4986) × Kékfrankos szülők keresztezéséből származó fajta feketerothadással szembeni kiemelkedő levél és fürt rezisztenciáját részletes fajtaösszehasonlító vizsgálatok igazolták (Roznik et al., 2017a) és a fajtát bevonták a PTE SZBKI rezisztencianemesítési programjába (Roznik et al., 2017b; Kozma, 2019). Németországban a 'Börner' (Rex et al., 2014) és a 'Villard Blanc' (Hausmann et al., 2017) rezisztenciaforrások felhasználásával a lokuszok térképezésére is sor került. A keresztezett V3125 x 'Börner' populációt olyan molekuláris markerek kifejlesztésére használták, amelyek korrelálnak a feketerothadással szembeni rezisztenciával. A V3125 tenésvonal a két hagyományos Trollinger és Rajnai rizling fajta keresztezéséből származik, amelyek jó borminőséget nyújtanak, de érzékenyek a feketerothadásra. A 'Börner' a *Vitis riparia* Gm183 és *Vitis cinerea* Arnold hibridje, és filoxérerezisztens alanyként használják (Hafner, 1998; Schaller, 1966). Mindkét fajról ismert, hogy a feketerothadással szemben ellenálló (Demaree et al., 1937). A rezisztencia biológiai alapjai, a gazda patogén kapcsolat részletei még nem kellően feltártak (Pirrello et al., 2019).

### **3.3 A szőlő védekezőmechanizmusai a kórokozók ellen (növény-patogén interakciók)**

A növények evolúciójuk során különböző mechanizmusokat fejlesztettek ki, hogy alkalmazkodni tudjanak a számukra kedvezőtlen abiotikus és biotikus környezeti hatásokhoz. Ezek egyfelől lehetnek a szőlőnövényen, szőlőnövényben permanensen jelen lévő passzív védelmi eszközök, másfelől kialakulhatnak dinamikusan funkcionáló, szabályozható védelmi rendszerek, amelyeket indukált rezisztenciának nevezünk. Ezek a rendszerek külső stresszhatásokra stimulálódnak, amelyre a megfelelő sejtválaszt generálják. Mindezt a sejtfelszínen vagy a citoplazmában található receptoroktól kapott és a sejtmagban elhelyezkedő transzkripciós mechanizmusba átvitt ingerekkel teszik lehetővé, különféle jelátviteli utak segítségével. Az indukált rezisztencia olyan jelátviteli utakat kontrollál, amelyek konstitutív módon, gyorsan reagálnak a kórokozókra a fertőzés helyén (Dangl et al., 1996). Ezek a struktúrák olyan védelmi mechanizmusokat foglalnak magukba, mint a hiperszenzitív reakció, a sejthalál (Venuti et al., 2013; Zyprian et al., 2016), a kallóz és lignin

felhalmozás (Dai et al., 1995; Gindro et al., 2003) az oxidatív stressz (Low és Merida, 1996), a fitoalexinek szintézise (Pezet et al., 2004; Gindro et al., 2006), a sejt nekrózis (Bellin et al., 2009; Zini et al., 2015), a peroxidáz aktivitás indukciója (Toffolatti et al., 2012), a fenolos vegyületek felhalmozódását a fertőzés helyeit körülvevő növényi szövetekben (Alonso-Villaverde et al., 2011), valamint számos enzim fehérje termelése (Dangl et al., 1996). Az indukált rezisztencia legismertebb formái növényekben a szalicilsav (SA) indukálta Szisztémikus Szerzett Rezisztencia (SAR - Systemic Acquired Resistance), a jázminsav (JA), illetve az etilén (ET) jelátviteli utakhoz kapcsolódó Indukált Szisztémikus Rezisztencia (ISR - Induced Systemic Resistance), valamint az abszcizinsav által mediált szignálút, amely leginkább az abiotikus stressztényezők ellen hatékony. Bármely növény-patogén kölcsönhatás eredménye az érzékenység és a rezisztencia tényezők relatív hozzájárulásától függ. A növény-patogén kölcsönhatások bemutatására és evolúciójára az úgynevezett cikk-cakk modell (4. ábra) a leginkább elfogadott (Jones és Dangl, 2006). Ennek alapján a növényi immunrendszer sejtjei a kórokozókra jellemző, általában konzervált szerkezetű mikroba felszíni elicitorokat (PAMP - Pathogen Associated Molecular Pattern) és a mikrobákhoz kapcsolódó molekuláris mintázatokat (MAMP - Microbe Associated Molecular Pattern) detektálnak mintázatfelismerő receptoraik (PRR - Pattern Recognition Receptors) révén (Rajamuthiah és Mylonakis, 2014).



4. ábra: A növényi immunválasz úgynevezett cikk-cakk modellje Deák et al. (2018) nyomán. PTI: effektor molekulák által előidézett immunválasz; ETS: effektor molekulák által kiváltott érzékenység; ETI: effektor molekulák által előidézett immunválasz; PAMP: patogénhez köthető molekuláris mintázat; R-gén: növényi rezisztencia gén.

A növény kétféle veleszületett immunmechanizmust alakított ki - a PAMP által kiváltott immunitást (PTI - PAMP Triggered Immunity) és az effektor által kiváltott immunitást (ETI - Effector Triggered Immunity), amelyek gyors reakcióhoz vezetnek a kórokozóval való hosszú távú koevolúció folyamatában (Jones és Dangl, 2006). A PAMP azonosításában főleg az úgynevezett mintázat felismerő receptorok (PRR - Pattern Recognition Receptors) vesznek részt. Ez a génexpressziós változásokhoz köthető rezisztenciaválasz, az első lépcsője a növényi rezisztenciának.

A növényi védelem az evolúció során kialakult konzervált szerkezetű molekulák azonosításán alapulva, tulajdonképpen helyi válaszreakciókkal, növényi sejtpusztulás nélkül megfékezi a patogéntámadást. Ennek érdekében MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) kaszkád aktiváció történik. A növény és kórokozója a koevolúciójuk következtében képessé váltak effektor molekulákkal ezt a védelmi vonalat elnyomni. Ilyenkor nem alakul ki a PTI válasz.

Amennyiben a kórokozó a PTI választ sikeresen elkerüli, bejuttatja effektor molekuláit a megtámadott növényi sejtekbe, amit a növény képtelen időben felismerni. Ezen folyamat eredménye az effektor kiváltotta érzékenység (ETS - Effector-Triggered Susceptibility). Ezután az effektor molekuláknak még át kell jutniuk a gazdanövény második immunmechanizmusán. Ez

az effektor molekulák által kiváltott immunválasz (ETI). Ezek, a PTI-vel szemben, teljesen specifikus felismerési reakciók, amik általában hiperszenzitív reakcióhoz vezetnek.

Például a bakteriális avirulencia gének (Avr) termékeit hatékonyan felismerhetik a növényi rezisztencia gének (R gének), ezért ezt a folyamatot gén a gén ellen (gene for gene) rezisztenciának is nevezik. Ezt a védekezési mechanizmust már látható tünetek kísérik, amelyeket a hiperszenzitív válaszreakció (HR - Hypersensitive Response) okoz. Ez egy programozott, genetikailag szabályozott válasz. A kórokozó valamilyen szignált bocsájt ki környezetébe, amit avirulencia faktornak hívunk. Ennek eredményeként mérgező szabad gyökök és reaktív oxigén származékok halmozódnak fel, amelyek szintén a megtámadott növényi sejt halálát okozzák sejtnekrózis formájában. Ha ezt az avirulencia faktort a gazdanövény észlelni tudja, akkor rezisztens választ ad, inkompatibilis kölcsönhatás alakul ki, a növény nem mutatja a betegség tüneteit. Ha a növény nem tud rezisztencia választ adni, akkor betegség alakul ki, más szóval kompatibilis kölcsönhatás lép fel. Ha van olyan képessége a növénynek, hogy rezisztencia választ tud adni, tehát rezisztencia génnel rendelkezik, akkor a rezisztencia gén kölcsönhatásba lép az avirulencia faktorról kiváltva a növényből az immunválaszt (Nirmala et al., 2007).

A kórokozó életmódja fontos szerepet játszik a gazdanövény reakciójában (Barna et al., 2012). Az alapján, hogy a növényi kórokozók milyen stratégiákat tudnak alkalmazni a megtámadott növény elpusztítására, illetve arra, hogy felhasználhassák az általa termelt szerves anyagokat saját célra, megkülönböztetünk biotróf, hemibiotróf és nekrotróf életmódot.

A nekrotróf kórokozók az elhalt sejtekből nyerik a tápanyagokat, míg a biotróf kórokozóknak élő sejtekre van szükségük táplálkozási igényeik kielégítéséhez. A két véglet között felismerhető egy harmadik táplálkozási típus: a hemibiotrófok. A hemibiotrófok mindkét életmódot adaptálják. A fertőzés kezdetén biotróf életmódot folytatnak, majd a patogenezis előrehaladtával nekrotróf életmódra váltanak (Newton et al., 2010). A fent ismertetett modell elsősorban a biotróf kórokozókkal való kapcsolatot írja le.

A *Guignardia bidwellii* a szőlő feketerothadását okozó gomba hemibiotróf organizmus. Fertőzésének lefutása két részre osztható. Az első, biotróf szakaszban nem látható külső jele a fertőzésnek, amíg az élő sejtek között növekszik és fejlődik a gomba. A fertőzést követő 12-14. naptól, ahogy sűrűbbé válnak a gomba szövetek, a környező szövetek nekrotizálódnak. Ezt követi a második (bomlási) szakasz, amikor a gomba az elhalt, nekrotizált növényi részekben fejlődik tovább. Tehát a gomba képes endotróf és nekrotróf körülmények között is fennmaradni (O'Connell et al., 2012).

A szalicilsav (SA) és a jázminsav (JA) különböző a jelátviteli utat aktiválnak a rezisztenciaválasz során, melyek szabályozzák és befolyásolják a különböző válaszok nagyságát (Kunkel és Brooks, 2002). A biotróf és hemibiotróf kórokozók elleni rezisztencia folyamatokban az SA szignálút játszik fontos szerepet (Grant és Lamb, 2006). A nekrotróf kórokozók elleni indukált növényi védelemben JA jelátviteli út kiemelt jelentőségű (Beckers és Spoel, 2006). A JA antagonistája hatása a SA-függő válaszokra jól ismert (Creelman és Mullet, 1997). Ugyanakkor számos kísérlet kimutatta a SA gátló hatását a JA szignálútra, hiszen a két különböző stratégiájú kórokozó ellen eltérő védelmi választ célszerű indítani (Doares et al., 1995). Bizonyos helyzetekben pedig szinergisztikus módon működik a két szignál rendszer (Mur, 2006). Valójában a kórokozók nem mindig sorolhatók be teljesen egyik vagy másik életmódba. Ráadásul a természetben gyakran előfordul, hogy egy növényt többféle biotikus és abiotikus stressz ér egyidőben, ezért a rezisztencia válaszok jóval összetettebbek. A növényi védelmi válaszokban szerepet játszik még az abszcizinsav (ABA - Absciscic acid) hormon, amely mind pozitív, mind negatív védelmi regulátor szerepet is betölthet. Hatását úgy fejt ki, hogy egy szimultán hidrogén-peroxid felhalmozódást segít elő egy MAPK kaszkádon keresztül (Xing et al., 2008). A klasszikus stressz hormonok mellett egyre többen vizsgálják más, a fejlődésben, növekedésben, vagy a szöveti differenciálódásban jelentős hormonok hatását, mint az auxin, amely a stresszhormonok által kiváltott expressziós válaszokat szabályozza, illetve további más hormonok (brasszinoszteroidok, citokininek, gibberellinek), amelyek szerepe még nem teljesen ismert (Bari és Jones, 2008).

### **3.4 Az RNS szekvenálás technológiája**

A fehérjék és nukleinsavak szekvenciáinak meghatározása a molekuláris biológia egyik legfontosabb feladata. A DNS nukleotid sorrendjének meghatározásához különböző technikákon alapuló módszereket dolgoztak ki.

Az első DNS-szekvenálási módszert Frederick Sanger fejlesztette ki (Sanger, 1975), amiért 1980-ban Nobel-díjat kapott. A Sanger-féle klasszikus láncterminációs technika radioaktívan jelölt DNS primer, egyszálú DNS templát, DNS polimeráz, valamint a dezoxi- és radioaktívan jelzett didezoxinukleotidok segítségével szekvenált DNS-t. Így csak 500 bázist lehet manuálisan leolvasni egyszerre. 1986-ban Smith és munkatársai bevezették a DNS-darabok fluoreszcens jelölését (Smith et al., 1986). A négy különböző bázishoz (A, C, G, T) eltérő színű fluorofort kovalensen kötöttek, így egyszerre lehetett elvégezni a szintézist egy közös csőben. A gélelektroforézis után kapott kromatogramból számítógép használatával nyerték ki a

szekvenciákat. Az 1994-ben kifejlesztett 3' végén módosított dezoxinukleotid-trifoszfát lehetővé tette a bázisspecifikus terminációt, valamint a 3' protektív csoport hatékony fotolitikus eltávolítását (Metzker, 1994). 1995-ben a korábbiaknál megbízhatóbb fluoreszcens jelölőfestéket fejlesztettek ki, amely az energiatranszfer révén optimálisabb abszorpciós és emissziós értékekkel bírt (Ju et al., 1995). Kheterpal és munkatársai 1996-ban egy, a szekvenciaolvasást automatikusan végző, 4 színű konfokális kapilláris array olvasót használtak szekvenálásaihoz (Kheterpal et al., 1996). Megindult az adatfeldolgozási folyamatokhoz szükséges szoftverek fejlesztése és tesztelése is (Ewing és Green, 1998).

Az elmúlt évtizedekben az élet molekuláris alapjairól, a DNS és RNS néven ismert építőelemekről szóló ismereteink rendkívüli mértékben megnőttek. A fizika, a kémia, a biológia és az informatika technikai áttörései elősegítették az új technológiák kifejlesztését. Így a hatalmas mennyiségű adat szisztematikus elemzése vált az egyik legfontosabb feladattá. A 2000-es évektől a DNS-könyvtárakból klonálisan amplifikált DNS-molekulákat eltérő módszerek segítségével szekvenáló új generációs szekvenálási technológiák (NGS: Next-Generation Sequencing) jelentek meg. Ez drámai módon megnövelte a genetikai információk hozzáférhetőségét, hatalmas mennyiségű genomi adatot generálva. Az NGS egy mindenre kiterjedő kifejezés, amelyet különböző szekvenálási technológiák leírására használnak, mint például az Applied Biosystems, Illumina / Solexa, a Roche 454 vagy az Ion Torrent. Mindezek a modern technológiák lehetővé teszik a DNS és az RNS (pontosabban cDNS) molekulák nukleotidszekvenciájának gyors meghatározását sokkal hatékonyabban, mint a régebbi Sanger szekvenálási technika tette. Az NGS segítségével egész genomokat vagy transzkriptumokat párhuzamosan szekvenálhatunk néhány óra alatt, viszonylag alacsony költségek mellett. Ezért az NGS módszereket nagy áteresztőképességű (HTP: high-throughput) szekvenálási technológiának is nevezik (Metzker, 2010; Goodwin et al., 2016).

Az NGS nem csak a DNS-molekulák szekvenálását teszi lehetővé, hanem egy adott időpillanatban egy biológiai mintában jelen lévő RNS-transzkriptumok szekvenálására is alkalmas. Az RNS-szekvenálás (RNASeq) hatékony módszer az RNS populáció profilozására és mennyiségi meghatározására (Wang et al., 2009). A jelenleg rendelkezésre álló rövid leolvasásokat végző NGS-technikákkal, mint például az Illumina, nem lehetséges az RNS-molekulák közvetlen szekvenálása. Először az RNS-t a szekvenáláshoz komplementer DNS-re (cDNS) kell átírni. Az RNS szekvenálás általános munkafolyamata magában foglalja a teljes RNS kivonását, a minta tisztítását egy bizonyos típusú RNS (például mRNS-ek vagy mikroRNS-ek) dúsítására, és a szekvenáló könyvtár készítését.

A könyvtár létrehozása olyan lépéseket foglalhat magába, mint a hosszabb RNS-molekulák fragmentálása, majd az RNS reverz transzkripciója cDNS-be, az adapterek ligálása a cDNS-fragmensek 5'- és / vagy 3'-végére, valamint PCR-amplifikáció (Corney, 2013). Az RNS-Seq kísérlethől származó leolvasások felhasználhatók bizonyos transzkriptumok gyakoriságának becslésére az egyes szekvenált mintákon belül. Ha különböző körülmények között szekvenálnak, a kapott transzkriptumok gyakoriságát tovább lehet használni a differenciáltan expresszáló gének azonosítására.

Az RNS-Seq megjelenése előtt az átfogó génexpressziós vizsgálatokat hibridizáción alapuló microarray-ekkel végezték. A microarray technológiával ellentétben az RNA-Seq lehetővé teszi az új transzkriptumok azonosítását is, és nem feltétlenül van szükség szekvenált referencia genomra. Továbbá az RNS-Seq lehetővé teszi a transzkriptumok genomszintű elemzését egy pontos nukleotid szinten. Ez magában foglalja az egy pontos nukleotid polimorfizmusok, génfüziók, allélspecifikus expresszió és alternatív splicing jelenségek azonosítását (Corney, 2013).

Az Illumina az egyik legelterjedtebb NGS platform mind a DNS, mind az RNS szekvenálás esetében (Croucher et al., 2009; Goodwin et al., 2016). A nagy pontosság és áteresztőképesség, valamint a folyamatosan csökkenő költségek az Illumina platformot tették a legalkalmasabbá számos biológiai kérdés megválaszolására, beleértve a génexpressziós vizsgálatokat és a (meglehetősen kis) genomok és transzkriptumok összeállítását.

A folyamat a következőképpen zajlik: A szekvenálni kívánt DNS-t, vagy akár a teljes genomot fragmentálják. A dupla szálú DNS két végén a ragadós végeket eltüntetik, és egy adeninnel töldik meg az 3' végeket. Ehhez egy adapter DNS-t ligálnak, mely egy timin túlnyúló véggel rendelkezik. Majd a ligált DNS-darabokat szelektálják és egyszálúsítják NaOH-dal. Ezt követően a mintát felviszik egy szekvenáló lemezre, ahova az adapterrel komplementer oligonukleotidokat (primerek) horgonyoznak ki. A DNS fragmentumokat ezekhez hibridizáltatják. Ezután klasztereket képeznek az egyes szálak között az úgynevezett híd-amplifikációs (bridge amplification) módszerrel és felszaporítják a meghatározni kívánt DNS-szakaszt. A templáthoz egy primert ligálnak, majd a reakcióhoz egyszerre adják hozzá a négy fluoreszcensen jelölt és terminálisan blokkolt nukleotidot. Ha egy nukleotid komplementer módon kötődik a templát szálhoz, akkor egy specifikus fluoreszcencia szín keletkezik és az újonnan hozzáadott bázis azonosítható. A következő ciklus előtt a fluorofórokat lehasítják és kimossák a be nem épült nukleotidokkal együtt, és az egyes nukleotidok 3'-OH csoportját regenerálják. Minden

szekvenálási körben a read-eket egyszerű szöveges karaktersorozatokként elmenti egy FASTQ fájlba (Cock et al., 2010) további feldolgozás céljából.

A legújabb technológiák segítségével ma már elegendő néhány nap és egyetlen készülék ahhoz, hogy egy élőlény teljes genetikai állományát megszekvenálhassuk. A *Vitis vinifera* diploid kromoszómakészlettel rendelkezik ( $2n = 38$ ), és haploid genomja körülbelül 475 Mb méretű (Lodhi és Reisch, 1995), amelyet Jaillon és munkatársai (2007) szekvenáltak.

### 3.5 Mikotoxin termelő gombák, jelentőségük

A szőlőt számos gomba és gombaszerű szervezet képes megtámadni, amelyek befolyással vannak a bogyóra, minőségromlást okoznak, ezáltal befolyásolják a bor ízét. A kórokozók támadása miatt a fertőzött növényi szövet elpusztul, nekrotizáció következik be. Mikor a levelek felületét a gombás betegségek megtámadják, a szőlő asszimilációs képessége csökken, ennek következtében a bogyó minősége is csökken. A leveleken kívül a legtöbb szőlőn előforduló kórokozó a virágzatokat, a fürtöket és a bogyókat is megfertőzi, így csökkentve a hozamot. A bogyón lévő fertőzések a gyümölcsszövet bomlását eredményezik. A bogyók fertőzés általi minőségére gyakorolt tényleges hatásai azonban annak érési szakaszától függenek. Egyes kórokozók enzimatikusan közvetlenül elpusztítják a gyümölcsszövetet, mások gátolják az érést. Számos gomba aromákat vagy mikotoxinokat termel. A szőlőbetegségek kedvező körülmények között gyorsan terjedhetnek, és többé-kevésbé súlyos járványokat okozhatnak. A szőlőbetegségeket okozó kórokozó gombák mellett a bogyókat mindenütt jelenlévő epifita gombák is kolonizálják, amelyek tápanyagforrásként a bogyókból kiszivárgó cukrot és aminosavakat használják. A szőlő kórokozói általában feloszthatók nagy gazdasági jelentőségű kórokozókra, amelyek dominánsak, például peronoszpóra (*Plasmopara viticola*), lisztharmat (*Erysiphe necator*), szürkerothadás (*Botrytis cinerea*), feketerothadás (*Guignardia bidwellii*) és a csak lokálisan vagy ideiglenesen előforduló kórokozókra (Fischer és Kassemeyer, 2003). A szőlőbogyót kolonizáló gombák és oomycéták némelyike ártalmatlan epifitának tekinthetőek, mások tulajdonképpen patogén gombák antagonistáinak (Schoene és Köhl, 1999; Li et al., 2003). A gombák egy része mikotoxinokat termel, amelyek többé-kevésbé mérgezőek az emberre, egyesek pedig élesztőre mérgező vegyületeket szabadíthatnak fel. A képződött metabolitok hatással vannak érzékszerveinkre, negatívan befolyásolhatják a mustot és a bort (Kassemeyer, 2017).

A mikotoxinok („mycos” (görög) gomba és „toxicum” (latin) mérge szavakból) a mikroszkópikus gombák, elsősorban a penészgombák többnyire extracellulárisan kiválasztódó másodlagos



metabolitjai (Richard, 2007), amelyek nagyobb mennyiségben rendszerint a gombák szaprofiton növekedése közben képződnek és erős fiziológiai, illetve patológiás hatásúak a magasabb rendű élőlényekre nézve (Bennett et al., 2003). Előfordulásuk természetes, ezért potenciálisan elkerülhetetlen veszélyt jelentenek (Bräse et al., 2013).

Az élelmiszerekben és takarmányokban található leggyakoribb mikotoxinok az aflatoxinok (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 és AFM1), a citrinin (CIT), a ciklopiazonsav (CA), a fumonizinek (FB1, FB2 és FB3), az ochratoxin (OTA, OTB és OTC), a patulin, a trichotecének (főként nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON), T-2 toxin (T2) és HT-2 toxin (T2)) és a zearalenon (ZEA) (Van der Gaag et al., 2003).

Az élelmiszereket szennyező anyagok közül a mikotoxinoknak súlyos következményei vannak mind az emberi és állati egészség, mind a gazdaság szempontjából. Az élelmiszerekre és takarmányokra vonatkozó gyors riasztórendszer (RASFF) éves jelentése szerint 2012-ben a mikotoxinok jelentették a fő veszélyt az Európai Unióban. Ezenkívül óriási gazdasági veszteségeket okoznak a gabonatermelésben, valamint az élelmiszerek és takarmányok forgalmazásában (Windels, 2000).

Az ismert mikotoxinok többségét az *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* és *Alternaria* nemzetségek fajai termelik. Egy bizonyos mikotoxint különböző fajok termelhetnek, egy bizonyos törzs pedig különböző mikotoxinokat. Ezek a másodlagos metabolitok olyan vegyületek, amelyek bioszintetizálódnak és kiválasztódnak többféle metabolikus úton, de nem elengedhetetlenek a szervezet növekedéséhez vagy túléléséhez (Betina, 1989).

A penészgombák okozta élelmiszerromlásnál viszonylag alacsony víztevékenység (aW) és alacsony pH-érték jellemző. A gombával szennyezett fő élelmiszercsoportok a gabonafélék és ezek származékai, a diófélék és a gyümölcsök (Cast, 2003). A RASFF legutóbbi jelentése szerint a diófélék, , gyümölcsök, zöldségek, gyógynövények, fűszerek és gabonafélék voltak a leginkább érintett élelmiszerkategóriák.

Az emberek mikotoxinokkal történő fertőzése főleg a növényi vagy állati eredetű szennyezett élelmiszerek lenyelésével történik. A fertőzés alternatív módja lehet a szennyezett porok belélegzése vagy a bőrrel való érintkezése. Azokat a betegségeket, amelyeket a mikotoxinok okoznak emberekben vagy állatokban mikotoxikózisoknak nevezzük. Míg az állati mikotoxikózisok többségét kísérleti úton meghatározták, az emberi mikotoxikózisok kevésbé ismertek (Smith, 1985).

A gombanövekedést és a mikotoxintermelést mind a gomba-egyed kölcsönhatása (törzsváltozékonyság, életkor, stb.), mind a kolonizált szubsztrát belső jellemzői (vízaktivitás, hidrogénion-koncentráció (pH), tápanyag-összetétel, gombaellenes vegyületek, stb.) és a környezet, amelyben növekszik (hőmérséklet, relatív páratartalom, fény, levegőösszetétel, napsugárzás, stb.) befolyásolja. A fajok közötti genetikai különbségek miatt egyes penészgombákból hiányozhatnak bizonyos mikotoxinok előállításához szükséges funkcionális gének, míg mások rendelkeznek ezzel (Nicholson et al., 2003). Valójában ugyanazon fajon belül is lehet toxint termelő és nem termelő törzseket találni (Cabañes et al., 2013). Hasonlóképpen nagyon gyakori, hogy a különböző törzsek eltérő mennyiségben termelik ugyanazt a mikotoxint. A különböző szubsztrátokból izolált fajokban vagy különböző évszakokban előforduló törzsek eltérhetnek toxigenicitásukban (Dobson et al., 2006).

A penészgombák növekedését és mikotoxintermelését befolyásoló legfontosabb tényezők a hőmérséklet és a vízaktivitás. Ami a hőmérsékletet illeti, a gombák szaporodási tartománya általában széles, 10-35 °C. Néhány faj képes növekedni ezen tartomány alatt vagy felett is (Pitt és Hocking, 2009). Az *Aspergillus* és a *Penicillium* nemzetségek spórái alacsonyabb vízaktivitás mellett több évig képesek fennmaradni (Carlile és Watkinson, 1996). További fontos tényező, amely befolyásolhatja a növekedést és a mikotoxin termelést, a kémiai összetétel és a pH-érték. A legtöbb penészgomba tolerálja a 4 és 9 közötti pH-értéket, de legjobban a semleges pH-érték közelében nő és sporulál (Cole, 1981). A savas körülmények kedveznek, a lúgos körülmények pedig rossz hatással vannak az aflatoxinok, az fumonizinek és a trichotecének termelésére (Woloshuk és Shim, 2013). Nemcsak a szén és a nitrogén forrása, hanem azok mennyisége, valamint a fémek közül a cink jelenléte is befolyásolja a mikotoxintermelést (Woloshuk és Shim, 2013).

Az a fiziokémiai környezet, amelyben a gomba növekszik is nagyban befolyásolja a mikotoxinok termelését. A mikotoxinogén gombákat aeroboknak tekintik, de fakultatívan anaerob körülmények között is növekedhetnek (Taniwaki et al., 2009). Figyelembe véve a légköri gázok okozta hatást, a mikotoxin képződés szabályozható a légkör CO<sub>2</sub>-dúsításával vagy az O<sub>2</sub> csökkentésével, míg a gombák növekedését ez nem befolyásolja (Taniwaki et al., 2009). A fény nagyon fontos tényező a penészgombák számára. Különböző élettani reakciókat befolyásol, mint a ivaros fejlődés, az ivartalan szaporodás, a pigmentáció, a másodlagos anyagcsere, stb. (Bayram et al., 2010). Kimutatták, hogy a fehér fény - szemben a sötéttel - csökkentette a mikotoxintermelést (Crespo-

Sempere et al., 2013). A fényhez hasonlóan az ultraibolya (UV) sugárzásnak is hatása van a gombaspórák csírázására, növekedésére és sporulációjára.

Kimutatták, hogy ez a hatás az időtartamtól, az UV hullámhossztól és a gombafajoktól egyaránt függ (Fourtouni et al., 1998; Nicot et al., 1996). A mikotoxinok kapcsán felvetődött, hogy az aflatoxin termelése egyfajta stratégia lehet a penészgombák részéről az UV-károsodások megelőzése érdekében (Cary és Ehrlich, 2006) de ez a feltevés tudományosan még nem igazolódott.

A biotikus kapcsolatot tekintve széles körben beszámoltak arról, hogy a rovarok jelenléte elősegítheti a gombás fertőzést, következésképpen a mikotoxin szennyeződést. A rovarok fokozhatják a gombás fertőzés folyamatát azok hordozásával, lehetővé téve a gombák bejutását az élelmiszerekbe és a takarmányokba (Dowd, 2003).

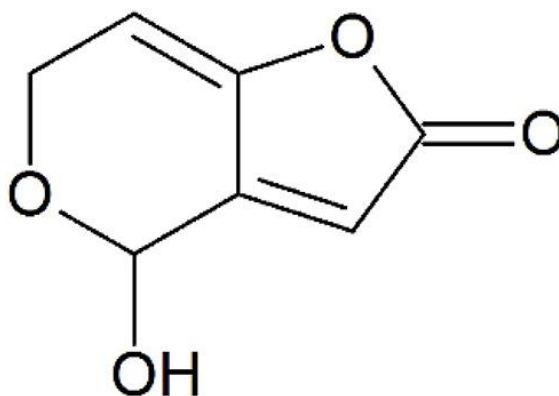
### **3.5.1 Mikotoxinok a borászatban**

A mustban, borban lévő különböző szelekciós tényezők, mint az alkohol (9-14 V/V%), a szerves sav (>4,5) és a pH (<4) nem kedveznek a mikotoxinok akkumulációjának. Ennek ellenére a számos mikotixin közül mégis számolnunk kell a patulin és az ochratoxin A jelenlétével (Magyar és Pomázi, 2014). Mindkettő a rothadásos folyamatok kísérő mikrobiotájában jelenlévő, főként *Aspergillus* és *Penicillium* fajok által termelt toxin (Al Anati és Petzinger, 2006).

#### **Patulin**

A patulint a borászatban nem szoktuk figyelembe venni az alkoholos közeg és a savas pH miatt, ennek ellenére mégis abból a megközelítésből, hogy a szőlőből gyümölcsle is készülhet, érdemes megemlíteni.

A patulin (5. ábra) egy vízben oldódó lakton, melyet poliketid anyagcsere útján állít elő számos mikrogombafaj (mint az *Aspergillus*, *Penicillium* fajok) (Frisvad et al., 2007).



5. ábra: Patulin szerkezeti képlete (Bata et al., 1990)

Ezt a mikotoxint az 1940-es években fedezték fel az Egyesült Királyságban, az influenza ellen lehetséges kezelésként. Termelését olyan nemzetségekben mutatták ki, mint az *Aspergillus*, a *Byssosclamyces* és a *Penicillium*. A leginkább azonban a *Penicillium expansum* felelős a patulin élelmiszerben történő felhalmozódásáért (Betina, 1989). Az érintett élelmiszerek főleg az alma, a körte, de gabonafélék, diófélék, gyökerek vagy rizómák is szennyeződhetnek. A patulin ezen felül megjelenhet sűrített gyümölcslevekben, pürékben (Cano-Sancho et al., 2009; Stoloff, 1975). Viñas és munkatársai (1993) megfigyelték, hogy a gyümölcshűtőházakból származó alma csaknem 50%-a tartalmazott patulint. Ezt figyelembe kell venni, amikor gyümölcslevekhez, gyümölcslé koncentrátumokhoz vagy egyéb termékekhez használják őket (Baert et al., 2006; Boonzaaijer et al., 2005), mert neurotoxikus, immunotoxikus, genotoxikus, teratogén hatású (Hopkins, 1993; Wichmann et al., 2002).

A patulin a nem alkoholtartalmú gyümölcsitalokban vagy gyümölcsből előállított ecetekben található meg. Az erjedés során lebomlik, de a pasztörizációs folyamatok során csak mérsékelt csökkenés történik a patulin-szintben (Harrison, 1989; WHO / IARC, 1990).

### Ochratoxin

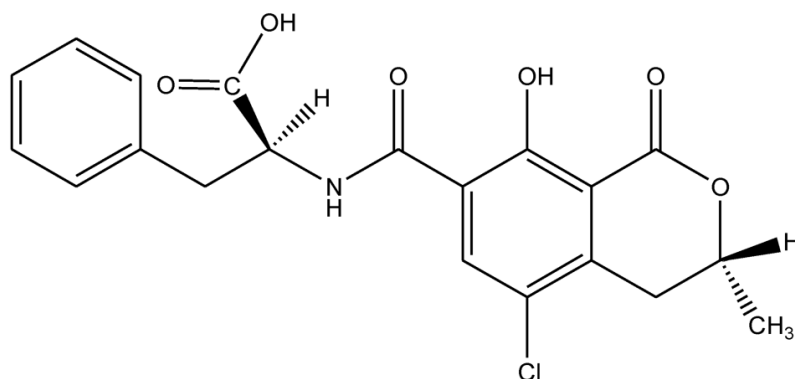
Az ochratoxinok csoportját 3 toxin alkotja, az ochratoxin-A, az ochratoxin-B és az ochratoxin-C, melyeket elsősorban néhány *Penicillium* és *Aspergillus* nemzetséghez tartozó penészgomba termel (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus sulphureus*, *Penicillium verrucosum*) (El Khoury és Atoui, 2010). Kémiai szerkezetük alapján  $\beta$ -fenilalaninhoz amid kötéssel kapcsolódó dihidro-izokumarin származékok.

Toxikológiai szempontból a legjelentősebb ezek közül az ochratoxin A (OTA), ami kémiai szerkezetét tekintve (6. ábra) egy hidroxikumarinkarbonsav származék, amely peptidkötéssel kapcsolódik az L-fenilalaninhoz, klóratom jelenléte mellett (Téren et al., 1996).

Az ochratoxint A-t először 1965-ben észlelték penészgomba anyagcseretermékek szisztematikus vizsgálata során *Aspergillus ochraceus* szűrletéből (Van Der Merwe et al., 1965). Később egyéb gombafajokban is detektálták.

Az OTA különböző élelmiszerekben fordulhat elő, mint a gabonafélék, mogoró, kávé, kakaó, gyümölcslevek, szárított gyümölcsök, sör, bor (Pardo et al., 2004; Abrunhosa et al., 2001). Szőlőben és mustban jelenlétét először 1996-ban bizonyították (Zimmerli és Dick, 1996). Biológiai hatása alapján súlyos máj-, vesekárosító, valamint immunrendszer represszáló valamint potenciálisan teratogén, karcinogén tulajdonságú (O'Brien és Dietrich, 2005).

