



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

**A szőlő szürkerothadással és feketerothadással szembeni  
rezisztencianemesítés módszereinek fejlesztése; a sztilbének szerepe a  
rezisztencia kialakításában**

Farkas Eszter Alexandra  
Gödöllő  
2023

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Biológia Tudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Biológia tudomány

**vezetője:** Dr. Nagy Zoltán  
tanszékvezető, egyetemi tanár, DSc, MTA doktora  
MATE, Szent István Campus  
Növénytermesztési-tudományok Intézet  
Növényélettan és Növényökológia Tanszék

**Témavezetők:** Dr. Bisztray György Dénes  
egyetemi tanár, professzor emeritus, PhD  
MATE, Budai Campus  
Szőlészeti és Borászati Intézet  
Szőlészeti Tanszék

Dr. Deák Tamás  
egyetemi docens, PhD  
MATE, Budai Campus  
Szőlészeti és Borászati Intézet  
Szőlészeti Tanszék

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

## TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS .....	9
2. CÉLKITŰZÉSEK .....	11
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	13
3.1. A szőlő legfontosabb nekrotróf és legfontosabb hemibiotróf betegsége .....	13
3.1.1. A nekrotróf <i>Botrytis cinerea</i> , a szürkepenész kórokozója.....	13
3.1.2. A hemibiotróf <i>Guignardia bidwellii</i> jelentősége, rendszertani besorolása ...	15
3.1.3. A kórokozó gazdanövényköre, tünetei, életciklusa, a kórfolyamat.....	17
3.1.4. Védekezés lehetőségei és a fungicidrezisztencia.....	23
3.2. Növényi immunválasz: rezisztencia .....	24
3.2.1. Sejtszintű védekezési folyamatok.....	25
3.2.2. A sztilbének és szerepük a növényi betegségellenállóságban .....	29
3.3. A szőlő rezisztencianemesítése.....	33
3.3.1. Feketerothadás rezisztenciaforrások.....	36
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	39
4.1. 'Juhfark' fajta klónjainak botritisz fogékonysága.....	39
4.2. Sztilbén vizsgálatok .....	39
4.2.1. Tenyészedényes szőlő növények és a fertőző anyag előállítása és tesztelése	39
4.2.2. A szabadföldi kísérleti szőlő fajták .....	41
4.2.3. Sztilbén mérés UPLC-MS/MS technikával.....	43
4.3. A feketerothadás ellenállóságban feltételezetten szerepet játszó gének eltérő expressziójának validálása .....	44
4.3.1. A gének in silico bioinformatikai elemzése, primer tervezés.....	44
4.3.2. A kórokozó gomba, <i>Guignardia bidwellii</i> in vitro fenntartása és a kísérleti növények fenntartása .....	47
4.3.3. Az ellenálló és fogékony szőlőfajták fertőzése a feketerothadás kórokozójával .....	47
4.3.4. A fertőzés mikroszkópos vizsgálata .....	48
4.3.5. Valós idejű PCR-rel történő vizsgálat .....	48
4.3.5.1. RNS kivonás szőlő szövetből.....	48
4.3.5.2. A kivont RNS minták DNázos emésztése, RNS koncentráció meghatározása és reverz transzkripció .....	49
4.3.5.3. Real-time PCR.....	49
4.4. CRISPR/Cas9 konstrukciók készítése .....	50
4.4.1. Guide RNS-k megtervezése .....	50
4.4.2. A CRISPR konstrukciók elkészítése .....	52

4.4.3.	<i>MtU6</i> promóter és gRNS scaffold amplikon előkészítése .....	52
4.4.3.1.	pUC gRNA shuttle plazmid kivonása és tisztítása .....	52
4.4.3.2.	<i>MtU6</i> és a scaffold régió amplifikálása PCR reakcióval a kivont pUC gRNA shuttle vektorból .....	53
4.4.3.3.	<i>MtU6</i> , gRNS és Scaffold szakaszok összeépítése, 5' és 3' túlnyúló végek szintézise <i>MtU6</i> és Scaffold szakaszokra .....	55
4.4.3.4.	p201N:Cas9 plazmid kivonása és tisztítása, linearizálása és ismételt tisztítása.....	56
4.4.3.5.	Ligálás és transzformáció <i>E.coli</i> 10-béta törzsébe, kolónia PCR.....	57
4.4.3.6.	Plazmid kivonás és emésztés .....	58
4.4.3.7.	Szekvenciaanalízis és a CRISPR konstrukciók felszaporítása, tárolása	59
4.5.	Embriogén kallusz indukció és felszaporítás <i>Furmint</i> levélből.....	59
4.5.1.	Kísérleti növények.....	59
4.5.2.	Felhasznált táptalajok.....	60
5.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....	63
5.1.	Botritisz ellenállóság vizsgálata szabadföldi 'Juhfark' ültetvényben.....	63
5.2.	A feketetrohadás és a sztilbének kapcsolata.....	66
5.2.1.	Feketrohadás kórokozó fertőzőképességének ellenőrzése .....	66
5.2.2.	A feketetrohadás fertőzés hatása a sztilbén szintekre tenyészedényes kísérletben 'Csillám' és 'Csaba gyöngye' fajtán.....	67
5.2.3.	A sztilbentartalom és a levélméret összefüggése szabadföldi minták alapján .....	68
5.2.4.	A feketetrohadással szemben ellenálló és arra fogékony fajták és genotípusok leveleinek sztilbén tartalma.....	69
5.2.5.	Sztilbén szintek a feketetrohadás ellenállóságra hasadó nemzedék leveleiben .....	71
5.3.	Feketrohadás fertőzésre ellenálló és fogékony fajtában eltérően reagáló gének expressziójának validálása.....	75
5.3.1.	Feketrohadás fertőzés vizsgálata fénymikroszkóppal .....	75
5.3.2.	A differenciáltan expresszáló gének listájának ellenőrzése, szűkítése .....	75
5.3.3.	Differenciáltan expresszáló gének validálása valós idejű PCR-rel.....	79
5.4.	Fogékonyság gének génszerkesztéssel történő csendesítésének előkészítése .....	81
5.4.1.	CRISPR konstrukciók megtervezése és elkészítése.....	81
5.4.2.	Embriogén kallusz indukció fejlesztése 'Furmint' fajtánál.....	82
6.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK .....	85
6.1.	<i>Botrytis cinerea</i> ellenállóság szabadföldi vizsgálata klónkísérletben .....	85

6.2.	Rezisztencia gének és a sztilbén szintek a szőlő feketerothadásában, Csillám és Csaba gyöngye fajtákban laboratóriumi körülmények között .....	85
6.3.	A sztilbén szintek kapcsolata a levélmérettel Csillámban, Csaba gyöngyében és más BR rezisztens és fogékony fajtákban szabadföldi körülmények között .....	87
7.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....	91
8.	ÖSSZEFOGLALÁS .....	93
9.	SUMMARY .....	95
10.	MELLÉKLETEK .....	97
	M1. Irodalomjegyzék .....	97
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	109



## JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2,4 D	2,4-diklórfenoxi-ecetsav
BAP	Benzilaminopurin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool - alapvető helyi beállítású keresőeszköz
BR	szőlő feketeerőhadás (Black rot)
Cas gének	CRISPR-asszociált gének
cDNS	Komplementer DNS
CHISAM	Kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú elegye
CRISPR	Halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
CTAB	Hexadecil-trimetil-ammónium-bromid
DAMP	Károsodással összefüggő molekuláris mintázat (Damage-associated molecular pattern)
DE gének	Differenciált expressziót mutató gének
DNáz	Dezoxiribonukleáz
dNTP	Dezoxiribonukleotid-trifoszfát
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
ET	Etilén
ETI	Effektor molekulák által kiváltott immunitás (Effector-triggered immunity)
ETS	Effektor molekulák által kiváltott fogékonyság (Effector-triggered susceptibility)
GAPDH	Glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
hpi	A fertőzéstől eltelt órák (Hours post infection)
JA	Jázmonsav
kb	Kilobázis
LG	Kapcsoltsági csoport (Linkage group)
MAS	Marker alapú szelekció (Marker assisted selection)
MS	Murashige és Skoog alap táptalaj
mRNS	Messenger RNS
NAA	1-naftil-ecetsav
NLR	Nukleotidkötő-leucin gazdag ismétlődésben gazdag (Nucleotide binding leucine rich repeat)

nt	Nukleotid
PAMP pattern)	Patogén-asszociált molekuláris mintázat (Pathogen-associated molecular pattern)
PCR	Polimeráz láncreakció (Polymerase chain reaction)
PR protein	Patogenezishez kapcsolt fehérje (Pathogenesis related protein)
PRR	Mintázatfelismerő receptor (Pattern recognition receptor)
PTI	PAMP által kiváltott immunitás (PAMP-triggered immunity)
PVP	Polivinil-pirrolidon
QTL	Kvantitatív jellegeket meghatározó lókus (Quantitative Trait Locus)
ROS	Reaktív oxigén gyökök (Reactive oxygen species)
R gén	Rezisztencia gén
RT-PCR	Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (reverse transcription polymerase chain reaction)
SA	Szalicilsav
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát (Sodium dodecyl sulfate)
SNP	Egy nukleotid polimorfizmus (Single Nucleotide Polymorphism)
SSR	Egyszerű szekvencia ismétlődés (Simple Sequence Repeat)
STS	Sztilbén szintáz
TDZ	Thidiazuron



## 1. BEVEZETÉS

Az egyik legősibb mezőgazdasági növényünk a szőlő, amely már a földtörténeti középidő, a kréta során megjelent és termesztésének mintegy 6000 éves története során jelentős kulturális és gazdasági értéket halmozott föl. 2019-ben a világ gyümölcs termesztésének 57%-át 5 féle gyümölcs foglalta magában, melynek 9%-át a szőlő adta (FAO, 2021). Jelenleg a termesztésbe vont szőlő legnagyobb részét a kerti szőlő *Vitis vinifera* L. teszi ki, mely számos biotikus stresszhatásnak van kitéve.

A szőlő gombás és oomikótás megbetegedéseit célzó rezisztencia kutatások elsősorban a szőlőlisztharmat (*Erysiphe necator*), a szőlőperonoszpóra (*Plasmopara viticola*) és a szürkerothadás (*Botrytis cinerea*) fontosságára hívták fel a figyelmet. Az elmúlt évtizedekben azonban a klímaváltozással járó szélsőséges időjárási körülmények, illetve a kizárólag lisztharmat és peronoszpóra rezisztens szőlő fajták alkalmazása mind elősegítették az olyan másodlagos kórokozók fokozottabb megjelenését a szőlőültetvényekben, mint a feketerothadást okozó *Guignardia bidwellii*. A kórokozó hazánkban 2010-ben és 2014-ben járványszerű megjelenésével jelentős termés kiesést okozott főleg a teljes kémiai védekezés nélküli környezetkímélő és biotermesztésben.

Egyre sürgetőbbé válik a fenntartható gazdálkodás és a megváltozott éghajlathoz való alkalmazkodás figyelembe vétele a szőlőnemesítésben. A növényvédőszeres túlzott használatával megjelenő fungicidrezisztens kórokozók, másrészt bizonyos hatóanyagok használatát érintő szigorítások, az Európai zöld megállapodás 2030-ra kitűzött 50%-os peszticid csökkentése mind kihívást jelent a szőlőtermesztőknek. Ehhez szükséges lehet egyrészt a szőlő természetes ellenállóképességének kihasználása illetve fokozása, a gombapatógén kapcsolatok biológiai alapjainak feltárása, továbbá a hagyományos fajtákkal szemben az új, ellenálló fajták nemesítése (Kozma, 2022).

A transzgénikus növények alacsony támogatottsága miatt ugyancsak cél a genomszerkesztéssel, mint pl. a CRISPR módosítással kialakított rezisztencia megvalósítása a szőlőben a megfelelő borminőség biztosítása mellett (Töpfer és Trapp, 2022). Jelen dolgozatban néhány, a szőlő gombás megbetegedését okozó faj, a nekrotrófok, biotrófok illetve elsősorban a hemibiotrófok elleni védekezéshez kívántam hozzájárulni.



## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetésben magfogalmazott általános célkitűzés, vagyis a nekrotróf *Botrytis cinerea* és főleg a hemibiotróf *Guignardia bidwellii* elleni rezisztencianemesítés biológiai alapjainak fejlesztéséhez munkám során az alábbi konkrét célokat fogalmaztam meg:

1. A nekrotróf *Botrytis cinerea* elleni védekezési lehetőségek vizsgálata kapcsán terveztem a szürkerothadással szemben kevésbé érzékeny két 'Juhfark' klón értékelését klónszelekciós kísérletben.
2. A szőlő feketerothadásának hemibiotróf kórokozójával szembeni ellenállóság és a sztilbének kapcsolatának vizsgálata kapcsán három célt tűztem magam elé.
  - 2.1. Sztilbén formák mennyiségi meghatározása egészséges és fertőzött levélből laboratóriumi körülmények között nevelt növényeken.
  - 2.2. Feketerothadás ellenálló és fogékony fajták sztilbén szintjének meghatározása levélből szabadföldi kísérletben.
  - 2.3. A sztilbén szintek és az ellenállóság vizsgálata feketerothadás ellenálló és fogékony genotípusok keresztezéséből származó utódnemzedékben. A tulajdonságok (sztilbén tartalom és feketetrohadás) közötti kapcsolat mértékének igazolása.
3. A feketerothadás hemibiotróf kórokozójának fertőzésére adott RNS szintű válaszreakció elemzése kapcsán két célt tűztem ki.
  - 3.1. A feketerothadás fertőzés hatására eltérő expressziós változást mutató gének azonosítása fogékony és ellenálló fajták esetében
  - 3.2. Feltételezett feketerothadás ellenállósághoz kapcsolható gének validálása RT-qPCR expressziós kísérletekben
4. A betegségellenállóságban potenciálisan részt vevő gének csendesítésére vonatkozó vizsgálatok előkészítéséhez terveztem továbbá:
  - 4.1. CRISPR konstrukció létrehozását néhány kiválasztott, a kórfolyamatban szerepet játszó növényi gén csendesítéséhez
  - 4.2. Embriogén kallusz indukálásának kidolgozását szőlőlevélből és portokból CRISPR kísérlethez



### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A szőlő legfontosabb nekrotróf és legfontosabb hemibiotróf betegsége

A növény patogén gombák és oomikóták életciklusuk és fertőzési stratégiájuk alapján biotróf, nekrotróf, illetve hemibiotróf stratégiát is követhetnek (Doehlemann et al., 2017). A biotróf életmódot folytatók az élő szövetet kolonizálják és kizárólag ebben képesek növekedni, a sejtekbe pl.: hausztóriumokkal behatolva szert tesznek a gazdanövény anyagcsere termékeire. A nekrotrófok a gazdanövény elpusztításával annak elhalt részeiből táplálkoznak, és ehhez, a biotrófokkal ellentétben sejtfalbontó enzimeket és toxinokat termelhetnek.

A szőlőben a legjelentősebb obligát biotrófok a *Plasmopara viticola* (Berk & Curtis) Berl. & De Toni és a peronoszpóra, az *Erysiphe necator* Schwein, a lisztharmat kórokozója. Nekrotróf tömlősgomba faj pl. a *Botrytis cinerea* Pers., a szürkerothadás és a *Coniella diplodiella* (Speg.) Sacc., a fakórothadás kiváltója.

A hemibiotrófok kezdetben biotróf életmódot folytatnak, melynek hossza változó lehet, majd végül nekrotróffá válnak és elpusztítják a gazdanövényt. Ide sorolható pl. a *Guignardia bidwellii* (feketerothadás) és *Elsinoë ampelina* (antraknózis) tömlősgomba fajok.

Mindazonáltal egy új csoportosítást javasoltak Hane és munkatársai (2020) a szénhidrátokra ható enzimeket (glikozil-transzferázok, glikozid-hidrolázok, szénhidrát-észterázok, poliszacharid-liázok) kódoló gének alapján. Elkülönítettek monomertróf (biotróf), polimertróf (nekrotróf), mezotróf (hemibiotróf) és vaszkulartróf (rothadást, hervadást és antraknózist okozó) gombákat.

##### 3.1.1. A nekrotróf *Botrytis cinerea*, a szürkepenész kórokozója

A *Botrytis cinerea* egy széles gazdanövénykörrel rendelkező, polifág, nekrotróf gombafaj. A szőlő szürkerothadás kórokozója, a *Botrytis cinerea* Pers., 2021-ben érvényes rendszertani besorolása az International Commission on the Taxonomy of Fungi alapján:

Ország: *Fungi*

Törzs: *Ascomycota*

Osztály: *Leotiomycetes*

Rend: *Helotiales*

Család: *Sclerotiniaceae*

Nemzetség: *Botrytis/Botrytinia*

Faj: *Botrytis cinerea*

Az ivaros alakja az aszkospórárt képző *Botryotinia fuckeliana*, mely a természetben nagyon ritkán található meg.

A szürkerothadás a szőlő minden zöld részét képes fertőzni. Fertőzési forrás lehet az elhalt növényi anyagban lévő fekete, áttelelő képletekből (szkleróciumok) kiszabaduló konídium. Ugyanakkor a mikro-, makrokonídium, apotécium, klamidospóra és a micélium is fertőzhet. A fertőzést elősegíti a légáram és a csapadék, de különböző olyan vektorok szerepét is leírták már a betegség terjesztésében, mint a szőlőmolyok vagy az ecetmuslica. A konídiumok csírázása 6-8 óra alatt lezajlik, ha 18-20 °C közötti a hőmérséklet és 20 órán át tartó felületi nedvesség biztosított.

A fertőzés kezdetén a konídium egy fizikai kölcsönhatásban megtapad a kutikulán, majd kicsírázik és appresszóriumot képezve behatol a növényi szövetbe. A csíratömlő csúcsát egy szénhidrát és fehérje tartalmú extracelluláris mátrix veszi körül, mely egyrészt erősebb adhéziót eredményez, másrészt védi a gombát a növényi stresszválasztól és a kiszáradástól. Passzív módon, a gázcserenyílásokon át vagy a sérült felületen keresztül is bejuthat a gomba. Másrészt enzimatikus folyamatok, mint kutináz vagy lipáz is segíthetik a penetrációt (Farkas et al., 2016).

A sejtfalbontó enzimek mellett nem gazdaspecifikus toxinok, mint a botridiál, a botcinin sav és kis RNS-ek (sRNS) is képződnek (Collado et al., 2007; Tani et al., 2006). Az sRNS-k azonban nem feltétlenül határozzák meg a gomba virulenciáját (Qin et al., 2023). A fertőzési folyamatban a sejthalált indukáló effektorfehérjék is részt vesznek, pl.: xiloglukanázok (BcXYG1) (Zhu et al., 2017), xilanázok (Xyn11A) (Noda et al., 2010), mellyekkel képes a gomba manipulálni a növény programozott sejthalálát, hogy helyi nekrozist indukáljon és az elhalt szövetekkel táplálkozhasson (Bi et al., 2023).

A bogyó kutikulájának vastagsága, a fürtszerkezet befolyásolja az egyes fajták érzékenységét. A kifejezetten a vékony héjú, tömött fürtű fajták, mint a 'Juhfark', 'Kadarka', 'Pinot noir' kiemelten veszélyeztetettek. Aszúsodásra, amely folyamatot ugyanezen kórokozó indítja be és okozza – hajlamos fajták Tokajban a Furmint, a Hárslevelű. Az első tünetek a leveleken megfigyelhetőek egy-egy főértől kiindulva nekrotikus foltok formájában. A fürtök a virágzás során fertőződhetnek először, majd fürtzáródás után zöld vagy savanyú rothadás következhet be, amelynek során a bogyón szürke konídiumgyep képződik. A kórokozó

hőoptimuma 25 °C alatt van. Kocsánybénulást is okozhat, mely során nem rothadó, de zsugorodó bogyók figyelhetők meg.

A zsendülő, érésben lévő, alacsony cukorfokú fürtök károsítása a leggyakoribb, ennek az esős, párás időjárási körülmények kedveznek. Száraz, meleg időben a bogyók megtöppednek, a cukorszintjük megnő és a gomba növekedése megtorpan. Ekkor a rothadás leáll és a gomba metabolitjai kerülnek be a szőlőbe, nemesrothadás következik be (Dula et al., 2016). Különböző agrotechnikai módszerek, mint a megfelelő tápanyag ellátottság a nitrogén túltrágyázás helyett, a szellős lombzatban a szabadon lévő fürtök vagy a biológiai készítmények, mint az *Aureobasidium pullulans* élesztőgomba spórák használata és a peronoszpóra ellen is használt kontakt hatóanyagú szerek is segíthetnek a védekezésben közvetlenül fürtzáródás előtt.

### 3.1.2. A hemibiotróf *Guignardia bidwellii* jelentősége, rendszertani besorolása

A szőlő fertőző, járványos gombás betegségei közül a jól ismert peronoszpóra, lisztharmat, illetve szürke- és fakórothadáson kívül a feketerothadás egy újabb kihívást jelentett a növényvédelemben. 1805-ben észak-amerikai útja során, F. A. Michaux jegyezte fel a feketerothadás tüneteit egy Lexington közeli szőlészetben, Kentucky államban (Ramsdell és Milholland, 1988). A 19. század második felében már a Nagy-tavak környékén okozott járványt. Európába először 1885-ben, Dél-Franciaországba fertőzött észak-amerikai hibridekkel került be (Viala és Ravaz, 1886), majd Dél-Amerikában és Ázsiában is megjelent (Crandall et al., 2022). A 21. században Németországból indult el a járvány, az Alpok környéki szőlőtermesztő régiókat, majd Romániát illetve Magyarországot is érintve. Chilét és Ausztráliát, illetve a kórokozó számára nem kedvező klímájú területeket, mint Mexikó vagy Skandinávia, elkerülte a fertőzés (Pirrello et al., 2019).

Magyarországon a szőlő feketerothadását először Mikulás és Tomcsányi (1999) írták le Kerekegyházán, majd hazánkban a betegség járványszintű megjelenését 2010-ben és 2014-ben tapasztalták (Dula et al., 2016). A lisztharmat-, peronoszpóra rezisztenciával rendelkező, azonban feketerothadásra fogékony szőlőfajták használata, az ökológiai termesztésben használt, feketerothadással szemben nem hatékony fungicidek alkalmazása, a felhagyott szőlőültetvények, illetve az ültetvény mikroklímáját párásabbá tévő termesztéstechnológiai eljárások a klímaváltozással együtt, mind hozzájárulhattak a *Guignardia bidwellii* elterjedéséhez (Hoffmann et al., 2018).

A szőlő feketerothadás Észak-Amerikában őshonos kórokozója, a *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala et Ravaz, 2021-ben érvényes rendszertani besorolása az International Commission on the Taxonomy of Fungi alapján:

Ország: *Fungi*

Törzs: *Ascomycota*

Osztály: *Dothideomycetes*

Rend: *Botryosphaeriales*

Család: *Botryosphaeriaceae*

Nemzetség: *Phyllosticta/Guignardia*

Faj: *Phyllosticta ampellicida/Guignardia bidwellii*

A rendszertan olyan alaktani bélyegeket vesz figyelembe, mint a gombahifa makromorfológiája vagy a betegség tünetei a szőlőn, azonban a molekuláris meghatározás nélkül ez önmagában nem teljesen megbízható. Ráadásul, bizonyos tanulmányok alapján a feketerothadás kórokozója legalább 4 fajt foglal magában, a *Phyllosticta* nemzetségből, ezek a *Phyllosticta ampellicida*, *parthenocissi*, *partricuspida* és *vitis-rotundifolia* (Zhang et al., 2013; Zhou et al., 2015).

A gomba molekuláris módszerekkel történő azonosítását a riboszómális RNS-t kódoló génei közötti ITS (internal transcribed spacer) régió, illetve béta-tubulin, kalmodulin gének alapján végzik (Crandall et al., 2022). Moreno-Velázquez (2019) *Guignardia bidwellii* f. *euvtis* specifikus detektálását dolgozta ki az ITS1 illetve ITS4 régióban lévő SNP alapján.

A mikroszatellita (SSR) markereket elterjedten használják növény-kórokozó populáció vizsgálatokban. A feketerothadás populáció szerkezetének vizsgálatához 11 db SSR markert fejlesztett ki *Guignardia bidwellii*-ben Narduzzi-Wicht (2014). Ehhez Svájcból, Franciaországból, Németországból, Luxemburgból és USA-ból, 69 gomba genotípust gyűjtöttek be. A *Vitis* fajok illetve fajták és a patogén *Phyllosticta ampellicida* genotípusok között viszont nem találtak kapcsolatot. A Bordeaux környéki francia minták nagyfokú allélgazdagságot mutattak, melynek oka lehet az, hogy az első európai nagy feketerothadás járvány kiindulópontja Franciaország volt.

Az egri szőlő ültetvényekben megjelent *Guignardia bidwellii* populációk változatosságát vizsgálta Spitzmüller (2018). Mindegyik izolátumban a sejtmagi riboszómális DNS ismétlődés IGS, aktin és RAS fehérjét kódoló gének, elongációs faktor 1- $\alpha$ , kalmodulin és kitin szintáz 1-t kódoló gének egy szakaszát sikeresen szekvenálták meg, hogy a szőlő feketerothadás kórokozójának szélesebb körű jellemzését elvégezzék.



Narduzzi-Wicht (2014) munkásságát alátámasztva, a 11 SSR markert is detektálták mindegyik mintában. A gomba teljes genom szekvenciáját 2022-ben publikálták (Eichmeier et al., 2022).

A szőlő feketerothadás kórokozóját elsőként *Naemospora ampellicida*-ként írták le (Engelman, 1861), majd későbbiekben az anamorf alakját *Phyllosticta ampellicida* néven jegyezték fel, a *Phyllosticta* (=phyllon levél, stictos pontozott) genusban (van der Aa, 1973). A gomba teleomorf alakja a *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz elnevezést kapta. Három forma *speciales*-a létezik, a *Guignardia bidwellii f.sp. euvitis*, *parthenocissi*, *muscadinii*, melyek eltérő mértékű patogenitással rendelkeznek a különböző gazdanövényeken (Luttrell, 1948).

A *Guignardia bidwellii f.sp. parthenocissi* kizárólag a *Parthenocissus* fajokat fertőzi. A *Guignardia bidwellii f.sp. euvitis* és *muscadinii* is a *Vitis vinifera* fajtákat támadja meg. Az *euvitis* forma azonban az *Euvitis* subgenusba tartozó *Vitis* fajokat is, a *muscadinii* pedig a *Vitis rotundifolia*-t is képes megfertőzni (Jabco et al., 1985).

