



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

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

Kellner Nikolett

Budapest

2022

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Zámboriné dr. Németh Éva
egyetemi tanár, DSc
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezető(k): Nyitrai dr. Sárdy Diána
egyetemi docens, PhD
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Borászati Tanszék

Deák Tamás
egyetemi docens, PhD
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szőlészeti Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető(k) jóváhagyása

1 A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A szőlőt világszerte számos, gombák által okozott betegség támadja meg, amelyek jelentős termés kiesést 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 betegséggel kapcsolatos tapasztalatok hiánya miatt a védekezés és a megelőzés lehetőségei korlátozottak, a rezisztenciával kapcsolatosan kevés információval rendelkezünk 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.

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 biológiai aktív vegyületek kialakulásának vizsgálata a feketerothadás hatására

2 ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 Mesterséges fertőzés

2.1.1 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.

2.1.2 A fertőzés menete

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 mesterséges fertőzésekhez használt *Guignardia bidwellii* izolátumot az egri Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetből Dr. Váczy Kálmán Zoltán biztosította. Az előállított spóraizolátum koncentrációja 5×10^5 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, azaz a levél egyik felére három darab spóraszuszpenzióval, a másik felére (kontroll) három darab desztillált vízzel átitatott szűrőpapír korongot helyeztünk.

2.1.3 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.

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 tripánkéssel történő gombaspecifikus festéshez.

2.1.4 *Guignardia bidwellii* festés tripánkéssel

Szőlő feketerothadás festési protokoll:

Feltisztítás

A festeni szándékozott leveleket meg kell tisztítani a klorofilltól, hogy a fénymikroszkópban a gombaszöveteket tanulmányozhassuk. ehhez a fertőzött levélkorongokat Petri-csészébe helyezett szűrőpapírra rakjuk színükkel fölfelé, majd etanol:ecetsav 1:1 arányú keverékét pipettázzuk rájuk. A feltisztítás optimális időtartama 2 nap.

Festés tripánkéekkel

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

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

2.2 RNS kivonás

A -80°C-on tárolt mintákból a Gambino és munkatársai (2008) által közölt LiCl-os kicsapáson alapuló protokollt használtuk.

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

2.3 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. Az RNS kivonatokból elkészített szekvenáló könyvtárakat IlluminaHiScanSQ platformon szekvenáltuk.

A nyers read-ek minőségellenőrzését FastQC szoftverrel (Wingett és Andrews, 2018) végeztük.

2.4 Adatelemzés, bioinformatika

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 expresszáló 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.

2.5 Feketerothadt szőlőbogyók kémiai összetételének finomanalitikai vizsgálata

2.5.1 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 szőlőfürtök voltak. A minták mindegyike feketerothadt volt.

A mintaelőkészítésnél a fertőzött fűrtökről csak a teljes mértékben feketerohadt bogyókat válogattuk le és használtuk fel. Kontroll mintának egészséges fűrtőről szedett bogyókat használtunk fel.

2.5.2 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 kloroformos extraktot rotadeszten, vákuumban szárazra pároltuk. A száraz maradékot 2 ml eluensben oldottuk fel.

Alapanalitikai vizsgálatok

A mustok redukáló cukortartalmát Rebelein-módszerrel, az MSZ 9479-1980 szabvány alapján határoztuk meg. A glicerintartalmat, az almasavtartalmat, a citromsavtartalmat, illetve tejsavtartalmat Boehringer-Mannheim enzimteszttel, a borkősavtartalmat a MSZ 9489:1978 szerint spektrofotometriával határoztuk meg.

Spektrofotométeres vizsgálatok

A spektrofotometriás vizsgálatokat MOM Spektromom 195 típusú készülékkel végeztük. Az összespolifenol-tartalmat Folin-Ciocalteu-fenolreagenssel mértem meg (Singleton-Rossi, 1969). A leukoantocianinok mennyiségét, vas(II)-szulfátot tartalmazó sósav-butanol, 40:60 arányú elegyével történő melegítés után spektrofotometriásan mértük, szintén Flanzky (1969) módosított módszere alapján. A katechin és epikatechin tartalmat, alkohollal hígított borban kénsavas vanilinnel reagáltatva, 500 nm-en, spektrofotométeresen mértük (Rebelein, 1965).