Kimutatták gabonafélékben (Scudamor et al., 2003), szőlőben és származékaiban (Zimmerli és Dick, 1996), kávéban (Taniwaki et al., 2009), kakaóban és származékaiban (Bonvehí, 2004), sertés- és baromfihús-termékekben (Matrella et al., 2006), tejben (Boudra et al., 2007), fűszerekben (Aziz et al., 1998), diófélékben (Bayman et al., 2002), édesgyökérben (Ariño et al., 2009) és növényi olajokban (Ferracane et al., 2007). A hús és állati termékek OTA-szennyeződését a szennyezett takarmány fogyasztása okozza. Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) 2002-ben tanulmányt végzett az étkezéssel bevitt OTA tartalom értékelésére. Becslések szerint az étrendben az OTA legalább 50%-a gabonafélékből származott, a második legnagyobb beviteli forrás (13%) pedig a bor volt (Miraglia és Brera, 2002).



6. ábra: Az ochratoxin A kémiai struktúrája (Bata et al., 1990)

Földünkön északról dél felé haladva növekvő tendencia figyelhető meg az ochratoxin A koncentrációjában és előfordulásában a különböző bormintákban, ami arra a következtetésre vezetett, hogy az ochratoxint termelő gombák által okozott szőlőfertőzés sokkal gyakoribb a déli területeken (Majerus et al., 2000). Tehát az ochratoxin mennyisége függ attól, hogy a borvidék milyen földrajzi szélességben fekszik (Battilani et al., 2006). Hidegebb éghajlaton a fekete *Aspergillus* fajokat nem izoláltak a szőlőn, bár az ochratoxin A-t kimutatták a borokban. Következésképpen hidegebb éghajlaton a *Penicillium* fajok felelősek az OTA-szennyeződésért (Serra et al., 2006). Nemcsak földrajzi, hanem technológiai összefüggést is mutat a borok OTA koncentrációja. A vörösborok ochratoxin A tartalma magasabb, mint a fehér vagy a rozéboroké (EU Report, 2002). Feltehetőleg a must szőlőhéjjal történő macerálása miatt, ami elősegítheti az OTA szőlőhéjból történő kivonását (Blesa et al., 2006).

Az élelmiszeripari termékeknél toxin határértékeket vezettek be. A 466/2001/EK rendelet és módosításai szabályozzák az élelmiszerekben előforduló ochratoxin legmagasabb határértékét, amely borokban és/vagy más szőlőmust alapú italokban 2,0 µg/kg (Commission Regulation, 2006).

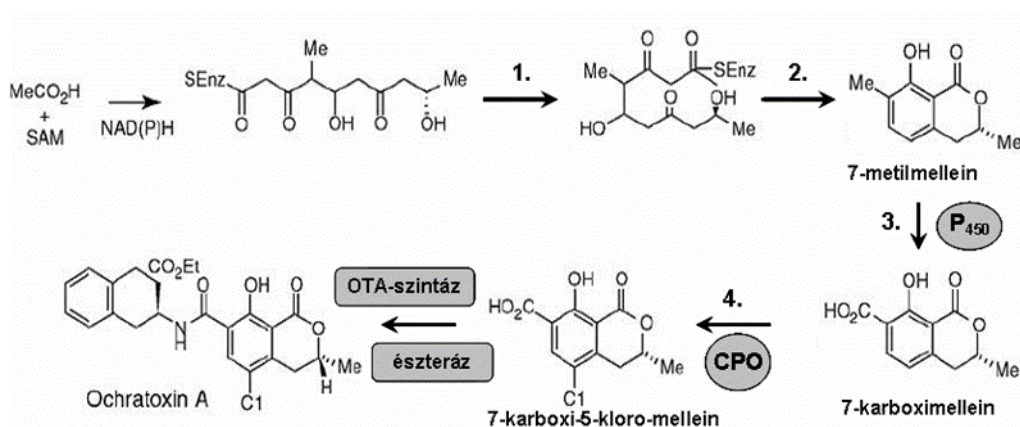
A különböző borok hozzájárulhatnak az OTA akkumulációjához az emberi szervezetben, ezért ezt a tényezőt lényeges élelmiszer-biztonsági veszélyforrásának kell tekinteni. Megelőzésében kulcsszerepet játszik a megfelelő növényvédelem és fitotechnika.

### Ochratoxinok bioszintézise

Általában a mikotoxin-szintetizáló gének csak bizonyos körülmények között aktiválódnak. A növekedési paraméterek erősen szabályozzák őket. Az OTA bioszintézisének útvonala (7. ábra)

bár még nem minden gombafajban tisztázott, de feltehetőleg az izokumarin-csoport (pentaketid forma) egy poliketid-szintézis útvonalon keresztül acetátból és malonátból áll össze (Moss, 1998). Az OTA heterociklikus része szerkezetileg hasonló a melleinhez, mely egy közös gombavegyület. A klóratom egy klór-peroxidáz enzim segítségével kapcsolódik az izokumarin vázhoz. A fenilalanin a sikimisav-útvonalból származik. Az izokumarin-vázhoz egy karboxil-csoporton keresztül kapcsolódik (Moss, 1998).

A klór-peroxidáz, OTA- szintáz, poliketid-szintázok az OTA-bioszintézisben résztvevő gének, melyek a folyamatban szerepet játszó enzimeket kódolják (Dobson et al., 2006).



7. ábra: Egyszerűsített ochratoxin-bioszintézis útvonal (Moss, 1998). A számokkal ellátott nyilak a főbb enzimikus lépéseket jelölik: 1. Gyűrűvé záródás, 2. Aldol-csoportok dehidratálása, 3. Oxidáció, 4. Klórtartalmú oldallánc létrehozása.

### 3.5.2 Mikotoxinok detektálása

Számos módszer alkalmazható a mikotoxinok analitikai elemzésére. Manapság a leggyakoribbak az ELISA, a TLC, a HPLC-MS és a GC-MS módszerek.

A vizsgálatok berendezésigényét elsősorban a szükséges elemzési szint határozza meg. A vékonyréteg-kromatográfia sok esetben jó minőségi elválasztást eredményez egy bizonyos koncentrációhatárig, de alacsony koncentrációjú minták mennyiségi meghatározásához teljesen alkalmatlan. A kívánt mintában lévő toxinok mennyiségi meghatározásához műszeres mérésre van szükség, amelyek közül a leggyakoribb technikák a GC-MS vagy HPLC-MS vagy HPLC-MS / MS (Peltola et al., 2001). Az egyszerű GC meghatározás sok esetben nem megfelelő módszer az alkalmazott detektorok (FID, ECD) kimutatási határai miatt, de a kapcsolt technika (MS) alkalmazásával a detektálási határ teljesen megfelelő szintre hozható. Általánosan használt

technika a HPLC-MS technika, amely a mikotoxinok szinte teljes spektrumát képes kimutatni (Klotzel et al., 2005).

Bármely analitikai kimutatási módszer lényeges lépése a minta előkészítése. A kimutatási módszer alapja a minta előkészítési eljárásának megfelelő megválasztása, ezért elengedhetetlen a pontos kidolgozás. A mikotoxinok kimutatására használt mintakészítési technikák szilárd-folyadék, folyadék-folyadék extrakción és toxin-visszanyerésen alapulnak szilárd fázisú extrakciós (SPE) és immunaffinitás (IA) oszlopokkal ellátott mintákból. E technikák hátránya sok esetben a drága SPE vagy IA oszlop. Előnyük, hogy konkrétan csak a vizsgálandó toxint vonják ki a mintából, ami szintén hátrányos lehet, ha a toxinok egymásra gyakorolt szinergetikus hatását vizsgálják egy mintában. Az SPE és IA oszlopok másik hátránya, hogy az oszlopok fizikai, kémiai tulajdonságaik miatt az egyes toxinok maximális telítettségi koncentrációjával rendelkeznek, amely felett már nem adszorbeálják a toxint a mintából, és ezért nem kötik meg a minta teljes toxinmennyiségét (Degelmann et al., 1999).

### **3.6 Fiziológiailag aktív vegyületek jelentősége**

A szőlőbogyóknál technológiai szempontból három részt különíthetünk el. Ezek a bogyóhéj, a bogyóhús és a magok. A bogyóhús kipréselésével létrejövő must különböző szerves és szervetlen molekulák és ionok valódi és kolloid vizes oldata. A szőlőbogyó egyéb alkotóival való együttes áztatás során további anyagok kioldása történhet meg. A borminőség és megbízhatóság érdekében fontos, hogy már a szüret előtt tisztában legyünk az emberi szervezetre ható egyes anyagok várható mennyiségével. .

#### **3.6.1 Biogén aminok**

A biogén aminok kis molekulatömegű alifás, aliciklusos vagy heterociklusos szerves nitrogénvegyületek, jelenlétük létfontosságú a szervezetünkben. Természetes alkotói a különböző élelmiszereknek, szerepük van az ételek ízvilágának kialakításában. Megtalálhatók a szőlőmustban, de kialakulhatnak az alkoholos és a malolaktikus erjedése közben, valamint a bor érlelése során is. Biogén aminok az aminosavak dekarboxileződése során jönnek létre (Guo et al., 2015). Nagyon változatos csoportot alkotnak, az egyes tagok szerkezete rendkívül eltérő (gyűrűk, elágazó láncok, kémiai csoportok, stb.) lehet. A csoport néhány tagja (hisztamin, szerotonin) a szervezetben ingerületátvivő anyagként működik, míg mások testünk alkalmazkodó- és védekező mechanizmusában, az idegrendszeri- és keringési folyamatokban vesznek részt (adrenalin,



tiramin, stb.) (Nyitrai Sárdy, 2004; Kállay, 2010). Nagy mennyiségű jelenléte a borban egészségügyi problémákhoz, allergiához hasonló tünetekhez vezethet.

A borban a legfontosabb biogén aminok a tiramin, triptamin, a putreszcin, a hisztamin, a kadaverin,  $\alpha$ -alanin,  $\beta$ -alanin, szerotonin, a feniletil-amin, a spermin és a spermidin.

A molekulaszervezet alapján a következőképp csoportosítjuk őket (Silla-Santos, 1996):

- alifás diaminok (kadaverin, putreszcin)
- alifás poliaminok (agmatin, spermidin, spermin)
- aromás szerkezetű monoaminok (adrenalin, dopamin, fenil-etil-amin, noradrenalin, tiramin)
- heterociklusos szerkezetű monoaminok (hisztamin, szerotonin, triptamin)

A biogén aminok az élelmiszerekben aminosav dekarboxilezéséből származnak (8. ábra), különféle mikroorganizmusok által felszabadított exogén enzimek aktivitása révén (Erdag et al., 2018).

Az aromás és heterociklusos aminok gyűrűik szerkezetében különböznek. Az aromás aminok benzolgyűrűt tartalmaznak, míg a heterociklusos aminok módosított gyűrűs szerkezettel rendelkeznek (kettős gyűrűk, nitrogénnel szubsztituált gyűrűk stb.). Ezeket az aminokat tartják a legmérgezőbbnek. Az alifás aminoknak két vagy több aminocsoportja van. Ezeket az aminokat kevésbé veszélyesnek tartják (del Rio et al., 2019). A szerkezeti különbségektől függetlenül a biogén aminok általában rendkívül stabilak (Veciana-Nogués et al., 1997). Bizonyos alifás aminok nitritek jelenlétében reakciósorozaton mennek keresztül, hogy nitrózaminokká váljanak. Ennek a reakciónak a mechanizmusa kevésbé ismert, de feltételezik, hogy az aminok, mint például a kadaverin, gyűrűkké polimerizálódnak, amelyek aztán nitrittel egyesülnek a nitrózaminok képződéséhez (Mitacek et al., 1999). A nitrózaminokat erős rákkeltőknek tekintik, strukturális károsodást okoznak azáltal, hogy kötődnek a DNS-molekulához. Ezek a változások mutációkhoz és végül rák kialakulásához vezethetnek (Song et al., 2015). Bár ismert, hogy ezek a vegyületek rákot okozhatnak állatokban, az emberre gyakorolt hatásokat még nem vizsgálták alaposan.

A biogén aminok képződésének lehetséges formái (Kállay, 2010):

- Aminosavak enzimes dekarboxileződése
- Nagy molekulatömegű vegyületek nitrogéntartalmú részének hidrolízise
- Nitrogénmentes anyagcseretermékek (aldehidek, ketonok, ketosavak) aminálása

- Nitrogéntartalmú anyagok metilezése

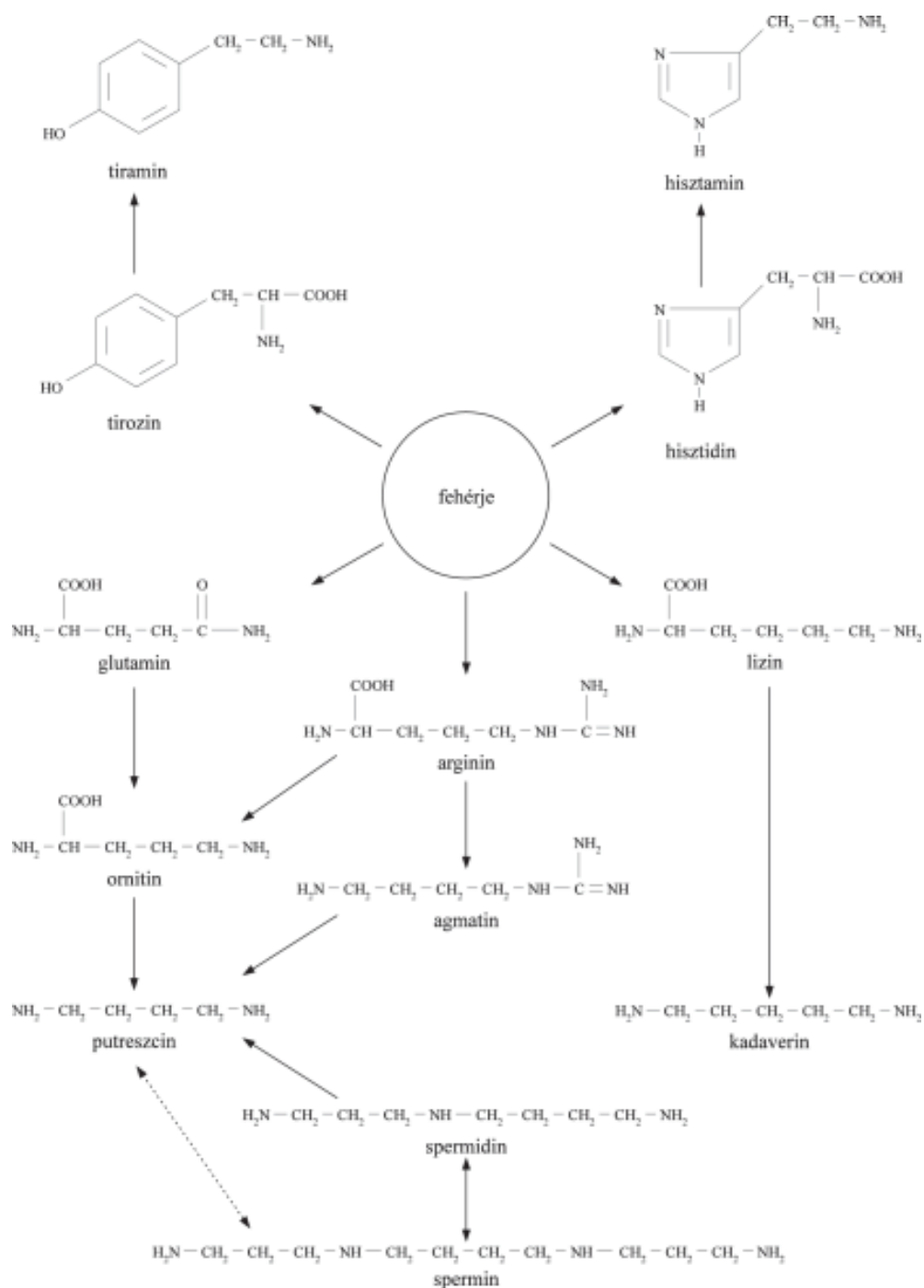
A felsorolt folyamatok közül az aminosavak enzimes dekarboxileződése a legelterjedtebb. Az aminosav-dekarboxileződés révén képződött aminok vagy normál metabolizmus útján a szövetekben termelődnek a fehérje-anyagcsere során vagy a bélflóra dekarboxilázai hatására, vagy táplálékkal és gyógyszerrel kerülhetnek magasabb rendű állati vagy emberi szervezetbe (Kállay, 2010).

A biogén aminok a szőlő természetes alkotóelemei. Mennyiségük a fajtától, a talajtípustól, a trágyázástól, az éghajlati viszonyoktól stb. függően változhat.

A borban a biogén aminok négyféle módon jelenhetnek meg (Soufleros et al., 1998):

- A mustban eredetileg is jelen voltak
- Az alkoholos erjedés során élesztők termelik
- A malolaktikus fermentáció (MLF) közben baktériumok tevékenységéhez köthetőek
- A bor érése során képződnek

Mennyiségük az erjedés alatt növekszik, az MLF során még nagyobb koncentrációban mérhetők (Bauza et al., 1995).



8. ábra: Egyes biogén aminok képződésének lehetséges újtjai (Kállay, 2010)

Kutatások szerint a szőlő nem steril körülmények közötti, zúzás előtti tárolása is befolyásolhatja biogén amin koncentrációt, ami arra utal, hogy ezek a vegyületek a borászati folyamat során jelzik a szőlő rossz egészségi állapotával járó higiénia hiányát (Cecchini és Morassut, 2010; Del Prete et al., 2009)

## *Hisztamin*

A hisztamin az emberi egészség szempontjából az egyik legmeghatározóbb biogén amin. Dolgozatomban allergén hatása miatt vizsgáltuk, ezért erről az aminról részletesebben írok.

A hisztidin aminosav dekarboxilációja egy úgynevezett biogén amin, a hisztamin képződését eredményezi. A hisztamin vegyület két bázikus nitrogénnel rendelkezik. Egyrészt az oldalláncon található alifás aminocsoporttal, másrészt az imidazol gyűrűn található hidrogénnel nem rendelkező nitrogénatommal. Az alifás nitrogén fiziológiás körülmények között protonált, az imidazol gyűrűn található nitrogén nem protonált (Paiva et al., 1970).

A borban a hisztamin nemkívánatos szennyezőanyag. Az allergének és az ellenanyagok találkozásakor az élő szervezetek szöveteiben a normál fehérjebioszintézis során szintetizálódik. A baktériumok tevékenysége során is képződhet, de táplálkozással is bevitethető. Az élő szervezet az előállított hisztamint tárolja, vagy lebontóenzimek (hisztamin-N-metil-transzferáz, diamin-oxidáz) segítségével inaktíválja.

Különösen az olyan élelmiszerek, mint a sajtok, zöldségek, kolbászok és halak, valamint az alkoholos italok erjedése és érlelése során képződnek. A képződő hisztamin mennyisége erősen függ a gyártási folyamat során végzett minőségirányítástól. Az élelmiszerek magas hisztamintartalma a romlással is összefügg, ezért a hisztamin alacsony koncentrációja az élelmiszerben a frissesség és a minőség jele. A hisztamintól eltérő biogén aminok, mint például putreszcin, tiramin, kadaverin, stb. gyakran képződnek az élelmiszerek feldolgozása és tárolása során. Ezeknek a biogén aminoknak az egyidejű előfordulása növeli a hisztamin toxicitását (Bodmer et al., 2000; Gaffner, 2002).

A hisztamin az összes biogén amin közül a legfontosabb az emberi egészség szempontjából. Ideális esetben ez az anyag a táplálékból való felvételt követően gond nélkül lebomlik, azonban egyre nő azoknak az embereknek a száma, akik drasztikus tünetekkel reagálnak az élelmiszerekben található kis mennyiségű biogén aminokra. Az ilyen típusú betegséget hisztamin-intoleranciának nevezik. A legtöbb hisztamin-intoleranciában szenvedő embernek nincs elegendő diamin-oxidáz-aktivitása (DAO), amely enzim normális esetben minden emberben jelen van. Ez az enzimaktivitás a biogén aminokat, mint a hisztamin, olyan termékekké alakítja át, amelyek nem károsak. A reakció hisztaminban gazdag étel elfogyasztása után kezdődik. A legfontosabb tünetek a viszketéssel járó bőrpír, fejfájás, hányinger, gyomorpanaszok, hasmenés és légzési zavarok. Tipikus allergiás tünetei még a bevörösödött szem és az orrfolyás (Bódog, 2003). Az

élelmiszerekben található hisztamin lebontásának képességét minden embernél drasztikusan csökkenti bizonyos gyógyszerek fogyasztása. Amennyiben alkohol és acetaldehid is jelen van a szervezetünkben, az nem képes a káros hatású aminok ellen védekezni (Kállay és Nyitrai Sárdy, 2008). Mindkettő gátolja a diamin-oxidáz enzimet, amely jelen van az emberi bélrendszerben, és képes a hisztamin és más biogén aminok lebontására. Ezért az alkoholtartalmú italok (sör, bor, pezsgő, párlatok, stb.) együttes fogyasztását a fokozott vagy magas koncentrációjú biogén aminokat tartalmazó élelmiszerekkel kerülni kell (Gaffner, 2002).

A hisztaminról bebizonyosodott, hogy bomlási reakció nélkül ellenáll a különböző hőhatásoknak (forralásnak, a sütésnek) (Lehane és Olley, 2000).

Az élelmiszerekben található hisztaminra vonatkozó tűréshatárokat a svájci élelmiszer-előírások határozzák meg. A bor esetében a tűréshatár 10 mg/l. A hisztaminmentesnek tekinthető bor hisztamintartalma nem lehet több 0,5 mg/l-nél. Ismert, hogy a tejsavbaktériumok között találhatók olyan fajok és törzsek, amelyek gyakorlatilag nem, vagy nagyobb mennyiségben képesek biogén aminokat képezni. Különösen a borban a *Pediococcus damnosus* törzsek képesek fokozott mennyiségű hisztamint termelni. A kismértékben, vagy nem biogén amin képző baktérium fajok vagy törzsek beoltásával csökkenthető a hisztamin előfordulása a borokban és a feldolgozott élelmiszerekben. Az alkoholos erjedéshez használt *Saccharomyces cerevisiae* élesztők és a malolaktikus erjedéshez használt *Oenococcus oeni* baktériumok sikeres beoltásával sokat lehet tenni a minőségileg jó és biztonságos bor előállításáért (Bodmer et al., 2000).

### 3.6.2 Polifenolok

A polifenolok a borászati technológiai szempontból rendkívül fontos vegyületcsoportot alkotnak. A bor minőségét is nagyban befolyásolják, ezért is kell a polifenol típusú vegyületekkel foglalkoznunk.

A polifenolok a növényvilágban jelenlévő legelterjedtebb vegyületek. Fontos szerepet játszanak a növények növekedésében és szaporodásában, védelmet nyújtanak a biotikus és abiotikus stressz, például a kórokozók és rovarok támadása, valamint egyéb sérülések és az UV-sugárzás ellen (Weisshaar et al., 1998; Winkel-Shirley, 2002). A polifenolok széles körben elterjedtek az emberi táplálkozásban, főként a növényi eredetű élelmiszerekben és italokban (gyümölcsök, zöldségek, diófélék, magvak, fűszernövények, fűszerek, tea és vörösbör), és számos érzékszervi tulajdonságot befolyásolhatnak, mint például az íz és a szín (Bautista-Ortín et al., 2013). A polifenolok étrendi bevitelét körülbelül 1 g/napra becsülik (Scalbert et al., 2000). Bevitelük 10-szer nagyobb, mint a

C-vitamin és a 100-szorosa az E-vitamin vagy a karotinoidok bevitelének (Scalbert et al., 2005). Ennek eredményeképpen a fenolos vegyületek jelenleg nagy figyelmet kapnak jótékony egészségügyi hatásuk miatt. Antioxidáns (Dröge, 2002), gyulladáscsökkentő (Castilla et al., 2006), szívvédő (Zern et al., 2005), rák megelőző (Nichols et al., 2010) és idegrendszervédő tulajdonságokkal rendelkeznek (Aquilano et al., 2008).

A szőlőben és a borban található polifenollokkal kapcsolatos tanulmányok jelentős része a jótékony egészségügyi hatásai miatt jelentek meg. Epidemiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy azoknál a személyeknél, akik rendszeresen, mérsékelt mennyiségű bort fogyasztanak, csökken a szív- és érrendszeri megbetegedés, az alkoholtól tartózkodó vagy azt mértéktelenül fogyasztó egyénnel összehasonlítva (Morten et al., 1995; German et al., 2000).

Egyes kutatók úgy vélik, hogy a polifenolok terápiás hatása a borban fokozódhat, talán a bor alkoholkomponensével való additív hatás vagy a borban található polifenolok erjedési folyamat következtében megnövekedett biológiai hozzáférhetősége miatt. A borok mellett számos bizonyíték alátámasztja a szőlőből, szőlőléből készült gyümölcslevekből, szőlőmag-, szőlőhéjkivonatokból származó egészségügyi előnyöket (Fitzpatrick et al., 1993; Castilla et al., 2006; Pérez-Jiménez et al., 2008). Bár a kémiai összetevőkben a szőlő és a bor bizonyos mértékben eltérnek egymástól, hasonló terápiás hatásokról számoltak be.

A polifenolok olyan természetes eredetű szerves vegyületek, melyekre jellemző a nagyszámú fenolgyűrű jelenléte, hozzá kapcsolódó hidroxilcsoporttal (Bravo, 1998). A polifenol vegyületek származásuk, biológiai funkciójuk és kémiai szerkezetük alapján osztályozhatók (Crozier et al., 2006). Peri és Pompei (1971) csoportosítása alapján nem flavonoid-fenolokat, flavonoid-fenolokat és tanninokat különböztetünk meg.

Nem flavonoid-fenolok, egyszerű fenolok. Szinte kizárólag bogyóhúsban találhatók, főleg észter típusú vegyületek formájában. Érzékszervileg jellemző rájuk a kevésbé összehúzó íz. A szőlő, valamint a bor benzoésav- és fahéjsav-származékokat tartalmaz. A benzoésav-származékok a p-hidroxi-benzoésav, protokatechusav, vanillinsav, veratrumsav, szalicilsav, gencizinsav. A fahéjsav-származékok közül jelentős a p-kumársav, kávéssav, ferulasav.

A polifenol típusú vegyületeknek két geometriai izomerje van, melyek közül a *transz*-sztilbén a természetben megtalálható. A *cisz* elrendeződés labilis a fenilcsoportok szterikus gátlása miatt. Gyakran előfordul glikozidos formában is, ahol a rezveratrolhoz  $\beta$ -glikozidos kötéssel egy

cukormolekula kötődik. Ez a piceid-alak, mely a glikozidos kötés felbomlásával rezveratrollá alakul. Az egészséges szőlőbogyóban legtöbbször a piceid-forma fordul elő (Keita et al., 2004).

A flavonoid-fenolokra jellemző a keserű, összehúzó íz és a barnulási hajlam, mely a bor fenolos anyagaira vezethető vissza (Singleton és Esau, 1969). Ennek a csoportnak a képviselői a katechin-, a leukoantocianin- és az antocianin-monomerek, amelyekből a procianidinek épülnek fel. A gyűrűkön előforduló eltérő számú és elhelyezkedésű hidroxilcsoportok, azok metilálása, illetve a flavonoidok glikozidos alakban való előfordulása eredményezik az alapvegyületek nagy számát. A flavonoid-fenolok antioxidáns és redukáló hatással is bírnak, hajlamosak a polimerizációra. Élettani szempontból fontos szerepet játszanak a kardiovaszkuláris megbetegedések megelőzésében.

A hidrolizálható tanninokat (galluszsav, digalluszsav, ellágsav, penta-galloil-glükóz) a szőlő nem tartalmazza. A tölgyfahordós tárolás és csersavas derítés során kerülnek a borokba.

A nem hidrolizálható tanninok (procianidinek, kondenzált tanninok, tannin-flavonoidok) szerepet játszanak a bor tisztaságában, stabilitásában, felelősek lehetnek a fanyar, összehúzó ízért.

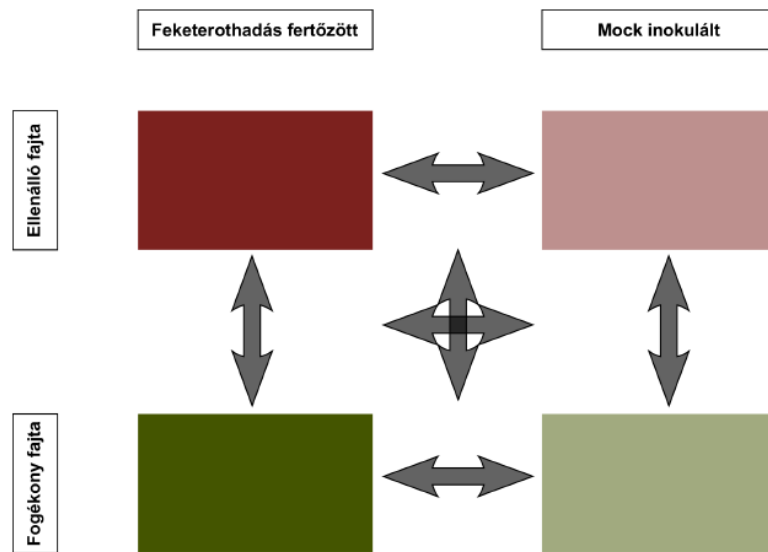
A szőlő kiemelkedően gazdag fenolos vegyületekben (Kállay, 1998). A polifenolok a szőlő különböző részeiben eltérő minőségi és mennyiségi összetételben találhatóak meg. A szőlőből származó polifenolok főként a magokban (60%) és a héjban (30%) koncentrálnak, és kisebb mértékben a gyümölcshúsban és a szárban (kevesebb mint 10%) (Kennedy, 2008). A bogyóhéjban vizsgált tanninok feltehetőleg már a fejlődés korai szakaszában kialakulnak. Mennyiségük kis mértékben változik a zsendüléstől a szüretig (Adams, 2006). A borászati szempontból jelentős procianidinek és katechinek a bogyóhéjban, magban, kocsányban fordulnak elő a legnagyobb koncentrációban. Az egyszerű fenolok (kávéssav, p-kumársav, ferulasav, stb.) a bogyóhúsban találhatóak (Chira et al., 2008).

A legtöbb élelmiszer polifenolok komplex keverékét tartalmazza, összetételük az élelmiszerekben eltérő. Egyéb tényezők, mint például a fajta, termőhely, környezeti tényezők, feldolgozás, tárolás, extrakciós módszerek, stb. befolyásolják a növényi élelmiszerek polifenoltartalmát. Az érettségi fok is jelentősen befolyásolhatja a polifenolok koncentrációját. Általánosságban elmondható, hogy a fenolsavak mennyisége csökken az érés során, míg az antocianinok koncentrációja nő (Manach et al., 2004). A borok fenolösszetétele elsősorban az alkalmazott szőlő-feldolgozási és borkészítési technológia függvénye.

## 4 ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1 Mesterséges fertőzés

A feketerothadásra adott növényi válaszreakcióban, az ellenállóképesség kialakításában részt vevő gének azonosításához komplex kísérleti rendszert építettünk fel, amelyben összehasonlítottuk egyrészt a fertőzött és kontroll (mock inokulált) növények RNS populációit, másrészt pedig figyelembe vettük azokat a reakció-különbségeket is, amelyet ellenálló és fogékony fajták mutatnak (9. ábra) a feketerothadás fertőzés hatására.



9. ábra: A szőlő feketerothadásra adott génexpressziós válaszáinak vizsgálatánál figyelembe vett expressziós különbségek

#### 4.1.1 A mesterséges fertőzéshez felhasznált növényanyag

A Magyarországon termesztésben levő Csillám fajta pedigréjében szerepel a feketerothadással szemben nagyfokú rezisztenciát mutató Merzling fajta rezisztens nagyszülője, a Rayon d'or (Seibel 4986), amely feltehetően a *Vitis rupestris* őseitől örökölte az ellenállóképességét. A betegségekkel szemben általánosan érzékenynek mutató Csaba gyöngye fajta megfelelő fogékony kontrollnak ígérkezik.

A Csaba gyöngye szaporítóanyagot Balatonboglárról, a Csillám vesszőket a Soós István Borászati Technikum és Szakképző Iskola szigetcsépi telephelyéről gyűjtöttük be a kényszernyugalom időszakában.



A növényeket kétrügyes dugványokról neveltük laboratóriumi körülmények között általános virágföld és perlit 1:1 arányú keverékében.

#### 4.1.2 A fertőzés menete

A fertőzési rendszer beállítása során az egyik legnagyobb kihívást annak megoldása jelentette, hogy pontosan onnan tudjunk mintát venni, ahol a konídiumok csírázása, a hifa növekedése történik, hiszen csak ekkor számíthatunk az RNS szintű válasz egyértelmű tettenérésére. A hagyományos fertőzési módszerek arra irányulnak, hogy az adott fajta/levél fogékonyságát teszteljék, vagyis a kialakuló tünet helye nem szempont. Ezen felül, mivel a kísérletben a korai válaszra voltunk kíváncsiak, a tünetek kialakulását – ami akár egy hónapig is eltarthat – nem vártuk meg. A fenti problémák kiküszöbölése érdekében a fertőzést szűrőpapír korongra vitt spóraszuszpenzióval végeztük és a korongot mintavételig (legfeljebb 72 óra) a levélen hagytuk. A mintavétel során így pontosan a fertőzés helyről származó szöveteket tudtuk begyűjteni.

A növényeket 100%-os relatív páratartalom és 36 órán keresztül fenntartott folyamatos levélfelület-nedvesség mellett 27°C-on inkubáltuk a fertőzés elősegítése érdekében. A vízcseppek megfolyásának megakadályozása érdekében a fertőzni szándékozott fiatal leveleket megtámasztottuk, hogy közel vízszintesen álljanak (10. ábra).

A mesterséges fertőzésekhez használt *Guignardia bidwellii* izolátumot az egri Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetből Dr. Váczy Kálmán Zoltán biztosította. Az előállított spóraizolátum koncentrációja  $5 \times 10^5$  spóra/ml volt. A spóraszuszpenzióból 10 µl-t vittünk egy 7 mm átmérőjű steril szűrőpapír korongra, majd ezeket a korongokat helyeztük az előkészített szőlőlevelekre.

A fertőzéseket féllevél-módszerrel végeztük (11. ábra), azaz a levél egyik felére három darab spóraszuszpenzióval, a másik felére (kontroll) három darab desztillált vízzel átitatott szűrőpapír korongot helyeztünk.



10. ábra: Fertőzésre előkészített szőlő növény. A levelek felületét benedvesítettük, a növények köré egyedi szigetelést helyeztünk. Növényenként két, ideális korú és állapotú levelet kiválasztottunk és azokat vízszintes állapotban finoman rögzítettük.



11. ábra: A fertőzések során használt féllevél-módszer. A levéllemez egyik felén *Guignardia bidwellii*-vel átitatott levélkorongok, a másik felén (narancssárga színnel megjelölve) mock korongok találhatóak.

A fertőzéseket és a kontroll kezeléseket mind az ellenálló, mind pedig fogékony növényeken, három biológiai ismétlésben végeztük. A biológiai ismétlések során feljegyeztük a leveleket is, így az adatelemzésnél információval rendelkezünk arról, hogy melyik fertőzött mintának pontosan melyik az a mock fertőzött párja, amely ugyanarról a levélről származik.

#### 4.1.3 Mintavétel

A mintavétel során a fertőzési folyamat korai lépéseire koncentráltunk, ezért a fertőzés előtt (0 órás minta), majd azt követően 6, 18, 36 és 72 órával vettünk mintát. Minden mintavétel esetében három korongot félretettünk az érzékeny fajtán történt fertőzésekről, hogy festési eljárással a fertőzés megtörténtét igazolhassuk, a kórfolyamatot nyomon követhessük.