### 3.1.3. A kórokozó gazdanövényköre, tünetei, életrajza, a kórfejlés

*Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz (1886) (anamorf alakja: *Phyllosticta ampellicida* (Engelman) Van der Aa) (Sivanesan és Holliday, 1981) a szőlő feketerothadás elsődleges kórokozója lehet hemibiotróf, amely kezdetben biotróf, tünetmentesen van jelen, majd ezt a fázist nekrosis követi. Ugyanakkor biotróf endofita gomba is lehet, amely tünetmentesen van jelen a növény szöveteinek belsejében szimbiontaként, de szaprotróf életmódúvá válhat (Kuo és Hoch, 1996a).

Elsődleges gazdanövényei között a *Vitaceae* családból a *Vitis* fajokat, mint pl.: a *Vitis vinifera*, *labrusca*, *rotundifolia*, *arizonica*-t találjuk, illetve egyéb fogékony szőlőfajokat is találunk az *Ampelopsis*, *Cissus* és *Parthenocissus* nemzetségekben (Sosnowski és Tan, 2017).

A *Vitis amurensis*-t is a feketerothadás alternatív gazdanövényeként jellemezték, azonban két *Vitis amurensis* × *Vitis vinifera* hibrid is ellenállónak bizonyult a fertőzéssel szemben (Roznik et al., 2017). Az őshonos amerikai *Vitis* fajok és interspecifikus hibridjeik változó ellenállósággal rendelkeznek, míg az összes európai termesztett szőlő közül a *Vitis vinifera* fajták fogékonyak tekinthetők (Ferrin és Ramsdell, 1977; Hausmann et al., 2017). Ugyanakkor a *Vitis vinifera* fajták között is érzékenységi különbségeket fedeztek fel, ennek

háttérben az állhat, hogy eltérő a fogékonyági időablakuk és a tüneteket kezdetétől eltelt napok számában is eltérés lehet fajtánként (Szabó et al., 2023).

A feketerothadással szemben kevésbé fogékonyak a *Parthenocissus tricuspidata* és a *Parthenocissus quinquefolia* fajok (Eyres et al., 2006). Az ellenálló szőlők közé tartoznak az amerikai alanszőlők közül a *Vitis rupestris* (Scheele), a *Vitis riparia* (Michaux), a *Vitis candidans* (Engelmann) és a *Vitis cordifolia* (Michaux) (Sosnowski és Tan, 2017).

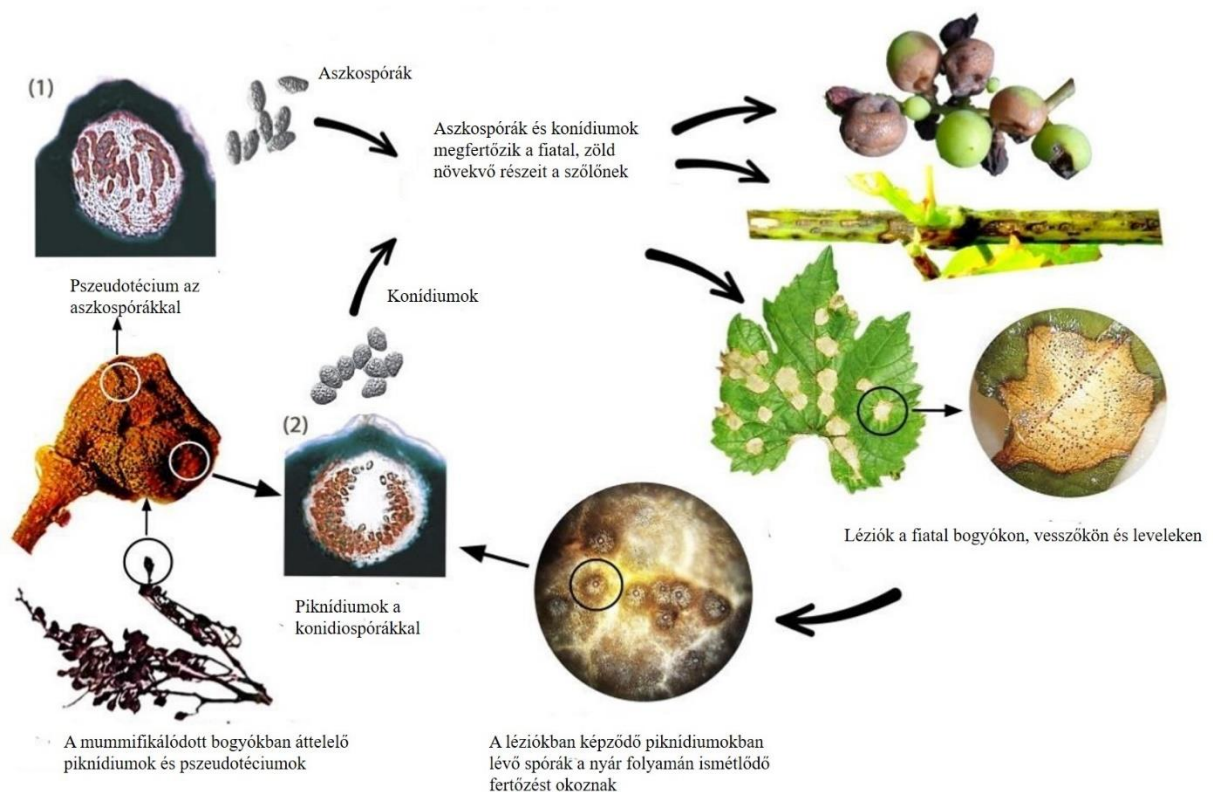
A szőlőn kívül *Asplenium nidus*-ból, *Garcinia hombroniana* leveléből illetve *Calotropis procera* idősebb leveleiből is izolálták a gombát (Nascimento et al., 2015; Sommart et al., 2012; Sosnowski és Tan, 2017).

A feketerothadást okozó gomba a szőlő valamennyi fiatal, zöld, növekvő, föld feletti részét megtámadja. A betegség első tünetei általában a legfelsőbb leveleken jelennek meg kb. egy-két héttel a fertőzés után, melyet a hőmérséklet és a fajta is befolyásol. A levélhez képest a bogyókon később látszódnak a fertőzés jelei.

A leveleken fakó, krémszínű foltok válnak láthatóvá és kb. 24 órán belül egy világosbarna nekrotikus rész veszi körül őket, majd sötétbarna szegély képződik. Két nappal később koncentrikus körökben a kék illetve fekete túszerű pontok, a piknídiumok jelennek meg. A gomba hatására a bogyók nedvességüket veszítik, és kékesfekete múmiává alakulnak, melyek pszeudotéciumokban aszkospórákat, illetve piknídiumokban konidiospórákat képeznek. A levélnyélben, fürtkocsányon és a hajtástengelyen hosszanti lefutású fekete, szabálytalan alakú, süppedő foltok jelzik a feketerothadás fertőzés jelenlétét. A fürttünet megjelenése *Vitis vinifera* cv. 'Merlot' fajtánál mindössze 14 nap, azonban 'Kékfrankos'-nál minimum 21 nap (Schmidt és Hoffmann, 2021). A növényi szövetek kora is befolyásolja a tüneteket, a már nem növekvő, idősebb levelek tünetmentesek, amely jelenséget több *Vitis* spp.-nél is kimutatták, a korról a kutikula és a sejtfalak megvastagodnak a levélben és a bogyóban egyaránt, ez megnehezíti a gomba penetrációját, ún. ontogenetikai rezisztencia alakul ki (Kuo és Hoch, 1996a).

A bogyókon, illetve a leveleken lévő tünetek hasonlíthatnak más gombák által okozott fertőzéshez, mint a *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea* és a *Coniella diplodia* által okozott szőlőperonoszpóra, szürke- és fakórothadáshoz, illetve perzselésszerű vagy a herbicidek, műtrágyák által okozott foltok is megtévesztően hasonlóak lehetnek (Crandall et al., 2022; Dula et al., 2016). A szőlőperonoszpóra és –lisztharmattal való fertőzési feltételek megegyeznek a feketerothadásával, ezért egy időben mindhárom megbetegedés sújthatja a szőlőt.

A szőlő feketerothadás fertőzési forrásai lehetnek a gomba ivaros, ivartalan formáit tartalmazó vagy a gombamicéliummal átszótt, talajra hullott, illetve a tőkén áttelelt mumifikálódott fürtök, levelek, rügyek, kacsok, vesszők is egyaránt, melyek legalább két évig megőrzik élet- és fertőzőképességüket. A megfelelő hőmérséklet (legalább 9 °C), páratartalom és fény hatására képződik mindkét spóratípus, majd rövid érési időszakon mennek keresztül. A spórák terjedhetnek széllel és csapadékkal. A tavaszi, elsődleges fertőzést az aszexuális termőtestekből, a piknidiumokból származó konídiumok is okozhatják a rügyfakadás idején, míg kb. két héttel később pedig az ivaros termőtestből felszabaduló askospórák (téli spórák) (Dula et al., 2016). A másodlagos fertőzés a leveleken megjelenő piknidiumokból származó ún. nyári spórákból indul el. A betegség policiklikus, egy fertőzési ciklus a spóra kiszabadulásától az érett termőtest létrejöttéig tart, mely többször ismétlődik (1. ábra).



**1. ábra**

*Szőlőfeketerothadás betegség ciklusa (Szabó et al., 2023).*

A legveszélyesebb fertőzési forrást mégis az ültetvényben maradt áttelelő képletek jelentik, mivel ezek egész tenyészidőszakban bocsáthatják ki a spórákat magukból.

A spórák csapadék hatására szabadulnak ki a termőtestből, 0,5 mm/h eső és legalább 7 °C-os hőmérséklet szükséges ehhez a tenyészidőszak elején (Schmidt és Hoffmann, 2021). Ugyanakkor a spórák csírázásához és a fertőzéshez is szükséges a csapadék, a fertőzés 10 °C felett következhet csak be. A piknídium 15 másodperc alatt megduzzad, majd 3-5 perc alatt kibocsátja a spórákat magából (Dula et al., 2012). A spórák képesek átvészelni az aszályos időszakokat, a konídiumok az élet- és fertőzőképességüket 60 napig is megőrizhetik. A legtöbb aszko- és konidiospóra kibocsátás a zöldborsó nagyságú bogyóméretnél figyelhető meg (Onesti et al., 2018).

Az enyhén nedves levélfelületen percek alatt megtapadnak a spórák, ebben hidrofób, van der Waals és elektrosztatikus kölcsönhatások vehetnek részt. Savas közegben vagy megemelt elektrolit koncentráció, illetve pozitív töltésű aminoszilán felületen már 0,03 másodperc elegendő volt ehhez (Kuo és Hoch, 1996b). Ugyanakkor a levél fonákján is képesek csírázni a spórák, ezért a védekezésben lényeges a levelek mindkét oldalának lekezelése. A tünetek jelentősebbek voltak a levél abaxiális oldalán (Ullrich et al., 2008). Az extracelluláris mátrix is valószínűleg szerepet játszik a konídiumok megtapadásában, ezen kívül részt vesz a spórák védelmében és a gazdanövény felismerésében. A spórát, a csíratömlőt, illetve az appresszóriumot is körülveszi. Az adhézió folyamata valószínűleg passzív, mivel rövid idő, akár 0,03 másodperc alatt végbe mehet.

A konidiospórából az adhézió után tud csíratömlő fejlődni, ehhez átlagosan 50-70 perc elegendő volt *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay' levelén. A csíratömlő végső hosszát befolyásolják a környezeti körülmények. Kezdetben egy 5 µm-es csíratömlő fejlődött, mely már appresszóriumot képezett, majd 6 órával az inokuláció után, 20-40 µm-essé fejlődtek a csíratömlők a fogékony *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay' levelén (Kuo és Hoch, 1995). A csíratömlők hosszát egy fogékony *Vitis vinifera* cv. 'Csaba gyöngye' és ellenálló 'Csillám' fajta levelén vizsgálta Kellner *Phyllosticta ampellicida* spórával történő fertőzést követő 18. órában (Kellner et al., 2021). Az ellenálló 'Csillám' fajta levelén átlagosan 40 µm, míg fogékony 'Csaba gyöngye' fajta levelén átlagosan 120 µm hosszúak voltak a csíratömlők vagyis lassabb volt a növekedésük az ellenálló fajtán.

Laboratóriumi körülmények között a csírázás nutrient és vízagar táptalajon csak kis mértékben megy végbe, míg a szőlőlevelek felszíne vagy a poliszitirén felületén jelentősebben.

A folyamat során a konídiumból gömb alakú testek kerülnek át a konidiospórából a csíratömlőbe, majd a melanizált appresszóriumba. A gomba képleteivel szomszédos epidermisz sejtekben pedig paramurális szerű testek és vezikulumok jelentek meg *Vitis*

*vinifera* cv. 'Rajnai rizling' fajtában, melyek pontos szerepe nem ismert (Ullrich et al., 2008).

A spórák csírázásához és a szőlőbe való behatolásához a hőmérséklet emelkedésével egyre rövidebb ideig tartó nedvességre van szükség. A csíratömlő megjelenését követő 5-6 órán belül, a levél korától függetlenül appresszorium képződik, amelynek segítségével a gomba a behatolás után szubkutikulárisan nő leginkább az epidermisz antiklinális sejtfalai felett, a levélerek közelében.