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. 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 biogén amin-tartalom HPLC-módszerrel történő meghatározása a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Borászati Tanszékén történt (Kállay és Nyitrai Sárdy, 2003).

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

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.

3 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

3.1 Feketerothadás érzékenység vizsgálata

Reprodukálható mesterséges viszonyok között fertőztünk, így vizsgálataink eredménye, a gombaspórák csírázása közti különbség kizárólag a vizsgált fajták eltérő fogékonyságának tulajdonítható. A csíratömlők eltérő növekedési ütemét fogékony és ellenálló fajtán korábban nem vizsgálták.

3.1.1 A szőlő-feketerothadás kapcsolat vizsgálata szűrőpapírkorongos fertőzéssel

A megfestett levélkorongok mikroszkópos ellenőrzése minden esetben igazolta a fertőzések sikerességét. A sztereo mikroszkópon 40x-es, illetve 100x-os nagyításban vizsgált levélkorongok alapján a fogékonynak talált Csaba gyöngye szőlőfajtánál a fertőzést követő 18. órában a gomba spórák csírázásnak indultak, 36. órában pedig jelentősebb csíratömlő növekedést mutattak.

3.1.2 *Guignardia bidwellii* konídiumok csírázási aránya

Csillám fajta esetében a fertőzés sikeres volt, de a gombaspórák csírázása időben jelentősen eltolódott a Csaba gyöngye fajtához képest. 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.

3.1.3 Csíratömlő növekedés

A csíratömlő növekedésének vizsgálata során kapott eredmények a két fajta között lévő jelentős különbségre mutattak rá. A csíratömlők hossza a fertőzés

után 18 órával a fogékony Csaba gyöngye fajta levelén átlagosan 120 μ m hosszúak, míg az ellenálló Csillám fajta levelén átlagosan 40 μ m hosszúságúak voltak. A feketerothadás 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.

3.2 A feketerothadás fertőzésre adott RNS szintű válaszreakció

3.2.1 Az RNS szekvenálás eredménye

Minőségellenőrzés

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.

3.2.2 Az inzert méret meghatározása

Az inzert méretek meghatározása alapján megállapíthatjuk, hogy a könyvtárak átlagos inzertmérete negatív értéket mutat, ami arra utal, hogy a pair-end szekvenálás során a két oldalról kapott szekvenciák átfednek.

3.2.3 *De novo* transzkriptom építése

Az összes megszekvenált RNS alapján létrehozott *de novo* transzkriptom, amelyről minden minta esetében megállapítható az egyes gének kifejeződési szintje.

A már ismert 32.000 gén mellett a 42 pair-end RNS könyvtárban a splice-változatokon felül azonosítottunk 4.331 új feltételezett gént.

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.

3.2.4 A génextpresszió mértékének meghatározása

Normalizálás GC-arányra és könyvtárméretre

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.

3.2.5 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. A statisztikai elemzés eredménye azon gének azonosítása, amelyek

eltérően válaszolnak különböző időpontokban a feketerothadás fertőzésre ellenálló és fogékony fajta esetén.

A három időpontban legjobb 25 különbözőképpen expresszálo gének összessége közül 19 kapcsolódik oxidatív stressz folyamatokhoz, 16 gén pedig a fenilalanin-ammónia-liáz vagy sztilbén szintáz génekhez tartozik.

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. Az 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.

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

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

A kromoszóma vége felé elhelyezkedő klaszter mind a 6 hpi, mind pedig a 18 hpi mintákban eltérő expressziót mutatott. 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.