A mintavételi rendszert a 2. táblázat ismerteti. Három levélkorong ad ki egy RNS mintát, minden kezelésről 6 biológiai ismétlést szedtünk. Ezek közül nem kerül mind szekvenálásra, a megmaradó minták esetleges megismételt kivonásokhoz, illetve a validáláshoz szükségesek.

2. táblázat: Szőlő feketerothadás fertőzés mintavételi stratégiája. BR: Black rot – feketerothadás fertőzött minta, Mock: steril desztillált vízzel kezelt minta. hpi: hour past inoculation = x órával a fertőzés után

| Mintavétel | Csaba gyöngye |      | Csillám |      |
|------------|---------------|------|---------|------|
| időpontja  | BR            | Mock | BR      | Mock |
| 0 hpi      |               | 3x6  |         | 3x6  |
| 6 hpi      | 3x6           | 3x6  | 3x6     | 3x6  |
| 18 hpi     | 3x6           | 3x6  | 3x6     | 3x6  |
| 36 hpi     | 3x6           | 3x6  | 3x6     | 3x6  |
| 72 hpi     | 3x6           | 3x6  | 3x6     | 3x6  |

A kivágott levélkorongokat mikrocentrifuga csövekbe tettük és azonnal fagyasztottuk folyékony nitrogénben (snap-freeze), majd a mintákat -80°C-on tároltuk feldolgozásig.

Az RNS-kivonáshoz szedett fertőzött mintákból párhuzamosan etanolba is tettünk egy-egy levélkorongot a tripánkékekkel történő gombaspecifikus festéshez.

#### 4.1.4 *Guignardia bidwellii* festés tripánkékkal

A *Guignardia bidwellii* fertőzést eredendően szőlő lisztharmat festésre optimalizált tripánkékkal festéssel mutattuk ki. A festék specifikusan festi a gomba sejteket, illetve az elhalt növényi sejteket is.

Szőlő feketerothadás festési protokoll:

– Feltisztítás

A festeni szándékozott leveleket meg kell tisztítani a klorofilltól, hogy a fénymikroszkópban a gombaszöveteket tanulmányozhassuk.

- A fertőzött levélkorongokat Petri-csészébe helyezett szűrőpapírra rakjuk színükkel felfelé, majd etanol:ecetsav 1:1 arányú keverékét pipetázzuk rájuk. A szűrőpapír bőven álljon savas etanolban, de a levelek ne tudjanak elmozdulni.
- A feltisztítás optimális időtartama 2 nap, de egy nap után már lehet a festéssel próbálkozni. A feltisztító oldatot reggel és este cseréljük frissre.

– Festés tripánkékkal

- A feltisztított levelekről a savas etanolt leszívjuk és helyette 1% HCl-t pipetázunk rá, majd fél óráig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
- Az inkubáció alatt elkészítjük a tripánkékal festéket (0,5 g/l sósavas glicerolban. 25% glicerol, 0,5% HCl).
- A levélkorongokat mikrocentrifuga csövekbe helyezzük és rámérjük a tripánkékal festéket, majd fél órán keresztül inkubáljuk szobahőmérsékleten.
- A tripánkékat egy gyűjtőbe leszívjuk, majd a levelekre sósavas glicerolt (25% glicerol, 0,5% HCl) pipetázunk és a festési háttérrel ebben mossuk ki.
- Fél óra elteltével a levélkorongokat tárgylemezre rakjuk, 50%-os glicerolt cseppentünk rá és fedőlemezrel lefedjük.

Különböző időpontokban vizsgált feketerothadás konídiumok csírázási arányát Csillám és Csaba gyöngye fajtákon a Welsch féle t-próbával végeztük.

## 4.2 RNS kivonás

A feketerothadással szembeni ellenállóképességben szerepet játszó gének azonosítása során olyan géneket keresünk, amelyek transzkripciós szintje jelentősen megváltozik a fertőzés hatására. Ennek megfelelően olyan stratégiát választottunk, amely – a legújabb generációs nukleinsav

szekvencia-meghatározási módszerek nyújtotta lehetőségeket kihasználva – a teljes hírvivő RNS populáció szekvenáláson keresztüli mennyiségi meghatározásán (RNAseq) alapul.

Az RNS kivonás megfelelő módszerét előkísérletekben optimalizáltuk a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Szőlészeti Tanszékén. Alapvetően két olyan módszert adaptáltunk, amelyekkel korábban a Tanszék laboratóriumában szőlőből már sikerrel vontak ki RNS-t. Az egyik módszer egy speciális vegyszeres módszer, alapja az Invitrogen (Life Technologies) Plant RNA Purification Reagent. Előnye, hogy gyors módszer és jó minőségű RNS-t ad, amely tartalmazza a kisRNS frakciót is, ugyanakkor viszonylag költséges. A második módszer az RNS molekulák LiCl-os kicsapásán alapul. Ez a módszer gazdaságos, megfelelő minőségű RNS kivonatot ad, ugyanakkor a LiCl-os kicsapás miatt a kivonatok nem, illetve kisebb arányban tartalmazzák a kisRNS frakciót. Végül a -80°C-on tárolt mintákból a Gambino és munkatársai (2008) által közölt LiCl-os kicsapáson alapuló protokoll laborunkban módosított változatát használtuk.

Az alkalmazott szőlő RNS kivonás protokollja:

Szükséges anyagok:

- Extrakciós puffer:
  - 2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)
  - 2,5% PVP (polivinilpirrolidone K40)
  - 100mM Tris-HCl (pH 8.0)
  - 25mM EDTA
  - 2M NaCl
  - Frissen, használat előtt hozzáadva 2%  $\beta$ -mercaptoetanol (20  $\mu$ l/ml)
- 9M LiCl
- SSTE
  - 1 M NaCl
  - 0,5% SDS
  - 10mM Tris-HCl (pH 8.0)
  - 1mM EDTA (pH 8.0)

## Az RNS kivonás menete

- 150/200mg anyagot homogenizálni eppendorf-ban, vagy dörzscsészében
- az extrakciós puffert 65°C-ra tesszük melegedni (felhasználás előtt adjuk hozzá a 20µl/ml β-mercaptoetanolt)
- a homogenizált mintához hozzáadunk 850 µl előmelegített extrakciós puffert és 17 µl β-mercaptoetanolt, átöntjük 2 ml-is eppendorf csövekbe, utána erősen vortexeljük
- 10 percre 65°C-ra rakjuk, időnként vortexeljük
- hozzáadunk 850 µl kloroform:isoamilalkohol (24:1) rázva, döntögetve keverjük
- centrifuga 10000 rpm, 10 percig, 4°C-on
- új 2 ml-is eppendorf csövekbe mérünk 800 µl kloroform:isoamilalkohol (24:1) és rámérjük a felülúszót a már lefugált mintákról, döntögetve keverjük
- centrifuga 10000 rpm, 10 percig, 4°C-on
- új 1,5 ml eppendorf csövekbe mérünk 250 µl 9M LiCl amelyre mérünk kb.450 µl felülúszót a már lefugált mintákról (FU: LiCl= 2:1) Óvatosan, finoman döntve keverjük a mintákat
- 30 percig jégen tartjuk
- centrifuga 13000 rpm, 20 percig, 4°C-on
- leöntjük a felülúszót és a csapadékra mérünk 450 µl 65°C-ra előmelegített SSTE-t. Vortex és rámérünk 450 µl kloroform:isoamilalkoholt, döntögetve keverjük
- centrifuga 10000 rpm, 10 percig, 4°C-on
- új 1,5 ml csövekbe mérünk mintánként 280 µl izopropanolt (0,7 térfogat) és 30 µl 4 M NaAcetát (pH 5,2) amelyre kb.400 µl felülúszót pipetázunk a már lefugált mintákról, forgatva keverjük, 5-10 percig inkubáljuk szoba hőn
- centrifuga 13000 rpm, 20 percig, 4°C-on, leönteni a felülúszót
- a csapadékot átmoszuk 500 µl 70% hideg etanolal
- centrifuga 13000 rpm, 5 percig, 4°C-on
- szárítani szoba hőn kb.10 percig (speed vac-ban ne szárítsuk)
- visszaoldani 25 µl steril MQ vízben

Az RNS kivonatok mennyiségét és minőségét denaturáló agaróz gélelektroforézissel, illetve spektrofotometriás méréssel ellenőriztük.

### 4.3 Teljes RNS szekvenálás

Az RNS szekvenálást a Debreceni Egyetem szekvenáló cége, az UD Genomed Kft. végezte. A szekvenáláshoz az Illumina vállalat technológiáját (SBS, Sequencing By Synthesis) használtuk, amely milliós nagyságrendben állít elő 100 bázispár hosszú egyedi szekvenciákat, amelyeket a szaknyelv leolvasásnak, „read”-nek nevez. Az RNS kivonatokból elkészített szekvenáló könyvtárakat IlluminaHiScanSQ platformon szekvenáltuk. A nyers read-ek minőségellenőrzését FastQC szoftverrel (Wingett és Andrews, 2018) végeztük.

### 4.4 Adatelemzés, bioinformatika

Az új generációs szekvenálási (NGS) módszerek elemzése során az egyik legnagyobb kihívást az előállított nagy mennyiségű adat elemzése jelenti. A mRNS szintek meghatározásához két külön stratégiát kombináltunk. Egyrészt kihasználjuk azt, hogy rendelkezünk teljes szülő genommal: a szekvencia-szakaszokat ráillesztjük a referencia genomra, illetve az azon azonosított referencia mRNS-ekere. Másrészt a szekvenálási lefedettség lehetővé teszi azt is, hogy a rövid szakaszokból *de novo* – azaz előzetes információk, referencia genom nélküli – elméleti mRNS molekulákat építsünk. Az egyes mRNS-ek egymáshoz viszonyított lefedettségének mértékéből következtethetünk az adott gén expressziós szintjére, működésének aktivitására.

Az RNS szekvenciák elemzése során első lépésben a kapott eredményeket feldolgoztuk. A mRNS szintek meghatározásához egyrészt elvégeztük a read-ek referencia genomra történő illesztését, másrészt az RNS readek *de novo* illesztését is.

Az illesztés sikerességét és minőségét nagyban javíthatjuk, ha pontos információnk van a könyvtárak inzertméret-eloszlásáról. Ehhez először minden minőségszűrt read-et illesztettünk a referencia-genomra, majd ezen illesztések alapján meghatároztuk az inzert méretet. A szekvencia olvasatok referencia genomra történő illesztését bwa (Li és Durbin, 2009) szoftverrel végeztük, az inzert méret statisztikához a picard tools (Broad Institute, 2018) csomagot hívtuk segítségül.

Az egy-egy gén különböző transzkriptjeire illeszkedő összes szekvenciaolvasat nyers számát HTSeq szoftver (Anders et al., 2014) segítségével határoztuk meg. A differenciáltan expresszálo gének azonosításához a szekvencia könyvtárak normalizálását az EDASeq programmal (Risso et al., 2011), az expressziós szintek elemzését az edgeR (McCarthy et al., 2012) programmal végeztük. A GO dúsítási teszthez a ShinyGO alkalmazást (GE et al. 2020) használtuk.

## **4.5 Feketerothadt szőlőbogyók kémiai összetételének finomanalitikai vizsgálata**

### **4.5.1 Vizsgált növényanyag**

Hat különböző szőlőfajta fekete rothadt bogyóit vizsgáltuk. Ezek a Borotáról (Koch Borászat) begyűjtött Bácska, Danubius, Hibernál, Palatina, Panonija rezisztens szőlőfajták, valamint Villányból (Koch Borászat) gyűjtött Kékfrankos szőlőfűrtök voltak. A minták mindegyike feketerothadt volt. A mintaelőkészítésnél a fertőzött fűrtökről csak a teljes mértékben feketerothadt bogyókat válogattuk le és használtuk fel. Kontroll mintának egészséges fűtről szedett bogyókat használtunk fel.

### **4.5.2 Vizsgált összetevők**

A bogyó-extraktumokban a következő összetevők mennyiségét vizsgáltuk:

- cukor
- glicerín
- glükonsav
- galakturonsav
- borkősav
- almasav
- sikiminsav
- tejsav
- citromsav
- borostyánkősav
- fumársav
- kaftársav
- összes polifenol
- katechin
- epikatechin
- leukoantocianin
- teljes antioxidáns kapacitás
- biogén aminok:
  - tiramin
  - szerotonin
  - hisztamin



- melatonin
- rezveratrolok:
  - *transz*-piceid
  - *transz*-rezveratrol
  - *cisz*-piceid
  - *cisz*-rezveratrol

#### 4.5.3 Az összetevők vizsgálatára alkalmazott mérési módszerek

Az összetevők vizsgálata során első lépésként szükség volt a feketerohadt bogyókivonat elkészítésére. A kivonatkészítés az alábbiak szerint történt: 20 mg mintát 60 ml metanollal (12 V/V% metanol víz elegye) turmixoltuk, majd 30 percig áztattuk. 2 perc centrifugálás után a felülúszót 2x50 ml kloroformmal extraháltuk. A koroformos extraktot rotadeszten, vákuumban szárazra pároltuk. A száraz maradékot 2 ml eluensben oldottuk fel.

##### *Alapanalitikai vizsgálatok*

Az analitikai vizsgálatot a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Borászati Tanszék kutatói laboratóriumában, az általános borászati analitikai gyakorlatnak megfelelően végeztük el. A mustok redukáló cukortartalmát Rebelein-módszerrel, az MSZ 9479-1980 szabvány alapján határoztuk meg. A glicerintartalmat, az almasavtartalmat, a citromsavtartalmat, illetve tejsavtartalmat Boehringer-Mannheim enzimeszttel, a borkősavtartalmat a MSZ 9489:1978 szerint spektrofotometriával határoztuk meg.

##### *Spektrofotométeres vizsgálatok*

A spektrofotometriás vizsgálatokat MOM Spektromom 195 típusú készülékkel végeztük a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Borászati Tanszék kutatólaboratóriumában. Az összespolifenol-tartalmat Folin-Ciocalteu-fenolreagenssel mértem meg (Singleton-Rossi, 1969), és galluszsav-egyenértékben kifejezve közlöm. A leukoantocianinok mennyiségét, vas(II)-szulfátot tartalmazó sósav-butanol, 40:60 arányú elegyével történő melegítés után spektrofotometriásan mértük, szintén Flanzy (1970) módosított módszere alapján. Koncentrációját malvidin-3,5-diglükozid-egyenértékben kifejezve adom meg. A katechin és epikatechin tartalmat, alkohollal hígított borban kénsavas vanilinnel reagáltatva, 500 nm-en, spektrofotométeresen

mértük (Rebelein, 1965). A TAK-érték meghatározását a következőképpen hajtottuk végre: a mintákat desztillált vízzel tízszeresére hígítottuk. Egy 50 ml-es mérőlombikba összemértünk kb. 30 ml desztillált vizet, 0,5 ml hígított bormintát, majd 2,5 ml Folin-Ciocalteu-fenolreagenst és 8 percen belül 7,5 ml 20%-os  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -oldatot adtunk hozzá. Összeráztuk és desztillált vízzel szemben 765 nm-en mértük az abszorbanciát.

### *NMR-spektroszkópia*

A glükonsav, galakturonsav, sikiminsav, borostyánkősav, fumársav és kaftársav meghatározása H NMR technikával történt (Godelmann et al., 2013). H NMR spektrumok rögzítése 26,85 °C-on Bruker AVANCE 400 spektrométerrel és 400'54 ASCEND magnet rendszerrel (Bruker, Karlsruhe, Germany) proton NMR módban, 400.13 MHz frekvencián. A célzott vizsgálathoz való minta előkészítés és vizsgálati paraméterek a következők voltak: pH állítás pH 3,1-ra automata BTPH rendszerrel, deutérium és tetrametil- szilán adagolása, relaxációs késés 4 s, mintavételi idő 3,98 s, spektrális szélesség: 8223,68 Hz. Az adatok NMR Wine-ProfilngTM 3.1 Analysis Reportban kerültek rögzítésre. Az NMR vizsgálatokra a Dyagnosticum Kft. Szerencsi laboratóriumában került sor.

### *Kromatográfia*

A rezveratrolok (transz-piceid, transz-rezveratrol, cisz-piceid, cisz-rezveratrol) minőségi és mennyiségi meghatározását nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás eljárással (HPLC) végeztük a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Borászati Tanszék kutatói laboratóriumában. A rezveratrolok meghatározásánál Kállay és Török (1997) módszere szerint jártunk el. A bogyókivonatokat az előkészítés után közvetlenül injektálhatóak voltak a HPLC-készülékbe. A rezveratrol meghatározása izokratikus módon történt.

A rezveratrolmérés körülményei és a készülék beállításai:

|               |                                           |
|---------------|-------------------------------------------|
| HPLC-készülék | HP Series 1050                            |
| kolonna       | LiChrospher® 100, CN 5µm (Merck, Germany) |
| detektor      | HP Series 1050                            |
| folyadékáram  | 2 mL/min                                  |

|             |                                      |
|-------------|--------------------------------------|
| hőmérséklet | 30°C                                 |
| hullámhossz | 306 nm                               |
| eluens      | 5:5:90=acetonitril:metil-alkohol:víz |

A biogén amin-tartalom HPLC-módszerrel történő meghatározása a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Borászati Tanszékén történt (Kállay és Nyitrai Sárdy, 2003). A méréshez a must szűrése 0,45 µm átmérőjű membránszűrőn történt, ezután borát-puffer jelenlétében OPA-val (orto-phtal-aldehid) léptettük reakcióba (Bauza et al., 1995; Lethonen, 1996). Az OPA-reagens a következő módon készült: 45 mg OPA-t 0,5 ml metanolban oldottunk, majd 0,1 ml merkaptotetanolt adtunk hozzá. A borát-puffer készítésekor 1 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-hoz 38 ml desztillált víz lett hozzáadva. A pH-érték 40 g/100 ml KOH oldattal 10,4-es értékre lett beállítva. Az OPA-reagens és a puffer a vegyítést követően négy perccel később az elegyből 20 µl lett a HPLC-berendezésbe injektálva.

A kromatográfiás körülmények az alábbiak voltak:

|               |                                                                  |
|---------------|------------------------------------------------------------------|
| HPLC készülék | HP 1050 típusú HPLC                                              |
| kolonna       | Nukleosil 100 C-18 200*0                                         |
| detektor      | HP 1046 A Fluorescens detektor                                   |
| olyadékáram   | 1 ml/min.                                                        |
| hőmérséklet   | 30°C                                                             |
| hullámhossz   | $\lambda_{ex}$ : 340 nm; $\lambda_{em}$ : 440 nm                 |
| eluens        | A-oldat: 0,08 M ecetsav<br>B-oldat: acetonitril (HPLC-minőségű). |

Az elválasztás hatékonyságának növelését a gradiens elúciós technika segítette. A komponensek standard mintákkal lettek azonosítva. A kalibrálást kalibrációs egyenesek készítésével végeztük el, illetve az egyes vegyületeket az elúciós idő alapján azonosítottuk. A szerotonint (kalibrációs egyenes:  $X=0,014Y+0,0897$ ) kivéve az egyes biogén aminok hisztaminban (kalibrációs egyenes:  $X=0,051Y-2,113$ ) lettek kifejezve. A mérési hiba  $\pm 6$  %.

Az OTA tartalom HPLC-módszerrel történő meghatározása a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Borászati Tanszékén történt. A bogyókivonatok az előkészítés után közvetlenül injektálhatóak voltak a HPLC-készülékbe.

A kivontok ochratoxin A meghatározását nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás eljárással végeztük. A kalibrációs görbét OTA-ra (Sigma Aldrich, CAS Number: 303-47-9) vettük fel.

Az OTA mérés körülményei és a készülék beállításai:

|               |                                                              |
|---------------|--------------------------------------------------------------|
| HPLC-készülék | HP Series 1050                                               |
| kolonna       | LiChrospher® 100, CN 5µm (Merck, Germany)                    |
| detektor      | HP Series 1050                                               |
| folyadékáram  | 1 mL/min                                                     |
| hőmérséklet   | 30°C                                                         |
| hullámhossz   | $\lambda_{\text{ex}}$ =333 nm; $\lambda_{\text{em}}$ =460 nm |
| eluens        | 5:5:90=acetonitril:metanol:víz                               |

A kapott adatok kiértékelését egytényezős varianciaanalízissel, valamint Tukey-Kramer próbával végeztem, annak érdekében, hogy el tudjam dönteni, hogy 95%-os megbízhatósági szinten van-e szignifikáns különbség a minták között.

## 5 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

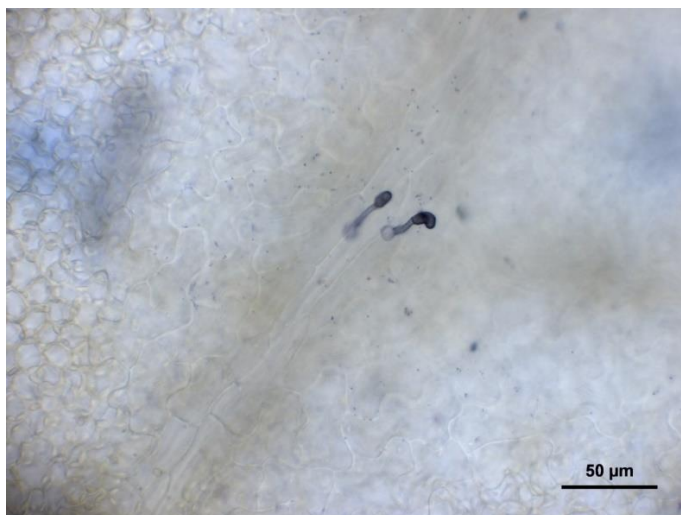
### 5.1 Feketerothadás érzékenység vizsgálata

A sikeres feketerothadás fertőzés szempontjából döntő a megfelelő hőmérséklet és a megfelelő ideig tartó folyamatos levélnedvesség (relatív páratartalom), amely mesterséges fertőzés esetén, zárt rendszerben biztosítható. Három növény (három biológiai ismételés) elegendő egy genotípus teszteléséhez. Reprodukálható mesterséges viszonyok között fertőztünk, így vizsgálataink eredménye, a gombaspórák csírázása közti különbség kizárólag a vizsgált fajták eltérő fogékonyságának tulajdonítható. A levél és a fűterezisztencia mértéke azonban egy fajtán belül is eltérő lehet, így az eredmények csak a 'Csillám' fajta levélrezisztenciájával hozhatók összefüggésbe.

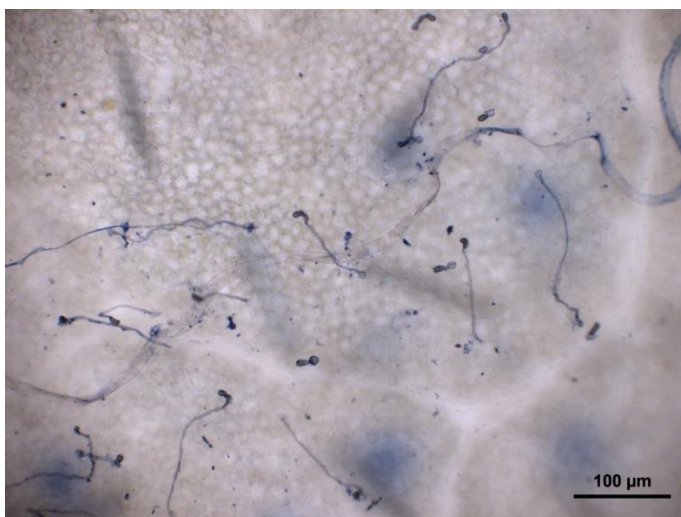
A fajták vagy interspecifikus keresztezések utódnemzedékeinek feketerothadással szembeni ellenállóságát mesterséges fertőzési kísérletekben többen vizsgálták (Spotts, 1977; Rex et al., 2014; Roznik et al., 2017b). A kiértékelés a fertőzés után 2-3 héttel a fertőzött részeken megjelenő tünetek alapján történt. Akár a fertőzött levelekből kimetszett levélkorongok nedveskamrában történt inkubálása utáni (Spotts, 1977), akár festése utáni (Ferrin és Ramsdell, 1977; Kellner et al., 2015) vagy közvetlenül a levélen végezett mikroszkópos vizsgálatok mindig csak a spórák számának, a gombaspórák csírázásának ellenőrzésére vagy a gomba jelenlétének kimutatására irányultak. A csíratömlők eltérő növekedési ütemét fogékony és ellenálló fajtán korábban nem vizsgálták.

#### 5.1.1 A szőlő-feketerothadás kapcsolat vizsgálata szűrőpapírkorongos fertőzéssel

Sikeresen megfestettük a szűrőpapírkorongok alatti levélkorongokat és felvételezni tudtuk a csírázott és nem csírázott spórákat, valamint a hifanövekedés előrehaladtát. A megfestett levélkorongok mikroszkópos ellenőrzése minden esetben igazolta a fertőzések sikerességét. A sztereo mikroszkópon 40x-es, illetve 100x-os nagyításban vizsgált levélkorongok alapján a fogékonnak talált Csaba gyöngye szőlőfajtnál a fertőzést követő 18. órában a gomba spórák csírázásnak indultak (12. ábra), 36. órában pedig jelentősebb csíratömlő növekedést mutattak (13. ábra).



12. ábra: Csirázó spórák a fertőzést követő 18. órában



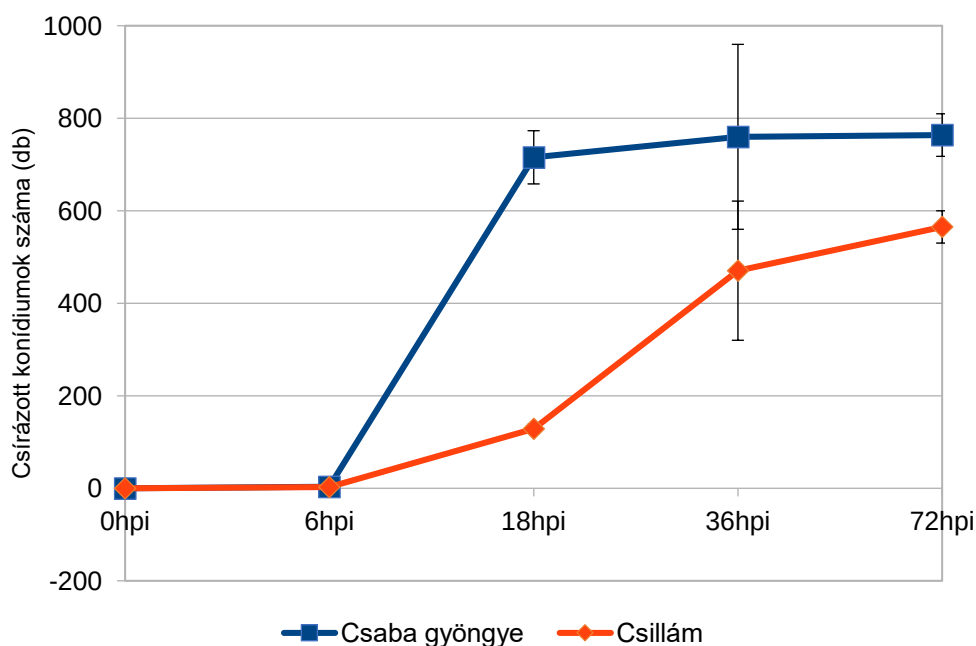
13. ábra: Csirázó spórák 36 órával a fertőzést követően

### 5.1.2 *Guignardia bidwellii* konídiumok csírázási aránya

Vizsgáltuk a megfestett levélkorongokon található konídiumok csírázási arányát (3. táblázat). Csillám fajta esetében a fertőzés sikeres volt, de a gombaspórák csírázása időben jelentősen eltolódott a Csaba gyöngye fajtához képest (14. ábra). A Csaba gyöngye fajtánál már a fertőzést követő 6. órában jelentős mértékben, 77,8%-ban csíráztak a spórák. A fertőzést követő 18. órában pedig már 99% felett volt a csírázási százalék, valamint jelentős csíratömlő növekedés volt megfigyelhető.

3. táblázat: Különböző időpontokban vizsgált fekete-rothadás konídiumok csírázási aránya Csillám és Csaba gyöngye fajtákon

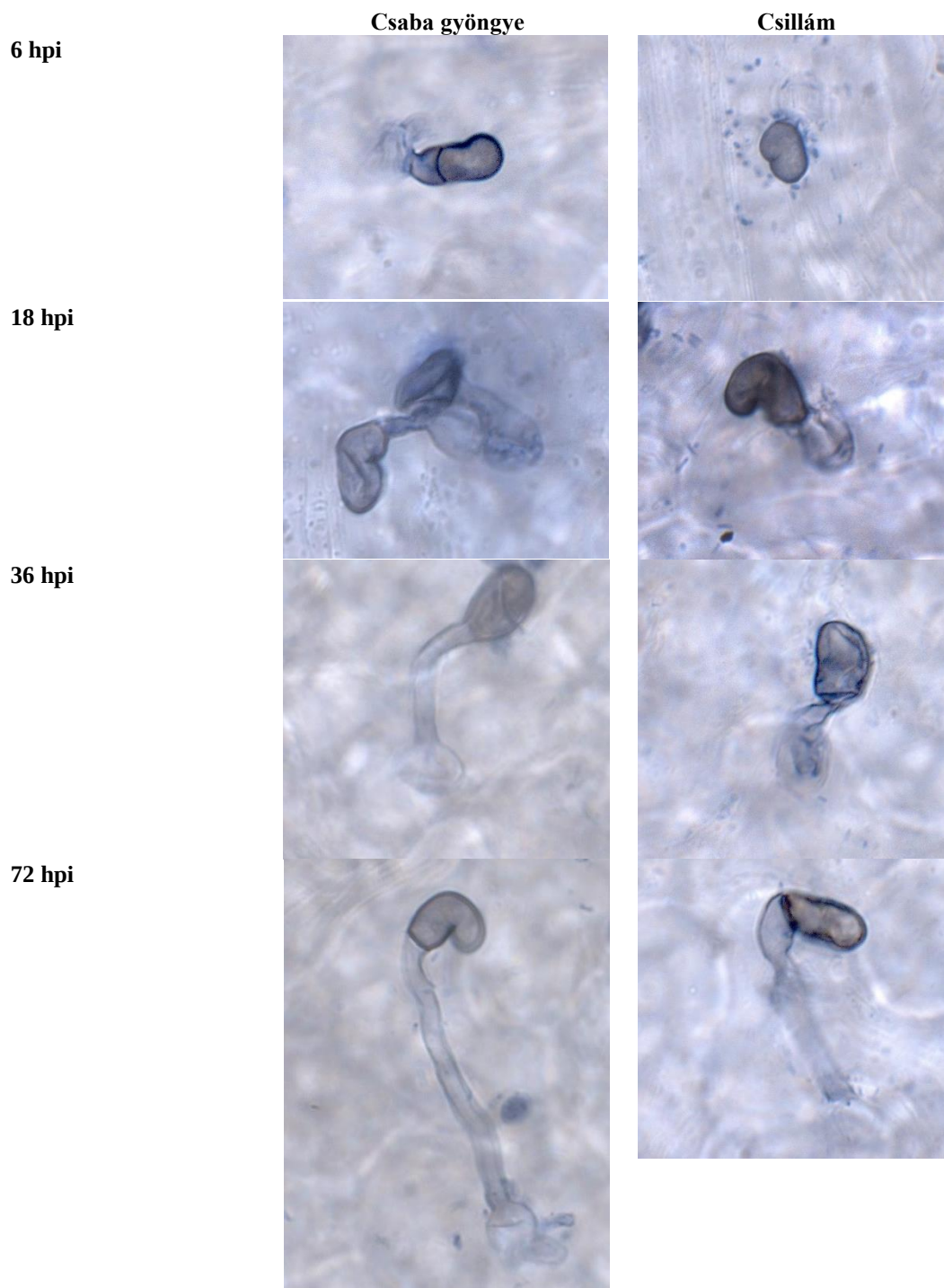
|               | 6hpi    | 18hpi    | 36hpi    | 72hpi    |
|---------------|---------|----------|----------|----------|
| Csaba gyöngye | 3,22    | 715,4444 | 759,7778 | 763,5556 |
| Csillám       | 2,55    | 128,5556 | 470,4444 | 565      |
| p-érték       | 0,698   | 6,49E-10 | 0,003473 | 3,47E-08 |
| t             | 0,39627 | 30,163   | 3,4695   | 10,323   |
| df            | 13,708  | 8,4686   | 14,862   | 14,915   |



14. ábra: Különböző időpontokban vizsgált, csírázott fekete-rothadás konídiumok száma Csillám és Csaba gyöngye fajtákon. A feltüntetett hibaszávok a szórást mutatják.

### 5.1.3 Csíratömlő növekedés

A fogékonyság és ellenállóság jellemzésére a csíratömlők hosszának mérése viszonylag gyors módszer lehet. Megfelelően előkészített növények és megfelelő laboratóriumi körülmények esetén két nap alatt különbséget lehet kimutatni egyes fajták vagy nemesítési anyagok fogékonyságát illetően. Mivel a vizsgálatokat csak két fajtán végeztük egy rezisztencia tesztelési módszer kifejlesztéséhez további fajták bevonása szükséges.

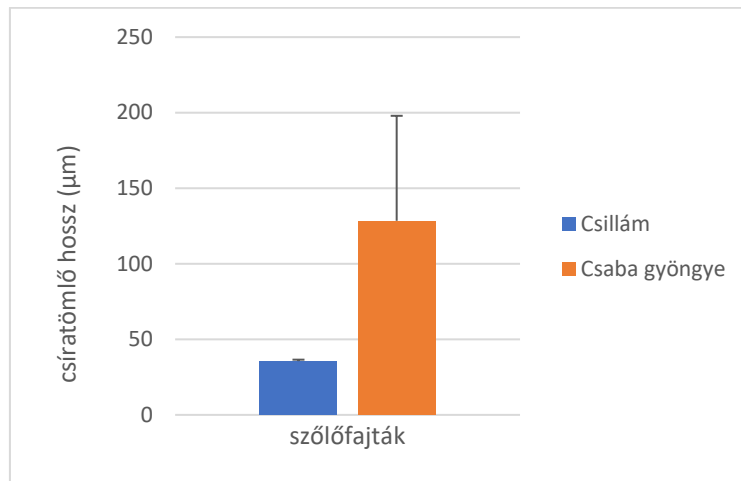


15. ábra: Csíratömlő növekedés összehasonlítása különböző időpontokban a Csillám és Csaba gyöngye fajtákon

A csíratömlő növekedésének vizsgálata során kapott eredmények a két fajta között lévő jelentős különbségre mutattak rá (15. ábra). A csíratömlők hossza a fertőzés után 18 órával a fogékony 'Csaba gyöngye' fajta levelén átlagosan 120µm hosszúak, míg az ellenálló 'Csillám' fajta levelén átlagosan 40µm hosszúságúak voltak. A fekete-rothadás rezisztens 'Csillám' fajta levelein



igazolhatóan [ $t(98,9) = 11,83, p < 0,001$ ] lassabb a *Guignardia bidwellii* csíratömlőinek növekedése, mint az érzékeny 'Csaba gyöngye' fajtán (16. ábra).



16. ábra: Feketerothadás spórák csíratömlőhossz átlagának összehasonlítása Csillám és Csaba gyöngye szőlőfajtáknál (18 hpi). A feltüntetett hibaszávok a szórást mutatják.