Az idősebb levelekben azonban a további növekedés leáll, bár a gomba életképes marad (Kuo és Hoch, 1996a). Az appresszorium kialakulása után 48-60 órával jött létre az első hifa. A gombahifák kutikula alatti növekedése a fiatalabb, növekvő *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay' levelekben jelentősebb, az idősebb, már nem növekvő levelekben maximum 30 µm-t tudott csak haladni, de még 2 hónapig életképes lehet. A sejtek körülbelül 10-12 nap után omlanak össze (Kuo és Hoch, 1996a; Ullrich et al., 2008). Mindkét spórátípus azonos módon csírázik, képez melanizált appresszoriumot és hifákat.

A *Vitis vinifera* cv. 'Rajnai rizling' levél kutikulájának emésztése során hifák lenyomatát találták meg, mely alapján arra következtettek, hogy a gomba bizonyos biokémiai reakció által a szőlőlevél kutikuláját megbonthatja. A gomba permeabilizáló anyagokat is termelhet, hogy a tápanyag a sejt belsejéből az apoplastba kerülhessen. Erre utal az, hogy a hifák terjeszkedésével a levél felszíne hullámossá válik. A levél abaxiális oldalán történő fertőzés esetén a gomba nem hatol be az alapszövetbe a gázcserenyíláson keresztül, hanem a sztómák körüli antiklinális sejtfalakon terjed, mely így is biztosítja a tápanyagot, valószínűleg a gazdanövény gombának való felismerését megkerülve. A gomba fejlődéséhez szükséges feltételekről kissé eltérő vélemények jelentek meg, a kísérleti körülmények eltérései miatt.

Amíg 10 °C-on még 24 óra nedvességborítás szükséges a csírázáshoz, addig a konídiumok csírázásához 25 °C-on 6 óra, vagy 10-15 óra folyamatos nedvesség borítás kell, Az aszkospóra esetén 24 °C-on 5 óra, vagy akár 36-48 óra szükséges (Mikulás, 2019; Schmidt és Hoffmann, 2021). Azonban 27 °C felett ismét megnő ez az időtartam, a fertőzés pedig 32-33 °C felett nem megy végbe (Schmidt és Hoffmann, 2021).

A fogékony *Vitis vinifera* cv. 'Csaba gyöngye' fajta levelén a fertőzést követő 18. órában kimutatható volt a csírázás, 36. órában pedig intenzív hifanövekedés (Kellner et al., 2014).

A *Guignardia bidwellii* hemibiotróf kórokozóként kezdetben biotróf, majd nekrotroffá válik, mely során toxinképzés jellemzi. A nekrotikus léziók megjelenéséhez a

gomba olyan nem gazdaspecifikus toxinok termelésével járulhat hozzá, mint a guignardiasav, a fenguignardiasav, az alaguignardiasav vagy a guignardianone A, E és F (Buckel et al., 2017; Szabó et al., 2023).

A hőmérséklet, a szőlőfajta, illetve a növényi szövetek fejlettsége is egyaránt befolyásolja a fertőzéstől az első tünetek megjelenéséig eltelt időt. Általánosságban a virágzást követő 6-7 hétig, a zsendülésig a legfogékonyabbak a fürtök, azonban a fogékonysági időszakot befolyásolja a szőlőfajta. A teljes nagyságukat elérő bogyókat, illetve leveleket már nem képes fertőzni a gomba. A lappangási idő 10-14 nap volt fiatal, még növekvő *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay' leveleken (Kuo és Hoch, 1996a).

A szőlőlevelek kora és a kórokozóval való inokuláció után eltelt idő nem befolyásolta a fertőzöttséget. A szőlő szövetek fejlettségétől független a gomba csírázási képessége is, azonban másképp tudnak védekezni az eltérő korú növényi részek (Kuo és Hoch, 1996a). A szükséges inkubációs idő a leveleknél, hajtásoknál, aszkospóra kibocsátásnál hőmérsékletfüggő (Szabó et al., 2023).

A léziók, majd a piknídiumok megjelenését és a cirrus-, konidiospóráképződést befolyásolja a fajta, a hőmérséklet és a relatív páratartalom, illetve a nedves időszak hossza. A léziók létrejötté és a piknídiumok megjelenése között eltelt idő hossza változó, ezt a hőmérséklet határozza meg. A cirrusok a piknídiumokon képződnek, melyek fehér vagy áttetsző, nyálkás képletek, melyekből a konídiumok kikerülnek a környezetbe.

A piknídiumok *Vitis vinifera* cv. 'Barbera' szőlőfajta levelén 5-35 °C között tudtak megjelenni in vitro körülmények között. 5 °C-on ez akár 8 nap is lehet, míg a hőmérséklet növelésével egyre csökkent ez az időtartam és a piknídiumok száma nőtt. Képződésük optimális hőmérsékleti tartománya 20-30 °C közé esett, ekkor 2 napra volt szükség az első piknídiumok létrejöttéhez a leveleken és ekkor keletkeztek a legnagyobb számban.

Mindazonáltal legalább 90 %-os relatív páratartalom szükséges a létrejöttükhöz, melynek emelkedése 100%-ig, még nagyobb számú piknídium képződéshez vezetett. Szabadföldi kísérletben szintén 2 nap elteltével megjelentek a piknídiumok, azonban legnagyobb mennyiségben 12-24 nappal a lézió megjelenését követően. Az első cirrusok 15 °C-on jelentek meg, 20 °C-on tovább emelkedett a mennyiségük és ekkor rendelkeztek a legnagyobb spóraszámmal. A legtöbb cirrus 25 °C-on termelődött, mely hőmérsékleten 16 napig emelkedett a számuk, viszont a spóraszám alacsonyabb volt a 20 °C-on mérthez képest (Onesti et al., 2016).

A forró, száraz (átlagosan 29 °C feletti hőmérséklet) és a csapadékos nyár (átlagosan 20 °C feletti hőmérséklet) hatását modellezték *Vitis vinifera* cv. 'Barbera' fajtán

54 ± 2 % relatív páratartalom mellett, illetve a többszöri esőzést is vizsgálták, melyet a többszöri steril desztillált vízzel történő mosás jelentett. 87 nappal később még mindig volt spóratermelés mindkét hőmérsékleten vagyis a forró, száraz nyarat is át tudja vészteni a gomba, egy kedvezőbb csapadékosabb időszak létrejöttéig. Azonban az ismétlődő esőzés jelentősen lecsökkenti a konídiumok számát (Onesti et al., 2017).

#### 3.1.4. Védekezés lehetőségei és a fungicidrezisztencia

A betegséggel szembeni védelemre a megfelelő agrotechnikai módszerek és kémiai védekezés együttes alkalmazásával tehetünk szert. Ugyanakkor a feketerothadás rezisztens vagy kevésbé fogékony szőlőfajták használata is segíthet. A szellős lombzat, az ültetvény gyommentesítése mind elősegíti a csapadék gyors felszáradását, mely a gomba számára kedvező körülményeket megszünteti. Továbbá a fertőzött növényi részek eltávolítása, illetve talajba forgatása csökkenti a fertőzési veszélyt. Különösen veszélyesek a felhagyott szőlőültetvények, melyekben enyhe tél esetén könnyen megőrződhetnek a spórák, rezervoárokat kialakítva. A gomba levél ad- és abaxiális felszínét is képes fertőzni, ezért mindkét oldalát érdemes fungiciddel kezelni.

A lisztharmat és/vagy peronoszpórával szemben alkalmazott három hatóanyag csoport, a feketerothadás megelőzésében szintén hatásosnak bizonyult. A feketerothadás fertőzési időszaka nagyrészt megegyezik ezzel a két, másik szőlőbetegséggel, ezért is hatékony ezek használata az integrált szőlőgazdálkodásban.

A ditiokarbamátok, quinone outside inhibitorok (QoI) közül a strobilurinok, mint a piraklostrobin, illetve a szterolgátlók közül a miklobutanil és a tebukonazol alkalmazása vált be, azonban az utóbbi hatóanyag inkább kuratív jelleggel, a kórfolyamat gátlásában játszik szerepet. Ezen kívül a boszkalid, illetve a cyflufenamid/fluopiram és dimetilációs inhibitor (DMI) fungicidek használatával értek el sikert a szőlő védelmében (Dula et al., 2016; Molitor és Beyer, 2014).

Az organikus szőlőültetvényekben a réz-hidroxid és réz-oxiklorid keveréke (Bigot et al., 2014) volt hatásos, azonban a szintetikus szerek hatásosabbak. Mivel a gombaspóra csak enyhén nedves felszínen képes csírázni, ezért nedvesítőszer, mint szaponinok használata is eredményes lehet a védekezésben, melyet *Yucca sp.*, *Hedera helix*, *Sapindus mukorossi*, *Chenopodium quinoa*, *Quilaja sp.*, primula gyökerekből vontak ki. Azonban üvegházi körülmények között volt csak hatásos ezek alkalmazása, mivel a szaponinok szabadföldi kísérletben a változó időjárási körülmények miatt már egy kis eső csökkentette

a hatékonyságukat. A feketerothadással fertőzött szőlőben a betegség súlyosságát csökkenti tudja egy *Bacillus subtilis* készítmény, illetve hatékony az *Aspergillus niger* egyik törzsének fermentleve is (Pálfi et al., 2020; Rutto et al., 2021).

Mindazonáltal az organikus szőlőültetvényekben a megfelelő higiéniai körülmények, a feketerothadás rezisztens vagy toleráns szőlőfajták, az előrejelzési modellek, illetve a web-alapú döntéstámogató rendszerek jelenthetik a megoldást. Ajánlott különböző hatásmódú fungicideket alkalmazni, az egyoldalú szerhasználat miatt a gombáknak rezisztens populációi jöhetnek létre.

A quinone outside inhibitorok a mitokondriális respirációt gátolják, a légzési elektrontranszportláncban a citokróm bc1 enzim komplexéhez kapcsolódva fejtik ki hatásukat. QoI, pl.: strobilurin rezisztencia a mitokondriális CYTB gén 143. kodonjában történő pontmutációjával jöhet létre. Azonban a kodon mellett lévő intron jelenléte esetén nem jellemző a mutáció, így a fungicid rezisztencia sem alakul ki más gombafajok, mint *Puccinia spp.* vizsgálatánál. A magyar szőlőültetvényekről a különböző szőlő fajtákról izolált, illetve törzsgyűjteményből (LGC ATCC) származó *Guignardia bidwellii* törzsek szekvenálása során nem találtak intront a 143. kodon mellett. Ugyanakkor *Guignardia aesculi*, *Guignardia gaultheriae* esetében sem találtak intront ebben a pozícióban, míg *Guignardia citricarpa* és *Guignardia mangiferae* törzsekben detektálták. Összességében a *Guignardia* törzsekben az intron jelenléte illetve hiánya nem feltétlenül függ össze a QoI rezisztenciával és a QoI elemekre való érzékenységgel, vagyis más mechanizmus állhat e jelenség mögött (Horváth et al., 2018).

A fungicidek használata csökkenthető betegség ellenálló fajták alkalmazásával, azonban a hagyományos nemesítés során az introgressziót nehezítheti a hosszú generációs idő, a beltenyésztéses leromlás lehetősége és a nem kívánt ízanyagok megjelenése a szőlőben és a borban (Töpfer és Trapp, 2022).

### **3.2. Növényi immunválasz: rezisztencia**

A gazdanövénnyel való kölcsönhatás lehet kompatibilis, melyben a gazdanövény érzékeny, míg inkompatibilis kölcsönhatásnál (rezisztenciánál) a növény nem fogékony a kórokozóra nézve. A gén a génnel szembeni modellben az inkompatibilitás feltétele az egymással komplementer domináns rezisztencia génnel (R génnel) rendelkező gazdanövény és a domináns avirulencia gént (effektor gént) hordozó patogén találkozása (Flor, 1956). A



rezisztencia gén egy olyan dominánsan öröklődő gén a növényben, mely a kórokozó egy vagy több genotípusával szemben védelmet nyújt, leginkább rasszspecifikus, általában NLR típusú. Az effektorok a kórokozó patogenitásáért felelős virulencia faktorok, faj-, rassz- vagy törzsspecifikus fehérjék is lehetnek (Thomma et al., 2011).

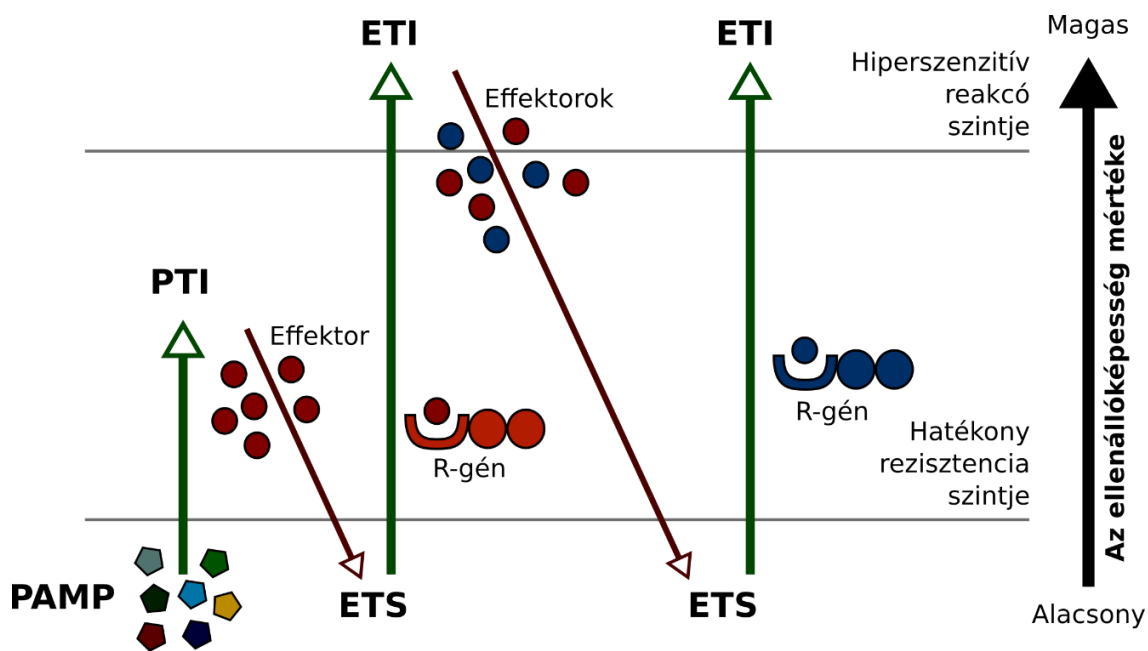
A rasszspecifikus (vertikális) rezisztenciára nemesítés alapját a domináns, egyedi R gének jelentik, melyek mono- vagy oligogénes öröklődést mutatnak, amelyek új fajtákba történő beépítése gyors eredménnyel kecsegtet a nemesítés során. A nem rassz-specifikus (horizontális) rezisztenciára nemesítésnél, mivel ez poligénes, mennyiségi öröklődésű, nehezebb a géneket azonosítani.