3.3 Fiziológiailag aktív vegyületek vizsgálata

3.3.1 Feketerothadt szőlőbogyók összetétele

A feketerothadás (*Guignardia bidwellii*) hatásának vizsgálata során méréseket végeztünk feketerothadt szőlő bogyójának összetételére vonatkozóan. A cukortartalom tekintetében a minták között szignifikáns különbség volt, csak a Bácska és Kékfrankos fajták között nem. A feketerothadt bogyókban képződik glicerín, valamint vele arányosan glükonsav is, ez utóbbi alacsonyabb koncentrációban. A galakturonsav koncentráció a feketerothadt bogyók esetében 0,55-1,36 g/kg közötti értékeket mutatott. A Palatina, Hibernál és Kékfrankos minták között nem volt szignifikáns különbség.

A feketerothadt bogyókban 0,056-01,00 g/kg (+)-tejsavat mértünk, legnagyobb mennyiségben a Bácska szőlőfajtában, mely szignifikánsan eltért többi mintától. A borkősav koncentráció 8,2-15,9 g/kg között alakult. 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. A Palatina, Panonija fajták kivételével a minták között szignifikáns különbség volt. A mért értékek katechin esetében 3452-5796 g/kg között változtak. A minták között szignifikáns különbség volt. Epikatechin mennyisége 100-1156 g/kg között alakult. A minták között szignifikáns különbség volt. Leukoantocianinok esetében 3276-5180 mg/kg közötti értékeket kaptunk. 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. A mért transz-piceid értékek 0,28-3,28 mg/kg között változtak. A szignifikánsan magasabb értéket a Bácska és Kékfrankos szőlőbogyók mutattak. A rezveratrol koncentrációra jelen vizsgált mintákban és évjáratban nincs befolyással a feketerothadás.

Vizsgáltuk a feketerothadással fertőzött minták biogén amin tartalmát. A mért tiramin tartalom 0,06 és 0,11 mg/kg között alakult. A szerotonin mennyiségét tekintve 0,04-0,10 mg/kg között változott. 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 szignifikáns nagyobb a többi mintához viszonyítva.

3.3.2 Feketerothadással fertőzött bogyók mikotoxin tartalmának vizsgálata

A szőlő feketerothadását okozó *Guignardia bidwellii* kórokozó nem termel mikotoxint. A kísérletbe vont fajták, melyek a feketerothadással szemben nem hordoznak rezisztenciát, megfelelő növényvédelem nélkül támadhatókká válnak a társult toxintermelő mikroorganizmusok számára.

3.3.3 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. A minták között szignifikáns különbség nem volt. A feketerothadás és az OTA tartalom között lineáris összefüggés nem mutatható ki.

4 KÖVETKEZTETÉSEK

Viszonylag gyors módszer lehet a feketerothadás fogékonyaság és ellenállóság jellemzésére a csíratömlők hosszának mérése. Mindössze két nap alatt különbséget lehet kimutatni a fogékonyaság tekintetében. Ez lényegesen megkönnyítheti a nemesítő munkáját, mivel gyors előrejelzést kap a növényanyagról, míg a kórfolyamat 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 ismétlésben. 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 expresszázó 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 expresszázó géneket későbbi időpontokban ki tudjuk szűrni a jelöltek közül.

A 25 legmagasabb szignifikancia szinttel rendelkező különbözőképpen expresszáló gén között különböző protein kinázok és egy rpm-1-szerű rezisztencia gén is található volt. Általánosságban kevés specifikus jelet észleltünk.

A differenciáltan expresszáló 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 sztilbének 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. A feketerothadás több hisztamint képez, mint a botritisz. Termel a bogyóban melatonint, tiramint és szerotonint, ám azok mennyisége is elhanyagolható. Ebből az következik, hogy a feketerothadason átesett szőlőszemet minőségileg érdemes válogatni, de ha belekerül sem okoz gondot.

Összességében a feketerothadason átesett szőlőbogyókból nyert kémiai adatok nem változtatják meg a bor kémiai összetételét a polifenolok, a biogén aminok, a rezveratrolok és az ochratoxin alapján.