A szűrőpapír-korongos fertőzési módszer megbízható, kevés fertőző anyagot igényel. Alkalmas a növények megfertőzésére és a tünetek kiváltására. Az alkalmazott fél-levél módszer jól használható a fajták közötti különbségtételre, valamint ez a fertőzési rendszer jól alkalmazható volt a szőlő-feketerothadás kapcsolat RNS szintű vizsgálata során is. A fent bemutatott módszert használtuk többek között annak az RNAseq kísérletnek a beállításához, amelyben a szőlő növény és a feketerothadást okozó gomba közötti kapcsolatot jellemezzük. A fogékony és rezisztens mintákról fertőzött és kontroll levélfelületről, 4 különböző időpontban szedett minták teljes RNS profilját meghatároztuk új generációs szekvenálással Illumina platformon.

## 5.2 A feketerothadás fertőzésre adott RNS szintű válaszreakció

### 5.2.1 Az RNS szekvenálás eredménye

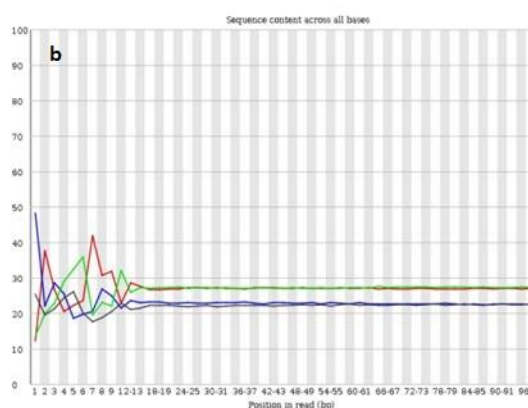
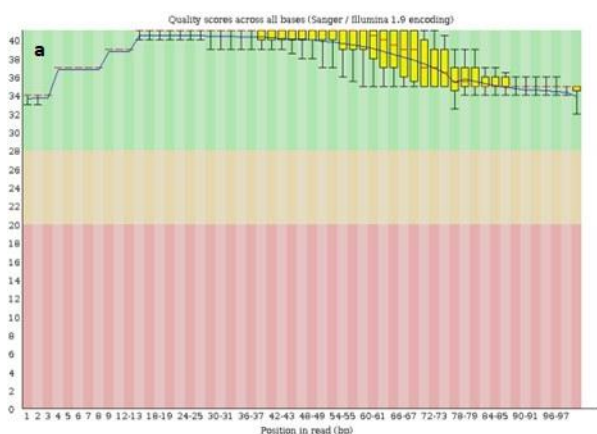
#### Minőségellenőrzés

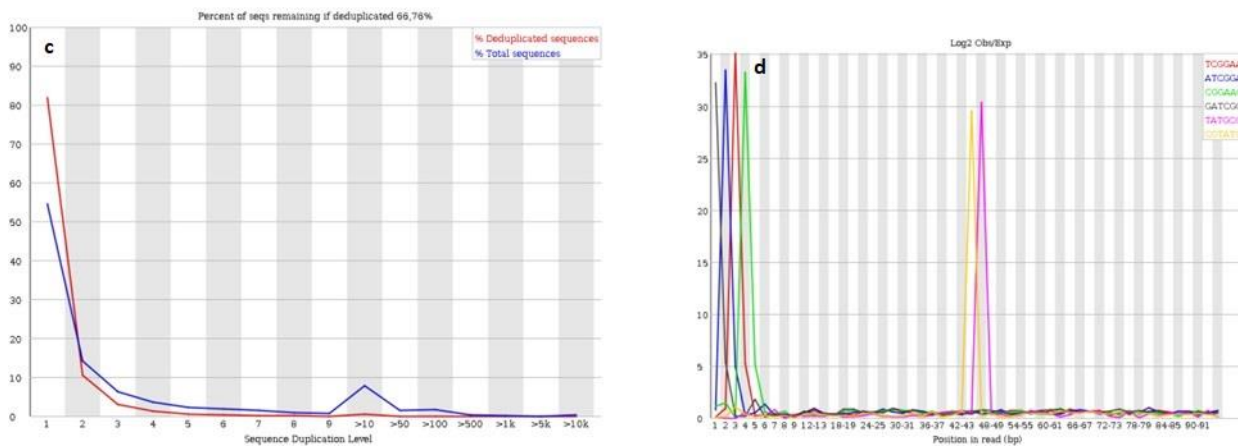
A nyers szekvencia olvasatok számát a 4. táblázat tartalmazza. A minőségellenőrzés alapján a szekvenálás minősége minden esetben kiemelkedő, esetenként a read végén egy-két bázis minősége 30 alá esik (Phred based quality value) (17a ábra). Az egyes pozíciókban található bázis-eloszlás a legtöbb esetben figyelmeztetést ad, mivel az első 12-14 bázis esetén tapasztalható némi

aránytalanság (17b ábra). Ez a jelenség a könyvtárkészítés sajátosságának köszönhető. Szintén több esetben generált hibát a szekvencia-duplikációkat vizsgáló elemzés (17c ábra), ami annak köszönhető, hogy RNAseq mintákról van szó, vagyis természetes, hogy bizonyos – magasan expresszálo – génekről több szekvencia származik.

4. táblázat: A szőlő RNS szekvenálásból visszakapott nyers szekvenciák száma (forward és reverse olvasatok együtt).

|     | Csillám    |            | Csaba gyöngye |            |
|-----|------------|------------|---------------|------------|
|     | Fertőzött  | Mock       | Fertőzött     | Mock       |
| 0h  |            | 57.398.796 |               | 39.217.300 |
|     |            | 13.126.472 |               | 10.220.442 |
|     |            | 48.983.682 |               | 22.929.206 |
| 6h  | 51.150.878 | 59.762.676 | 60.017.568    | 46.501.644 |
|     | 48.424.468 | 13.774.650 | 45.144.016    | 12.094.798 |
|     | 41.493.646 | 47.769.144 | 12.143.068    | 10.159.862 |
| 18h | 11.402.696 | 24.659.228 | 21.707.624    | 50.631.236 |
|     | 58.139.482 | 46.529.030 | 50.513.822    | 44.984.250 |
|     | 41.160.156 | 15.586.444 | 42.107.530    | 20.709.472 |
| 36h | 55.199.368 | 51.371.456 | 56.075.874    | 65.733.734 |
|     | 21.378.520 | 22.184.292 | 35.366.838    | 36.957.502 |
|     | 21.696.924 | 31.647.092 | 22.731.576    | 33.102.948 |





17. ábra: Nyers FastQC eredmények (Csillám fajta, 0h, forward read-ek). a: bázisok minősége (Phred based quality score). b: a bázisgyakoriság a különböző szekvencia pozíciókban. c: Szekvencia-duplikációk. d: K-mer tartalom

Majd minden mintában vannak kiemelkedő gyakoriságú K-mer-ek (17d ábra). Az első 12–14 bázis esetén a könyvtárkészítés miatt (ahogyan a bázisonkénti szekvencia-eloszlásnál is) a K-mer-ek jelenléte elfogadható, ugyanakkor a read-ek közepén is rendszeresen megjelennek kiugróan nagy gyakoriságú K-mer-ek. A K-mer szekvenciák nem fednek át az esetlegesen detektált túlreprezentált szekvenciákkal. Ellentmondásos, hogy amíg a magas K-mer gyakoriság túlreprezentált szekvenciákra utal, azokból a legtöbb esetben nincsen sok, vagy egyáltalán nincsen. Elképzelhető, hogy a jelenség oka egyrészt az RNAseq mintákkal magyarázható, másrészt azzal, hogy a FastQC program a számítási idő kordában tartása érdekében a K-mer elemzésnél csak a read-ek első 20%-át vizsgálja.

A minták egy részénél a program detektált felülreprezentált szekvenciákat is. Ezek egyrészt különböző adapterek, másrészt ismeretlen szekvenciák. Az ismeretlen szekvenciák esetében a blast keresés minden esetben a grip24 gént hozta ki találatnak.

A nyers szekvencia olvasatok minőségellenőrzése alapján szükséges az esetleges adapter maradványok eltávolítása, amivel mind a szekvencia olvasatok elején található egyenlőtlen bázis-eloszlás, mind pedig a felülreprezentált K-mer-ekre vonatkozó mutatók javíthatók.

### Adapterek eltávolítása

Az illumina adapterek eltávolításához először a cutadapt (Martin, 2011) programot használtam. Az adapter szekvenciák közül a "TruSeq Indexed Adapter" szekvenciák mindegyike a read-párok első tagja esetén volt kimutatható, míg a "TruSeq Universal Adapter" második tagon.

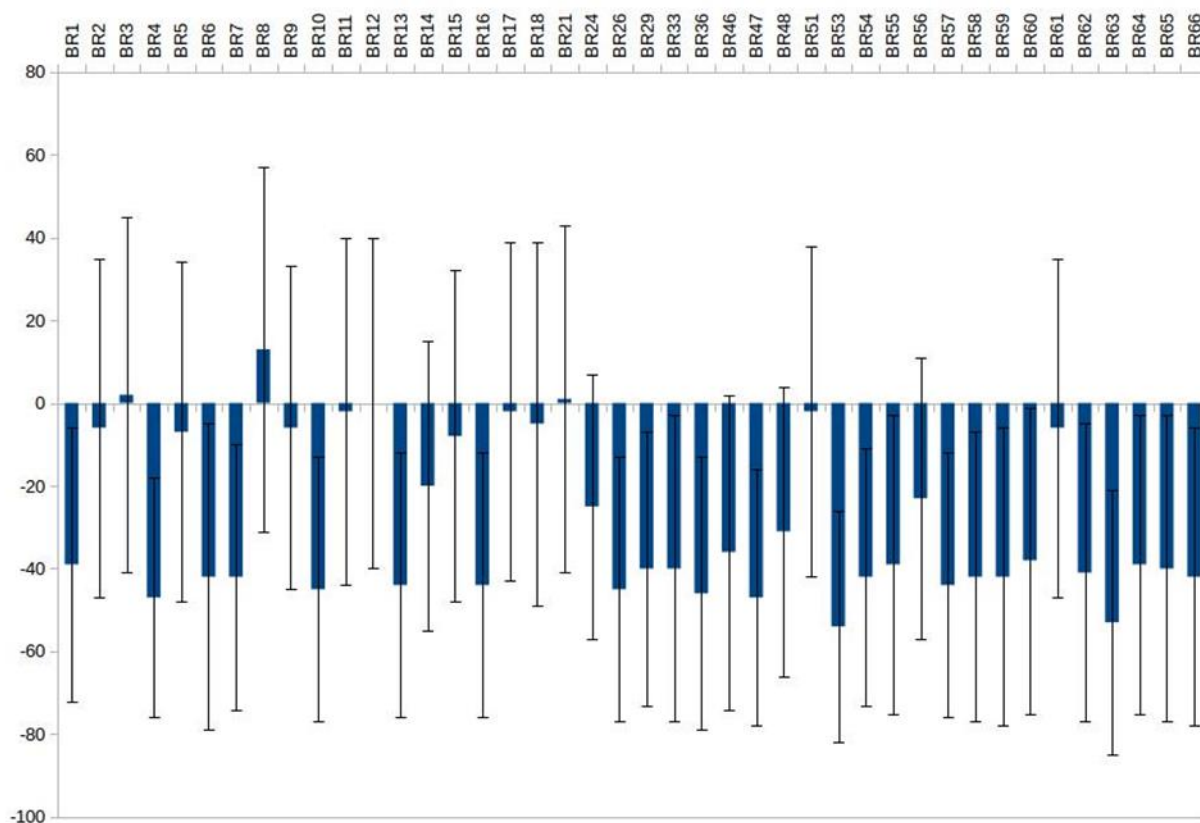
A trimmomatic (Bolger et al., 2014) szoftverrel végeztük el a végső minőségszűrést. A minőségszűrést követően megmaradt szekvencia-olvasatok számát az 5. táblázat mutatja.

5. táblázat: A szőlő RNS szekvenálásból visszkapott trimmelt, minőségszűrt szekvenciák száma (forward és reverse read-ek együtt).

|     | Csillám    |            | Csaba gyöngye |            |
|-----|------------|------------|---------------|------------|
|     | Fertőzött  | Mock       | Fertőzött     | Mock       |
| 0h  |            | 55.387.300 |               | 35.838.152 |
|     |            | 13.019.442 |               | 10.122.678 |
|     |            | 47.751.098 |               | 22.639.528 |
| 6h  | 49.435.486 | 57.668.940 | 57.954.512    | 44.838.690 |
|     | 47.121.930 | 13.639.334 | 44.187.656    | 11.997.154 |
|     | 40.541.314 | 46.642.310 | 12.018.612    | 10.042.476 |
| 18h | 11.296.048 | 24.365.296 | 20.987.702    | 49.689.626 |
|     | 55.864.086 | 44.872.044 | 48.024.110    | 43.443.082 |
|     | 40.123.490 | 15.456.354 | 41.018.952    | 20.413.468 |
| 36h | 53.290.000 | 49.673.336 | 54.181.542    | 63.412.402 |
|     | 21.088.830 | 31.153.446 | 34.569.204    | 36.350.928 |
|     | 21.328.922 | 21.900.620 | 22.294.038    | 32.421.940 |

## 5.2.2 Az inzert méret meghatározása

Az inzert méretek meghatározása alapján (18. ábra) megállapíthatjuk, hogy a könyvtárak átlagos inzertmérete negatív értéket mutat, ami arra utal, hogy a pair-end szekvenálás során a két oldalról kapott szekvenciák átfednek. Az átfedés abszolútértéke ugyanakkor nem túl magas, így fölösleges redundancia nem jellemző. Az inzertméretek szórása minden könyvtár esetében hasonló, ami az előzőekhez hasonlóan ideális könyvtárkészítésre utal.



18. ábra: Az RNS könyvtárak inzer méretének eloszlása. A negatív értékek átfedő read-eket jelentenek. A hibasávok SD értékek alapján kerültek feltüntetésre, ami nem az átfedés mértékére, hanem az inzerthosszakra vonatkozik.

### 5.2.3 *De novo* transzkriptom építése

A genom illesztéshez képest az RNS illesztések nehézsége abban rejlik, hogy a referencia genomban jelen lévő, de az érett mRNS-ből már kivágott exonok hiánya egy-egy szekvencia olvasat illesztésekor sok esetben csak részleges illesztést tesz lehetővé. Az alkalmazott Cufflinks algoritmus (Trapnell et al., 2012) ezt a problémát kiemelten kezeli, továbbá a referencia alapú illesztést kiegészíti *de novo* transzkriptom építésével is. Az eredmény az összes megszekvenált RNS alapján – ugyanakkor a referencia genom és az azon annotált gének figyelembevételével – létrehozott *de novo* transzkriptom (6. táblázat), amelyről minden minta esetében megállapítható az egyes gének kifejeződési szintje.

6. táblázat: A *de novo* transzkriptom építés eredménye. Az egyes értékek exonokra vonatkoznak.

| Típus                                            | exonok száma |
|--------------------------------------------------|--------------|
| Ismert transzkript potenciális új izoformája     | 589.370      |
| Pontos találat a referencia exonra               | 324.214      |
| Ismeretlen intergénikus transzkript              | 11.948       |
| Ismert exon-nal átfedő                           | 6.060        |
| Ismert transzkript a másik szálon                | 1.271        |
| Rossz irányban illeszkedő read (illesztési hiba) | 8            |
| Új exon, ismert transzkripttel kapcsolatban      | 4            |

A már ismert 32.000 gén mellett a 42 pair-end RNS könyvtárban a splice-változatokon felül azonosítottunk 4.331 új feltételezett gént. Ezek tartalmazhatnak nagy mennyiségben hibásan azonosított pozitív eredményeket vagy ál-géneket, ugyanakkor a legtöbb génnek szabályos intron-exon szerkezete van és – mivel RNS szekvenálási könyvtárról van szó – RNS szintetizálódik belőlük.

A Cufflinks szoftverrel (Trapnell et al., 2012) létrehozott – a kísérletünkre specifikus és teljes – *de novo* transzkriptumot referenciaként használva illesztettük a szekvencia olvasatokat a genomra és a referencia transzkriptumra TopHat (Trapnell et al., 2012) szoftverrel. Az illesztés során az illeszkedő olvasatok aránya kiemelkedően magas (80% fölötti) volt

#### 5.2.4 A génexpresszió mértékének meghatározása

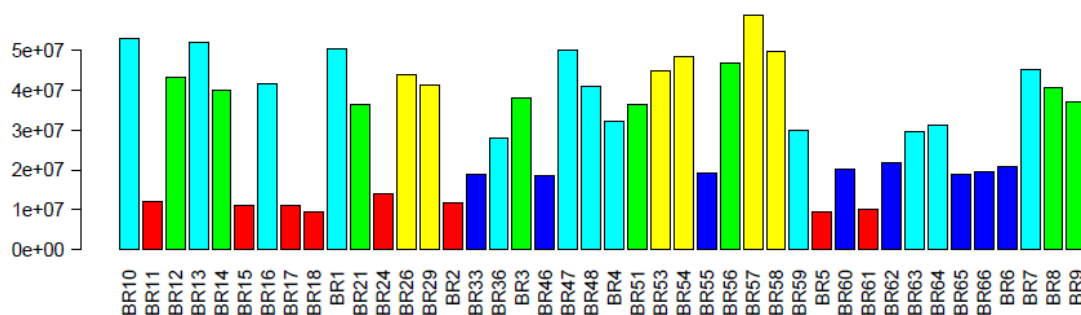
##### *Normalizálás*

A 19. ábra szemlélteti, hogy az egyes szekvenálási egységeken és az egyes könyvtárakban sem egységes a szekvenciaolvasatok száma. Ezért az RNAseq könyvtárak gondos normalizálása szükséges, mert az egyes gének hossza és GC-aránya jelentősen befolyásolja az adott transzkriptumra illeszkedő read-ek számát.

A kiértékeléshez használt edgeR függvénykönyvtárat kifejezetten a relatív expresszióra fejlesztették ki. Az edgeR kézikönyve (McCarthy et al., 2012) szerint ilyen esetekben kevésbé jelentősek azok a tényezők (gén hossza, GC-arány), amelyek egy adott gén esetében mintáról mintára változatlanok. Kiemelkedően fontos ugyanakkor a szekvenáló könyvtárak mérete (19. ábra).

A második legfontosabb tényező a minták RNS összetétele. Egy-egy jelentősen felülreprezentált RNS egy adott mintában "elnyomhatja" a többi gént, és látszólagos relatív expressziójukat csökkentheti. Az edgeR függvényei között szerepel olyan is, ami ezt a tényezőt figyelembe veszi

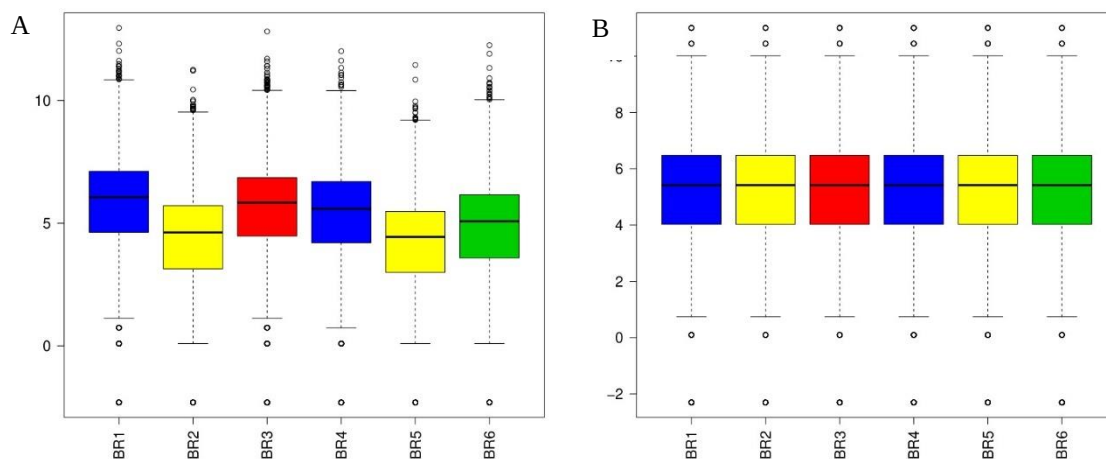
(calcNoemFactors függvény), aminek eredménye egy módosított könyvtárméret, amit a további függvények figyelembe vesznek, így külön erre normalizálni szintén nem szükséges.



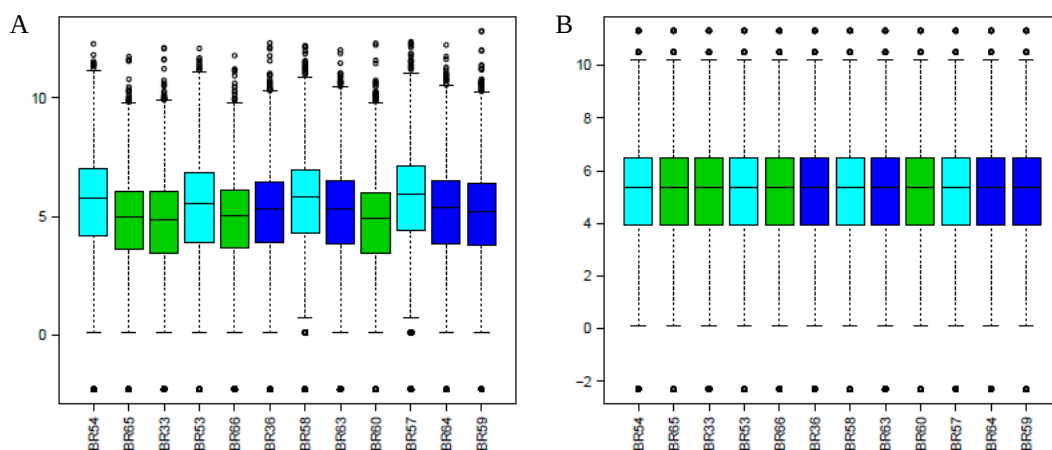
19. ábra: A szőlő fekete rohadás RNAseq szekvenáló csatornáiról kapott, a transzkriptumokra illeszkedő read-ek száma. A színek a különböző szekvenálási egységeket (un. lane-eket, csatornákat) jelölik.

### *Normalizálás GC-arányra és könyvtárméretre*

A génexpresszió mértékének meghatározása előtt EDASeq szoftverrel elvégeztük a könyvtárak GC-arányra és könyvtárméretre vonatkozó normalizálását. A könyvtárak közötti read-szám beli különbségek nagyon meghatározóak minden normalizálás szempontjából. A 20-21. ábrák a normalizálás előtti és utáni állapotot mutatják.



20. ábra: RNAseq expressziós adatok normalizálása (0 hpi). (A) normalizálás előtti állapot, (B) normalizálást követő állapot. A különböző színek a különböző szekvenáló lane-eket jelölik.



21. ábra: RNAseq expressziós adatok normalizálása (36 hpi). (A) normalizálás előtti állapot, (B) normalizálást követő állapot. A különböző színek a különböző szekvenáló lane-eket jelölik.

A normalizálás eredményeként létrejött egy SeqExpressionSet könyvtár a nyers read számokkal, normalizációs faktorokkal és normalizált szekvencia olvasat számokkal. Az edgeR tudja kezelni az EDASeq normalizálás eredményeként kapott korrekciós értékeket.

### 5.2.5 Differenciáltan expresszáló gének

A normalizált könyvtárak esetében végül edgeR eszköz segítségével kiolvastuk a – megfelelő kontrollok figyelembevételével – differenciáltan expresszáló gének listáját, azaz három mintavételi időpontban meghatároztuk azokat a géneket, amelyek a feketerothadás fertőzés hatására kifejeződésük változásának szempontjából eltérően reagálnak fogékony és ellenálló fajta esetében.

Miután megtörtént a szekvencia-olvasatok illesztése és az egyes génekre illeszkedő szekvencia-olvasatok számának GC-tartalom alapú illesztése, elkészítettünk egy statisztikai modell-mátrixot, amely azonosítja a két vizsgált szőlőfajta közötti differenciált expressziót mutató géneket függő és független kontrollok és biológiai replikátumok alapján. Az alkalmazott módszer kifejezetten biológiai ismétléseket is tartalmazó RNAseq kísérletek értékelésére került kifejlesztésre, negatív binomiális eloszláson alapuló, általánosított loglineáris modell alapján.

A statisztikai elemzés eredménye azon gének azonosítása, amelyek eltérően válaszolnak különböző időpontokban a feketerothadás fertőzésre ellenálló és fogékony fajta esetén (7. táblázat). A 20 legmagasabb megbízhatósági szinten lévő szignifikáns (és nem legnagyobb mértékű) különbséget mutató gén listáját mutatják a 8-10. táblázatok.



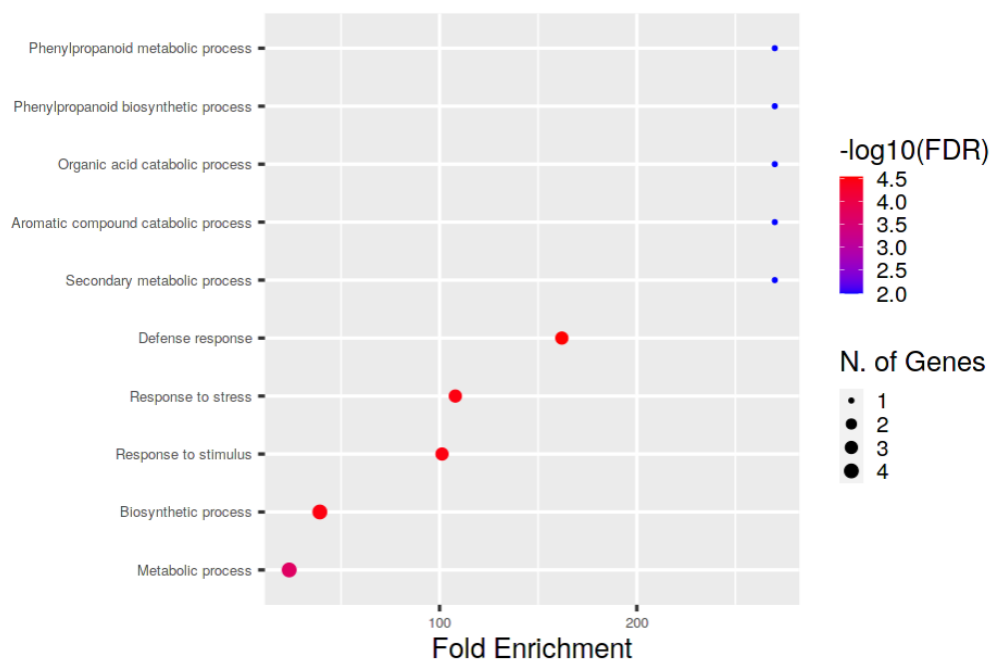
7. táblázat: Különböző P-érték mellett differenciáltan expresszáló gének száma a különböző időpontokban

| Időpont   | P<0.05 | P<0.01 |
|-----------|--------|--------|
| 0 hpi T0  | 3753   | 2680   |
| 6 hpi T1  | 143    | 49     |
| 18 hpi T2 | 334    | 126    |
| 36 hpi T3 | 102    | 22     |

A 6 hpi szedett minták (8. táblázat) esetén már láthattuk a féllevél-módszerrel kontrollált különbségeket, amelyek a különbözőképpen expresszáló gének különbségének megbízhatóságában is megmutatkoznak: a p-érték 0 hpi mintáknál  $10^{-20}$ – $10^{-50}$  nagyságrend között alakult, míg a 6 hpi minta esetén  $10^{-5}$  körül volt.

A GO dúsítás elemzés alapján a fertőzésre adott különbségben biológiai folyamatok szempontjából a legnagyobb mértékben a fenilpropanoid bioszintézis útvonalhoz köthető gének aránya nőtt meg (22. ábra), ugyanakkor az egyes folyamatok csak egy-egy génnel képviseltettek. Szintén megnőtt a védekezési válaszban, a biotikus stresszben és a külső hatásokra adott válaszban szereplő folyamatok aránya, ezeket a folyamatokat már nagyobb számú gén képviseli.

A GO dúsítási teszt alapján a molekuláris funkciók tekintetében (23. ábra) a liáz, trihidroxi sztilbén szintáz és különböző transzferáz útvonalak aránya változott, ami részben a fertőzésre adott válaszreakció sztilbénekhez való kötődésére enged következtetni.



22. ábra: A fogékony és ellenálló fajtában feketerothadás fertőzés hatására (6 hpi) eltérő expressziós változást mutató ( $p < 0.01$ ) gének GO dúsítás elemzésének eredménye alapján érintett biológiai folyamatok.



23. ábra: A fogékony és ellenálló fajtában feketerothadás fertőzés hatására (6 hpi) eltérő expressziós változást mutató ( $p < 0.01$ ) gének GO dúsítás elemzésének eredménye alapján érintett molekuláris funkciók.

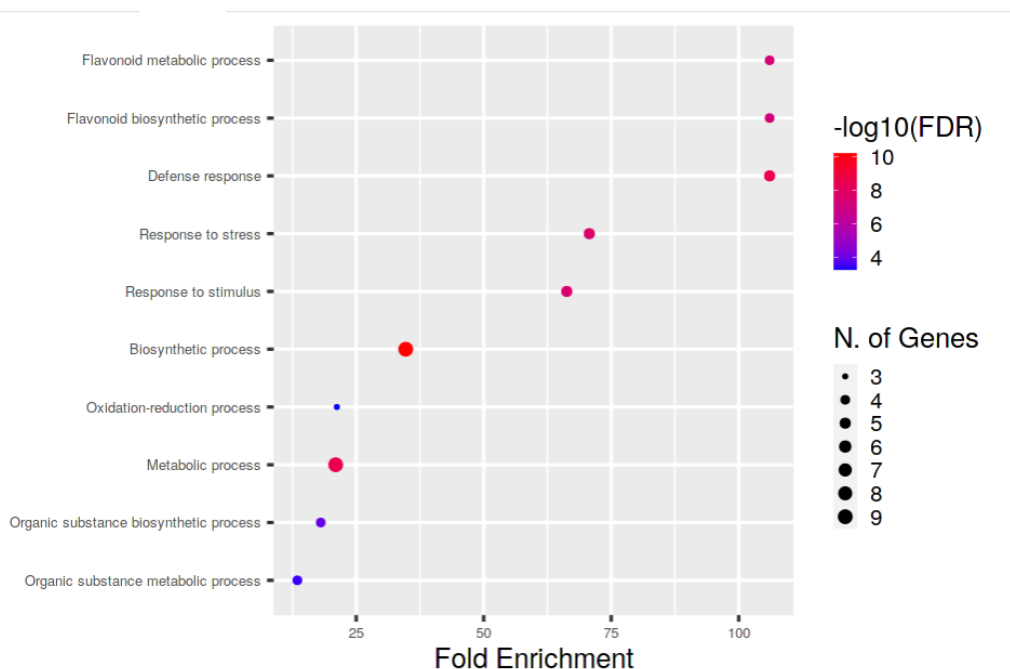
8. táblázat: A statisztikailag legmegbízhatóbban különböző expressziójú gének 6hpi időpontban. A referencia gén a publikus referencia kódot jelenti, a *de novo* lókuszt a referencia transzkriptom azonosítóját mutatja. LFC (log-fold change): a különbség logaritmus alapú mértéke. A valószínűsíthető funkciót a legjobb BLAST találat alapján határoztam meg.

| Referencia gén     | <i>de novo</i> lókuszt | LFC               | P érték              | Kromoszóma | Funkció                                                 |
|--------------------|------------------------|-------------------|----------------------|------------|---------------------------------------------------------|
| VIT_216s0039g01130 | XLOC_011336            | -5.40894850700868 | 1.04836458252051e-05 | chr16      | phenylalanine ammonia-lyase                             |
| VIT_216s0039g01300 | XLOC_011343            | -5.78943835643616 | 1.41103605502536e-05 | chr16      | phenylalanine ammonia-lyase                             |
| VIT_210s0042g00840 | XLOC_002156            | -8.78126518478644 | 2.59181971702648e-05 | chr10      | stilbene synthase                                       |
| VIT_216s0039g01280 | XLOC_011342            | -4.29274600307188 | 3.92504713407405e-05 | chr16      | phenylalanine ammonia-lyase                             |
| VIT_216s0100g00770 | XLOC_011775            | -4.68945435186216 | 4.38163171294789e-05 | chr16      | stilbene synthase                                       |
| VIT_216s0039g01120 | XLOC_012041            | -3.06407518888704 | 4.99073113518309e-05 | chr16      | phenylalanine ammonia-lyase                             |
| VIT_214s0006g02555 | XLOC_008367            | 2.54444222492397  | 5.04977136427249e-05 | chr14      | probable non-specific lipid-transfer protein akcs9-like |
| VIT_213s0106g00080 | XLOC_007067            | 5.34307341840061  | 5.66061203280575e-05 | chr13      | ankyrin repeat-containing                               |
| VIT_214s0083g00250 | XLOC_009364            | 4.98735406039023  | 7.80922573871567e-05 | chr14      | uncharacterized protein loc100853032                    |
| VIT_216s0100g00750 | XLOC_011773            | -3.30399979620808 | 7.89969399176127e-05 | chr16      | stilbene synthase                                       |
| VIT_216s0100g01170 | XLOC_012398            | -3.87244261375151 | 0.000369233804874871 | chr16      | stilbene synthase                                       |
| VIT_205s0049g00770 | XLOC_023883            | -3.38342335061093 | 0.00060323605717483  | chr5       | proline-rich 33 kda extensin-related                    |
| VIT_216s0100g00900 | XLOC_012378            | -2.46017212292538 | 0.000869214832940767 | chr16      | stilbene synthase 4-like                                |
| VIT_216s0100g01020 | XLOC_012388            | -2.69574415313446 | 0.00109912200895959  | chr16      | stilbene synthase 4-like                                |
| VIT_216s0100g00830 | XLOC_011777            | -2.97678067870695 | 0.00115710164493146  | chr16      | stilbene synthase                                       |
| VIT_216s0100g01130 | XLOC_012393            | -5.9504438814809  | 0.00133217919625411  | chr16      | stilbene synthase                                       |
| VIT_216s0100g00860 | XLOC_012375            | -2.24387524506513 | 0.00137481118686157  | chr16      | stilbene synthase 4-like                                |
| VIT_216s0100g00930 | XLOC_012380            | -2.50555739513752 | 0.00162081976620589  | chr16      | stilbene synthase                                       |
| VIT_211s0078g00290 | XLOC_003345            | -7.57269249208772 | 0.00168196365145889  | chr11      | trans-cinnamate 4-monooxygenase                         |
| VIT_210s0003g05430 | XLOC_002543            | -2.07031793608576 | 0.00188622338276629  | chr10      | reticuline oxidase-like protein                         |

A 18 hpi mintáknál (9. táblázat) csökkenni kezd az oxidatív stresszválasz génjeinek száma. A különbözőképpen expresszáló gének köre további antocianin bioszintézis génekkel bővült.

A GO dúsítás alapján érintett biológia folyamatok (24. ábra) közül a változás mértékét tekintve továbbra is a flavonoid metabolizmus és bioszintézis folyamatok mutatják a legnagyobb mértékű változást, amelyet a védekezési- és környezeti válaszreakciók folyamatai követnek. Új elemként megjelenik az oxidatív folyamatokban résztvevő gén is.