A biotróf és a hemibiotróf kórokozók elleni védekezésben az NLR-knek, míg a nekrotrof patogénekénél az általános rezisztenciának van szerepe (Liao et al., 2022).

### 3.2.1. Sejtszintű védekezési folyamatok

A rezisztens növény rendelkezhet öröklött rezisztenciával, mely jelenthet passzív, preformált védekezést vagy indukált immunitást is. A preformált rezisztencia állandó fizikai és kémiai akadályt jelent a kórokozó számára. Például, *Plasmopara viticola* fertőzés vizsgálata során az aszkorbinsav-peroxidáz magasabb alapszintje volt megfigyelhető egy rezisztens szőlőfajtában a fogékonyhoz képest (Gong et al., 2022).

A növény-kórokozó kölcsönhatások dinamikájának alapmodelljét Jones és Dangl dolgozta ki (Jones és Dangl, 2006). A cikk-cakk modell az indukált immunválaszban a PAMP által kiváltott (PTI) és az effektor molekulák által kiváltott immunitásként (ETI) jellemzi a növényi védekezési stratégiákat (2. ábra). A nevezéktant később módosították és a receptorok típusa alapján a PRR és az NLR közvetített immunitás fogalmát vezették be a PTI és az ETI helyett (Lacaze és Joly, 2020).



**2. ábra**

*A növényi immunválasz cikk-cakk modellje. PTI: a PAMP által kiváltott immunitás, ETS: effektor molekulák által kiváltott érzékenység; ETI: effektor molekulák által előidézett immunyválasz; PAMP: patogén asszociált molekuláris mintázat; R-gén: növényi rezisztencia gén (Deák et al., 2018).*

A PTI vagyis az általános rezisztencia folyamata során a növény felismeri és megköti a transzmembrán helyzetű PRR segítségével a külvilág felől érkező kórokozónak egy molekuláris szakaszát, a PAMP-t/MAMP-t. A PRR közvetített immunválaszt a DAMP, vagyis a károsodás következtében a gazdanövény sejtjeiből felszabaduló degradációs termékek, pl.: sejtfal poliszacharidok vagy az intakt sejtek által szekretált molekulák is kiválthatják (Hou et al., 2019). Továbbá a PRR-k fitocitokineket is képesek megkötni, melyek olyan növényi peptid hormonok, melyek a citoszólban keletkeznek, majd az apoplasztba kerülve serkentik a növény immunitását (Luo, 2012). Ezen kívül a PRR-k az apoplasztikus patogén eredetű effektorokat is felismerhetik (Ngou et al., 2022).

*Vitis vinifera*-ban, a gombasejtfalat alkotó kitin és kitozán PAMP-okat a VvLYK1-1 és VvLYK1-2 LysM receptor kinázok ismerik fel (Brulé et al., 2019). DAMP-ként pedig szintén a kerti szőlőben, a növényi sejtfalból származó xiloglukán oligoszacharidokat azonosítottak (Claverie et al., 2018).

A PRR-ek általános felépítésére jellemző egy sejtfelszíni ligandum kötő domén és egy transzmembrán domén, míg a citoszól felőli oldalon nem feltétlenül található domén. Az intracelluláris kináz domén hiánya alapján receptor szerű fehérjéknek (RLP), míg jelenléte esetén receptor szerű kinázoknak (RLK) is nevezhetjük őket.

Az extracelluláris domén felépítésében lehet leucin ismétlődésben gazdag (LRR), lizin motívumot tartalmazó (LysM), lektin típusú, epidermális növekedési faktor szerű (EGF), galakturon kötő sejtfalhoz asszociált kináz (GubWAK) és WAK asszociált C terminális domén is, mellyel felismeri a kórokozónak egy általában konzervatív szakaszát (McCombe et al., 2022). A kitin felismerésében pl. a LysM domén vesz részt.

A PTI során a védekezési gének expresszióját a PAMP-nak a receptorhoz való kapcsolódása illetve a ligandum későbbi disszociációja által aktivált jelátviteli útvonalak befolyásolják. Az alapfolyamatban ez az intracelluláris kalcium szint hirtelen megnövekedésével és a sejten kívüli reakcióképes oxigén fajták felhalmozódásával jár, melyet a NADPH oxidáz katalizál. A ROS antimikrobiális hatású, de egyben szignálként is működik. A kalcium függő protein kinázok aktivációjával a MAPK (mitogén aktivált protein kináz) kaskád út stimulálódik és növényi hormonok szintetizálódnak.

Alapvetően a biotróf és a hemibiotróf kórokozók esetén SA közvetített, míg a nekrotrofoknál a JA, ET mediált védekezés aktiválódik (Pieterse et al., 2009). A két hormonális útvonal között gyakran antagonisták a kapcsolat, azonban megfigyeltek már pozitív kölcsönhatást is közöttük *Populus nigra* egy rozsdagomba fajjal való fertőzése során (Ullah et al., 2022)

Mindezek a PR fehérjék, fitoalexinek transzkripcióját serkentik és az anyagcserében számos változást idéznek elő. A kórokozó behatolása során poliszacharidok, mint pl.: kallóz termelődik, mely elősegíti a növény védekezését.

Hasonlóképp az ETI során is ROS termelés indukálódhat, azonban ebben a folyamatban már R fehérjék vesznek részt. Ezzel együtt SA képződhet, mely végül hiperszenzitív reakcióhoz vezethet, mely során ismét ROS szabadul fel és a sejtfal megvastagodásával leválasztódhat a fertőzött növényi szövetrész. Abban az esetben, ha a patogén, effektor molekulák által meggátolja a PTI-t, akkor az első szintű ETS következik be. A növény azonban R fehérjékkel felismerheti az effektor molekulákat vagy az effektor által módosított saját molekuláit, ez az ETI folyamata. Ennek következtében a kórokozó eliminálódik.

Azonban a kórokozó képes lehet újabb vagy módosított effektorokat termelni, mellyel a gazdasejt specifikus monitorozását gátolhatja, akkor a másodszintű ETS-ről beszélünk. Ezen kívül módosíthatja az R fehérjét, illetve a növény is képes lehet újabb védekezési mechanizmust kifejleszteni. A növényi proteázok a peptidkötések hasításával részt vesznek a PTI és ETI folyamatában is egyaránt, ekképp a kórokozó felismerésében, a védekező rendszer előhangolásában (priming), a jelátvitelben és a hiperszenzitív reakció

kialakításában (Santos és Figueiredo, 2021). A hormonális szabályozásban a JA, ET, SA és a HNP (N-hidroxi-pipekolsav) szerepét is már leírták.

Hatásmechanizmusokat tekintve rendkívül változatosak az effektorok, a PAMP-hoz kötődve becsaphatják a PRR-t és ez által észrevétlen maradhat a kórokozó, gátolhatják a növényi proteázokat, ugyanakkor növényi hormon vagy transzkripció faktor analógnaként is befolyásolhatják a növényi jelátviteli útvonalakat, végül pedig a génexpressziót. Az effektorok egy része valószínűleg a növényben meglévő fogékonysági géneket célozza meg, mint pl. *Arabidopsis thaliana*-ban a HopZ2 bakteriális effektor az MLO2-t. A szőlőben a *Plasmopara viticola* által termelt PvRXLR131 effektor gátolja a BKI1 receptor szerű kináz inhibítort és ezáltal megakadályozza a sejthalál létrejöttét a növényben (Lan et al., 2019). Bizonyos biotróf, hemibiotróf gombák effektora és ennek következtében az NLR indukciója jellemzően hiperszenzitív reakcióval jár (Balint-Kurti, 2019).

Az R gének többsége NLR-eket kódol, melyek elsősorban a citoplazmában fordulnak elő, de a plazmamembránban, az apoplastban, a sejtmagban egyaránt megtalálhatóak. Egy C terminális leucin ismétlődésben gazdag (LRR), egy középső nukleotid kötő (NB) és egy variábilis N terminális doménből állnak. Az NB és az LRR domének szabályozzák az NLR indukcióját, míg a jelátviteli folyamatok aktiválásában az N terminális domének vesznek részt, melyek alapján TIR toll/interleukin-1)-NLR-eket és CC (coiled coil)-NLR-eket lehet elkülöníteni.

Az NLR-ek a növény immunrendszerét és valószínűleg a fogékonysági géneket is monitorozzák. Funkció alapján vannak effektorokat vagy az effektor módosított célpontját felismerő szenzor NLR-ek és helper NLR-k, melyek downstream helyzetben vannak a szenzor NLR-khez képest az ETI folyamatában. A szenzor NLR-től a helper NLR-nek történő jelátadás folyamata még ismeretlen.

A cikk-cakk modell hiányossága az, hogy az R fehérjéknek csak egy bizonyos csoportjával foglalkozik, mivel vannak immunitást nem aktiváló R fehérjék is. Másrészt nem ad magyarázatot a kórokozó illetve a növény genomjában megtalálható nagyszámú effektor illetve NLR fehérjét kódoló génre.

A jéghegy modell alapján az NLR-k monitorozzák a növényben megtalálható célpontokat (targeteket), mely az immunrendszer része vagy fogékonysági faktor is lehet (Thordal-Christensen, 2020). Az NLR-k az elsődleges ETS effektorral kölcsönhatásba lépve ETI-t indukálhatnak, ez esetben az NLR R fehérjeként működik, ez a látható reakció a jéghegy csúcsa. Ha a patogén képes másodlagos ETS effektorral a target és elsődleges

effektor komplexéhez kapcsolódni, akkor nem jön létre immunreakció a növényben, de a kórokozó mégis eredményes, ezek a jéghegy alján lévő folyamatok.

A PRR, az NLR és a SA mediált immunitásban meglévő kölcsönhatásokat vizsgálta Ngou és munkatársai (2022). A PRR-k képesek egymást serkenteni illetve gátolni is. Az NLR-ek aktiválása serkenti a PRR-közvetített immunitást és a PRR pedig elősegíti az NLR közvetített HR-t. A szalicilsav függő és független jelátviteli útvonalak is képesek a PRR szignalizációs komponensek felhalmozódását előidézni.

Valószínűleg több NLR is képes egyidejűleg aktiválódni, de egymásra való hatásokról jelenleg még nincs adat. Az NLR közvetített immunitáshoz szalicilsav kell, míg szalicilsav hozzáadásával az NLR indukált HR negatívan szabályozódhat.

Megfigyelték, hogy NLR aktiválásával együtt más NLR-k expressziója is megemelkedhet. Ez bekövetkezhet külső szalicilsav hozzáadása esetén is. A szalicilsav koncentrációja határozhatja meg, hogy pozitív vagy negatív hatással lesz-e az NLR közvetített immunitásra. A legtöbb helper NLR pozitív szabályozója az NLR közvetített immunitásnak, azonban ellenkező hatásmódú NLR-eket is találtak (Ngou et al., 2022).

### 3.2.2. A sztilbének és szerepük a növényi betegségellenállóságban

A sztilbének a növények által termelt 1,2 difenil-etilén szerkezettel rendelkező másodlagos anyagcsere termékek, elnevezésük a görög stilbos, fénylő szóból ered. Elsősorban a növényi védekezésben szerepet játszó fitoalexinek, melyek általános jellemzője, hogy *de novo* szintetizálódnak abiotikus vagy biotikus stressz hatására (Sharma et al., 2022). A növényi betegség rezisztenciában felhasználható antimikrobiális, antifungális tulajdonságuk, mivel a fertőzés helyén felhalmozódva gátolják a kórokozó növekedését vagy elpusztítják azt (Albert et al., 2011). Kimutatták a nematódákra, rovarokra, és feltételezhetően a gerinces herbivorokra nézve negatív hatásukat a sztilbéneknek (Valletta et al., 2021).

A sztilbének a polifenolok sztilbenoid családjában található meg, monomer alakján kívül (transz-rezveratrol, oxirezveratrol, piceatannol, izorhapontigenin stb.), oligomer formában is jelen lehetnek. A legtöbb sztilbén monomer a rezveratrol, a piceatannol vagy a pinoszilvin származékai (Dubrovina és Kiselev, 2017). A *Vitaceae* családban a rezveratrol származékok jellemzőek és az oligomerek közül a *Vitis* fajokban az  $\epsilon$ -viniferin rezveratrol dimer a leggyakoribb (Rivière et al., 2012).