5 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 glicerin, 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 fumársav 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 feketerothadás inkább a katechin koncentráció változását befolyásolta.
8. Elsőként vizsgáltam a feketerothadás 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 feketerothadás a piceidek előfordulását befolyásolta a bogyókban.
9. Elsőként vizsgáltam a feketerothadás 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 feketerothadás nem volt befolyással az általam vizsgált aminokra.

6 A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Impakt faktoros folyóiratcikk

Kellner, Nikolett; Antal, Eszter; Szabó Anna; Matolesi Réka. The effect of black rot on grape berry composition. *Acta Alimentaria: An International Journal of Food Science* (2022) **in press**

Lektorált folyóiratban (MTA listás) megjelent közlemények

Kellner, Nikolett; Matolesi, Réka; Sólyom-Leskó, Annamária; Antal, Eszter. Feketerothadás (*Guignardia bidwellii*) hatása a szőlőbogyó egyes biogén aminosav összetételére. *Borászati Füzetek* (2021). 31:3 pp. 30-33., 4 p.

Kellner, Nikolett; Farkas, Eszter; Bisztray, György Dénes; Deák, Tamás; Nyitrai, Éva; Sárdy Diána Ágnes. A feketeterothadást okozó *Guignardia bidwellii* konídiumok csírázása fogékony és ellenálló szőlőfajták levelén. *Borászati Füzetek* (2021). 31:2 pp. 30-33., 4 p.

Deák, Tamás; Lózsa, Rita; **Kellner, Nikolett;** Bisztray, György Dénes. A szőlő és a feketeterothadás kapcsolata RNS szinten. *Borászati Füzetek Külön Kiadványa*. (2015). 81-83 p. 3 p.

Kellner, Nikolett; Deák, Tamás; Váczy, Kálmán Zoltán; Dula, Bencéné; Bisztray, György Dénes. A szőlő-feketerothadás kapcsolat vizsgálata szűrőpapírkorongos fertőzéssel. *Borászati Füzetek Külön Kiadványa*. (2015). 84-86 p. 3 p.

Egyéb tudományos cikk

Kellner, Nikolett; Deák, Tamás; Váczy, Kálmán Zoltán; Dula, Bencéné; Bisztray, György Dénes. A szőlő feketerothadása és a fertőzésre adott növényi válasz vizsgálata RNS szinten. *Agrofórum* (2014). 25:(9) pp. 120-124., 5 p.

Konferencia közlemények

Farkas Eszter; **Kellner Nikolett**; Deák Tamás; Bisztray György Dénes. Comparative transcriptome profiling of resistant and susceptible grapevine varieties infected with black rot. LX. Georgikon Napok, Tanulmánykötet, Keszthely, Magyarország: Pannon Egyetem Georgikon Kar (2018). pp. 79-86., 8 p.

Kellner Nikolett; Deák Tamás; Váczy Kálmán Zoltán; Dula Bencéné és Bisztray György Dénes. Mesterséges fertőzési rendszer kidolgozása a szőlő - feketerothadás kapcsolat vizsgálatához. In: Horváth, József; Haltrich, Attila; Molnár, János (szerk.) 61. Növényvédelmi Tudományos Napok Budapest, Magyarország: MAE Növényvédelmi Társaság (2015). (ISSN 02312956) p. 90

Konferencia összefoglalók

Deák, Tamás; Farkas, Eszter; Lózsa, Rita; **Kellner, Nikolett**; Bálo, Borbála; Bisztray, György Dénes. Differential expression of susceptible and tolerant grape cultivars on black rot infection expression. 20th GiESCO International Meeting, Mendoza, Argentína (2017). 1 261p. pp. 246-250., 5 p.

Farkas, Eszter; **Kellner, Nikolett**; Bisztray, György Dénes; Deák, Tamás. Comparative transcriptome analysis of a resistant and a susceptible grapevine cultivar to *Guignardia bidwellii* using RNAseq technique. 4th Transylvanian Horticulture and Landscape Studies Conference. Marosvásárhely, Románia: Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Marosvásárhelyi Kar (2017). p. 16, 1 p.