A GO dúsítás alapján a molekuláris funkciók közül (25. ábra) a 18 órás mintákban a fogékony és ellenálló fajta közötti különbségek tekintetében dioxigenáz, vitamin-, aszkorbinsav-, karboxilsav és szénhidrát-kötő funkciók, valamint 6 órás mintákhoz hasonlóan a trihidroxi sztilbén szintáz funkciók aránya nőtt meg.



24. ábra: A fogékony és ellenálló fajtában feketeerőthadás fertőzés hatására (18 hpi) eltérő expressziós változást mutató ( $p < 0.01$ ) gének GO dúsítás elemzésének eredménye alapján érintett biológiai folyamatok.

9. táblázat: A statisztikailag legmegbízhatóbban különböző expressziójú gének 18hpi időpontban. A referencia gén a publikus referencia kódot jelenti, a *de novo* lókuszt a referencia transzkriptom azonosítóját mutatja. LFC (log-fold change): a különbség logaritmus alapú mértéke. A valószínűsíthető funkciót a legjobb BLAST találat alapján határoztam meg.

| Referencia gén     | <i>de novo</i> lókuszt | LFC               | P érték              | Kromoszóma | Funkció                              |
|--------------------|------------------------|-------------------|----------------------|------------|--------------------------------------|
| VIT_206s0004g07970 | XLOC_025675            | 7.20296260794642  | 2.76118915357767e-14 | chr6       | expansin                             |
| VIT_216s0100g01100 | XLOC_012391            | -6.06173537920315 | 5.76904139642458e-09 | chr16      | stilbene synthase                    |
| VIT_206s0009g02810 | XLOC_025105            | -5.55573117749914 | 6.45688357530786e-09 | chr6       | flavonoid 3 -hydroxylase 2-like      |
| VIT_203s0091g01290 | XLOC_020484            | -6.6273536245896  | 1.06336002548492e-08 | chr3       | serine carboxypeptidase-like 18-like |
| VIT_216s0100g00770 | XLOC_011775            | -7.38821083543003 | 5.29685006313696e-08 | chr16      | stilbene synthase                    |
| VIT_210s0003g05550 | XLOC_002074            | -11.0329788150488 | 6.20191743510275e-08 | chr10      | reticuline oxidase-like              |
| VIT_202s0025g04720 | XLOC_018461            | -5.40645072557843 | 1.3096974001159e-07  | chr2       | anthocyanidin synthase               |
| VIT_203s0088g00260 | XLOC_020500            | -7.02148425048772 | 3.64191719599745e-07 | chr3       | serine carboxypeptidase-like 18      |
| VIT_203s0088g00260 | XLOC_020500            | -7.02148425048772 | 3.64191719599745e-07 | chr3       | serine carboxypeptidase-like 18-like |
| VIT_206s0009g02840 | XLOC_025107            | -3.84409569611138 | 7.81866951299544e-07 | chr6       | flavonoid 3 -hydroxylase 2           |
| VIT_218s0041g02060 | XLOC_015049            | -10.4979359865678 | 2.18091751185496e-06 | chr18      | 12-oxophytodienoate reductase        |
| VIT_216s0100g00780 | XLOC_011776            | -4.48481743305605 | 4.8148746205725e-06  | chr16      | stilbene synthase                    |
| VIT_206s0004g02620 | XLOC_025435            | -4.46361671226099 | 5.81891553984574e-06 | chr6       | phenylalanine ammonia-lyase          |
| VIT_214s0068g00920 | XLOC_008497            | -4.46739963239507 | 6.14646515962822e-06 | chr14      | chalcone synthase                    |
| VIT_205s0136g00260 | XLOC_023138            | -3.98940146828274 | 7.00495517970657e-06 | chr5       | chalcone synthase                    |
| VIT_219s0090g01340 | XLOC_016965            | -6.20609023510325 | 7.78718013771225e-06 | chr19      | glycine-rich protein                 |
| VIT_206s0061g00730 | XLOC_025881            | -3.0478784807749  | 1.94458848461133e-05 | chr6       | tonoplast intrinsic                  |
| VIT_214s0066g00010 | XLOC_009590            | -5.90704879286304 | 2.04151894489358e-05 | chr14      | uncharacterized protein loc100249294 |
| VIT_203s0091g00040 | XLOC_019791            | -9.92289689640377 | 2.22904107614244e-05 | chr3       | limonoid udp-glucosyltransferase     |



25. ábra: A fogékony és ellenálló fajtában feketerothadás fertőzés hatására (6 hpi) eltérő expressziós változást mutató ( $p < 0.01$ ) gének GO dúsítás elemzésének eredménye alapján érintett molekuláris funkciók.

A 36 hpi minták (10. táblázat) esetében megjelentek LRR típusú és más kinázok génjei, valamint további diverz fehérjék génjei, amelyek között számottevően sok a szőlő-specifikus, illetve nem karakterizált fehérjét kódoló gén. A listában már nincsenek jelen az oxidatív stresszfolyamatokra jellemző gének. Ekkorra az egyes levelek válasza már feltehetően egymástól elvált, így a különbözőképpen expresszáló gének statisztikai alátámasztása tovább csökkent, a  $p$ -érték  $10^{-3}$  körül mozgott.

Amellett, hogy a válaszreakcióban különböző expressziót mutató gének esetében az eltérés statisztikai ereje csökkent, a GO dúsítás sem adott ki olyan biológiai folyamatot vagy molekuláris funkciót, ami statisztikailag igazolhatóan feldúsult volna. Ez feltehetően részben azzal magyarázható, hogy a szigorúbb statisztikai határt ( $p < 0,01$ ) figyelembe véve ebben a fázisban már mindössze 22 gén mutatott eltérő expressziót (7. táblázat).

10. táblázat: A statisztikailag legmegbízhatóbban különböző expressziójú gének 36hpi időpontban. A referencia gén a publikus referencia kódot jelenti, a *de novo* lókuszt a referencia transzkriptom azonosítóját mutatja. LFC (log-fold change): a különbség logaritmus alapú mértéke. A valószínűsíthető funkciót a legjobb BLAST találat alapján határoztam meg.

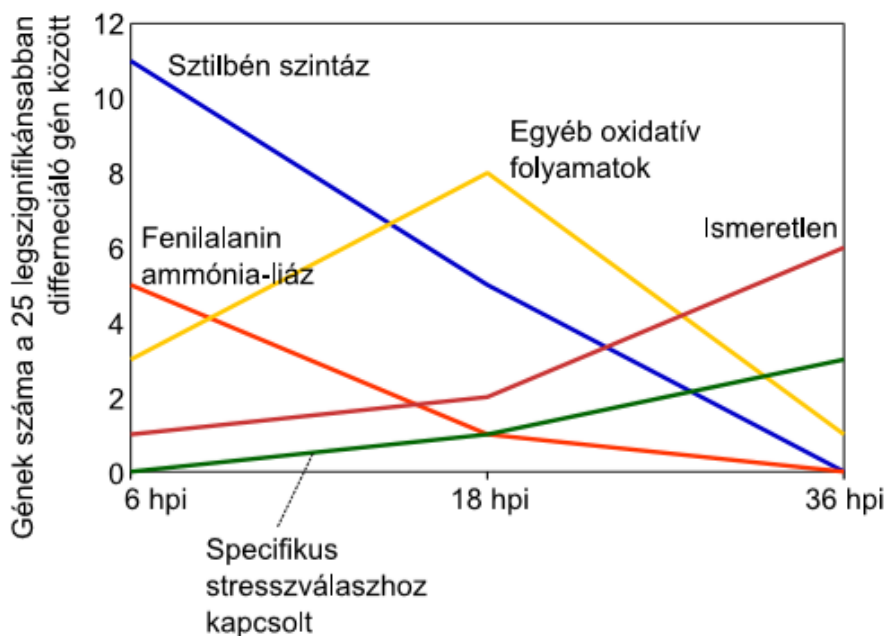
| Referencia gén     | <i>de novo</i> lókuszt | LFC               | P érték              | Kromoszóma | Funkció                                         |
|--------------------|------------------------|-------------------|----------------------|------------|-------------------------------------------------|
| VIT_213s0064g01260 | XLOC_007389            | -4.66893210553257 | 0.000139244360207196 | chr13      | leucine-rich repeat receptor-like protein       |
| VIT_204s0023g00640 | XLOC_022278            | 2.71649898480436  | 0.000879758060591401 | chr4       | receptor-like protein kinase 5-like             |
| VIT_201s0150g00460 | XLOC_000806            | -6.83543535963159 | 0.00152254779240572  | chr1       | xyloglucan endotransglycosylase                 |
| VIT_217s0000g08100 | XLOC_013831            | 6.12715768507891  | 0.00171517321295986  | chr17      | udp-glycosyltransferase 90a1-like               |
| VIT_215s0046g00070 | XLOC_011005            | 4.26183059692417  | 0.00172599033182537  | chr15      | calcium-binding protein kic-like                |
| VIT_218s0001g11830 | XLOC_015575            | 2.0382792005322   | 0.00192283321168738  | chr18      | protein                                         |
| VIT_213s0067g00420 | XLOC_005929            | -2.96219131217517 | 0.00195554039706576  | chr13      | serine-threonine protein plant-                 |
| VIT_212s0034g01930 | XLOC_004874            | -2.83841022091451 | 0.00280583487657405  | chr12      | glutelin type-a                                 |
| VIT_211s0016g04670 | XLOC_003721            | 4.20579617205791  | 0.00352290971917451  | chr11      | unnamed protein product [VITis vinifera]        |
| VIT_218s0001g15150 | XLOC_015728            | -3.51912520817731 | 0.00426575118524055  | chr18      | unnamed protein product [VITis vinifera]        |
| VIT_214s0030g01890 | XLOC_008118            | -1.97038008613178 | 0.00454585950105672  | chr14      | protein                                         |
| VIT_203s0063g02360 | XLOC_019755            | 3.11381842778652  | 0.00464955355418562  | chr3       | organ-specific protein s2                       |
| VIT_211s0016g00570 | XLOC_003550            | -6.94373474544944 | 0.00470436911188788  | chr11      | probable flavin-containing monooxygenase 1-like |
| VIT_217s0000g01930 | XLOC_012938            | -3.0300546597853  | 0.00510379922366483  | chr17      | protein                                         |
| VIT_217s0000g06210 | XLOC_013150            | -2.42099420008516 | 0.00514033976012621  | chr17      | gibberellin-regulated protein                   |
| VIT_203s0038g01770 | XLOC_019513            | -3.32948747700473 | 0.00670700385333612  | chr3       | unnamed protein product [VITis vinifera]        |
| VIT_211s0016g04330 | XLOC_003710            | -3.47589094573408 | 0.00681334966172433  | chr11      | dihydrofolate reductase                         |
| VIT_219s0093g00110 | XLOC_017167            | -1.73282618311615 | 0.00758206387886015  | chr19      | probable glutathione s-transferase              |

Összefoglalva, a három időpontban legjobb 25 különbözőképpen expresszálo gén (8., 9. és 10. táblázat) összessége közül 19 kapcsolódik oxidatív stressz folyamatokhoz, 16 gén pedig a fenilalanin-ammónia-liáz vagy sztilbén szintáz génekhez tartozik (26. ábra).

A folyamatban résztvevő differenciáltan expresszálo gének közül a sztilbén szintázok közül a legtöbb a fertőzést követő 6. órában játszik szerepet, a sztilbén szintázok szerepe azok száma alapján a fertőzés során fokozatosan csökken, a fertőzést követő 36. órában nem mutatnak eltérő expressziót a fogékony és ellenálló fajtában. Nem szabad megfeledkezni azonban arról, hogy ezek az adatok a génműködésre vonatkoznak, a képződött fehérjék és legfőképpen a fehérjék közreműködésével előállított különböző sztilbén formák mennyiségére ez közvetve hat, ezek további vizsgálata szükséges.

A fertőzés hatására különbözőképpen expresszálo gének közül a fenilpropanoid útvonalban résztvevő gének száma a sztilbén szintáz génekhez hasonló lefutást mutat.

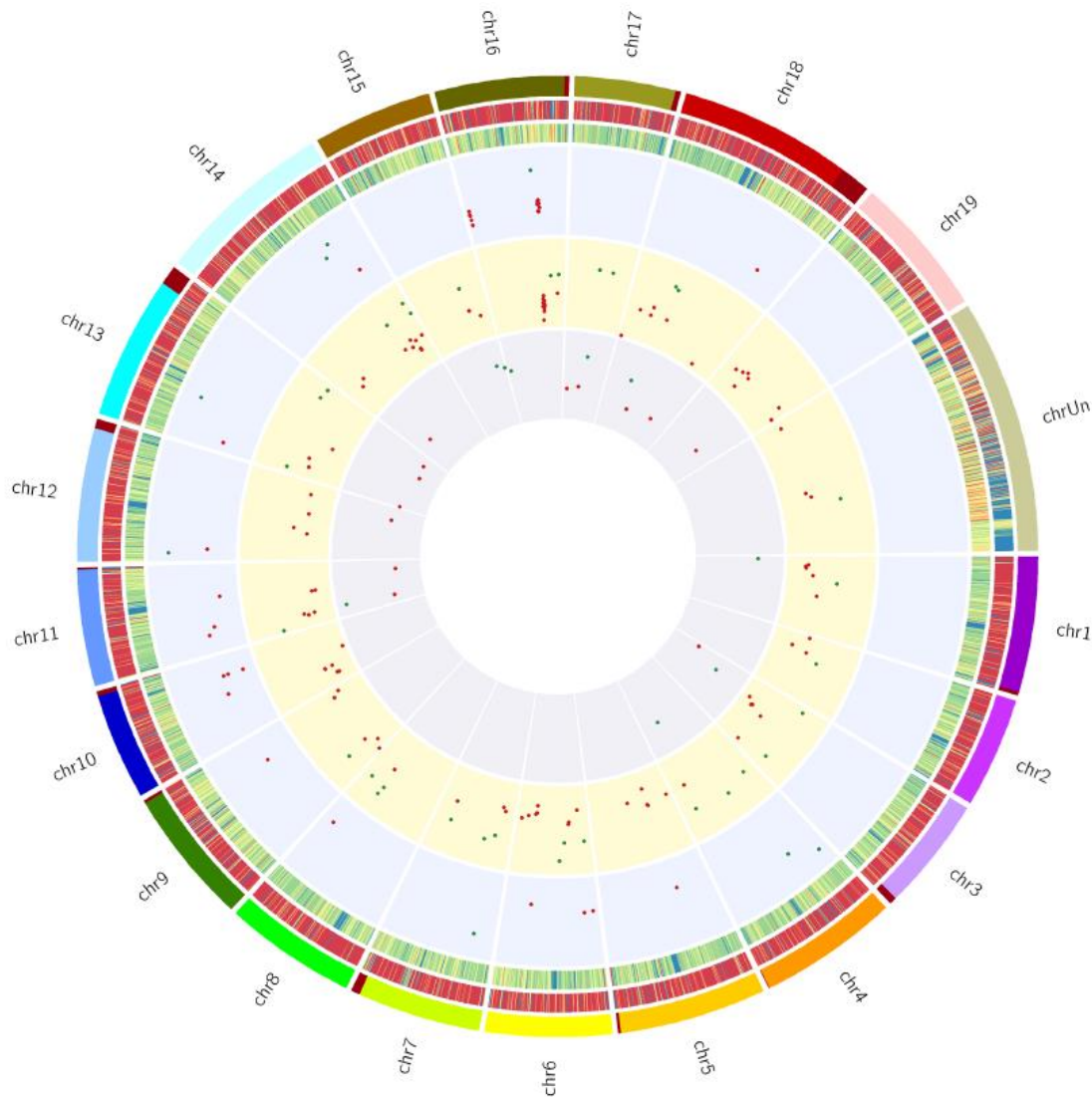
A 26. ábrán bemutatott eredmények alapján a fertőzést követő 18. órában az oxidatív folyamatoké a főszerep, majd a 36. órában megemelkedik az ismeretlen funkciójú, illetve a specifikus stresszválaszhoz köthető gének aránya.



26. ábra: Az egyes időpontokban szedett minták esetén a 25 statisztikailag legtámogatottabb differenciáltan expresszálo génnek száma a különböző folyamatokhoz kötve



A differenciáltan expresszáló gének esetében a 27. ábrán látható, hogy azok általában elszórtan helyezkednek el a kromoszómákon, míg a 16. kromoszóma esetében több olyan csoportot is találunk, amelyek együttesen mutatnak különbséget.



27. ábra:  $P < 0.01$  differenciáltan expresszáló gének. A legkülső sáv a szőlő kromoszómáit (piros színnel az un. random kromoszómarészeket) mutatja. A második és harmadik sáv a szőlő genom általános jellemzőiről ad áttekintést: a második sáv a genom ismeretlen N tartalmát (bizonytalan vagy hibás szekvencia részeket, ezek a régiók nem, vagy kisebb arányban tartalmaznak géneket), a harmadik sáv a G/C arányt mutatja (az alacsony G/C arányú régiók általában intergénikus vagy repetitív régiók, ezekben a régiókban kevesebb gén található). A következő sávok a 6, 18 és 36hpi mintákban 99% fölötti megbízhatósági szinten alul (piros) vagy felül (zöld) expresszált (Csaba gyöngye szőlőfajta) gének pozícióját mutatja.

A kromoszóma elején lévő csoport csak a 6 hpi mintákban mutatott eltérő expressziót, ami a 8. táblázat alapján egy fenilalanin ammónia liáz gén klasztert ölel föl.

A kromoszóma vége felé elhelyezkedő klaszter mind a 6 hpi, mind pedig a 18 hpi (8. és 9. táblázat) mintákban eltérő expressziót mutatott. A 8. táblázat alapján ez a csoport sztilbén szintázokat ölel föl. A változás minden esetben negatív előjelű, vagyis a Csillám fajtában a változás mértéke kisebb volt, mint a Csaba gyöngye fajtában. Az expressziós adatok alapján a Csaba gyöngye fajtában az adott sztilbén szintáz expressziója vagy alacsonyabb volt 0 hpi időpontban, vagy egyáltalán nem volt expresszió detektálható, miközben a fertőzés hatására az génműködés intenzitása nőtt.

### **5.3 Fiziológiailag aktív vegyületek vizsgálata**

Doktori dolgozatomban azt vizsgáltam, milyen változásokat idézett elő a feketerothadás a szőlőbogyó összetételében. Hogyan és milyen mértékben változott a szőlőbogyóban található vegyületek mennyisége és vegyületcsoportokon belül az egymáshoz viszonyított arányuk, valamint ez hogyan befolyásolhatja a készítendő bort, amennyiben a feketerothadt szőlő bekerülne a feldolgozás folyamán válogatás nélkül az alapanyagok közé. A szőlőfeldolgozás idejét nagymértékben befolyásolja a szőlőválogatás, mind munkaerő ráfordítást, mind időbeli ráfordítást igényel.

#### **5.3.1 Feketerothadt szőlőbogyók összetétele**

A feketerothadás (*Guignardia bidwellii*) hatásának vizsgálata során méréseket végeztünk feketerothadt szőlő bogyójának összetételére vonatkozóan. Vizsgáltuk a polifenolokat, mint a borászati szempontból egyik leglényegesebb vegyületcsoportot, valamint a szerves savakat, cukrokat, illetve olyan a növényvilágban jelenlévő legelterjedtebb vegyületek mennyiségét, mint a rezveratrol koncentrációt, valamint az emberi egészség szempontjából az egyik legmeghatározóbb biogén ament, az allergénhatású hisztamint.

Az ép bogyó cukortartalmához (203 g/kg) viszonyítva a feketerothadás jelentős cukorbetöményedést eredményezett. Az összes kapott érték magasabb, mint ami az aszúbogyókra jellemző (500 g/kg) (Magyar és Pomázi, 2014). A Bácska mintánál 620,6 g/kg, míg az Kékfrankos mintánál 616,0 g/kg voltak a mért értékek, ezek között szignifikáns különbség nincs. A legmagasabb érték 660,4 g/kg a Palatina szőlőfajtánál volt, legalacsonyabb cukortartalmat a Hibernál fajtánál (534,5 g/kg) mértünk (11. táblázat). A minták között szignifikáns különbség volt, csak a Bácska és Kékfrankos fajták között nem.

A botritiszhez hasonlóan a feketetrothadt bogyókban képződik glicerín, valamint vele arányosan glükonsav is, ez utóbbi alacsonyabb koncentrációban (Kállay, 2010). Míg az ép szőlőbogyó 0,09 g/kg, a botritizált bogyó 20,67 g/kg (Magyar és Pomázi, 2014), addig a feketetrothadt bogyók 9,6-33,2 g/kg glicerint tartalmaztak. A legmagasabb értéket a Kékfrankos bogyókban mértük.

Magyar és Pomázi (2014) vizsgálták ép bogyókban és botritizált bogyókban a glükonsav koncentrációt. Vizsgálataik szerint a glükonsav tartalom az ép bogyóban 0,02 g/kg, a botritizált bogyókon ez az érték valamivel magasabb, 2,17 g/l. Az általam vizsgált feketetrothadt bogyókban szintén mérhető volt glicerín jelenléte 1,2-1,6 g/kg koncentrációban.

A galakturonsav ép bogyónál 0,07 g/kg, aszúbogyónál 1,12 g/kg (Magyar és Pomázi, 2014). A feketetrothadt bogyók esetében 0,55-1,36 g/kg közötti értékeket kaptunk. Legmagasabb mennyiség a Panonija szőlő bogyójában volt detektálható. Kállay 2010 szerint a galakturonsav koncentráció enzimtevékenységre utal (pektináz). Legmagasabb mennyiség a Panonija szőlő bogyójában volt detektálható. A Palatina, Hibernál és Kékfrankos minták között nem volt szignifikáns különbség.

11. táblázat: Cukor, glicerín, glükonsav és galakturonsav tartalom feketetrothadt szőlőbogyókban

|                    | Cukor [g/kg] | Glicerín [g/kg] | Glükonsav [g/kg] | Galakturonsav [mg/kg] |
|--------------------|--------------|-----------------|------------------|-----------------------|
| Palatina           | 660,4        | 14,8            | 1,6              | 600                   |
| Palatina kontroll  | 595,3        | n.d.            | n.d.             | n.d.                  |
| Panonija           | 586,8        | 15,2            | 1,4              | 1368                  |
| Panonija kontroll  | 580,2        | n.d.            | n.d.             | n.d.                  |
| Hibernál           | 534,5        | 11,2            | 1,5              | 600                   |
| Hibernál kontroll  | 529,3        | n.d.            | n.d.             | n.d.                  |
| Danubius           | 631,0        | 9,6             | 1,4              | 550                   |
| Danubius kontroll  | 630,2        | n.d.            | n.d.             | n.d.                  |
| Bácska             | 620,6        | 14,4            | 1,2              | 1080                  |
| Bácska kontroll    | 618,2        | n.d.            | n.d.             | n.d.                  |
| Kékfrankos         | 616,0        | 33,2            | 1,3              | 600                   |
| Kékfrankos kontrol | 615,3        | n.d.            | n.d.             | n.d.                  |

n.d.: nem detektálható

Érdekeség, hogy almasav nem volt detektálható, azonban a (+)-tejsav megjelent. A (+)-tejsav ép bogyóban 0,01 g/kg, botritizált szőlőben 0,18 g/kg (Magyar és Pomázi, 2014). A feketetrothadt bogyókban 0,056-01,00 g/kg (+)-tejsavat mértünk, legnagyobb mennyiségben a Bácska szőlőfajtában (12. táblázat), mely szignifikánsan eltért többi mintától.

Ugyancsak érdekes a sikiminsav és a citromsav hiánya a bogyóban, miközben jelentős a borostyánkősav és a fumársav koncentrációja. A borostyánkősav ép bogyóban 0,5-1,5 g/kg mennyiségben van jelen (Kállay, 2010). A feketetrohadt mintákban 3,4-9,2 g/kg mennyiségben mértük. A legmagasabb értéket a Kékfrankos mintában észleltünk. A Palatina, Hibernál, Danubius, Bácska minták között nem volt szignifikáns különbség. A fumársav az ép szőlőbogyókban csak igen kis mennyiségben van jelen (Kállay, 2010). Feketrohadt mintákban 78,0-369,1 mg/kg mennyiségben mértük. Legnagyobb mennyiségben a Panonija, legkisebb mennyiségben a Kékfrankos mintákban detektáltuk. A minták között szignifikáns különbség volt, csak a Hibernál, és a Bácska fajták között nem.

12. táblázat: Szerves savak mennyisége feketetrohadt szőlőbogyókban

|                        | Borkősav<br>[g/kg] | Almasav<br>[g/kg] | Sikiminsav<br>[mg/kg] | (+)-<br>Tejsav<br>[g/kg] | Citromsav<br>[mg/kg] | Borostyánkősav<br>[g/kg] | Fumársav<br>[mg/kg] | Kaftársav<br>[mg/kg] |
|------------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|
| Palatina               | 8,2                | n.d.              | n.d.                  | 0,056                    | n.d.                 | 6,5                      | 125,4               | 80,0                 |
| Palatina<br>kontroll   | 4,2                | 2,9               | n.d.                  | n.d.                     | 0,3                  | n.d.                     | n.d.                | 75,6                 |
| Panonija               | 12,4               | n.d.              | n.d.                  | 0,063                    | n.d.                 | 3,4                      | 369,1               | 108,1                |
| Panonija<br>kontroll   | 3,9                | 1,8               | n.d.                  | n.d.                     | 0,2                  | n.d.                     | n.d.                | 106,9                |
| Hibernál               | 11,2               | n.d.              | n.d.                  | 0,064                    | n.d.                 | 6,7                      | 110,8               | 111,9                |
| Hibernál<br>kontroll   | 4,1                | 2,5               | n.d.                  | n.d.                     | 0,1                  | n.d.                     | n.d.                | 105,8                |
| Danubius               | 15,9               | n.d.              | n.d.                  | 0,066                    | n.d.                 | 6,4                      | 161,2               | 108,3                |
| Danubius<br>kontroll   | 3,6                | 2,1               | n.d.                  | n.d.                     | 0,05                 | n.d.                     | n.d.                | 103,8                |
| Bácska                 | 15,6               | n.d.              | n.d.                  | 0,100                    | n.d.                 | 6,6                      | 104,8               | 120,5                |
| Bácska<br>kontroll     | 3,8                | 2,6               | n.d.                  | n.d.                     | 0,08                 | n.d.                     | n.d.                | 112,6                |
| Kékfrankos             | 14,3               | n.d.              | n.d.                  | 0,076                    | n.d.                 | 9,2                      | 78,0                | 80,6                 |
| Kékfrankos<br>kontroll | 10,3               | 7,2               | n.d.                  | 0,003                    | 0,02                 | n.d.                     | n.d.                | 90,2                 |

n.d.: nem detektálható

A borkősav koncentráció 8,2-15,9 g/kg között alakult. Legmagasabb értéket a Bácska szőlőbogyók, legalacsonyabb mennyiséget a Palatina fajta mutatott. A minták között szignifikáns különbség volt, csak a Danubius, Bácska, Kékfrankos minták között nem.

A polifenolok az irodalmi adatoknak megfelelő mennyiségben voltak jelen (Kállay, 2010), jelentős eltérést nem találtam a mérési eredményeim között (13. táblázat). A mért értékek 5328-6480

mg/kg között változtak. Legnagyobb mennyiséget a Bácska, legkisebb koncentrációt a Danubius fajta mutatta. A Palatina, Panonija fajták kivételével a minták között szignifikáns különbség volt. Érdekesség azonban a katechin, epikatechin arány. Általánosságban a bogyó érése során inkább az epikatechin dominál, majd érett állapotban az 1:1 arányú koncentráció a jellemző, (Kállay, 2010). A mért értékek katechin esetében 3452-5796 g/kg között változtak. Legnagyobb mennyiséget a Kékfrankos, legkisebb koncentrációt a Hibernál fajta mutatta. A minták között szignifikáns különbség volt.

13. táblázat: Polifenolok mérési eredményei feketeterothadt szőlőbogyókban

|                        | ÖPF<br>[mg/kg] | (+)-katechin<br>[g/kg] | (-)-epikatechin<br>[g/kg] | Leukoantocianinok<br>(procianidinek) [mg/kg] | TAK<br>[mmol/kg] |
|------------------------|----------------|------------------------|---------------------------|----------------------------------------------|------------------|
| Palatina               | 5932           | 3763                   | 924                       | 3276                                         | 112,4            |
| Palatina<br>kontroll   | 618,6          | 480,3                  | 230,3                     | 780,6                                        | 11,7             |
| Panonija               | 5936           | 3640                   | 448                       | 3476                                         | 112,4            |
| Panonija<br>kontroll   | 585,2          | 466,2                  | 219,8                     | 790,5                                        | 11,1             |
| Hibernál               | 6176           | 3452                   | 1156                      | 3372                                         | 117,2            |
| Hibernál<br>kontroll   | 596,3          | 453,8                  | 225,3                     | 760,3                                        | 11,3             |
| Danubius               | 5328           | 4332                   | 176                       | 3992                                         | 100,8            |
| Danubius<br>kontroll   | 525,3          | 430,8                  | 115,2                     | 782,4                                        | 9,9              |
| Bácska                 | 6480           | 4744                   | 100                       | 3864                                         | 122,8            |
| Bácska<br>kontroll     | 580,2          | 423,9                  | 126,4                     | 775,6                                        | 11,0             |
| Kékfrankos             | 6364           | 5796                   | 120                       | 5180                                         | 120,8            |
| Kékfrankos<br>kontroll | 589,9          | 382,6                  | 256                       | 382,5                                        | 11,2             |

Epikatechin mennyisége 100-1156 g/kg között alakult. A Hibernál szőlő mintában volt a legmagasabb, a Bácska szőlőbogyókban pedig a legalacsonyabb a koncentráció. A minták között szignifikáns különbség volt. Leukoantocianinok esetében 3276-5180 mg/kg közötti értékeket kaptunk. Legnagyobb mennyiségben a Kékfrankos mintában volt jelen. A minták között szignifikáns különbség volt. A teljes antioxidáns kapacitás 100,8-122,8 mmol/kg között változott. Szignifikánsan legkisebb értéket a Danubius minta mutatta.

Ahogy az várható volt, csak piceidek (rezveratrol glükozidok) fordulnak elő a szőlőbogyóban (14. táblázat). A mért transz-piceid értékek 0,28-3,28 mg/kg között változtak. A szignifikánsan

magasabb értéket a Bácska és Kékfrankos szőlőbogyók mutattak. A feketetrohadást okozó mikroorganizmus tehát nem termel  $\beta$ -glükózidáz enzimet, ahogy ez a botritisznél is tapasztalható (Kállay, 2010). A rezveratrol koncentrációra jelen vizsgált mintákban és évjáratban nincs befolyással a feketetrohadás.

Vizsgálatainkat érdemes lenne folytatni más innovatív fajták bevonásával.

14. táblázat: A rezveratrolok mérési eredményei feketetrohadott szőlőbogyókban

|                     | Cisz-piceid<br>[mg/kg] | Transz-piceid<br>[mg/kg] | Cisz-rezveratrol<br>[mg/kg] | Transz-rezveratrol<br>[mg/kg] |
|---------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Palatina            | n.d.                   | 0,28                     | n.d.                        | n.d.                          |
| Palatina kontroll   | n.d.                   | n.d.                     | n.d.                        | n.d.                          |
| Panonija            | n.d.                   | 0,38                     | n.d.                        | n.d.                          |
| Panonija kontroll   | n.d.                   | n.d.                     | n.d.                        | n.d.                          |
| Hibernál            | n.d.                   | 0,93                     | n.d.                        | n.d.                          |
| Hibernál kontroll   | n.d.                   | n.d.                     | n.d.                        | n.d.                          |
| Danubius            | 0,46                   | 0,33                     | n.d.                        | n.d.                          |
| Danubius kontroll   | n.d.                   | n.d.                     | n.d.                        | n.d.                          |
| Bácska              | n.d.                   | 0,31                     | n.d.                        | n.d.                          |
| Bácska kontroll     | n.d.                   | n.d.                     | n.d.                        | n.d.                          |
| Kékfrankos          | n.d.                   | 3,28                     | 0,91                        | n.d.                          |
| Kékfrankos kontroll | n.d.                   | n.d.                     | n.d.                        | n.d.                          |

n.d.: nem detektálható

Vizsgáltuk a feketetrohadással fertőzött minták biogén aminosav tartalmát. Azokat az aminosavakat mértük meg, amelyek élettani hatásuk miatt a vizsgálatok középpontjában állnak (15. táblázat). A mért tiramin tartalom 0,06 és 0,11 mg/kg között alakult. Legnagyobb értéket a Kékfrankos szőlőben mutatta. A szerotonin mennyiségét tekintve 0,04-0,10 között változott. Legmagasabb értéket itt is a Kékfrankos fajtánál detektáltunk. A minták között szignifikáns különbség csak a Bácska és Kékfrankos között volt. A hisztamin tartalom esetében 8,8-11,6 mg/kg közötti értéket kaptunk.

A tiramin és hisztamin tartalmat tekintve elmondható, hogy nincs szignifikáns különbség a fajták között. A Kékfrankos mintában mért szerotonin tartalom szignifikánsan nagyobb a többi mintához viszonyítva.

15. táblázat: Biogén aminok mérési eredményei feketerohadt szőlőbogyóban

|                     | Tiramin [mg/kg] | Szerotonin [mg/kg] | Hisztamin [mg/kg] |
|---------------------|-----------------|--------------------|-------------------|
| Palatina            | 0,07            | 0,05               | 11,6              |
| Palatina kontroll   | n.d.            | n.d.               | 2,3               |
| Panonija            | 0,06            | 0,07               | 10,8              |
| Panonija kontroll   | n.d.            | n.d.               | 1,9               |
| Hibernál            | 0,09            | 0,08               | 8,8               |
| Hibernál kontroll   | n.d.            | n.d.               | 3,2               |
| Danubius            | 0,10            | 0,06               | 9,8               |
| Danubius kontroll   | n.d.            | n.d.               | 2,6               |
| Bácska              | 0,08            | 0,04               | 10,5              |
| Bácska kontroll     | n.d.            | n.d.               | 1,9               |
| Kékfrankos          | 0,11            | 0,10               | 11,2              |
| Kékfrankos kontroll | 0,04            | 0,06               | 3,2               |

n.d.: nem detektálható

A biogén amin eredményekből megállapítható, hogy borkészítés szempontjából alacsony koncentrációban voltak jelen (Kállay, 2010). Jelentős azonban a hisztamin tartalom. Az aszúszemek kémiai összetételéhez hasonlítva megállapítható, hogy ez utóbbiban kevesebb a hisztamin és stabilan mérhető a tiramin és szerotonin koncentráció, viszont a feketerohadason átesett bogyók magasabb értékeket mutatnak.

### 5.3.2 Feketerohadással fertőzött bogyók mikotoxin tartalmának vizsgálata

A szőlő feketerohadását okozó *Guignardia bidwellii* kórokozó nem termel mikotoxint. A klímaváltozás hatására fokozottabb jelenlétével kell számolnunk. A kísérletbe vont viszonylag magas fokú lisztharmat és peronoszpóra ellenálló, innovatív fehérszőlő fajták, melyek a feketerohadással szemben nem hordoznak rezisztenciát, más fogékony fajtákhoz hasonlóan viselkednek feketerohadás fertőzés esetén. Így megfelelő növényvédelem nélkül ezek is támadhatókká válnak a társult toxintermelő mikroorganizmusok számára.