Egymástól rendszertanilag távoli rokonsági kapcsolatban álló, eddig 45 növény családot jegyeztek fel és 196 növényfajban mutatták ki a sztilbének jelenlétét. Összesen 459 természetes eredetű sztilbént jegyeztek már fel (Teka et al., 2022). A szárazföldi növények között a májmoháktól a harasztokon át, de főleg a *Gnetophyta* törzs *Gnetales* rendjében, a nyitvatermőknél az erdei fenyőben (*Pinus sylvestris*), a japán erdeifenyőben (*Pinus densiflora*) és a zárvatermőknél találunk sztilbén termelő fajokat. A zárvatermőkön belül főként az egyszikűekben fordulnak elő, mint pl.: a *Poales* rendben a tarka cirok (*Sorghum bicolor*), *Arecales* és *Asparagales* rendekben.

A kétszikűeknél eddigi ismereteink alapján a Rosid és Asterid kládra jellemzőek, ezen belül inkább a Rosid klád tagjaira a *Vitales* (*Vitis vinifera* L.), *Fabales* földimogyoróban (*Arachis hypogaea*), *Rosales*, *Malvales*, *Myrtales* rendben fordulnak elő sztilbén termelő fajok (Rivière et al., 2012). Ugyanakkor sztilbének jelenlétét kimutatták már entomopatogén baktérium fajokból (Eleftherianos et al., 2007; Kumar et al., 2012), selyemlepke hernyóból (Kikuchi et al., 2004), ehető gombákból (Peng et al., 2015), növényben élő endofita gombafajokból (Dwibedi és Saxena, 2019; Shi et al., 2012; Wang et al., 2014) és még szivacsfajból is (Jayatilake et al., 1995).

Szőlőlevélben a transz-rezveratrol felhalmozódását először *Vitis vinifera*-ban mutatták ki, mechanikai sérülés és *Plasmopara viticola*-val történő fertőzés hatására (Langcake és Pryce, 1976). Rezveratrol hatását vizsgálták *Penicillium expansum* tömlősgombafajban is, melynél a tirozináz működését képes volt gátolni a sztilbén (Kato et al., 2009).

Szőlőben bizonyos sztilbének gátolták *Botrytis cinerea* lakkáz termelését illetve a gombaspóra csírázását illetve a hifa növekedését is egyaránt (Taillis et al., 2023).

A termesztett szőlőben a fő sztilbének, mint a transz-rezveratrol, transz- $\epsilon$ -viniferin, ampelopszin, visitin B és izohopeafenol/hopeafenol elsődlegesen a fás részekben, a törzsben és a kordonkarban halmozódnak fel, állandó alkotóként. A gyökérben, a szálvesszőben és a fűrtkocsányban magasabb koncentrációban vannak jelen, mint a levelekben, illetve a bogyókban, melyekben stressz hatására nő meg a mennyiségük. Mindezek ellenére Wang és munkatársai (2010) a legmagasabb sztilbén szintáz mRNS és fehérje szintet a levelekben találta, míg UV sugárzás hatására *Vitis pseudoreticulata*-ban a *VpSTS29* szintje a gyökérben és a levelekben lett a legmagasabb (Ma et al., 2019). A sztilbén szintáz fehérjék jelenlétét főleg a sejtfalban detektálták és a különböző szőlő szövetek másodlagos sejtfalaiban. Ezen kívül még ezek a fehérjék jelen voltak a citoplazmában, az endoplazmatikus retikulumban a kloroplasztiszban és a vakuólumban. A bogyó érése során az STS fehérje lokalizációja nem

változott meg jelentősen. A sztilbének tehát konstitutív és indukálható védelmet biztosítanak a növényben abiotikus vagy biotikus stressz tényezőkkel szemben is egyaránt. Az eddigi kutatási eredmények alapján, a vörösszőlő fajták levelében és fűrtkocsányában a sztilbének szintje magasabb, mint a fehér szőlőben (Goufo et al., 2020).

A rezveratrol főként a szőlő héjában található meg, transz és cisz sztereoizomer formában, legmagasabb értékét, közvetlenül a termés éretté válása előtt éri el (Weiskirchen és Weiskirchen, 2016). Mennyisége függ a szőlőfajtától, a szőlő fejlettségi állapotától, a szőlő művelésmódjától, az ültetvény klimatikus és geografikus tényezőitől, a szőlőt ért abiotikus és biotikus stressz hatásoktól, illetve a borkészítési technológiától. 'Kékfrankos' fajtában a fűrtön belül főként a vállban halmozódott fel a rezveratrol egyéb polifenolos vegyületekkel együtt (Balga et al., 2014).

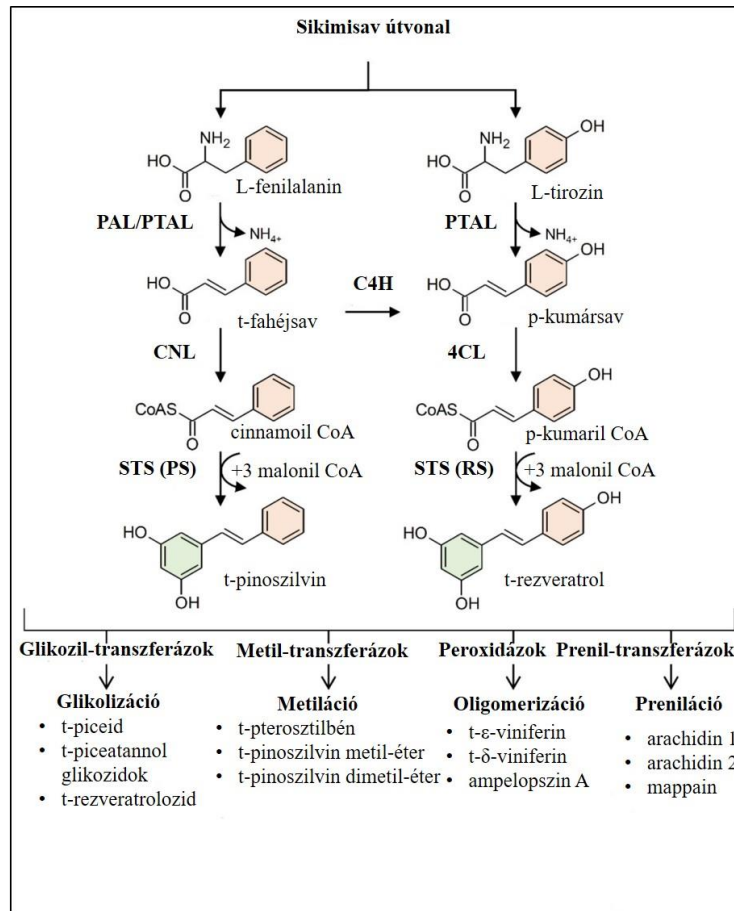
A sztilbén szintázok szabályozásában résztvevő transzkripciós faktorokat nem ismerjük megfelelően.

A sztilbén szintázok katalizálják a sztilbén monomerek képződését egy molekula fahéjsav származék-CoA (koenzim A) észteréből (p-kumaril CoA-ból a rezveratrol, cinnamoil-CoA-ból a pinoszilvin képződését, dihidro-cinnamoil-CoA-ból a dihidro-pinoszilvin képződését) és három molekula malonil-CoA kiindulási termékekből (Valletta et al., 2021). A cinnamoil-CoA transz-fahéjsavból képződik, amely a sikimisav úton képződő L-fenilalaninból jön létre fenil-alanin-ammónia-liáz vagy a bifunkcionális fenilalanin/tirozin ammónia liáz által.

A p-kumaril CoA, a transz-fahéjsav származékából, a p-kumársavból képződik, ami pedig tirozinból is képződhet szintén a sikimisav úton (Dubrovina és Kiselev, 2017), míg a másik sztilbén prekursor, a malonil-CoA, az acetyl-CoA egységek elongációjával jön létre (Roat és Saraf, 2015). A sztilbének glikolizálódhatnak, metilálódhatnak vagy prenilálódhatnak specifikus enzimek által, azonban a sztilbén származékok nagy része még ismeretlen (3. ábra). A sztilbén-szintázok szerepét feltételezik még kaffeoil-CoA-ból a piceatannol képződésénél.

A sztilbén szintázokon kívül lényeges megemlíteni a flavonoid bioszintézis kulcsenzimét, a chalcon szintázt, mivel kompetíció zajlik a két enzim között a közös szubsztrátokért a malonil-CoA-ért és a p-kumaril-CoA-ért, másrészt hasonló kondenzációs reakciót is katalizálnak. A két enzim nagyfokú aminosav szekvencia azonosságot mutat egymással. Ezáltal lehetséges, hogy aktivitásuk és génexpressziós szintjeik hasonló szabályozás alatt állnak. Általánosságban a szőlőben a sztilbének kisebb mennyiségben fordulnak elő, mint a flavonoidok (Goufo et al., 2020)

A sztilbén szintázokat kódoló gének általában kis, 1–10 tagú géncsaládokban fordulnak elő, mint pl. a tarka cirokban (*Sorghum bicolor*), az erdeifenyőben (*Pinus sylvestris*), a simafenyőben (*Pinus strobus*), a földimogyoróban (*Arachis hypogaea*), míg a bortermő szőlőben (*Vitis vinifera* L.) különösen magas a számuk. Az eddigi ismereteink azonban csak a termesztett szőlő és a tarka cirok genomját illetően teljeseek, mivel ezeknek határozták meg a nukleotidszekvenciáját.



### 3. ábra

Sztilbén szintézis a növényekben. (PAL) fenil-alanin ammónialiáz, (PTAL) bifunkcionális fenil-alanin/L-tirozin ammónialiáz, (C4H) a cinnamát 4-hidroxiláz, (4CL) 4-kumarát CoA ligáz, (CNL) cinnamát CoA ligáz, STS (sztilbén szintáz), (RS) rezveratrol szintáz, (PS) pinoszilvin szintáz.

A szőlő 12x-es referenciagenomában (*V. vinifera* cv. 'Pinot noir' PN40024 genotípusában) a sztilbén szintáz géncsalád teljes jellemzését Vannozzi és munkatársai (2012) végezték el. Ez magában foglalta a gének beazonosítását, annotációját, minden tag filogenetikai elemzését illetve az adatokat beillesztette az eddig kapott génexpressziós



eredményekbe. Az eredmények alapján egy kiemelkedően nagy, 48 tagú multigén családban fordulnak elő, melyből funkcionális jelentőséget legalább 32-33 génnek lehet tulajdonítani, 9 gén esetében pedig bizonyított volt a betöltött működés (Parage et al., 2012).

*Vitis vinifera*-ban a 10-es kromoszómán a konstitutív expressziót mutató és az egyedfejlődés szabályozásában fontos sztilbén szintáz géneket, a VvSTS1-VvSTS1-6-ig azonosítottak, míg a 16-os kromoszómához volt köthető a stresszválaszban szerepet játszó, a VvSTS7-48-ig jelenléte (Vannozzi et al., 2012). Ezenkívül feltételeznek egy olyan felosztást is, melyben vannak a korán expresszálódnók, melyek mRNS-e gyorsan degradálódik és a későn expresszálódnók, melyek mRNS-e stabilabb.

### 3.3. A szőlő rezisztencianemesítése

Európában az első, nagyobb szőlőt érintő járványokat az Észak-Amerikából behurcolt károsítók okozták, melyek jelentős gazdasági veszteséget okoztak, mivel nem tudtak koevolválódni az európai szőlőfajokkal, illetve fajtákkal. 1845-ben a lisztharmat, majd 1868-ban a filoxéra, míg 1878-ban a peronoszpóra megjelenése elindította a betegség ellenálló fajtanemesítést a szőlőben. Kezdetben az amerikai szőlőfajok és -fajták keresztezésével, pl.: 'Isabella', majd az amerikai (*Vitis rupestris*, *Vitis labrusca*) és az európai szőlő keresztezésével jellemzően filoxéra-, lisztharmat- és peronoszpóra rezisztens direkttermő hibrideket hoztak létre. A borkészítés során azonban bizonyos direkttermő fajtákból metanol keletkezett, mely egészségügyi kockázata negatívan sújtotta a piaci megítélésüket. Ráadásul 1940-ben Magyarországon már a szőlőterületek 20%-át tették ki ezek a hibridek (Sidlovits, 2019).

Hazánkban a filoxérával szembeni sikeres alanynevelés Teleki Zsigmond nevéhez fűződik, ezt követően az 1950-es évek elején vette kezdetét a rezisztens csemege- és borszőlő fajták nevelése. A franko-amerikai fajták továbbkeresztelésével Dr. Csizmazia Darab József hozta létre szőlőperonoszpóra és -lisztharmat ellenálló 'Bianca' fajtát. A Kertészeti Egyetemen dr. Tamássy István és dr. Koleda István nevelői csapata által, *Vitis amurensis* × *Vitis vinifera* hibridekből fagyűrő, gombabetegségekkel szemben ellenálló 'Kunleány', 'Kunbarát' hibrideket hozott létre.

2000-ben a PTE Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetében ifj. dr. Kozma Pál vezetésével peronoszpóra, lisztharmat és szürkerothadás ellenálló, új hibridek előállítását tűzték ki célul. Munkásságában a peronoszpóra és a lisztharmat ellen immunitásszerű

rezisztenciával, szürkerothadással szemben magas fokú rezisztenciával rendelkező a Pannónia, Petra, Jázmin, Borsmenta, Kozmopoliten fajtákat nemesített (Németh, 2019).