Nemzetközi adatok szerint az OTA a kész borok jelentős részében kimutatható kis koncentrációban. A rendszeres borfogyasztással azonban akkumulálódhat a szervezetben, ezért szigorú határérték (2 µg/l) vonatkozik a borokra az Európai Unióban.

### 5.3.3 Feketerothadás tüneteket mutató bogyók mikotoxin tartalma

A mérésekből megállapítható, hogy a vizsgált innovatív szőlőfajták közül a Hibernál, a Palatina és Panonija minták nem tartalmaztak ochratoxin A-t. A Danubius 1,01 µg/kg, a Bácska 0,93 µg/kg, a Kékfrankos 1,36 µg/kg mennyiségben tartalmazott ochratoxin A-t, az EU határérték alatti mennyiségben (16. táblázat). A minták között szignifikáns különbség nem volt. A feketeterothadás és az OTA tartalom között lineáris összefüggés nem mutatható ki.

16. táblázat: OTA mérési eredményei feketeterothadt szőlőbogyókban

|                     | ochratoxin A [µg/kg] |
|---------------------|----------------------|
| Palatina            | n.d.                 |
| Palatina kontroll   | n.d.                 |
| Panonija            | n.d.                 |
| Panonija kontroll   | n.d.                 |
| Hibernál            | n.d.                 |
| Hibernál kontroll   | n.d.                 |
| Danubius            | 1,01 µg/kg           |
| Danubius kontroll   | n.d.                 |
| Bácska              | 0,93 µg/kg           |
| Bácska kontroll     | n.d.                 |
| Kékfrankos          | 1,36 µg/kg           |
| Kékfrankos kontroll | n.d.                 |

n.d.: nem detektálható

Megállapítható, hogy a *Guignardia bidwellii* okozta sérülések nyomán a bogyó felületén út nyílik egyéb penészgombák behatolásához, elsősorban toxintermelő *Penicillium* és *Aspergillus* fajok számára.

Ahhoz, hogy teljeskörű vizsgálatot tehessünk, méréseinket folytatnunk kell különböző borvidékeken, különböző szőlőfajták bevonásával, különös tekintettel az innovatív fajtákra, hiszen ezeknek a fajtáknak egyfajta „gyengesége” lehet a feketeterothadással szembeni csekély ellenállás, ahogy az a jelen kísérletünkbe bevont fajták is tükrözik.



## 6 KÖVETKEZTETÉSEK

Viszonylag gyors módszer lehet a feketerothadás fogékonyság és ellenállóság jellemzésére a csíratömlők hosszának mérése. Mindössze két nap alatt különbséget lehet kimutatni a fogékonyság tekintetében. Ez lényegesen megkönnyítheti a nemesítő munkáját, mivel gyors előrejelzést kap a növényanyagról, míg a kór folyamat lassúsága miatt a levélen jelentkező tünetekre, barna foltokra mintegy két hetet kell várni. A módszer a gomba csírázását vagy növekedését gátló vegyületek *ex situ* tesztelésénél is használható.

Összesen 42 pair-end RNS könyvtárat szekvenáltunk kontroll és feketerothadással fertőzött, rezisztens és fogékony növényekből vett mintákból négy időpontban (0, 6, 18, 36 hpi) három biológiai ismételtsben. Az egyes mintákban a minőségileg szűrt szekvencia-olvasat párok száma 5 és 30 millió db (0,5 és 3 milliárd bázis) között mozgott. Az inzerthosszak mérete -53 és 2 között volt, ebből arra következtethetünk, hogy a könyvtárak inzerthossza ideális volt, a két oldalról történő szekvenálás 41 könyvtárban összeért, a legnagyobb átlagos átfedés 53 bp volt.

Az egyes időpontokban vett minták esetében az előzetes funkcionális elemzést a 25 statisztikailag leginkább támogatott különbözőképpen expresszálo gén egyszerű blast-annotációja alapján írtuk le. A 0 hpi időpontban, azaz közvetlenül a fertőzés előtt vett minták kiértékelésével az volt a célunk, hogy kiszűrjük a kezdeti különbségeket, hogy az esetleges differenciáltan expresszálo géneket későbbi időpontokban ki tudjuk szűrni a jelöltek közül. A 25 legmagasabb szignifikancia szinttel rendelkező különbözőképpen expresszálo gén között különböző protein kinázok és egy rpm-1-szerű rezisztencia gén is található volt. Általánosságban kevés specifikus jelet észleltünk.

A differenciáltan expresszálo gének elemzése alapján feltételezhető, hogy a Csillám szőlőfajta feketerothadással szembeni ellenállóképességében az általános ellenállóképesség, vagy PTI komponensei játszhatnak döntő szerepet, ezek között is kiemelkedően fontos a fitoalexinként működő sztilbénak termeléséért felelős sztilbén szintázok csoportja. Ugyanakkor nem zárható ki a rezisztencia gén alapú ETI sem.

A szőlőbogyó beltartalmi értékeit tekintve a feketerothadás okozta változások jelenlegi tudásunk szerint elhanyagolhatóak. A nemkívánatos vegyületek, mint az ochratoxin vagy a hisztamin szempontjából is. Hiába termel a bogyóban melatonin, tiramint és szerotonint, azok mennyisége

is elhanyagolható. Ebből az következik, hogy a feketerothadáson átesett szőlőszemet minőségileg érdemes válogatni, de ha belekerül sem okoz gondot.

Összességében a feketerothadáson átesett szőlőbogyókból nyert kémiai adatok nem változtatják meg a bor kémiai összetételét a polifenolok, a biogén aminok, a rezveratrolok és az ochratoxin alapján. A botritisz kevesebb hisztamint képez, mint a feketerothadás. A borkezelési eljárások, mint a bentonitos derítés, vagy a szűrés csökkentik a hisztamin koncentrációját.

Miután a feketerothadás elég érzékenyen érinti az új innovatív szőlő fajtákat, ebből kifolyólag ezeket hosszú távon vizsgálnunk kell, hiszen e fajták jó alapját képezik a bio szőlőtermesztésnek. Ha ezek érzékenyebbek a betegségekkel szemben, akkor foglalkoznunk kell velük hosszútávon.

## 7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kidolgoztam egy levélkorongos fertőzési módszert, ami biztosítja, hogy a *Guignardia bidwellii* kórokozóval fertőzött levélen a kórokozó szaporítóképlete lokalizáltan és nagy koncentrációban legyen jelen. A módszer egyben célzott mintavételt tesz lehetővé.
2. Igazoltam a Csillám fajta feketerothadással szemben mutatott toleranciáját konídium csírázás és csíratömlő növekedés alapján. A csíratömlők eltérő növekedési ütemét fogékony és ellenálló fajtán korábban nem vizsgálták.
3. Elsőként hasonlítottam össze egy feketerothadással szemben ellenálló és arra fogékony szőlőfajta RNS szintű válaszát és a transzkripciós mintázat változásának időbeli lefutását. Kimutattam, hogy a fertőzést követő első 36 órában a patogén által kiváltott immunitáshoz köthető folyamatokban (pl. fitoalexin termelés) szerepet játszó gének eltérően válaszolnak a fertőzésre.
4. Eredményeim alapján a Csillám feketerothadás toleranciája a kórfolyamat korai fázisában az eredendően magas sztilbén termeléshez köthető.
5. Elsőként vizsgáltam feketerothadás hatását a szőlőbogyó kémiai összetételére vonatkozóan.
6. Elsőként vizsgáltam a feketerothadás hatását az általános beltartalmi értékekre és savösszetételre vonatkozóan. Megállapítottam, hogy feketerothadt bogyókban képződik glicerín, valamint vele arányosan glükonsav is. Megállapítottam, hogy bár almasavat, sikiminsavat, citromsavat nem tudtam detektálni, azonban a (+)-tejsav jelenléte kimutatható volt a mintákban. Jelentős koncentrációban volt mérhető a borostyánkősav, a fűmársav és a kaftársav is.
7. Elsőként vizsgáltam a feketerothadás hatását a polifenol-összetételre. Megállapítottam, hogy a polifenol-összetétel (összes polifenol, leukoantocianin, katechin, epikatechin) az irodalmi adatoknak megfelelő mennyiségben volt mérhető. Méréseim alapján

megállapítható, hogy a feketetrohadás inkább a katechin koncentráció változását befolyásolta.

8. Elsőként vizsgáltam a feketetrohadás hatását, a polifenol-összetételen belül a pozitív élettani hatású rezveratrol koncentrációra (*transz*-piceid, *transz*-rezveratrol, *cisz*-piceid, *cisz*-rezveratrol). Méréseim alapján egyértelműen megállapítható, hogy a feketetrohadás a piceidek előfordulását befolyásolta a bogyókban.
9. Elsőként vizsgáltam a feketetrohadás hatását a biogén aminokra (a legjelentősebb élettani hatású vegyületek: tiramin, hisztamin, szerotonin). Megállapítottam, hogy a biogén aminok az eddigi irodalmi adatoknak megfelelő mértékben voltak jelen. Azaz a feketetrohadás nem volt befolyással az általam vizsgált aminokra.

## 8 ÖSSZEFOGALÁS

Az Észak-Amerikában őshonos kórokozó, a szőlő guignardiás feketerothadása (*Guignardia bidwellii*) hazánkban is régóta ismert, jelentős károsító, mely kizárólag a szőlő növekvő zöld részeit (levél, levélnyél, hajtás, fürt, kacs) fertőzi. Kártétele elsősorban a szőlőbogyók rothadása miatt jelentős. Megjelenésére csapadékos, meleg, párás időjárási viszonyok kialakulásakor számíthatunk. Ilyen volt a 2014-es túlnyomóan esős év is, mely súlyosbította a kórokozó nagymértékű elterjedését és kórokozását - helyenként akár 90%-os termés kiesést okozva.

Jelenleg nem rendelkezünk kellő ismerettel a növény és a kórokozó közötti kapcsolatáról, pedig erre szükség lenne a hatékony védekezési technikák megteremtéséhez. Munkánk során célunk volt egy hatékony és jól nyomon követhető fertőzési rendszer kialakítása a szőlő és a feketerothadás kórokozója közötti kapcsolat biológiai hátterének vizsgálatához.

Az ellenállónak tekintett Csillám szőlőfajta válaszát a fogékony Csaba gyöngye válaszával hasonlítottuk össze. A fertőzéseket az úgynevezett féllevél-módszerrel végeztük. Az ellenőrzés alapján a fertőzések sikeresek voltak: 18 órával a fertőzést követően a feketerothadás spórák csírázni kezdtek 36 órával a fertőzés után pedig már jelentős hifanövekedést tapasztaltunk a fogékony Csaba gyöngye fajtánál. A fertőzés alapján igazoltuk a Csillám és Csaba gyöngye fajták közötti különbséget a csírázás és a csíratömlő növekedés alapján.

A szőlő feketerothadás fertőzésre adott válaszát elemeztük transzkriptomikai szinten újgenerációs RNS szekvenálási technikával is. Az eredmények értékelése alapján az ellenállónak vélt Csillám fajta és a fogékonynak tekintett Csaba gyöngye fajta reakciója között a legfőbb különbség a fertőzést követő 6-18 órával gyorsan kialakuló oxidatív reakciók aktiválódásában szerepet játszó fehérjék génjeiben található. Ez a különbség a fertőzés után 36 órával már kiegyenlítődik, szerephez jutnak olyan specifikus fehérjék, mint az LRR kinázok, amelyek akár specifikus rezisztencia géneket is kódolhatnak. Munkánk eredményeként betekintést nyertünk a feketerothadás fertőzést követően a szőlőben bekövetkezett változásokba.

A szőlő feketerothadása, mint betegség egyrészt szőlészeti probléma, mivel csökkentheti a termés mennyiségét és minőségét, másrészt borászati probléma is. Munkám során célzottan olyan vegyületeket választottunk vizsgálatra, amiknek következménye lehet a bor élettani hatására. Szerves savakat, polifenolokat, biogén aminokat, rezveratrolokat és ochratoxint vizsgáltunk.

Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a feketerothadás jelentős cukorbetöményedést eredményezett. A botritiszhez hasonlóan képez glicerint, valamint vele arányosan glükonsavat is kisebb koncentrációban. A galakturonsav koncentráció pektináz enzimtevékenységre utal. Érdekes eredmény volt az almasav, a sikiminsav és a citromsav hiánya a bogyóban, miközben a (+)-tejsav megjelent, valamint jelentős volt a borostyánkősav és a fumársav koncentrációja is. A feketerothadás hatására polifenolok szempontjából a minták a megszokott koncentrációkat mutatják. A inkább a katechin koncentráció vált jellemzővé a bogyóban. A feketerothadást okozó gomba nem termel  $\beta$ -glükozidáz enzimet. Rezveratrol tartalmat tekintve, a feketerothadásnak nincs különösebb jelentősége. A biogén amin eredményekből megállapítható, hogy borkészítés szempontjából alacsony koncentrációban voltak jelen.

A mérésekből megállapított OTA koncentráció alapján elmondható, hogy a vizsgált innovatív szőlőfajták közül a Hibernál, a Palatina és Panonija minták nem tartalmaztak ochratoxin A-t. A Danubius, Bácska, Kékfrankos minták tartalmaztak, azonban az EU határérték alatti mennyiségben. A feketerothadás és az OTA tartalom között lineáris összefüggés nem mutatható ki.

Összességében megállapítható, hogy a feketerothadás okozta változások a szőlőbogyó beltartalmi értékeit tekintve elhanyagolhatóak.

## 9 SUMMARY

*Guignardia bidwellii*, a pathogen indigenous to North America, is a major pest of grapes that has long been known in Hungary, infecting only the growing green parts of the vine (leaves, petioles, shoots, bunches, tendril). Its damage is mainly due to rot of the grapes. It is expected to appear in rainy, warm, humid weather conditions. The predominantly rainy year of 2014 exacerbated the high spread of the pathogen, causing yield losses of up to 90% in some places.

At present, we do not have sufficient knowledge of the relationship between the plant and the pathogen, which is needed to develop effective control techniques. Therefore, the aim of our work was to develop an efficient and traceable infection system to understand the biology of the relationship between grapevine and the pathogen responsible for black rot.

We compared the response of the resistant grape cultivar Csillám with that of the susceptible Pearl of Csaba. Infections were carried out using the so-called half-leaf method. The control showed that the infections were successful: 18 hours after infection, black rot spores started to germinate and 36 hours after infection, significant hyphal growth was observed in the susceptible cultivar Pearl of Csaba. Based on the infection, we confirmed the difference between the pearl millet and pearl millet cultivars based on germination and germ tube growth.

We also analyzed the response of grape black rot to infection at the transcriptomic level using a next-generation RNA sequencing technique. The evaluation of the results showed that the main difference between the response of the cultivar Csillám, considered resistant, and the cultivar Pearl of Csaba, considered susceptible, is in the genes of proteins involved in the oxidative burst that occurs rapidly 6-18 h after infection. This difference is levelled out 36 hours after infection, with the involvement of specific proteins such as LRR kinases, which may even encode specific resistance genes. As a result of our work, we have gained insight into the changes that occur in grapevines after black rot infection.

Grape black rot as a disease is a problem for viticulture as it can reduce yield and quality. On the other hand, it is a problem for the wine industry, which uses the grapes immediately. In my thesis we specifically chose compounds that might have consequences for the physiological effects of wine. Organic acids, polyphenols, biogenic amines, resveratrols and ochratoxins were investigated. These compounds were chosen as a first approximation.

Our research showed that black rot resulted in a significant increase in sugar intake. Similar to botrytis, it also forms glycerol and, proportionally, gluconic acid in lower concentrations. The galacturonic acid concentration indicates pectinase enzyme activity. An interesting result was the absence of malic, succinic and citric acids in the berry, while (+)-lactic acid was present and the concentration of succinic and fumaric acids was significant. Samples showed the usual concentrations of polyphenols after the black rot infection. Catechin concentrations became more characteristic in the berry. The black rot fungus does not produce  $\beta$ -glucosidase enzyme. In terms of resveratrol content, black rot has no particular significance. The biogenic amine results showed that they were present in low concentrations for wine making.

Based on the OTA concentrations determined from the measurements, it can be said that of the innovative grape varieties tested, the Hiber, Palatina and Panonija samples did not contain ochratoxin A. The Danubius, Bácska, Kékfrankos samples contained ochratin A, but at levels below the EU limit. No linear correlation between black rot and OTA content was found.

Overall, it can be concluded that the changes caused by black rot are negligible in terms of the content values of the grapes.



## 10 MELLÉKLETEK

### M1. Irodalomjegyzék

1. Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H. (2009). Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* 132, 100–108.
2. Abrunhosa, L., Paterson, R.R.M., Kozakiewicz, Z., Lima, N., Venâncio, A. (2001). Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 240–242.
3. Adams, D.O. (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 57(3):249–256.
4. Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier, Academic Press. 952-954.
5. Al Anati, L., Petzinger, E. (2006). Immunotoxic activity of ochratoxin. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 29 (2): 79–90.
6. Alleweldt, G. (1977). 100 Jahre Rebenzüchtung in Deutschland. *Der Deutsche Weinbau* 32, 904
7. Alleweldt, G. (1980). The breeding of fungus- and phylloxera-resistant grapevine varieties. *Proc. 3rd Int. Symp. Grape Breeding, Davis (California)*, 242-250.
8. Alleweldt, G., Possingham. (1988). Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 75, 669-673
9. Alonso-Villaverde, V., Voinesco, F., Viret, O., Spring, J. L., Gindro, K. (2011). The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiol. Biochem.* 49 (3), 265–274. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.12.010
10. Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W. (2014). HTSeq A Python framework to work with high-throughput sequencing data. Technical Report 2.
11. Aquilano, K., Baldelli, S., Rotilio, G., Ciriolo, M. (2008). Role of nitric oxide synthases in parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochemical Research*, 33 (12): 2416-2426.
12. Ariño, A., Herrera, M., Estopañan, G., Rota, M.C., Carramiñana, J.J., Juan, T., Herrera, A. (2009). Aflatoxins in bulk and pre-packed pistachios sold in Spain and effect of roasting. *Food Control* 20, 811–814.
13. Aziz, N.H., Youssef, Y.A., El-Fouly, M.Z., Moussa, L.A. (1998). Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39, 279–285.
14. Baert, K., De Meulenaer, B., Kamala, A., Kasase, C., Devlieghere, F. (2006). Occurrence of patulin in organic, conventional, and handcrafted apple juices marketed in Belgium. *Journal of Food Protection*, 69(6), 1371-1378.
15. Bari, R., Jones, J.D. (2008). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69(4):473-488.
16. Barna, B. (1963). *Kertészeti növénynevelés alapjai. Kertészeti és Szőlészeti Főiskola Növényörökléstani és Nemesítési Tanszéke, Budapest.*
17. Barna, B., Fodor, J., Harrach, B., Pogány, M., Király, Z. (2012). The janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 59, 37–43.
18. Barrett, H.C. (1953). A Survey of Black Rot Resistance of the foliage of Wild Grape Species. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 62, 319-322.
19. Barrett, H.C. (1955). Black rot resistance of foliage on seedlings in selected grape progenies.

- Proc. Amer Soc Hort Sci, 66:220-224. p.
20. Bata, Á., Draskovics, I., Etter, L., Koudela, Sz., Novák, E.K., Sándor, G., Szigeti, G., Téren, J., Ványi, A. (1990). Mikotoxinok, toxinogén gombák, mikotoxikózisok. 2-20.
  21. Battilani, P., Barbano, C., Marin, S., Sanchis, V., Kozakiewicz, Z., Magan, N. (2006). Mapping of *Aspergillus section Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S72–S82.
  22. Bautista-Ortín, A. B., Busse-Valverde, N., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R. and GómezPlaza, E. (2013). Grape seed removal: effect on phenolics, chromatic and organoleptic characteristics of red wine. *International Journal of Food Science & Technology*: doi: 10.1111/ijfs.12270.
  23. Bauza, T., Blaise, A., Teissedre, P.L., Mestres, J.P., Daumas, F., Cabanis, J.C. (1995). Changes in biogenic amines content in musts and wines during the winemaking process. *Scientes des Alimentes*, 15 (6): 559-570.
  24. Bavaresco, L. (2019). Impact of grapevine breeding for disease resistance on the global wine industry. *Acta Hort.* 7–14. 10.17660/actahortic.2019.1248.2
  25. Bavaresco, L. és Eibach, R. (1987). Investigations on the influence of N fertilizer on resistance to powdery mildew (*Oidium tuckeri*) downy mildew (*Plasmopara viticola*) and on phytoalexin synthesis in different grapevine varieties. *Vitis* 26, 192–200.
  26. Bayman, P., Baker, J.L., Doster, M.A., Michailides, T.J., Mahoney, N.E. (2002). Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2326–2329.
  27. Bayram, Ö., Braus, G. H., Fischer, R., Rodriguez-Romero, J. (2010). Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genetics and Biology* 47, 900–908.
  28. Becker, C., Pearson, R. (1993). Evaluation of cultural control strategies for managing Black-rot (*Guignardia bidwellii*) of grapes. *Plant Dis.* 83, 1377.
  29. Beckers, G.J., Spoel, S.H. (2006). Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biol (Stuttg)* 8(1):1-10.
  30. Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A. F., Cipriani, G. (2009). Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theor. Appl. Genet.* 120 (1), 163–176. doi: 10.1007/s00122-009-1167 2
  31. Bennett, J. W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews.* 16 (3): 497–516.
  32. Betina, V. (1989). Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects. *Bioactive Molecules*, 9, 114-150.
  33. Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. (2006). Factors affecting the presence of ochratoxin a in wines. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46, 473–478.
  34. Bodmer, S., Gafner, J. (2000). Histamin in Wein. *Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau*, 21, 546-547.
  35. Bódog, A. (2013). Hisztaminintolerancia. *Új Diéta*, 22 (2-3): 10-12.
  36. Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
  37. Bonvehí, J.S. (2004). Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6347–6352.
  38. Boonzaaijer, G., Bobeldijk, I., van Osenbruggen W. A. (2005). Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method. *Food Control*, 16(7), 587-591.
  39. Boopathi, N.M. (2013a). Success Stories in MAS. *Genetic Mapping and Marker Assisted Selection*: Springer India. pp. 187-192.
  40. Boopathi, N.M. (2013b). Marker-Assisted Selection. *Genetic Mapping and Marker Assisted*

Selection: Springer India. pp. 173-186.

41. Boubals, D. (1961): Étude des causes de la résistance des Vitacées à l'oidium de la vigne (*Uncinula necator* (Schw.) Burr.) et de leur mode de transmission héréditaire. *Ann Amélior Plant*, 11:401-500. p.
42. Boudra, H., Barnouin, J., Dragacci, S., Morgavi, D.P. (2007). Aflatoxin M1 and ochratoxin a in raw bulk milk from french dairy herds. *J. Dairy Sci.* 90, 3197–3201.
43. Bouquet A. (1980). *Vitis x Muscadinia* hybridization: a new way in grape breeding for disease resistance in France, *Proc. 3rd Int. Symp. Grape Breeding*, Davis (California), 42-61.
44. Bräse, S., Gläser, F., Kramer, C., Lindner, S., Linsenmeier, A.M., Masters, K.-S., Meister, A.C., Ruff, B.M., Zhong, S., (2013). *The Chemistry of Mycotoxins, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer.
45. Bravo, L. és Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of dietary fiber and the In vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (2): 135-141.
46. Broad Institute. (Accessed: 2018/02/21; version 2.17.8). Picard Tools. Broad Institute, GitHub repository. <http://broadinstitute.github.io/picard/>.
47. Cabañes, F.J., Bragulat, M.R., Castellá, G. (2013). Characterization of nonochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from grapes. *Food Microbiol.* 36, 135–141.
48. Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A.J., Sanchis, V. (2009). Survey of patulin occurrence in apple juice and apple products in Catalonia, Spain, and an estimate of dietary intake *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance* 2 (1), 59-65.
49. Carlile, M., Watkinson, S. (1996). *The fungi*. Academic Press, Harcourt Brace and Company Publishers, London, UK.
50. Cary, J.W., Ehrlich, K.C. (2006). Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: Molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia*, 162(3), 167-177.
51. CAST. (2003). *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems*. Ames, IA, USA: Council for Agricultural Science and Technology.
52. Castilla, P., Echarrí, R., Dávalos, A., Cerrato, F., Ortega, H., Teruel, J. L., Lucas, M. F., Gómez-Coronado, D., Ortuño, J., Lasunción, M. A. (2006). Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84 (1): 252-262.
53. Cecchini, F., Morassut, M. (2010). Effect of grape storage time on biogenic amines content in must. *Food Chem.* 123, 263–268.
54. Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., Teissèdre, P. L. (2008). Grape phenolics. *Phytotherapie*, 6 (2): 75-82.
55. Cock, J.A., Fields, C.J., Goto, N., Heuer, M.L., Rice, P.M. (2010). “The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants”. In: *Nucleic acids research* 38.6, pp. 1767–1771.
56. Cole, G.T. (1981). *Biology of Conidial Fungi*. Academic Press, 1981. ISBN: 9780323138994
57. Collard, B.C.Y., Mackill, D.J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 557-572.
58. Commission Regulation (2006). (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Brussels: Official Journal of the European Union.
59. Corney, David, C Corney. (2013). RNA-seq using next generation sequencing. In: *Methods* 3, p. 203.
60. Creelman, R.A., Mullet, J.E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:355-381.
61. Crespo-Sempere, A., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2013). VeA and LaeA

- transcriptional factors regulate ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 479–486.
62. Croucher, N.icholas J Croucher,, Fookes, M.aria C. Fookes, Perkins, T.imothy T. Perkins, Turner, D.aniel J. Turner, Marguerat, S.amuel B. Marguerat, Keane, T.homas Keane, Quail, M.ichael A. Quail, He, M.iao He, Assefa, S.ammey Assefa, Bähler, J.ürg Bähler, et al. (2009). A simple method for directional transcriptome sequencing using Illumina technology. In: *Nucleic acids research* 37.22, e148–e148.
  63. Crozier, A., Jaganath, I., Clifford, M. N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. pp. 1-24. Crozier, A., Clifford, M. N., and Hiroshi, A., Oxford, Blackwell Publishing.
  64. Csizmazia, J., Bereznai, L. (1968). A szőlő *P. viticola* és a *Viteus vitifolii* elleni rezisztencianemesítés eredményei. *Orsz Szől Bor Kut Int Évk*, Budapest, 191-200. p.
  65. Dai, G. H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., Boubals, D. (1995). Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Eur. J. Plant Pathol.* 101 (5), 541–547. doi: 10.1007/ BF01874479
  66. Dalbó, M.A. (1998). Genetic mapping, QTL analysis and marker-assisted selection for disease resistance loci in grapes. In Graduate School of Cornell University. Dissertation.
  67. Dalbó, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Wilcox, W.F., Reisch, B.I. (2001). Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(1), 83–89. p.
  68. Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H. (1996). Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8:1793-1807.
  69. Degelmann, P., M. Becker, M., M. Herderich, M., H., Humpf, .U. (1999). Determination of ochratoxin A in beer by high – performance liquid chromatography., *Chromatographia* 49
  70. Deák, Tamás; Farkas, Eszter; Bálo, Borbála; Bisztray, György Dénes. (2018). Fitoalexinek szerepe a szőlő betegség-ellenállóságában, a nemesítés lehetőségei *Agrofórum Extra* 76:1 pp. 67-69. Paper: 67, 3 p.
  71. Del Prete, V., Costantini, A., Cecchini, F., Morassut, M., Garcia-Moruno, E. (2009). Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chem.* 112, 474–481.
  72. del Rio, B., Redruello, B., Linares, D.M. (2019). The biogenic amines putrescine and cadaverine show *in vitro* cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Sci Rep* 9, 120. doi: 10.1038/s41598-018-36239-w
  73. Demaree, J.B., Dix, I.W., Magoon, C.A. (1937). Observations on the Resistance of Grape Varieties to Black Rot and Downey Mildew. *American Society for Horticultural Science*.
  74. Di Gaspero, G., Copetti, D., Coleman, C., Castellarin, S., Eibach, R. (2012). Selective sweep at the Rpv3 locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 277-286.
  75. Doares, S.H., Narvaez-Vasquez, J., Conconi, A., Ryan, C.A. (1995). Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol* 108:1741-1746.
  76. Dobson, A.D.W., Ortoneda, M., O`Challagan, J. (2006). Advances in ochratoxin A biosynthesis. Book of Abstracts, International Conference of "Advances on genomics, biodiversity and rapid systems for detection of toxigenic fungi and mycotoxins" September 26-29, 2006. Monopoli (Bari), Italy 39
  77. Doligez, A., Bouquet, A., Danglot, Y., Lahogue, F., Riaz, S. (2002). Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 780-795.
  78. Dowd, P.F. (2003). Insect management to facilitate preharvest mycotoxin management. *J. Toxicol. - Toxin Rev.* 22, 327–350.

79. Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82 (1): 47-95.
80. Dufour, R. (2006). Grapes: Organic Production, ATTRA - National Sustainable Agriculture Information Service.
81. Dula, B. (2012). A szőlő feketerothadása. *Gyakorlati Agroforum*, Extra 46. 24-27.
82. Dula, B., Lázár, J., Kölber, M. (2016). A szőlő növényvédelme II: Betegségek, Növényvédelem 5, 230-233.
83. Eibach, R., Zyprian, E., Welter, L., Töpfer, R. (2007). The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* 46, 120-124
84. El Khoury, A., Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*. 2(4):461-493.
85. Ellis, M.A., Madden, L. V., Wilson, L.L. (1986). Electronic grape black-rot predictor for scheduling fungicides with curative activity. *Plant Disease* 70, 938–940.
86. Emele, L., Wilcox, W.F., Gadoury, D., Seem, R. (1998). Critical period for control of black-rot of grape. *Phytopathology* 88, 25–26.
87. Emele, L., Wilcox, W.F., Gadoury, D., Seem, R. (1999). Retaining overwintered mummies within the trellis increases grape black-rot severity. *Phytopathology* 89, S23.
88. Erdag, Dincer, Oguz Merhan, Baris Yildiz. (2018). Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines. *Biogenic Amines*. doi: 10.5772/intechopen.81569
89. EU Report (2002). Reports on tasks for scientific cooperation. Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States. Brussels: Directorate-General Health and Consumer Protection. Task 3.2.7. Brussels.
90. Ewing, B., Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 8, 186–194.
91. Eyres, N., Wood, C., Taylor, A. (2006). Black-rot - *Guignardia bidwellii*. Department of Agriculture and the State of Western Australia. Note: 167, Replaces Factsheet 6/2000.
92. Farkas, E., Kellner N., Deák T., Bisztray, Gy.D. (2018). Comparative transcriptome profiling of resistant and susceptible grapevine varieties infected with black rot. LX. *Georgikon Napok, Tanulmánykötet*, Keszthely, Magyarország: Pannon Egyetem Georgikon Kar. pp. 79-86., 8 p.
93. Ferracane, R., Tafuri, A., Logieco, A., Galvano, F., Balzano, D., Ritieni, A. (2007). Simultaneous determination of aflatoxin B1 and ochratoxin A and their natural occurrence in Mediterranean virgin olive oil. *Food Addit. Contam.* 24, 173–180.
94. Ferrin, D.M., Ramsdell, D.C. (1977). Ascospore Dispersal and Infection of Grapes by *Guignardia bidwellii*, Causal Agent of Grape Black Rot Disease. *Phytopathology*, 67:1501-1505.p.
95. Fischer M., Kassemeyer H.H. (2003). Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis* 42:109–116.
96. Fitzpatrick, D.F., Hirschfield, S.L., Coffey, R.G. (1993). Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 265 (2 34-2): H774-H778.
97. Flanzy, M., Aubert, S., Marinos, M. (1969). New technique for determination of leucoanthocyanic tannins. Applications. *Ann. Technol. Agric.* 18:327–328.
98. Fourtouni, A., Manetas, Y., Christias, C. (1998). Effects of UV-B radiation on growth, pigmentation, and spore production in the phytopathogenic fungus *Alternaria solani*. *Canadian Journal of Botany*, 76(12), 2093-2099.
99. Frisvad, J.C., Smedsgaard, J Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U. (2007). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of. Agriculture and. Food Chemistry*, 55, 9727–9732
100. Funt, R., Ellis, M., Madden, L. (1990). Economic analysis of protectant and diseaseforecast- based fungicide spray programs for control of apple scab and grape blackrot

- in Ohio. *Plant Disease* 74, 638–642.
101. Gadoury, D. (1993). Integrating management decisions for several pests in fruit production. *Plant Disease* 77, 299–302.
  102. Gaffner, J. (2002). Biogenic amines in wine. *Proceedings of the 13th International Enology Symposium in Montpellier / France*, 95-106, 2002.
  103. Gambino, G., Perrone, I. és Gribaudo, I. (2008). A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis* 19 (6): 520–525.
  104. Ge, S.X., Jung, D., Yao, R. (2020). ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, 36 (8): 2628-2629.
  105. German, J.B. és Walzem, R.L. (2000). The health benefits of wine. *Annual Review of Nutrition*, 20 (1): 561-593.
  106. Gessler, C., Jermini, M. (2009). Working Group “Integrated Protection and Production in Viticulture”. *Proceedings of the Meeting at Staufen im Breisgau (Germany)*, in: Black-rot - Downy Mildew Control in Small Vineyards in Southern Switzerland. Duso, C., Gessler, C., Kassemeyer, H., Maixner, M., Thiéry, D., Zahavi, T. (Eds.), pp. 139–142.
  107. Gindro, K., Pezet, R., Viret, O. (2003). Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiol. Biochem.* 41 (9), 846–853. doi: 10.1016/S0981-9428(03)00124-4
  108. Gindro, K., Spring, J. L., Pezet, R., Richter, H., Viret, O. (2006). Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. *Vitis-Geilweilerhof*, 45 (4), 191.
  109. Glits, M., Folk, Gy. (2000). *Kertészeti növénykórtan, Mezőgazda Kiadó, Budapest*
  110. Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schutz, B., Bansbach, M., Schafer, H., Spraul, M. (2013). Targeted and Nontargeted Wine Analysis by H-1 NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5610-5619.
  111. Golodriga, P.I. (1978). Culture de variétés de vigne polyrésistantes. *Génétique et amélioration de la vigne. Ile Symposium International sur l’Amélioration de la Vigne, Bordeaux, 14-18 juin 1977*, 183-188.
  112. Goodwin, S., McPherson, J.D., McCombie, W.R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. In: *Nature Reviews Genetics* 17.6, pp. 333–351.
  113. Grant, M., Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol* 9(4):414-420.
  114. Guo, Y.-Y.,; Yang, Y.-P.,; Peng, Q.,; Han, Y. (2015). Biogenic amines in wine: A review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 50, 1523–1532.
  115. Hafner, P. (1998). Börner - eine neue Rebunterlage. *Obstbau - Weinbau. Fachblatt des Südtiroler Beratungsrings*.
  116. Hajdu, E., Ésik, A. (2001). *Új magyar szőlőfajták. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 170. p.*
  117. Harms, M., Holz, B., Hoffmann, P.G., Lipps, H.P., Silvanus, W. (2005): Occurrence of *Guignardia bidwellii*, the causal fungus of black rot on grapevine, in the vine growing areas of Rhineland-Palatinate, Germany. *BCPC symp. proceedings*, 81:127-132. p.
  118. Harrison, M. A. (1989). Presence and stability of patulin in apple products: A review. *Journal of Food Safety*, 9 147-153.
  119. Hausmann, L., Rex, F., Töpfer, R. (2017). Evaluation and genetic analysis of grapevine black rot resistances. *Acta Horti*, 285-290. p. doi: 10.17660/actahortic.2017.1188.37
  120. He, P., Wang, G. (1986). Studies on the resistance of wild *Vitis* species native to China to downy mildew, *Plasmopara viticola*. *Acta Horticulturae Sinica* 13, 17-24
  121. Hoffman, L.E., Wilcox, W.F. (2002). Utilizing epidemiological investigations to optimize

- management of grape Black rot. *Phytopathology*, 92:676-680. p.
122. Hoffman, L.E., Wilcox, W.F. (2003). Factors Influencing the Efficacy of myclobutanil and azoxystrobin for control of grape black-rot. *Plant Disease* 87, 273–281.
  123. Hoffman, L.E., Wilcox, W.F., Gadoury, D.M., Seem, R.C. (2002). Influence of grape berry age on susceptibility to *Guignardia bidwellii* and its incubation period length. *Phytopathology* 92, 1068–76. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.10.1068
  124. Hoffman, L.E., Wilcox, W.F., Gadoury, D.M., Seem, R.C., Riegel, D.G. (2004). Integrated control of grape black-rot: influence of host phenology, inoculum availability, sanitation, and spray timing. *Phytopathology* 94, 641–50. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.6.641
  125. Hopkins, J. (1993). The toxicological hazards of patulin. *Food and Chemical Toxicology* 31(6),454-456.
  126. Jabco, J.P., Nesbitt, W.B., Werner, D.J. (1985). Resistance of various classes of grapes to the bunch and muscadine grape forms of black rot. *J Am Soc Hortic Sci*, 110:762–765. p.
  127. Jaillon, O., Aury, J.M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyere, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pe, M.E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.F., Weissenbach, J., Quetier, F., Wincker, P. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449, 463-465.
  128. Jermini, M. és Gessler, C. (1996). Epidemiology and control of grape black rot in southern Switzerland. *Plant Disease* 80, 322-325.
  129. Jones, J.D., Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444(7117):323-329.
  130. Ju, J., Ruan, C., Fuller, C. (1995). Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 4347–4351.
  131. Kállay, M. (1998). Borászati kémia. In: Eperjesi I., Kállay M., Magyar I.: *Borászat. Mezőgazda Kiadó, Budapest.*
  132. Kállay, M. (2010). *Borászati kémia [Oenological chemistry]. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 128-133.*
  133. Kállay, M., Nyitrai Sárdy, D. (2003). Tokaji borkülönlegességek biogénamintartalmának vizsgálata. *Borászati Füzetek*, 13 (1): 16-20.
  134. Kállay, M., Nyitrai Sárdy, D. (2008). N-tartalmú vegyületek koncentrációjának alakulása mustból erjesztett pezsgő készítése során [Determination nitrogen-compounds during the sparkling wine production from must]. *Borászati Füzetek*, 18 (2): 8.
  135. Kállay, M., Török, Z. (1997). Determination of resveratrol isomers in Hungarian wines. *Kertészeti Tudomány*. 29(3–4):78–82.
  136. Karaagac, E., Vargas, A., Andrés, M., Carreño, I., Ibáñez, J. (2012). Marker assisted selection for seedlessness in table grape breeding. *Tree Genetics & Genomes* 8: 1003-1015.
  137. Kassemeyer, H.H. (2017). *Fungi of Grapes*. In: König H., Uden G., Fröhlich J. (eds) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine*. Springer, Cham. pp103-132.
  138. Keita, Y., Yoshihiro, Y., Masao, O. (2004). Changes in concentrations of resveratrol and its related compounds in red wine during alcoholic and malolactic fermentation. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*. 51(5):274–278.
  139. Kellner, N., Deák, T., Váczy K. Z., Dula, B., Bisztray Gy.D. (2015). A szőlő - feketetrohadás kapcsolat vizsgálata szűrőpapírkorongos fertőzéssel. *Borászati Füzetek Külön Kiadvány*. 84-86.

140. Kennedy, J.A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e investigación agraria*, 35: 107-120.
141. Kheterpal, I., Scherer, J., Clark, S. (1996). DNA sequencing using a four-color confocal fluorescence capillary array scanner. *Electrophoresis*, 17, 1852–1859.
142. Kiss, E., Tóth-Lencsés, K., Szőke, A., Roznik, D., Kerekes, A., Veres, A., Kozma, P. (2017). Origin of cv. 'Csillám' a promising source for black rot resistance. *Vitis*, 56:53–54. p.
143. Klotzel, M., Gutsche, B., Lauber, U., Humpf, H.-U. (2005). Determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53
144. Kong, G. (2009). PaDIL - Plant Biosecurity Toolbox in: Diagnostic Methods for Black Rot of Grapes *Guignardia bidwellii*. <http://www.padil.gov.au/pbt>
145. Kozma, P. (2002). Goals and methods in grape resistance breeding in Hungary. *Int. J. Hortic. Sci.* 8, 1, 41–46.
146. Kozma, P. (2019). A Pécsi Tudományegyetem Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet szőlőnemesítési tevékenysége, eredményei. In: A magyar növénytermesztés eredményei az ezredfordulón. Szerk: I. Karsai. Agroiinform Kiadó Budapest. 220-226.
147. Kozma, P., Nagy, Sz., Sesztákné, L. (1986). Néhány új interspecifikus hybrid szőlőfajta jelöltünk termesztési értéke. *Kertészeti Egyetem Közleményei*. Budapest, 49(17):23-29. p.
148. Kövics, Gy. (2000). Növénybetegséget okozó gombák névtára. *Mezőgazda Kiadó*, Budapest, 116 p.
149. Kunkel, B.N., Brooks, D.M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 5:325-331.
150. Kuo, K.C., Hoch, H.C. (1996). The parasitic relationship between *Phyllosticta ampellicida* and *Vitis vinifera*. *Mycologia* 88, 626–634.
151. Lehane, L. és Olley, J. (2000). Histamine Fish Poisoning Revisited. *International Journal of Food Microbiology* 58(1–2): 1–37.
152. Lethonen, P. (1996). Determination of amines and amino acids in wine. A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47 (2): 127-133.
153. Li, G.Q., Huang, H.C., Acharya, S.N. (2003). Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrovirens* on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biol Control* 28:11–18
154. Li, H., Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, 25:1754-60.
155. Linhart, Gy., Mezey, Gy. (1885). Szőlőbetegségek. M. Kir. Földművelési Miniszter Kiadványa, Mosonmagyaróvár, 149 p.
156. Lodhi, M.A. és Reisch, B.I. (1995). Nuclear-DNA content of *Vitis* species, cultivars and other genera of the Vitaceae. *Theoretical and Applied Genetics* 90, 11-16.
157. Low, P.S. és Merida, J.R. (1996). The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol Plant* 96:533-542.
158. Luttrell, E.S. (1946). Black Rot of Muscadine Grapes. *Phytopathology* 36, 905- 924.
159. Lüstner, G. (1935). Auftreten der Schwarzfaule (Black rot) der Rebe in Deutschland. *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst (Berlin)* 15:27.
160. Mackay, T.F.C. (2001). Quantitative trait loci in *Drosophila*. *Nat. Rev. Genet.* 2, 11-20.
161. Magyar, I., Pomázi, A. (2014). Borászati mikrobiológia. Budapest. Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó.
162. Majerus, P., Bresch, H., Otteneder, H. (2000): Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. *Arch. Lebensmittelhyg.* 51: 95-97.
163. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (5): 727-747.
164. Martelli, U. (1891). Il black rot sulle viti presso Firenze. *Nuovo G. Bot. Ital.* 23:604-610.



165. Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal, [S.l.], v. 17, n. 1, p. pp. 10-12. doi:10.14806/ej.17.1.200.
166. Matrella, R., Monaci, L., Milillo, M.A., Palmisano, F., Tantillo, M.G. (2006). Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. Food Control 17, 114–117.
167. Maurin, G., Cartolaro, P., Clerjeau, M., Benac, G. (1991). Black-rot: vers une méthode de prévisions des risques. Phytoma 433, 39–42.
168. McCarthy, D.J., Chen, Y., Smyth, G.K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. Nucleic Acids Research, 40(10), 4288-4297. doi: 10.1093/nar/gks042.
169. Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies – the next generation. In: Nature reviews genetics 11.1, pp. 31–46.
170. Metzker, M.L., Raghavachari, R., Richards, S. et al. (1994). Termination of DNA synthesis by novel 3'-modified-deoxyribonucleoside 5'-triphosphates. Nucleic Acids Res., 22, 4259–4267.
171. Michel, R.H., McGovern, P.E., Badler, V.R. (1993). The 1st wine and beer. Analytical Chemistry 65, A408-A413.
172. Mikulás, J., Tomcsányi, E. (1999). Megjelent hazánkban is a feketerothadás. Kertészet és Szőlészet 49, 11-12.
173. Miraglia, M., Brera, C. (2002). Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A by the Population of EU Member States. Assess. Diet. Intake Ochratoxin Popul. EU Memb. States.
174. Mitacek, E.J., Brunnemann, K.D., Suttajit, M., Martin, N., Limsila, T., Ohshima, H., Caplan, L.S. (1999). Exposure to N-Nitroso Compounds in a Population of High Liver Cancer Regions in Thailand: Volatile Nitrosamine (VNA) Levels in Thai Food. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association. 37(4): 297–305.
175. Molitor, D. (2009). Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) an Weinreben.
176. Molitor, D., Augenstein, B., Mugnai, L., Rinaldi, Jorge, P.A., Hed, S., Dubuis, P.H., Jermini, M., Kühner, E., Bleyer, G., Hoffmann, L., Beyer, M. (2015). Composition and evaluation of a novel web-based decision support system for grape black rot control. Eur J Plant Pathol, 144(4):785-798. p.
177. Molitor, D., Augenstein, B., Mugnai, L., Rinaldi, P.A., Sofia, J., Hed, B., Dubuis, P.-H., Jermini, M., Kühner, E., Bleyer, G., Hoffmann, L., Beyer, M. (2016). Composition and evaluation of a novel web-based decision support system for grape black rot control. Eur. J. Plant Pathol. 144:785-798. doi:10.1007/s10658-015-0835-0
178. Molitor, D., Berkelmann-Loehnertz, B. (2011). Simulating the susceptibility of clusters to grape black rot infections depending on their phenological development. Crop Protection, 30:1649-1654. p.
179. Morten, G., Allan, D., Thorkild, I.A.S., Ulrik, B., Peter, S., Gorm, J. (1995). Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. British Medical Journal, 310 (6988): 1165-1169.
180. Moss, M.O. (1998). Recent studies of mycotoxins. Journal of Applied Microbiology, 84 (Suppl.): S62-S76.
181. Munson, T.V. (1909). Foundations of American Grape Culture. T.V. Munson Son Denison Texas pp, 252. 10.5962/bhl.title.55446
182. Mur, L.A., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., Wasternack, C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. Plant Physiol 140(1):249- 262.

183. Müller, K., von Bassermann-Jordan, F., Biermann, W., Börner, K., Dümmler, A., Fahrnschon, K., Fuess, J., Fuhr, H., von der Heide, K., Kaserer, H. (1930). Weinbau-Lexikon für Winzer, Weinhändler, Küfer und Gastwirte. Ed. K. Müller. 93-95. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin.
184. Myers, A.L. (2006). Online guide to grapevine disease - Black rot. AHS Agricultural Research and Extension Center, Winchester, VA
185. Myles, S. (2013). Improving fruit and wine: what does genomics have to offer? Trends in Genetics 29: 190-196.
186. Myles, S., Boyko, A.R., Owens, C.L., Brown, P.J., Grassi, F. (2011). Genetic structure and domestication history of the grape. Proceedings of the National Academy of Sciences 108: 3530-3535.
187. Newton, A.C., Fitt, B.D., Atkins, S.D., Walters, D.R., Daniell, T.J. (2010). Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. Trends Microbiol. 18, 365–373.
188. Nichols, J. és Katiyar, S. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: antiinflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. Archives of Dermatological Research, 302 (2): 71-83.
189. Nicholson, P., Chandler, E., Draeger, R.C., Gosman, N.E., Simpson, D.R., Thomsett, M., Wilson, A.H. (2003). Molecular tools to study epidemiology and toxicology of Fusarium head blight of cereals. Eur. J. Plant Pathol. 109, 691–703.
190. Nicot, P.C., Mermier, M., Vaissière, B.E., Lagier, J. (1996). Differential spore production by Botrytis cinerea on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light-absorbing polyethylene film. Plant Disease, 80(5), 555-558.
191. Nirmala, J., Dahl, S., Steffenson, B.J., Kannangara, C.G., von Wettstein, D., Chen, X., Kleinhofs, A. (2007). Proteolysis of the barley receptor-like protein kinase RPG1 by a proteasome pathway is correlated with Rpg1-mediated stem rust resistance. Proc. Natl Acad. Sci. USA 104, 10 276–10 281. (doi:10.1073/pnas.0703758104)
192. Northover, P. R., Travis, J. W., Hickey, K. D. (1997). Use of a Degree-Day Model to Predict Sporulation of *Guignardia bidwellii* on Grape. Phytopathology, 87: S70 p.
193. Nyitrai Sárdy, D. (2004). Bioborok összetételének vizsgálata. Doktori (PhD) értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, 172.
194. O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic Colletotrichum fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. Nat. Genet. 44, 1060–1065. doi: 10.1038/ng.2372
195. O'Brien, E., Dietrich, D.R. (2005). Ochratoxin A: the continuing enigma. Crit. Rev. Toxicol. 35 (1): 33–60.
196. Olmo, H. (1996). The Origin and Domestication of the Vinifera Grape. In: Patrick McGovern SF, Solomon Katz, editor. Origins and Ancient History of Wine. pp. 31-43.
197. Olmo, H.P. (1971). Vinifera Rotundifolia hybrids as wine grapes. Am. J. Enol. Vitic. 22, 87–91.
198. Onesti, G., González-Domínguez, E., Rossi, V. (2016). Accurate prediction of black rot epidemics in vineyards using a weather-driven disease model. Pest Manage. Sci. 72:2321-2329. doi:10.1002/ps.4277
199. Paiva, T.B., Tominaga, M., Paiva, A.C. (1970). "Ionization of histamine, N-acetylhistamine, and their iodinated derivatives". Journal of Medicinal Chemistry. 13 (4): 689–92.
200. Pardo, E., Marín, S., Solsona, A., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2004). Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of Aspergillus ochraceus as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. Food Microbiol. 21, 267–274.

201. Peltola, J., M. A. Andersson, T. Haahtela, M. Mussalo-Rauhamaa, F. A. Rainey, R. M. Kroppenstedt, R. A. Samson, M. S. Salkinoja-Salonen. (2001). Toxic-metabolite-producing bacteria and fungus in an indoor environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3269-3274.
202. Pérez-Jiménez, J. és Saura-Calixto, F. (2008). Grape products and cardiovascular disease risk factors. *Nutrition Research Reviews*, 21 (02): 158-173.
203. Peri, C., Pompei, C. (1971). An assay of difference phenolic fractions in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 22:55–58.
204. Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., and Richter, H. (2004). Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis-Geilweilerhof* 43 (3), 145–148.
205. Pirrello, C., Mizzotti, C., Tomazetti, T. C., Colombo, M., Bettinelli, P., Prodorutti, D., Peressotti, E., Zulini, L., Stefanini, M., Angeli, G., Masiero, S., Welter, L. J., Hausmann, L., Vezzuli, S. (2019). Emergent Ascomycetes in Viticulture: An Interdisciplinary Overview. *Frontiers in Plant Science*. 10, Article 1394. doi: 10.3389/fpls.2019.01394
206. Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3rd Edition. London; New York: Blackie Academic & Professional. doi: 10.1007/978-0-387-92207-2
207. Rajamuthiah, R., Mylonakis E. (2014). Effector triggered immunity: activation of innate immunity in metazoans by bacterial effectors. *Virulence* 5, 697–702. doi:10.4161/viru.29091
208. Ramsdell, D.C., Milholland, R. (1988). Black-rot, in: *Compendium of grape diseases*. Pearson, R., Goheen, A. (Eds.), APS Press, St. Paul, pp. 15–17.
209. Rebelein, H. (1965). Beitrag zur Bestimmung des Catechingehaltes in Wein. *Dtsch. Lebensm.-Rundschau*. 61:182–183.
210. Reddick, D. (1911). The black-rot disease of grapes. *Cornell University Agricultural Experiment Station Bulletin* 293, 289-364.
211. Reisch, B., Owens, C., Cousins, P. (2012). Grape. In: *Badenes ML, Byrne DH, editors. Fruit Breeding: Springer US*. pp. 225-262.
212. Rex, F., Fechter, I., Hausmann, L., Töpfer, R. (2014). QTL mapping of black rot (*Guignardia bidwellii*) resistance in the grapevine rootstock ‘Börner’ (*V. riparia* Gm183 × *V. cinerea* Arnold). *Theoretical Applied Genetetics* 127, 1667-1677. doi: 10.1007/s00122-014-2329-4
213. Reynolds, A. (eds) (2015). *Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 268. UK: Elsevier.
214. Richard, J.L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview. *International Journal of Food Microbiology*. 119 (1–2): 3-10.
215. Rinaldi, P. A., Brogini, 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. *Acta Phytopathol. Sin.* 43:11.
216. Rinaldi, P.A., Mugnai, L. (2012). Marciume nero degli acini, potenziale pericolo in viticoltura. *Informatore Agrario* 15, 68–71.
217. Risso, D., Schwartz, K., Sherlock, G., Dudoit, S. (2011). GC-Content Normalization for RNA-Seq Data. *BMC Bioinformatics*, 12 (1), 480.
218. Roznik, D., Hoffmann, S., Kozma, P. (2017a). Screening a large set of grape accessions for resistance against black rot (*Guignardia bidwellii* (Ell.)). *Mitteilungen Klosterneuburg*. 67, 149-157.
219. Roznik, D., Hoffmann, S., Kozma, P. (2017b). Feketerothadás, az új kihívás a szőlő rezisztencianemesítésében. *Jelenkori társadalmi és gazdasági folyamatok*, (2017) XII. 3., 113-117. doi: 10.14232/jtgf.2017.3.113-117
220. Rui, D. (1935). Il black rot o marciume nero dell’uva nell’isola di Veglia (Jugoslavia).

- Annuario della Regia. Stazione di viticoltura e di enologia di Conegliano 5:285-289.
221. Sanger, F. (1975). Nucleotide sequences in DNA. *Proc. R. Soc. Lond B. Biol. Sci.*, , 191, 317–333.
  222. Scalbert, A. és Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130 (8): 2073-2085.
  223. Scalbert, A., Johnson, I. T., Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (1): 215S-217S.
  224. Schälller, G. (1966). Ergebnisse der Rebenunterlagenzüchtung mit *Vitis cinerea* Arnold. *Der Züchter* 35, 250-255
  225. Schoch, C.L., Shoemaker, R.A., Seifert, K.A., Hambleton, S., Spatafora, J.W., Crous, P.W. (2006). A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia* 98, 1041–1052.
  226. Schoene, P., Köhl, J. (1999). Biologische Bekämpfung von *Botrytis cinerea* mit *Ulocladium atrum* in Reben und Cyclamen. *Gesunde Pflanze* 51:81–85
  227. Schwanck, A. A., Savary, S., Lepennetier, A., Debaeke, P., Vincourt, P., and Willocquet, L. (2016). Predicting quantitative host plant resistance against phoma black stem in sunflower. *Plant Pathol.* 65 (8), 1366–1379. doi: 10.1111/ ppa.12512
  228. Schwander, F., Eibach, R., Fechter, I., Hausmann, L., Zyprian, E. (2012). Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 163-176.
  229. Scribner, F.L. (1886). Report on the Fungus Diseases of the Grapevine. U. S. Dep. Agric. Bot. Div. Sect. Plant Pathol. Bull. 2 GPO, Washington D. C.
  230. Scudamore, K.A., Banks, J., MacDonald, S.J. (2003). Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Addit. Contam.* 20, 1153–1163.
  231. Serra, R., Lourenço, A., Alípio, P., Venâncio, A. (2006). Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycol. Res.* 110, 971–978.
  232. Shaw, B.D., Hoch, H.C. (2000). Ca<sup>2+</sup> regulation of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospore germination and appressorium formation. *Fungal Genetics and Biology* 31, 43-53.
  233. Silla-Santos, M.H., (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Intennational Journal of Food Microbiology*. 29: 213-231
  234. Singleton, V.L., Esau, P. (1969). Phenolic substances in grapes and wine and their significance. Academic Press, New York, London. 8–14.
  235. Smith, D.L. (2009). Grape pathology research update: Black-Rot advisory. *Le Vigneron* 4, 7-8.
  236. Smith, D.L. (2012). Mesonet grape black-rot advisor. Eds. Oklahoma State University Albert Sutherland.
  237. Smith, J.E. (1985). Mycotoxin hazards in the production of fungal products and byproducts. *Pract of Biotech, Spec Prod and Serv Act.*
  238. Smith, L., Sanders, J., Kaiser, R. et al. (1986). Fluorescence detection in automated DANN sequence analysis. *Nature*. 321, 674–679.
  239. Song, Peng, Lei Wu, Wenxian Guan. (2015). Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Nutrients* 7(12): 9872–95.
  240. Sosnowski, M. R., Emmett, R. W., Wilcox, W. F., Wicks, T. J. (2012). Eradication of black rot (*Guignardia bidwellii*) from grapevines by drastic pruning. *Plant Pathology*. 61, 1093-1102. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02595.x
  241. Sosnowski, M. R., Tan, Y-P. (2017). National Diagnostic Protocol for *Phyllosticta ampellicida*- NDP13 V2. (Eds. Subcommittee on Plant Health Diagnostics) Ed.: Alwis, S.K.,

- Tan, Y P., Baskarathevan, J., ISBN 978-0-9945113-7-9. CC BY 3.0.NDP 13 V2 - National Diagnostic Protocol for *Phyllosticta ampellicida*.
242. Soufleros, E., Barrios, M. L., Bertrand, A. (1998). Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (3): 266-278.
  243. Spotts, R.A. (1977). Effect of leaf wetness duration and temperature on infectivity of *Guignardia bidwellii* on grape leaves. *Phytopathology*, 67(11):1378–1381. p.
  244. Spotts, R.A. (1980). Infection of grape by *Guignardia bidwellii* -factors affecting lesion development, conidial dispersal, and conidial populations on leaves. *Phytopathology*, 70(3):252–255. p.
  245. Stoloff, L. (1975). Patulin, a contaminant of apple juice. New York State Agricultural Experiment Station Special Report, 19, 51–54.
  246. Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H. (2009). Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* 132, 100–108.
  247. Téren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E., Kevei, F. (1996). Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, 134, 171-176.
  248. Toffolatti, S. L., Venturini, G., Maffi, D., Vercesi, A. (2012). Phenotypic and histochemical traits of the interaction between *Plasmopara viticola* and resistant or susceptible grapevine varieties. *BMC Plant Biol.* 12 (1), 124. doi: 10.1186/1471-2229-12-124
  249. Tomoiaga, L., Comsa, M. (2010). The strategy of optimization for combat the black rot of vine (*Guignardia bidwellii*), in the ecoclimatic conditions from vineyard Târnave. Page 500 in: *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture* 67(1). Cluj-Napoca, Romania.
  250. Töpfer, R., Hausmann, L., Eibach, R. (2011). Molecular breeding. In: Adam- Blondon A-F, Martínez-Zapater AM, Kole C (Eds) *Genetics, Genomics and Breeding of Grapes*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 161-185
  251. Töpfer, R., Hausmann, L., Harst, M., Maul, E., Zyprian, E., Eibach R. (2011). New Horizons for Grapevine Breeding. In *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*. Eds. Hendryk Flachowsky und M.-V. Hanke. 79-100. Global Science Books, Isleworth, UK.
  252. Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* 7, 562–578. doi: 10.1038/nprot.2012.016
  253. Ullrich, C.I., Kleespies, R.G., Enders, M., Koch, E. (2009). Biology of the black rot pathogen, *Guignardia bidwellii*, its development in susceptible leaves of grapevine *Vitis vinifera*. *Journal für Kulturpflanzen* 61, 82-90.
  254. Váczy, Zs., Váczy, K.Z., Schmidt, Á., Kiss, L. (2012). A *Guignardia bidwellii* által okozott feketerothadás magyarországi szőlőültetvényekben. In: 58. Növényvédelmi Tudományos Napok Összefoglalók (2012) (Budapest) 38. p.
  255. Van der Gaag, B., Spath, S., Dietrich, H., Stigter, E., Boonzaaijer, G., van Osenbruggen, T., Koopal, K. (2003). Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control* 14, 251–254.
  256. Van Der Merwe, K., Steyn, P., Fourie, L. (1965). Ochratoxin A, a Toxic Metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh.. *Nature* 205, 1112–1113.
  257. Van der Plank, J. E. (1963). *Plant diseases: epidemics and control*. (New York: Academic Press Inc.).
  258. Veciana-Nogues, M. T., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M. C. (1997). Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry, 45(6), 2036-2041.
259. Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A. (2007). A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. PLoS ONE 2: e1326.
  260. Venuti, S., Copetti, D., Foria, S., Falginella, L., Hoffmann, S., Bellin, D. (2013). Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the Asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. PloS One 8 (4), e61228. doi: 10.1371/journal.pone.0061228
  261. Viala, P., Ravaz, L. (1886). Mémoire sur une nouvelle maladie de la vigne, le Black Rot (pourriture noir). Annales de l'École National d'Agriculture de Montpellier, 2:17-58. p.
  262. Viñas, I., Vela, E., Sanchis, V. (1993). Capacidad productora de patulina de cepas de *Penicillium expansum* procedentes de centrales hortofrutícolas de Lleida. Revista Iberoamericana de Micología 10, 30-32.
  263. Wan, Y., Schwaninger, H., He, P., Wang, Y. (2007). Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. Vitis 46, 132- 136
  264. Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. In: Nature Reviews Genetics 10.1, pp. 57–63.
  265. Weisshaar, B. és Jenkins, G. I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. Current Opinion in Plant Biology, 1 (3): 251-257.
  266. WHO IARC. (1990). Patulin. WHO Food Additives Series. 26: 143-165.
  267. Wichmann, G., Herbarth, O., Lehmann, I. (2002). The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon- $\gamma$  rather than interleukin-4 production in human blood cells. Environmental Toxicology, 17(3), 211-218.
  268. Wikee, S., Udayanga, D., Crous, P.W., Chukeatirote, E., McKenzie, E.H.C. (2011). Phyllosticta – an overview of current status of species recognition. Fungal Diversity 51, 43–61.
  269. Wilcox, W. (2003). Grapes: Black rot (*Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala and Ravaz.) Cornell Cooperative Extension Disease Identification Sheet No. 102GFSG-D4, Cornell University.
  270. Wilcox, W., Walter, G., Uyemoto, J. (2015). Compendium of Grape Diseases, Disorders and Pests. Second Edition. Minnesota: APS PRESS. 232. p.
  271. Wilcox, W. F., Hoffman, L. E. (2015). Black rot. Pages 28-33 in: Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests, Second Edition. W. F. Wilcox, W. D. Gubler, and J. K. Uyemoto, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
  272. Windels, C.E. (2000). Economic and social impacts of Fusarium head blight: Changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. Phytopathology 90, 17–21.
  273. Wingett, S.W., Andrews, S. (2018). FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. F1000Research 7:1338. doi: 10.12688/f1000research.15931.2.
  274. Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Current Opinion in Plant Biology, 5 (3): 218-223.
  275. Woloshuk, C.P., Shim, W.-B. (2013). Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. FEMS Microbiol. Rev. 37, 94–109. doi:10.1111/1574-6976.12009
  276. Xing, Y., Jia, W., Zhang, J. (2008). AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production via AtMPK6-coupled signaling in Arabidopsis. Plant J 54(3):440-451.
  277. Zadoks, J.C. (1972). Modern concepts in disease resistance in cereals. The way ahead in plant breeding In Proceedings of Sixth Congress of Eucarpia (Lupton, F.A.G.H. et al. eds.) 89–98.
  278. Zern, T. L. és Fernandez, M. L. (2005). Cardioprotective effects of dietary polyphenols. The Journal of Nutrition, 135 (10): 2291-2294.

279. Zimmerli, B., Dick, R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, 13, 655-668.
280. Zini, E., Raffeiner, M., Di Gaspero, G., Eibach, R., Grando, M. S., Letschka, T. (2015). Applying a defined set of molecular markers to improve selection of resistant grapevine accessions. In XI International Conference on Grapevine Breeding and Genetics 1082 (pp. 73-78). doi: 10.17660/ ActaHortic.2015.1082.9.
281. Zyprian, E., Ochßner, I., Schwander, F., Šimon, S., Hausmann, L., Bonow-Rex, M., et al. (2016). Quantitative trait loci affecting pathogen resistance and ripening of grapevines. *Mol. Genet. Genomics* 291 (4), 1573–1594. doi: 10.1007/ s00438-016-1200-5

## M2. További mellékletek

17. táblázat: Szekvencia olvasatok illesztése a *de novo* transzkriptumra. Az illesztést TopHat szoftverrel végeztük a Cufflinks-szel létrehozott *de novo* transzkriptumot használva referenciaként

| Minta | Forward  |                  |               |  |  | Reverse  |                  |               |  |  | Illesztett | Read párok |               |               |             |       |
|-------|----------|------------------|---------------|--|--|----------|------------------|---------------|--|--|------------|------------|---------------|---------------|-------------|-------|
|       | read#    | illesztve        | többszörös    |  |  | read#    | illesztve        | többszörös    |  |  |            | illesztett | többszörös    | ellentmondó   | összhangban |       |
| BR10  | 28834470 | 24932199 (86.5%) | 980194 (3.9%) |  |  | 28834470 | 24961319 (86.6%) | 983230 (3.9%) |  |  | 86.5%      | 23435285   | 903819 (3.9%) | 102184 (0.4%) |             | 80.9% |
| BR11  | 6819667  | 5894191 (86.4%)  | 137221 (2.3%) |  |  | 6819667  | 5868015 (86.0%)  | 135903 (2.3%) |  |  | 86.2%      | 5430271    | 120214 (2.2%) | 27091 (0.5%)  |             | 79.2% |
| BR12  | 23321155 | 20773049 (89.1%) | 535384 (2.6%) |  |  | 23321155 | 20688291 (88.7%) | 533053 (2.6%) |  |  | 88.9%      | 19475061   | 475928 (2.4%) | 138922 (0.7%) |             | 82.9% |
| BR13  | 28977256 | 25121802 (86.7%) | 575927 (2.3%) |  |  | 28977256 | 25119361 (86.7%) | 576858 (2.3%) |  |  | 86.7%      | 24148655   | 538197 (2.2%) | 79727 (0.3%)  |             | 83.1% |
| BR14  | 22093828 | 19417827 (87.9%) | 387238 (2.0%) |  |  | 22093828 | 19368418 (87.7%) | 385957 (2.0%) |  |  | 87.8%      | 18559372   | 357189 (1.9%) | 69568 (0.4%)  |             | 83.7% |
| BR15  | 6009306  | 5428743 (90.3%)  | 105633 (1.9%) |  |  | 6009306  | 5408892 (90.0%)  | 105156 (1.9%) |  |  | 90.2%      | 5149663    | 95957 (1.9%)  | 22105 (0.4%)  |             | 85.3% |
| BR16  | 22419345 | 20162741 (89.9%) | 438002 (2.2%) |  |  | 22419345 | 20161494 (89.9%) | 438461 (2.2%) |  |  | 89.9%      | 19395830   | 412940 (2.1%) | 55991 (0.3%)  |             | 86.3% |
| BR17  | 5998577  | 5417104 (90.3%)  | 110394 (2.0%) |  |  | 5998577  | 5398874 (90.0%)  | 109766 (2.0%) |  |  | 90.2%      | 5127998    | 99170 (1.9%)  | 26884 (0.5%)  |             | 85.0% |
| BR18  | 5021238  | 4526628 (90.1%)  | 85940 (1.9%)  |  |  | 5021238  | 4511876 (89.9%)  | 85621 (1.9%)  |  |  | 90.0%      | 4298026    | 77999 (1.8%)  | 19007 (0.4%)  |             | 85.2% |
| BR1   | 27693650 | 24143720 (87.2%) | 693806 (2.9%) |  |  | 27693650 | 24148234 (87.2%) | 694912 (2.9%) |  |  | 87.2%      | 22671299   | 639611 (2.8%) | 85210 (0.4%)  |             | 81.6% |
| BR21  | 20061745 | 17733637 (88.4%) | 351202 (2.0%) |  |  | 20061745 | 17665131 (88.1%) | 349909 (2.0%) |  |  | 88.2%      | 16355609   | 310450 (1.9%) | 93666 (0.6%)  |             | 81.1% |
| BR24  | 7728177  | 7811247 (87.7%)  | 114163 (1.7%) |  |  | 7728177  | 6743798 (87.3%)  | 113337 (1.7%) |  |  | 87.5%      | 6255336    | 101783 (1.6%) | 23727 (0.4%)  |             | 80.6% |
| BR26  | 24012055 | 21252732 (88.5%) | 463039 (2.2%) |  |  | 24012055 | 21246115 (88.5%) | 463823 (2.2%) |  |  | 88.5%      | 20483254   | 433827 (2.1%) | 69080 (0.3%)  |             | 85.0% |
| BR29  | 21721541 | 20046456 (92.3%) | 412191 (2.1%) |  |  | 21721541 | 20040720 (92.3%) | 412412 (2.1%) |  |  | 92.3%      | 19296116   | 385751 (2.0%) | 64222 (0.3%)  |             | 88.5% |
| BR2   | 6509721  | 5706231 (87.7%)  | 117454 (2.1%) |  |  | 6509721  | 5674658 (87.2%)  | 116540 (2.1%) |  |  | 87.4%      | 5256650    | 104228 (2.0%) | 27542 (0.5%)  |             | 80.3% |
| BR33  | 10664461 | 9069006 (85.0%)  | 224965 (2.5%) |  |  | 10664461 | 9052415 (84.9%)  | 224582 (2.5%) |  |  | 85.0%      | 8504950    | 206087 (2.4%) | 24886 (0.3%)  |             | 79.5% |
| BR36  | 15576723 | 13455778 (86.4%) | 405869 (3.0%) |  |  | 15576723 | 13434193 (86.2%) | 405240 (3.0%) |  |  | 86.3%      | 12695339   | 376667 (3.0%) | 41151 (0.3%)  |             | 81.2% |
| BR3   | 23875549 | 18523707 (77.6%) | 367535 (2.0%) |  |  | 23875549 | 18453634 (77.3%) | 365903 (2.0%) |  |  | 77.4%      | 17091969   | 322073 (1.9%) | 104703 (0.6%) |             | 71.1% |
| BR46  | 10206734 | 8918527 (87.4%)  | 184103 (2.1%) |  |  | 10206734 | 8901490 (87.2%)  | 183880 (2.1%) |  |  | 87.3%      | 8578664    | 171538 (2.0%) | 31191 (0.4%)  |             | 83.7% |
| BR47  | 27932043 | 24109151 (86.3%) | 592096 (2.5%) |  |  | 27932043 | 24134007 (86.4%) | 594769 (2.5%) |  |  | 86.4%      | 22771730   | 544524 (2.4%) | 73154 (0.3%)  |             | 81.3% |
| BR48  | 22436022 | 19718087 (87.9%) | 489856 (2.5%) |  |  | 22436022 | 19722670 (87.9%) | 491167 (2.5%) |  |  | 87.9%      | 18512237   | 444076 (2.4%) | 77691 (0.4%)  |             | 82.2% |
| BR4   | 17919076 | 15558099 (86.8%) | 327386 (2.1%) |  |  | 17919076 | 15540716 (86.7%) | 327541 (2.1%) |  |  | 86.8%      | 14918293   | 304743 (2.0%) | 70726 (0.5%)  |             | 82.9% |
| BR51  | 20509476 | 17623309 (85.9%) | 360334 (2.0%) |  |  | 20509476 | 17565309 (85.6%) | 358757 (2.0%) |  |  | 85.8%      | 16746070   | 326221 (1.9%) | 105813 (0.6%) |             | 81.1% |
| BR53  | 24836668 | 21436476 (86.3%) | 575050 (2.7%) |  |  | 24836668 | 21449651 (86.4%) | 576160 (2.7%) |  |  | 86.3%      | 20292715   | 529561 (2.6%) | 83274 (0.4%)  |             | 81.4% |
| BR54  | 26645000 | 23198484 (87.1%) | 626413 (2.7%) |  |  | 26645000 | 23217765 (87.1%) | 628268 (2.7%) |  |  | 87.1%      | 21850234   | 571609 (2.6%) | 106604 (0.5%) |             | 81.6% |
| BR55  | 10493851 | 9247585 (88.1%)  | 204877 (2.2%) |  |  | 10493851 | 9222092 (87.9%)  | 204152 (2.2%) |  |  | 88.0%      | 8870377    | 191260 (2.2%) | 32892 (0.4%)  |             | 84.2% |
| BR56  | 24844813 | 22442195 (90.3%) | 520701 (2.3%) |  |  | 24844813 | 22386159 (90.1%) | 519633 (2.3%) |  |  | 90.2%      | 21420122   | 476499 (2.2%) | 111703 (0.5%) |             | 85.8% |
| BR57  | 31706201 | 28132971 (88.7%) | 696494 (2.5%) |  |  | 31706201 | 28131103 (88.7%) | 697574 (2.5%) |  |  | 88.7%      | 27089089   | 652460 (2.4%) | 108958 (0.4%) |             | 85.1% |
| BR58  | 27090771 | 23888527 (88.2%) | 587732 (2.5%) |  |  | 27090771 | 23886525 (88.2%) | 588954 (2.5%) |  |  | 88.2%      | 22990216   | 550498 (2.4%) | 94019 (0.4%)  |             | 84.5% |
| BR59  | 16210970 | 14464342 (89.2%) | 292594 (2.0%) |  |  | 16210970 | 14442749 (89.1%) | 292031 (2.0%) |  |  | 89.2%      | 13936770   | 274539 (2.0%) | 40896 (0.3%)  |             | 85.7% |
| BR5   | 5061339  | 4624946 (91.4%)  | 77566 (1.7%)  |  |  | 5061339  | 4605748 (91.0%)  | 76966 (1.7%)  |  |  | 91.2%      | 4385311    | 70921 (1.6%)  | 18216 (0.4%)  |             | 86.3% |
| BR60  | 11147019 | 9730184 (87.3%)  | 189040 (1.9%) |  |  | 11147019 | 9714106 (87.1%)  | 188893 (1.9%) |  |  | 87.2%      | 9353578    | 176570 (1.9%) | 27274 (0.3%)  |             | 83.7% |
| BR61  | 5648024  | 4875341 (86.3%)  | 105355 (2.2%) |  |  | 5648024  | 4855111 (86.0%)  | 104735 (2.2%) |  |  | 86.1%      | 4506601    | 93134 (2.1%)  | 22876 (0.5%)  |             | 79.4% |
| BR62  | 12182648 | 10552903 (86.6%) | 237613 (2.3%) |  |  | 12182648 | 10525554 (86.4%) | 236563 (2.2%) |  |  | 86.5%      | 9920250    | 217018 (2.2%) | 33235 (0.3%)  |             | 81.2% |
| BR63  | 17284602 | 14171509 (82.0%) | 355420 (2.5%) |  |  | 17284602 | 14155108 (81.9%) | 355215 (2.5%) |  |  | 81.9%      | 13651431   | 336347 (2.5%) | 46723 (0.3%)  |             | 78.7% |