Az elmúlt évtizedekben a klímaváltozással együttjáró hatások serkentették a szőlőtermesztés további átalakulását. A környezetkímélő és egyben versenyképes szőlőtermesztéshez szükséges betegség ellenálló, megfelelő gyümölcs és borminőséggel rendelkező fajták nemesítése. Az Európai Unió Ecophyto tervében (2008-2018), a mezőgazdaságban alkalmazott növényvédőszer 50%-os csökkentése volt a cél, másrészt az európai zöld megállapodásban különböző hatóanyagok kivonását is célul tűzték ki (ICV, 2013).

Sajnos önmagában a betegség rezisztens szőlőfajták létrehozása nem elengedő. *Vitis vinifera* cv. 'Bianca' fajtában az *Rpv3.1* rezisztencia letöréséről számolt be Peresotti és munkatársai (2010). A stabil, tartós rezisztenciához általában hozzájárulhatunk a vetésforgó használatával, a különböző szabadföldi fajták, illetve a szomszédos földterületeken, az eltérő fajták termesztésével. Azonban a szőlő évelő kultúrnövény és a 30 éves állókultúra miatt ez nehezen megvalósítható, ezért a rezisztencia gének piramidálása jelenthet megoldást (Töpfer és Trapp, 2022).

A biotechnológia fejlődésével már lehetőség van a növényekben védekezési gének, mint pl. PR fehérjéket, transzkripciós faktorokat, antimikrobiális peptideket kódoló, másodlagos anyagcseretermékek (pl. sztilbének) szintézisében szerepet játszó és egyéb védekezési gének túlexpresszáltatásával közvetlen vagy közvetett módon gátolni a patogén gombák, oomikóták növekedését. Más szempontból viszont a növényi betegség fogékonysági gének csendesítésével is lehet fokozni a védelmet. Az MLO (Mildew Locus O) gének, mint liztharmat rezisztencia gének, először árpában egy természetes mutáció alapján fedeztek fel (Kim et al., 2002). Az MLO fehérje valamennyi szárazföldi növényben megtalálható, a növényi stresszválaszban van szerepe. Ahhoz, hogy a liztharmat spórakezdeményekből sikeres fertőzés létrejöhessen, szükséges a működőképes MLO fehérje jelenléte (Reinstädler et al., 2010). RNS interferenciával pedig a kórokozót célzó, effektort kódoló gének alulszabályozásával lehet elősegíteni ezt.

A specifikus, kívánt jelleg bevitele történhet közvetlen génpuskával (biolisztikus) történő géntranszferrel és/vagy *Agrobacterium tumefaciens* fertőzés által. A CRISPR/Cas9 alapú genommodosítások *Agrobacterium tumefaciens* közvetített transzformációját már sikerrel alkalmazták szőlőliztharmat esetén *VvMLO3*, szőlőperonoszpóránál *VvPR4b* és szürkerothadásnál *VvWRKY52* módosításával (Li et al., 2020; Wan et al., 2020).

A genommodosítási technikával inszerciót, deléciót is létrehozhatunk növényi sejtekben, a módszerek elnevezésében a különbséget a nukleáz típusa adja. A CRISPR/Cas9 alapú módszer gyorsabb és költséghatékonyabb a cinkujj nukleáz (ZFN) és transzkripció aktiváló szerű (TALEN) módszerekhez képest (Capriotti et al., 2020). A CRISPR/Cas9 rendszerben a többi két módszer fehérje alapú felismeréséhez képest, egy egyszálú RNS molekula ismeri fel, az általunk megtervezett guide RNS, a módosítani kívánt szekvenciát, míg a DNS kétszálú hasítását a Cas9 DNáz és helikáz aktivitású fehérje végzi. A CRISPR-Cas9 segítségével bázispár pontossággal szerkeszthető a genom, indel típusú mutációk létrehozása nem homológ végek összekapcsolásával (NHEJ), mikrohomológia közvetített módon (MMEJ) is megvalósulhat, míg néhány kilobázisnyi DNS beépítése homológ rekombinációval is egyaránt (Yao et al., 2017).

Szőlőben a legfőbb növényi regenerációs módszerek közé tartoznak a hajtásból való organogenezis vagy a szomatikus embriogenezis. A szomatikus embriogenezis során dedifferenciált sejt kultúrákból állítanak elő *de novo* regeneránsokat in vitro körülmények között (Birch, 1997). A módszer előnye az organogenezissel szemben, hogy egy sejtől indul ki, mellyel elkerülhető a kiméra képződés. Ráadásul a szomatikus embriogenezis egyben egy vírus, viroid mentesítési eljárás, mellyel hozzájárulhatunk a patogénmentes szaporítóanyag biztosításához (Oláh et al., 2022).

A regeneráció sikerességét számos tényező befolyásolhatja, mint a szőlőfajta, a felhasznált növényi rész és a táptalaj összetétele (Zhang et al., 2021). Szőlőben a legelterjedtebb a portokkultúrából kiinduló szomatikus embriogenezis, melyet számos fajta mellett *Vitis vinifera* cv. 'Furmint'-ból is megkíséreltek Oláh és munkatársai (2009), azonban nem tapasztaltak embrióképződést.

Szőlő különböző részeiből, mint levélről, éretlen virágbimbókból, ováriumokból is lehet kalluszt indukálni. Soliman és munkatársainak (2018) *Vitis vinifera* cv. 'Superior Seedless' estében sikerült levélből kalluszt létrehozni külön-külön 2,4D (2,4-diklór-fenoxiacetsav) illetve NAA (1-naftil-ecetsav) szintetikus auxin és BAP (6-benzil-aminopurin) szintetikus citokinin, összetételű táptalajokon.

### 3.3.1. Feketerothadás rezisztenciaforrások

Az Európában termesztett szőlő az észak-amerikai eredetű patogénekkal nem találkozott, ezért szelekciós nyomás hiányában a feketerothadásra nézve azt váránk, hogy nem rendelkezik betegség rezisztenciával. Ennek ellenére kimutatták az európai vadszőlő, *Vitis vinifera subsp. sylvestris* (Willd). Hegi feketerothadás ellenállóságát. Hasonlóképp, találtak az Észak-Amerikában őshonos *Erysipthe necatorral* szemben ellenálló európai és ázsiai szőlőfajtákat is (Coleman et al., 2009; Hoffmann et al., 2008; Pap et al., 2016). Mindenesetre az észak-amerikai, feketerothadással koevolválódott, ekképp ellenálló vad szőlő fajokat, mint *Vitis cinerea*, *Vitis rupestris*, *Vitis lincecumii* érdemes a rezisztens jellegek szempontjából megvizsgálni.

Később feketerothadás rezisztencianemesítéshez kerestek ellenálló Seibel hibrideket. A 'Chancellor' ('Seibel 7053') és 11 Seyve-Villard hibridet vizsgálata során a 'Seyval blanc' ('SV 5276') kiemelkedő volt ellenállóságát tekintve (Roznik et al., 2017). Azonban a Merzling, Felicia és Villard blanc (Seyve-Villard 12375) mérsékelten volt csak rezisztens, a korábbi tanulmányokkal ellentétben (Rex, 2012).

A jelenlegi ismereteink alapján a legjobb rezisztencia források a Seibel 4986 (Rayon d'or) és Seibel 4643 ('Roi des noirs'), illetve a Rayon d'or × Kékfrankos szülők keresztezéséből származó 'Csillám' interspecifikus hibrid, mely a feketerothadással szemben mind a levél, mind a fűrtellenállóságot vizsgálva magas fokú rezisztenciát mutat (Kiss et al., 2017). A további potenciális feketerothadás rezisztencia források között vannak franko-amerikai, *Vitis amurensis* hibridek, illetve visszakeresztett franko-amerikai hibridek, mivel a franko-amerikai hibridek ősei között számos észak-amerikai *Vitis* fajt találunk, mint a *Vitis rupestris* és a *Vitis lincecumii*-t. A szőlőlisztharmat, peronoszpóra és szürkerothadás rezisztens 'Arandell', mérsékelt szintű feketerothadás ellenállóságot mutatott (Reisch et al., 2014).

A szőlőfajták ellenállósági fenotipizálásán kívül, a QTL (mennyiségi tulajdonságok szabályozásában szerepet játszó lokuszok) számának és genomban való lokalizációjának meghatározását végzik molekuláris markerekből álló genetikai térképekkel. Több tanulmányban is a marker alapú szelekció (MAS) alapján kétszülős populációk hasadó nemzedékét vizsgálva kerestek feketerothadás rezisztenciához kapcsolható QTL-t.

Kezdetben a RAPD (véletlenszerűen amplifikált DNS polimorfizmus) alapján Dalbó és munkatársai (2000) két lisztharmat rezisztencia QTL-t találtak a 16-os és a 18-os kapcsoltsági csoportokban, melyek átfedtek a feketerothadás rezisztenciához kapcsolható

QTL-lekkel Illinois 547-1-ben (*Vitis rupestris* × *Vitis cinerea*). Másrészt felhívták a figyelmet a sztilbének lehetséges szerepére, mivel a fogékony szülőben, a 'Horizon' interspecifikus hibridben a 16-os kapcsoltsági csoport egyik QTL-e átfedésben volt a rezveratrol bontással kapcsolatos QTL-lel.

Rex és munkatársai (2014)'V3125' ('Schiava grossa' × 'Riesling') × 'Börner' (*V. riparia* Gm183 × *V. cinerea* Arnold) utódjait vizsgálva a 14-es kromoszómán azonosítottak a GF14-41 és GF14-42 markerekkel egy *Rgb1* (*Resistance Guignardia bidwellii* 1) QTL-t, míg a 16-os kromoszómán a *Rgb2*-t. Hasonlóképp, Hausmann 'GF.GA-47-42' (Bacchus Weiss × Seyval Blanc) × 'Villard Blanc' (Seibel 6468 × Seibel 6905) és Bettinelli 'Teroldego' *Vitis vinifera* hibrid és 'Merzling' (Seyval blanc × Freiburg 379-52) térképező populációi alapján a 14-es kromoszóma azonos régióján találták meg a feketerothadás rezisztencia QTL-t, mellyel a korábbi tanulmányok eredményeit alátámasztották (Bettinelli et al., 2023; Hausmann et al., 2017).

Mindezek alapján bebizonyosodott a korábban feltételezett *Vitis cinerea* eredetű feketerothadás rezisztenciáról, hogy helyette inkább a *Vitis ripariához* vagy *Vitis rupestrishez* köthető a feketerothadás ellenállóság (Szabó et al., 2023). További genetikai elemzésekben ígéretes lehet még a *Vitis sylvestris* és amerikai *Vitis* fajok elemzése is.



## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. 'Juhfark' fajta klónjainak botritisz fogékonysága

*Vitis vinifera* cv. 'Juhfark' szőlőfajta két kiválasztott klónjának, a B.1. és B.2. klónoknak 20 növényes kis parcelláit, valamint az alapfajta 0,3 ha-os parcelláját a MATE Szőlészeti és Borászati Intézetének badacsonyi kutatóállomásán nevelték. Mindegyik vizsgált szőlőültetvényt egyaránt 2×1 m-es térállásban, Teleki 5C (E20) alanyra oltva telepítették közepmagas kordon műveléssel. A tőketerhelés 7 rügy/m<sup>2</sup> vagyis 14 rügy/tőke volt.

12 év (2011-2022) meteorológiai adatait (napi minimum, maximum és átlag hőmérséklet, napi csapadékmennyiség) egy automata agrometeorológiai állomás (Lufft HP-100 Meß- und Regeltechnik GmbH-1997) rögzítette a kísérleti növényeket tartalmazó badacsonyi ültetvényben.

Minden évben felvételezésre került a fő fenológiai fázisok: rügyfakadás (BBCH 09, EL 5), virágzás kezdete (BBCH 61, EL 19), virágzás vége (BBCH 69, EL 26), zsendülés (BBCH81, EL 35) és az érés (BBCH 89, EL 38) időpontja és a *Botrytis cinerea* fertőzöttség mértéke teljes érésben. A botritisz fertőzöttség mértéke a rothadt bogyók becsült %-os arányát mutatja a teljes parcellában vizuális felvételezés alapján. A statisztikai kiértékelést az R programmal végeztük.

### 4.2. Sztilbén vizsgálatok

#### 4.2.1. Tenyészedényes szőlő növények és a fertőző anyag előállítása és tesztelése

A tenyészedényes kísérletekhez kétrügyes dugványokat állítottunk elő. A 'Csillám' anyagot a NAIK Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet Kecskeméti Kutató Állomásától, a 'Csaba gyöngye' alapanyagot Balatonboglárról szereztük be. Kétrügyes dugványokat metszettünk és indítottunk 3 dl-es perlitet tartalmazó műanyag poharakban. Az alsó szemet kivakítottuk, a nádusz alatt 2-4 mm-rel elvágtuk a hajtást. A dugványokat 3,5 hónapig 25 °C-on, 16 óra megvilágítással neveltük a MATE Talajtani Tanszékének fényszobájában.

Az Eszterházy Károly Egyetem Szőlészeti és Borászati Intézetétől 2020. március 6-án *Guignardia bidwellii* izolátumot kaptunk 3%-os MEA (malátaagar) táptalajon. A

táptalajról 1×1 cm-es telepdarabokat kimetszve a tenyészetet lefagyasztottuk 1 ml 20%-os glicerint tartalmazó 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe -80°C-on. 2020. május 26-án olvasztottuk ki a gombaizolátumot Furmint zöldbogyólevet tartalmazó zabtáptalajra tettük, állandó fluoreszcens megvilágítás alatt (50 % Tungsram 36 W F7 Daylight és 50 % Sylvania 36W T8 F Black light blue (UV-A)) 25 °C-on inkubáltuk őket (Roznik, 2019). Havonta új táptalajra oltottuk át a tenyészeteket.