|      |          |          |         |        |        |          |          |         |        |        |       |          |        |        |        |        |       |
|------|----------|----------|---------|--------|--------|----------|----------|---------|--------|--------|-------|----------|--------|--------|--------|--------|-------|
| BR64 | 18175464 | 15088772 | (83.0%) | 357782 | (2.4%) | 18175464 | 15065321 | (82.9%) | 357399 | (2.4%) | 83.0% | 14501689 | 335481 | (2.3%) | 55684  | (0.4%) | 79.5% |
| BR65 | 10544415 | 9045609  | (85.8%) | 244860 | (2.7%) | 10544415 | 9027513  | (85.6%) | 244166 | (2.7%) | 85.7% | 8503408  | 224166 | (2.6%) | 30188  | (0.4%) | 80.4% |
| BR66 | 10950310 | 9321139  | (85.1%) | 302035 | (3.2%) | 10950310 | 9300326  | (84.9%) | 301441 | (3.2%) | 85.0% | 8738575  | 276928 | (3.2%) | 32606  | (0.4%) | 79.5% |
| BR6  | 11319764 | 10157393 | (89.7%) | 185002 | (1.8%) | 11319764 | 10135965 | (89.5%) | 184612 | (1.8%) | 89.6% | 9734180  | 174217 | (1.8%) | 36624  | (0.4%) | 85.7% |
| BR7  | 24717743 | 21439577 | (86.7%) | 739818 | (3.5%) | 24717743 | 21451393 | (86.8%) | 741679 | (3.5%) | 86.8% | 20138226 | 682415 | (3.4%) | 81955  | (0.4%) | 81.1% |
| BR8  | 23560965 | 19624394 | (83.3%) | 495242 | (2.5%) | 23560965 | 19523951 | (82.9%) | 492928 | (2.5%) | 83.1% | 17924018 | 428735 | (2.4%) | 154628 | (0.9%) | 75.4% |
| BR9  | 20270657 | 17952312 | (88.6%) | 396085 | (2.2%) | 20270657 | 17882331 | (88.2%) | 394175 | (2.2%) | 88.4% | 16901898 | 356479 | (2.1%) | 96665  | (0.6%) | 82.9% |

18. táblázat: A differenciáló gének részletes listája kromoszómánként (6 hpi, p&lt;0.01)

| Kromoszóma | helyzet    | LFC   | gén                | megjegyzés                                                                |
|------------|------------|-------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| chr4       | 1.863.214  | 6.03  | VIT_204s0008g02260 | probable flavin-containing monooxygenase 1-like                           |
|            | 7.481.458  | 2.29  | VIT_204s0008g07230 | aspartic proteinase nepenthesin-2-like                                    |
| chr5       | 7.789.933  | -3.28 | VIT_205s0049g00770 | proline-rich 33 kda extensin-related                                      |
| chr6       | 1.149.407  | -2.36 | VIT_206s0004g01040 | disease resistance response protein 206                                   |
|            | 3.233.332  | -2.01 | VIT_206s0004g02620 | phenylalanine ammonia-lyase                                               |
|            | 15.353.958 | -3.92 | VIT_206s0009g02590 | pectinesterase 2-like                                                     |
| chr7       | 4.380.271  | 4.60  | VIT_207s0005g01940 | pectinesterase family expressed                                           |
| chr8       | 19.729.076 | -4.24 | VIT_208s0007g05830 | unnamed protein product [Vitis vinifera]                                  |
| chr9       | 17.134.524 | -2.74 | XLOC_030833        |                                                                           |
| chr10      | 10.064.687 | -2.10 | VIT_210s0003g05430 | reticuline oxidase-like protein                                           |
|            | 14.216.034 | -7.20 | VIT_210s0042g00840 | stilbene synthase                                                         |
|            | 14.246.930 | -2.52 | VIT_210s0042g00870 | stilbene synthase                                                         |
|            | 14.304.786 | -3.66 | VIT_210s0042g00930 | stilbene synthase                                                         |
| chr11      | 12.503.269 | -5.85 | VIT_211s0078g00290 | trans-cinnamate 4-monooxygenase                                           |
|            | 5.712.680  | -3.61 | VIT_211s0118g00160 | probable lrr receptor-like serine threonine-protein kinase at4g36180-like |
|            | 3.977.181  | -2.03 | XLOC_004109        |                                                                           |
| chr12      | 2.573.979  | -3.56 | VIT_212s0028g01940 | 8-hydroxyquercetin 8-o-methyltransferase                                  |
|            | 1.632.442  | 5.35  | XLOC_005740        |                                                                           |
| chr13      | 2.074.318  | -2.91 | VIT_213s0067g03720 | sac3 ganp family protein                                                  |
|            | 9.423.954  | 5.55  | VIT_213s0106g00080 | ankyrin repeat-containing                                                 |
| chr14      | 20.323.725 | 2.53  | VIT_214s0006g02555 | probable non-specific lipid-transfer protein akcs9-like                   |
|            | 24.814.759 | -3.94 | VIT_214s0068g01040 | ethylene-responsive transcription factor erf114-like                      |
|            | 22.298.923 | 5.01  | VIT_214s0083g00250 | uncharacterized protein loc100853032                                      |
| chr16      | 15.204.145 | 4.80  | VIT_216s0022g02470 | peroxidase 66                                                             |
|            | 613.506    | -3.07 | VIT_216s0039g01120 | phenylalanine ammonia-lyase                                               |
|            | 619.675    | -5.51 | VIT_216s0039g01130 | phenylalanine ammonia-lyase                                               |
|            | 649.907    | -2.25 | VIT_216s0039g01170 | phenylalanine ammonia-lyase                                               |
|            | 688.542    | -3.2  | VIT_216s0039g01240 | phenylalanine ammonia-lyase                                               |
|            | 699.950    | -4.36 | VIT_216s0039g01280 | phenylalanine ammonia-lyase                                               |
|            | 706.775    | -5.62 | VIT_216s0039g01300 | phenylalanine ammonia-lyase                                               |
|            | 16.238.950 | -3.01 | VIT_216s0100g00750 | stilbene synthase                                                         |
|            | 16.268.744 | -4.63 | VIT_216s0100g00770 | stilbene synthase                                                         |
|            | 16.286.615 | -2.54 | VIT_216s0100g00800 | stilbene synthase                                                         |
|            | 16.335.550 | -3.01 | VIT_216s0100g00830 | stilbene synthase                                                         |
|            | 16.342.994 | -2.3  | VIT_216s0100g00840 | stilbene synthase                                                         |
|            | 16.349.897 | -2.22 | VIT_216s0100g00860 | stilbene synthase 4-like                                                  |
|            | 16.366.812 | -2.65 | VIT_216s0100g00880 | stilbene synthase 4-like                                                  |
|            | 16.385.884 | -2.46 | VIT_216s0100g00900 | stilbene synthase 4-like                                                  |
|            | 16.398.197 | -2.6  | VIT_216s0100g00910 | stilbene synthase                                                         |
|            | 16.404.994 | -2.08 | VIT_216s0100g00920 | stilbene synthase                                                         |
|            | 16.408.318 | -2.51 | VIT_216s0100g00930 | stilbene synthase                                                         |
|            | 16.411.708 | -2.40 | VIT_216s0100g00940 | stilbene synthase 4-like                                                  |
|            | 16.440.652 | -4.74 | VIT_216s0100g00960 | stilbene synthase 4-like                                                  |
|            | 16.466.734 | -2.11 | VIT_216s0100g00990 | stilbene synthase                                                         |
|            | 16.503.220 | -2.66 | VIT_216s0100g01020 | stilbene synthase 4-like                                                  |
|            | 16.511.136 | -2.85 | VIT_216s0100g01040 | stilbene synthase 4-like                                                  |
|            | 16.615.515 | -2.84 | VIT_216s0100g01120 | stilbene synthase                                                         |
|            | 16.697.908 | -3.78 | VIT_216s0100g01170 | stilbene synthase                                                         |
| chr18      | 27.186.796 | -3.8  | VIT_218s0041g02060 | 12-oxophytodienoate reductase                                             |

19. táblázat: A differenciáltan expesszázó gének részletes listája kromoszómánként (18 hpi, p&lt;0.01)

| Kromoszóma | helyzet    | LFC   | gén                | megjegyzés                                           |
|------------|------------|-------|--------------------|------------------------------------------------------|
| chr1       | 2.632.427  | -5.28 | VIT_201s0011g02960 | leucoanthocyanidin reductase                         |
|            | 3.167.509  | -5.91 | VIT_201s0011g03490 | 3-ketoacyl- synthase                                 |
|            | 3.678.832  | -5.74 | VIT_201s0011g04030 | reticulon-like protein b9-like                       |
|            | 6.034.187  | -4.09 | VIT_201s0011g06240 | cyto chrome b-561 protein                            |
|            | 12.259.928 | -2.76 | VIT_201s0026g02620 | expansin                                             |
|            | 7.926.124  | 1.48  | VIT_201s0127g00560 | probable nucleoredoxin 1-like                        |
| chr2       | 7.184.140  | 1.37  | VIT_202s0012g01160 | nitrate transporter -like                            |
|            | 4.282.027  | -5.38 | VIT_202s0025g04720 | anthocyanidin synthase                               |
|            | 5.130.968  | -1.70 | VIT_202s0154g00300 | 14 kda proline-rich protein                          |
| chr3       | 17.193.257 | 3.30  | VIT_203s0017g01300 | white-brown-complex abc transporter family           |
|            | 19.008.977 | -4.17 | VIT_203s0017g02240 | carbohydrate-binding x8 domain-containing protein    |
| chr4       | 1.527.899  | 3.84  | VIT_203s0038g02220 | actin depolymerizing factor 5                        |
|            | 8.252.443  | -6.95 | VIT_203s0088g00260 | serine carboxypeptidase-like 18                      |
|            | 8.252.443  | -6.95 | VIT_203s0088g00260 | serine carboxypeptidase-like 18-like                 |
|            | 6.338.109  | -8.32 | VIT_203s0091g00040 | limonoid udp-glucosyltransferase                     |
|            | 7.950.976  | -6.74 | VIT_203s0091g01290 | serine carboxypeptidase-like 18-like                 |
|            | 3.279.191  | 2.31  | VIT_204s0008g03940 | burp domain-containing protein                       |
|            | 19.929.438 | -2.93 | VIT_204s0023g03370 | flavanone 3-hydroxylase                              |
|            | 20.134.581 | 3.08  | VIT_204s0023g03610 | mlo-like protein 4-like                              |
|            | 1.239.180  | -2.95 | VIT_205s0077g01540 | pathogenesis-related protein 10                      |
|            | 13.597.238 | -3.97 | VIT_205s0136g00260 | chalcone synthase                                    |
| chr6       | 1.790.969  | 2.68  | VIT_206s0004g01460 | linoleate 13s-lipoxygenase 2-chloroplastic-like      |
|            | 3.233.332  | -4.46 | VIT_206s0004g02620 | phenylalanine ammonia-lyase                          |
|            | 5.817.040  | -1.85 | VIT_206s0004g04860 | expansin                                             |
|            | 6.012.395  | -1.38 | VIT_206s0004g05080 | protein binding                                      |
|            | 7.301.207  | 2.91  | VIT_206s0004g06570 | vacuolar cation proton exchanger                     |
|            | 8.695.880  | 6.94  | VIT_206s0004g07970 | expansin                                             |
|            | 15.670.201 | -5.50 | VIT_206s0009g02810 | flavonoid 3 -hydroxylase 2-like                      |
|            | 15.714.588 | -3.79 | VIT_206s0009g02840 | flavonoid 3 -hydroxylase 2                           |
|            | 16.008.909 | -3.51 | VIT_206s0009g02970 | flavonoid 3 -hydroxylase 2-like                      |
|            | 18.257.401 | -3.06 | VIT_206s0061g00730 | tonoplast intrinsic                                  |
|            | 20.242.801 | -2.32 | VIT_206s0080g00330 | esterase lipase thioesterase-like protein            |
|            | 3.730.365  | -3.96 | VIT_207s0005g01210 | transcription factor myb12                           |
|            | 4.490.769  | 2.68  | VIT_207s0005g02070 | protein nim1-interacting 1-like                      |
|            | 7.226.206  | 4.01  | VIT_207s0005g04130 | had subfamily iiib acid phosphatase                  |
|            | 17.794.258 | 2.26  | VIT_207s0031g01710 | probable wrky transcription factor 51-like           |
|            | 18.105.237 | -2.25 | VIT_207s0031g01980 | ap2 erf domain-containing transcription factor       |
|            | 2.806.800  | -3.14 | VIT_207s0104g01800 | glutathione s-transferase f13                        |
|            | 15.293.254 | 3.43  | VIT_208s0007g01180 | receptor protein kinase 1-like                       |
|            | 15.578.678 | 5.39  | VIT_208s0007g01480 | tpr repeat-containing thioredoxin ttl1-like          |
| chr8       | 16.006.138 | -1.33 | VIT_208s0007g01940 | gdp-mannose-dependent alpha-mannosyltransferase-like |
|            | 19.866.070 | 3.03  | VIT_208s0007g06020 | beta- -glucanase                                     |
|            | 240.600    | -2.80 | VIT_209s0002g00320 | pectin methylesterase                                |
|            | 2.678.232  | -4.06 | VIT_209s0002g02970 | protein                                              |
|            | 4.850.834  | 3.38  | VIT_209s0002g05150 | auxin-induced protein                                |
|            | 5.316.083  | -1.96 | VIT_209s0002g05590 | pleiotropic drug resistance protein 1-like           |
| chr9       | 20.967.249 | -2.30 | VIT_209s0054g00430 | uncharacterized protein                              |
|            | 3.210.601  | -5.76 | VIT_210s0003g01740 | uncharacterized protein                              |
|            | 5.539.131  | -3.57 | VIT_210s0003g03340 | uncharacterized protein loc100253775                 |

|              |            |       |                    |                                                |
|--------------|------------|-------|--------------------|------------------------------------------------|
| chr11        | 5.673.052  | -3.57 | VIT_210s0003g03430 | uncharacterized protein loc100257299           |
|              | 5.698.653  | -5.41 | VIT_210s0003g03440 | uncharacterized protein loc100855345           |
|              | 10.224.104 | -9.38 | VIT_210s0003g05550 | reticuline oxidase-like                        |
|              | 583.486    | 2.20  | VIT_211s0016g00590 | 21 kda protein                                 |
|              | 3.394.623  | -4.22 | VIT_211s0016g04160 | sulfate transporter                            |
|              | 3.975.392  | -3.17 | VIT_211s0016g04670 | unnamed protein product [Vitis vinifera]       |
| chr12        | 10.804.182 | -5.82 | VIT_211s0037g01350 | uncharacterized protein loc100854873           |
|              | 10.879.650 | -6.70 | VIT_211s0037g01370 | uncharacterized protein loc100262122           |
|              | 20.686.814 | -4.41 | VIT_212s0035g01000 | serine-type endopeptidase inhibitor            |
|              | 14.484.489 | -4.91 | VIT_212s0055g01010 | bacterial-induced peroxidase                   |
| chr13        | 9.713.036  | -1.89 | VIT_212s0057g01020 | fasciclin-like arabinogalactan protein         |
|              | 8.133.136  | -5.01 | VIT_212s0134g00500 | d6-type cyclin                                 |
|              | 3.455.870  | -2.17 | VIT_213s0019g02170 | tropinone reductase homolog at1g07440          |
|              | 5.881.261  | -1.53 | VIT_213s0019g04460 | phenylalanine ammonia-lyase                    |
|              | 23.127.104 | 2.63  | VIT_213s0064g01260 | leucine-rich repeat receptor-like protein      |
| chr13_random | 1.578.476  | 2.62  | VIT_213s0067g02930 | expansin                                       |
|              | 11.335.596 | -5.64 | VIT_213s0147g00230 | protein                                        |
| chr14        | 1.544.839  | 2.20  | VIT_213s0067g02840 | phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase      |
| chr14        | 4.785.645  | -3.55 | VIT_214s0030g00650 | bifunctional 3-dehydroquinase dehydratase      |
|              |            |       |                    | shikimate chloroplastic-like                   |
|              | 6.654.605  | -2.32 | VIT_214s0030g01790 | pollen-specific protein sf21                   |
|              | 26.536.958 | -5.71 | VIT_214s0066g00010 | uncharacterized protein loc100249294           |
|              | 26.610.469 | -6.01 | VIT_214s0066g00060 | uncharacterized protein loc100254392 isoform 2 |
|              | 26.622.115 | -3.54 | VIT_214s0066g00070 | uncharacterized protein loc100244128 isoform 2 |
|              | 24.673.233 | -4.46 | VIT_214s0068g00920 | chalcone synthase                              |
|              | 25.221.282 | -2.77 | VIT_214s0068g01500 | glycerophosphodiester phosphodiesterase        |
|              |            |       |                    | gde1-like isoform 1                            |
|              | 22.298.923 | 3.10  | VIT_214s0083g00250 | uncharacterized protein loc100853032           |
|              | 22.332.992 | -3.86 | VIT_214s0083g00290 | uncharacterized protein loc100853032           |
|              | 29.183.985 | 5.18  | VIT_214s0108g00420 | transcription factor bhlh135-like              |
|              | 29.210.967 | -3.17 | VIT_214s0108g00440 | alpha tubulin 1                                |
|              | 29.649.186 | 2.35  | VIT_214s0108g01020 | expansin protein                               |
|              | 13.742.179 | 2.57  | VIT_215s0021g02710 | pethy zpt4-1                                   |
|              | 17.211.622 | -4.77 | VIT_215s0046g00170 | protein                                        |
|              | 14.297.045 | -2.91 | VIT_215s0048g00190 | phosphorus starvation-induced protein          |
| chr16        | 18.908.189 | 1.62  | VIT_216s0050g01960 | atp binding                                    |
|              | 20.787.131 | -2.44 | VIT_216s0098g00360 | zinc finger protein constans-like protein      |
|              | 21.182.902 | 1.89  | VIT_216s0098g00860 | flavanone 3-dioxygenase-like                   |
|              | 16.238.950 | -5.40 | VIT_216s0100g00750 | stilbene synthase                              |
|              | 16.268.744 | -8.46 | VIT_216s0100g00770 | stilbene synthase                              |
|              | 16.276.379 | -4.53 | VIT_216s0100g00780 | stilbene synthase                              |
|              | 16.335.550 | -3.63 | VIT_216s0100g00830 | stilbene synthase                              |
|              | 16.398.197 | -3.82 | VIT_216s0100g00910 | stilbene synthase                              |
|              | 16.503.220 | -2.93 | VIT_216s0100g01020 | stilbene synthase                              |
|              | 16.503.220 | -2.93 | VIT_216s0100g01020 | stilbene synthase 4-like                       |
|              | 16.525.933 | -5.82 | VIT_216s0100g01070 | stilbene synthase                              |
|              | 16.555.604 | -6.51 | VIT_216s0100g01100 | stilbene synthase                              |
|              | 16.627.150 | -4.13 | VIT_216s0100g01140 | stilbene synthase                              |
|              | 16.673.901 | -5.34 | VIT_216s0100g01160 | stilbene synthase                              |
|              | 16.697.908 | -4.94 | VIT_216s0100g01170 | stilbene synthase                              |
|              | 16.682.384 | -5.10 | VIT_216s0100g01170 | stilbene synthase                              |
| chr17        | 12.697.439 | 3.36  | VIT_217s0000g10370 | uncharacterized protein loc100246199           |

|       |            |        |                    |                                                             |
|-------|------------|--------|--------------------|-------------------------------------------------------------|
| chr18 | 4.143.167  | -3.09  | VIT_218s0001g05060 | -bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase-like |
|       | 7.839.499  | -1.61  | VIT_218s0001g09340 | acyl- -binding domain 3                                     |
|       | 7.879.995  | -3.49  | VIT_218s0001g09400 | cyto chrome b5                                              |
|       | 11.425.469 | 4.67   | VIT_218s0001g13400 | cysteine proteinase rd19a-like                              |
|       | 12.488.434 | 4.11   | VIT_218s0001g14490 | thaumatin-like protein                                      |
|       | 12.997.268 | -3.11  | VIT_218s0001g14990 | tpa: protein kinase superfamily protein                     |
|       | 27.186.796 | -8.91  | VIT_218s0041g02060 | 12-oxophytodienoate reductase                               |
|       | 694.312    | -10.10 | VIT_218s0122g00980 | glucan endo- -beta-glucosidase                              |
|       | 3.933.365  | -3.52  | VIT_219s0014g03840 | uncharacterized protein loc100258913                        |
|       | 21.494.385 | -1.69  | VIT_219s0027g01400 | disease resistance protein rga4-like                        |
| chr19 | 23.264.978 | -4.64  | VIT_219s0085g00810 | carbohydrate-binding x8 domain-containing protein           |
|       | 7.399.533  | -6.47  | VIT_219s0090g01340 | glycine-rich protein                                        |
|       | 7.441.177  | -2.23  | VIT_219s0090g01360 | uncharacterized protein loc100262468                        |
|       | 6.032.317  | -2.88  | VIT_219s0177g00200 | early nodulin-like protein                                  |
| chrUn | 2.342.188  | -3.87  | VIT_200s0131g00110 | low quality protein: annexin d4-like                        |
|       | 24.052.573 | -4.08  | VIT_200s0337g00040 | uncharacterized protein                                     |
|       | 25.598.321 | -3.04  | VIT_200s0361g00040 | anthocyanidin reductase                                     |
|       | 27.950.497 | 3.40   | VIT_200s0409g00050 | s-locus-specific glycoprotein s6                            |

20. táblázat: A differenciáltan expresszáló gének részletes listája kromoszómánként (36 hpi,  $p < 0.01$ )

| Kromoszóma | helyzet    | LFC   | gén                | megjegyzés                                                     |
|------------|------------|-------|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| chr1       | 806.633    | 4.27  | VIT_201s0011g00950 | disease resistance protein rpm1-like                           |
| chr3       | 1.235.668  | -3.3  | VIT_203s0038g01770 | unnamed protein product [Vitis vinifera]                       |
|            | 5.590.920  | 2.95  | VIT_203s0063g02360 | organ-specific protein s2                                      |
| chr4       | 16.872.105 | 2.7   | VIT_204s0023g00640 | receptor-like protein kinase 5-like                            |
| chr11      | 3.614.037  | -3.25 | VIT_211s0016g04330 | dihydrofolate reductase                                        |
|            | 16.190.207 | -4.38 | XLOC_004177        |                                                                |
|            | 3.977.181  | 7.93  | XLOC_004109        |                                                                |
| chr12      | 18.139.407 | -2.67 | VIT_212s0034g01930 | glutelin type-a                                                |
| chr13      | 16.849.395 | -5.25 | VIT_213s0047g00525 | anaphase-promoting complex subunit 1-like                      |
|            | 23.127.104 | -4.64 | VIT_213s0064g01260 | leucine-rich repeat receptor-like protein                      |
|            | 263.154    | -3.68 | VIT_213s0067g00420 | serine-threonine protein plant-protein                         |
| chr14      | 6.790.297  | -1.95 | VIT_214s0030g01890 |                                                                |
| chr15      | 17.143.740 | 4.13  | VIT_215s0046g00070 | calcium-binding protein kic-like                               |
|            | 20.161.262 | 3.26  | VIT_215s0046g03660 | probable disease resistance protein rdl6                       |
|            |            |       |                    | rf9-like                                                       |
| chr16      | 1.143.348  | 2.17  | VIT_216s0039g01540 | gamma-glutamylcyclotransferase at3g02910-like                  |
| chr17      | 1.502.932  | -3.10 | VIT_217s0000g01930 | protein                                                        |
|            | 6.769.207  | -2.44 | VIT_217s0000g06210 | gibberellin-regulated protein                                  |
|            | 9.097.005  | 4.59  | VIT_217s0000g08100 | udp-glycosyltransferase 90a1-like                              |
| chr18      | 10.100.593 | 2.02  | VIT_218s0001g11830 | protein                                                        |
|            | 13.231.125 | -4.40 | VIT_218s0001g15150 | unnamed protein product [Vitis vinifera]                       |
|            | 25.797.007 | -3.56 | VIT_218s0041g01160 | probable l-type lectin-domain containing receptor kinase -like |
| chr19      | 16.531.272 | -1.72 | VIT_219s0093g00110 | probable glutathione s-transferase                             |

Az egytényezős varianciaanalízis eredményei:

Cukortartalom

| VARIANCIAANALÍZIS |           |           |           |             |                |                |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|----------------|----------------|
| <i>Tényezők</i>   | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i>    | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
| Csoportok között  | 28046,785 | 5         | 5609,357  | 623,2618889 | 4,65E-14       | 3,105875       |
| Csoporton belül   | 108       | 12        | 9         |             |                |                |
| Összesen          | 28154,785 | 17        |           |             |                |                |

Glicerintartalom

| VARIANCIAANALÍZIS |           |           |           |          |                |                |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| <i>Tényezők</i>   | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
| Csoportok között  | 1090,56   | 5         | 218,112   | 54,528   | 7,79E-08       | 3,105875       |
| Csoporton belül   | 48        | 12        | 4         |          |                |                |
| Összesen          | 1138,56   | 17        |           |          |                |                |

Glükonsav tartalom

| VARIANCIAANALÍZIS |           |           |           |          |                |                |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| <i>Tényezők</i>   | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
| Csoportok között  | 0,3       | 5         | 0,06      | 0,666667 | 0,65603        | 3,105875       |
| Csoporton belül   | 1,08      | 12        | 0,09      |          |                |                |
| Összesen          | 1,38      | 17        |           |          |                |                |

Galakturonsav tartalom

| VARIANCIAANALÍZIS |           |           |           |          |                |                |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| <i>Tényezők</i>   | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
| Csoportok között  | 1750570   | 5         | 350114    | 21882,13 | 2,55E-23       | 3,105875       |
| Csoporton belül   | 192       | 12        | 16        |          |                |                |
| Összesen          | 1750762   | 17        |           |          |                |                |

Borkósav tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 130,42    | 5         | 26,084    | 72,45556 | 1,53E-08       | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 4,32      | 12        | 0,36      |          |                |                |
| Összesen         | 134,74    | 17        |           |          |                |                |

(+)-tejsav tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 0,0036865 | 5         | 0,000737  | 20,48056 | 1,7E-05        | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 0,000432  | 12        | 0,000036  |          |                |                |
| Összesen         | 0,0041185 | 17        |           |          |                |                |

Borostyánkősav tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 50,86     | 5         | 10,172    | 63,575   | 3,24E-08       | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 1,92      | 12        | 0,16      |          |                |                |
| Összesen         | 52,78     | 17        |           |          |                |                |

Fumársav tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i>  | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|------------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 171282,025 | 5         | 34256,41  | 3806,267 | 9,17E-19       | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 108        | 12        | 9         |          |                |                |
| Összesen         | 171390,025 | 17        |           |          |                |                |

# Kaftársav tartalom

## VARIANCIAANALÍZIS

| Tényezők         | SS      | df | MS      | F        | p-érték  | F krit.  |
|------------------|---------|----|---------|----------|----------|----------|
| Csoportok között | 4373,98 | 5  | 874,796 | 97,19956 | 2,78E-09 | 3,105875 |
| Csoporton belül  | 108     | 12 | 9       |          |          |          |
| Összesen         | 4481,98 | 17 |         |          |          |          |

# Összes polifenol tartalom

## VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 2539200   | 5         | 507840    | 31740    | 2,74E-24       | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 192       | 12        | 16        |          |                |                |
| Összesen         | 2539392   | 17        |           |          |                |                |

# (+)-katechin tartalom

## VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i>  | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|------------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 11625062,5 | 5         | 2325013   | 581253,1 | 7,27E-32       | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 48         | 12        | 4         |          |                |                |
| Összesen         | 11625110,5 | 17        |           |          |                |                |

# (-)-epikatechin tartalom

## VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 3064170   | 5         | 612834    | 153208,5 | 2,17E-28       | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 48        | 12        | 4         |          |                |                |
| Összesen         | 3064218   | 17        |           |          |                |                |



#### Leukoantocianin tartalom

##### VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 7483270,5 | 5         | 1496654   | 166294,9 | 1,32E-28       | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 108       | 12        | 9         |          |                |                |
| Összesen         | 7483378,5 | 17        |           |          |                |                |

#### Teljes antioxidáns kapacitás tartalom

##### VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 936,96    | 5         | 187,392   | 46,848   | 1,84E-07       | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 48        | 12        | 4         |          |                |                |
| Összesen         | 984,96    | 17        |           |          |                |                |

#### Transz-piceid tartalom

##### VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 20,97325  | 5         | 4,19465   | 10486,63 | 2,1E-21        | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 0,0048    | 12        | 0,0004    |          |                |                |
| Összesen         | 20,97805  | 17        |           |          |                |                |

#### Tiramin tartalom

##### VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 0,00525   | 5         | 0,00105   | 2,625    | 0,079293       | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 0,0048    | 12        | 0,0004    |          |                |                |
| Összesen         | 0,01005   | 17        |           |          |                |                |

### Szerotonin tartalom

#### VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 0,007     | 5         | 0,0014    | 3,5      | 0,034998       | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 0,0048    | 12        | 0,0004    |          |                |                |
| Összesen         | 0,0118    | 17        |           |          |                |                |

### Hisztamin tartalom

#### VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 15,465    | 5         | 3,093     | 0,77325  | 0,587054       | 3,105875       |
| Csoporton belül  | 48        | 12        | 4         |          |                |                |
| Összesen         | 63,465    | 17        |           |          |                |                |

### Melatonin tartalom

#### VARIANCIAANALÍZIS

| <i>Tényezők</i>  | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>p-érték</i> | <i>F krit.</i> |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|----------------|
| Csoportok között | 0,0222    | 2         | 0,0111    | 111      | 1,82E-05       | 5,143253       |
| Csoporton belül  | 0,0006    | 6         | 0,0001    |          |                |                |
| Összesen         | 0,0228    | 8         |           |          |                |                |

## 11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni konzulenseimnek, Nyitrai dr. Sárdy Diánának és Dr. Deák Tamásnak, hogy munkám során rengeteg tanáccsal és szakmai támogatással láttak el, melyek nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Külön köszönöm nekik minden szabadidejüket, amit rám áldoztak, és hogy a végsőkig tartották bennem a lelket.

Köszönöm Dr. Bisztray György Dénesnek, hogy a teljes doktori képzés és fokozatszerzési tevékenységem alatt szakmai és erkölcsi támogatást, iránymutatást nyújtott számomra. Az ő segítségével szegényesebb lenne a disszertációm.

Külön szeretném megköszönni Dr. Kállay Miklós professzor úrnak, hogy segítségemre volt az analitikai vizsgálatok elvégzésében, hogy szaktudásával hozzájárult a munkámhoz.

Köszönöm a Szőlészeti Tanszék és a Borászati Tanszék volt és jelenlegi kollégáinak együttműködését, valamint a lehetőséget, hogy a tanszéki laborokban dolgozhattam.

Köszönöm, hogy részese lehettem a KTIA\_AIK\_12-1-2013-0001: Korszerű genomikai és biotechnológiai technikák bevezetése a szőlő és gyümölcs (fásszárúak) egészséges szaporítóanyag előállításban, növényvédelemben és a fajtanemesítésben pályázatnak, mely a Magyar Kormány támogatásával, a Kutatási és Technológiai Innovációs Alap finanszírozásával valósult meg. A dolgozatban bemutatott eredmények jelentős részét ennek köszönhetem.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családom támogatását és türelmét. Kiváltképp Dr. Szabó Viktornak, aki behozta az életembe a paletta többi színét, amit még nem láttam.

Köszönöm!