Teszteltük az izolátum életképességét Furmint zöldbogyókon. Ehhez 10%-os NaOCl oldatban 10 másodpercig fertőtlenítettünk zöldbogyókat, melyek ezután háromszoros steril desztillált vizes mosást kaptak és steril Petri-csészékbe steril desztillált vízzel átitatott szűrőpapírkorongra tettük őket. A fertőtlenített bogyóból eltávolítottam steril csipesszel a kocsányt és annak helyére pipettáztam a gombatelepből kivágott 1×1 cm-s táptalaj kocka steril desztillált vízben felvortexelt oldatát pipettáztam a bogyóra, majd sztereomikroszkóppal követtem nyomon a fertőzést.

A dugványok fertőzéséhez 4 hónapos *Guignardia bidwellii* tiszta tenyészeteket használtunk, melyeket 1-2 ml steril desztillált vízzel nedvesítettünk be és felkapartuk a felszínüket steril spatulával. Végül  $\sim 2 \times 10^5$  spóra/ml töménységű spóraszuszpenziót állítottunk be Bürker kamrával.

A fertőzéshez autoklávozott, steril ecsetekkel vittük fel a spóraszuszpenziót egyenletesen felkenve a legfelső, fiatal levelekre. A kontroll leveleket steril desztillált vízzel fújtuk le. A mintákat 3 biológiai ismétlésben, a fertőzést követően 0, 6, 18, 36 órával gyűjtöttük, ugyanis a feketerothadás esetében a növényi válasz a fertőzést követő 24-48 órában eldől.

A fertőzés mértékét és előrehaladását a fertőzött és nem kezelt levélminták tripánkéssel történő festése alapján ellenőriztük (Várallyay et al., 2012), majd a fertőzés eredményességét fénymikroszkópos vizsgálattal validáltuk.

A tripánkék festés protokollja:

### *1. Feltisztítás*

A fertőzött levelekről korongokat csíptettünk le és Petri-csészébe helyezett szűrőpapírra raktuk színükkel fölfelé, majd etanol:ecetsav (1:1) arányú keverékét mértük rá. A savas etanolos tisztítás során a szűrőpapírt a levélkorongokkal elmozdítás nélkül áztattuk 2 napig. A feltisztító oldatot reggel és este frissre cseréltük.

### *2. Festés tripánkéssel*

A feltisztított levelekről a savas etanolt leszívtuk és helyette 1% HCl-t pipettáztunk rá, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubáció alatt elkészítettük frissen



az eredeti protokollban szereplő 0,05%-os helyett 0,01%-os tripánkék festék oldatot. A tripánkék festékport sósavas glicerinbe (25%-os glicerin, 0,5% HCl) oldottuk be. A levélkorongokat 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük és ráértünk annyi tripánkék festéket, hogy ellepje a mintákat, majd szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk.

Ezután a tripánkék festéket leszívtuk, majd a levelekre sósavas glicerint (25%-os glicerin, 0,5% HCl) pipettáztunk és a festési hátteret ebben mostuk ki. Fél óra elteltével a levélkorongokat tárgylemezre helyeztük, melyre 50%-os glicerint cseppentünk, fedőlemezzel lefedtük és fénymikroszkóppal ellenőriztük a fertőzés sikerességét a fogékony fajtában.

#### 4.2.2. A szabadföldi kísérleti szőlő fajták

2023.június.6-án a virágzás kezdetekor (BBCH 61, EL 19) szedtünk levélmintákat a Pécsi Tudományegyetem Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetének Szentmiklóshegyi Kísérleti Telepén található szőlőültetvényből különböző BR ellenállóságot mutató és feketetrohdásra fogékony szőlőfajtákról (1. táblázat).

A levélmintákat intenzív növekedésben lévő hajtásokról szedtük. A vitorlától számítva a első-második kiterült, kb. 2,5-3 cm átmérőjű levelet tekintettük „kis méretű levél”-nek, a továbbiakban „3 cm”, a valamivel idősebb, a vitorlától számított negyedik-ötödik kiterült 4,5-5,5 cm átmérőjű levelet „nagy méretű levélnek”, a továbbiakban „5 cm” tekintettük. A leveleket 3 biológiai ismétlésben gyűjtöttük feketetrohdásnak ellenálló és fogékony szőlőfajtákról. Bizonyos fajtákról, mint a Csillám, SK001/7, 01-1-797 7,5 cm-nél nagyobb leveleket is kiválasztottunk (a továbbiakban „8 cm”). A Csillám × SK001/7 és Csillám × 01-1-797 szülők által létrejött hasadó nemzedék tagjait is vizsgáltuk, melyek között feketetrohdásnak ellenálló (109, 147, 180, 187, 192) és érzékeny (83, 106, 112, 113, 127, 163, 213, 234) hibridek is voltak Ezekről 1-1 „3 cm” és „5 cm” méretkategóriájú levelet gyűjtöttünk. Ebben az esetben, mivel nem az egyes egyedeket, hanem az ellenálló, illetve fogékony hibrideket hasonlítottuk össze, a két kategória biológiai ismétléseit az egyes egyedek jelentették. A metszőollóval levágott leveleket alufóliába csomagolva, folyékony nitrogénbe helyeztük és a sztilbén meghatározásig -80 °C-on tároltuk.

**1. táblázat.** A sztilbén szint meghatározáshoz felhasznált különböző ellenállóságú szőlőfajták. NA: nincs adat. A lizstharmat, peronoszpóra rezisztencia gének adatai a vivc adatbázisából (<https://vivc.de>) származtak.

Fajta	Lizstharmat / peronoszpóra rezisztencia gén	Származás	Levél feketerothadás ellenállóság (FR)	Feketerothadás referencia	Szürkerothadás ellenállóság
<i>Feketerothadás ellenálló fajták</i>					
5-11-02	NA	<i>V. amurensis</i> F2	Ellenálló	(Roznik et al., 2017)	NA
CSFT92	NA	Rayon d'Or × Kékfrankos	Ellenálló	Kozma, szóbeli közlés	NA
Csillám	NA	Rayon d'Or × Kékfrankos	Tünetmentes rezisztencia	(Roznik et al., 2017)	Kevésbé fogékony (Bényei és Lőrincz, 2005)
Merzling	<i>Ren1, Ren9, Rpv3.3</i>	Seyval blanc × Freiburg 379-52 (Riesling × Pinot gris)	Közepesen ellenálló	(Loskill et al., 2009; F. Rex, 2012; Roznik et al., 2017)	NA
Muscaris	<i>Ren3, Ren9, Rpv10</i>	Solaris × Muscat a Petits Grains Blancs	Ellenálló	Kozma, szóbeli közlés	Kevésbé fogékony (Rousseau et al., 2013)
Rayon d'Or	NA	Seibel 405 × Aramon du Gard	Ellenálló	Kozma, szóbeli közlés	NA
Seyval blanc	<i>Ren3, Ren9, Rpv3.2, Rpv 3.3</i>	Seibel 5656 × Rayon d'Or	Magas rezisztencia	(Roznik et al., 2017)	Kevésbé fogékony (Rousseau et al., 2013)
Solaris	<i>Ren3, Ren9, Rpv3.3, Rpv10</i>	Merzling × Geisenheim 6943	Közepesen ellenálló	(Loskill et al., 2009)	Kevésbé fogékony (Rousseau et al., 2013)
Souvignier gris	<i>Ren3, Ren9, Rpv3.2</i>	Seyval blanc × Zähringer	Ellenálló	Kozma, szóbeli közlés	Kevésbé fogékony (Rousseau et al., 2013)
<i>Lizstharmat és/vagy peronoszpóra ellenálló, de feketerothadásra fogékony fajták</i>					
01-1/797	NA	NA	Érzékeny	Kozma szóbeli közlés	NA
SK001/7	NA	NA	Érzékeny	Kozma szóbeli közlés	NA
Bianca	NA	Villard blanc × Bouvier	Érzékeny	(Hausmann et al., 2017; Roznik et al., 2017)	Kevésbé fogékony (Rousseau et al., 2013)
Regent	<i>Ren3, Ren9, Rpv3.1</i>	Diana × Chambourcin	Érzékeny	(Loskill et al., 2009; F. Rex, 2012)	Kevésbé fogékony (Rousseau et al., 2013)
<i>Érzékeny (V. vinifera) fajták</i>					

Csaba gyöngye	-	Madlene d'Angevine × Muscat fleur d'Orange	Érzékeny	Kozma, szóbeli közlés	Közepesen fogékony (Bényei és Lőrincz, 2005)
Furmint	-	Alba imputotato × Heunisch Weiß	Érzékeny	(Roznik et al., 2017)	Fogékony (Bényei és Lőrincz, 2005)
Kékfrankos	-	Zimmertraube Blau × Heunisch Weiß	Érzékeny	Kozma, szóbeli közlés	Kevésbé fogékony (Bényei és Lőrincz, 2005)
Merlot	-	Magdeleine noire des Charentes	Érzékeny	(Loskill et al., 2009)	Közepesen fogékony (Robinson et al.)
<i>Hibridek</i>					
83	NA	Csillám × SK001/7	Érzékeny	Kozma, szóbeli közlés	NA
106	NA	Csillám × 01-1/797	Érzékeny	Kozma, szóbeli közlés	NA
109	NA	Csillám × SK001/7	Ellenálló	Kozma, szóbeli közlés	NA
112	NA	Csillám × SK001/7	Érzékeny	Kozma, szóbeli közlés	NA
113	NA	Csillám × SK001/7	Érzékeny	Kozma, szóbeli közlés	NA
127	NA	Csillám × 01-1/797	Érzékeny	Kozma, szóbeli közlés	NA
147	NA	Csillám × SK001/7	Ellenálló	Kozma, szóbeli közlés	NA
163	NA	Csillám × SK001/7	Érzékeny	Kozma, szóbeli közlés	NA
180	NA	Csillám × 01-1/797	Ellenálló	Kozma, szóbeli közlés	NA
187	NA	Csillám × 01-1/797	Ellenálló	Kozma, szóbeli közlés	NA
192	NA	Csillám × 01-1/797	Ellenálló	Kozma, szóbeli közlés	NA
213	NA	Csillám × 01-1/797	Érzékeny	Kozma, szóbeli közlés	NA
234	NA	Csillám × SK001/7	Érzékeny	Kozma, szóbeli közlés	NA

#### 4.2.3. Sztilbén mérés UPLC-MS/MS technikával

Az általunk vizsgált szőlőfajtákban az alábbi sztilbének szintjét mértük meg: transz-rezveratrol, cisz-rezveratrol, a glikolizált formák közül a transz-piceid, cisz-piceid, a metilált

módosulat a pterosztilbén, transz- $\epsilon$ -viniferin, cisz- $\epsilon$ -viniferin, transz- $\omega$ -viniferin, cisz- $\omega$ -viniferin,  $\alpha$ -viniferin trimert, piceatannol.

A sztilbén szintek meghatározását az MTA martonvásári Agrártudományi Kutatóintézetének Növényélettani Osztálya végezte. A levélmintákból a sztilbének kivonását, elválasztását és detektálását egy ultrahatékonyaságú folyadékkromatográfiás Waters Acquity I class UPLC rendszerrel vizsgálták, amely egy többszörös reakció monitorozás módszerén alapuló, UniSpray ionforrással (US) működő, Waters Xevo TQ-XS (Milford, MA, USA) tandem tömegspektrométerrel volt összekapcsolva, ami egy argon gázzal működtetett ütközési cellával volt ellátva. A módszer során (Pál et al., 2019), a fagyasztott levélmintákat folyékony nitrogénben homogenizálták és metanol-víz 2:1 arányú elegyében extrahálták 100 mg FW ml<sup>-1</sup> friss tömegűre. Az elválasztás Waters Acquity HSS T3 oszlopon (1.8  $\mu$ m, 100 mm  $\times$  2.1 mm), 40 °C-os hőmérsékleten történt. A grádiens elúcióhoz víz és 0,1 v/v %-ban hangyasavat tartalmazó acetonitril keverékét alkalmazták. Az adatok feldolgozását Waters MassLynx 4.2 és TargetLynx szoftverrel végezték.

### **4.3. A fekete rothadás ellenállóságban feltételezetten szerepet játszó gének eltérő expressziójának validálása**

#### **4.3.1. A gének in silico bioinformatikai elemzése, primer tervezés**

Az RNS szekvenálás bioinformatikai vizsgálatával kapott korábbi eredmények (Kellner, 2022) alapján a ( $p < 0,01$ ) szignifikancia szinten 6, 18, 36 hpi differenciált expressziót mutató gének minőségellenőrzését végeztem el. Az RNS szekvenálás adatelemzése során kapott XLOC azonosítóval jelölt és ehhez párosított VIT (v2.1) azonosítójú (a CRIBI adatbázisához tartozó) transzkriptumok alternatív splicing variánsait leellenőriztem a CRIBI adatbázisában találhatóakkal. Kiszűrtem a hibás szekvenciákat, műtermékeket, mivel pl. egymáshoz közeli pozíciójú gének esetén egy XLOC azonosítóhoz két VIT azonosítójú gén is tartozhat, illetve a DNS sense és antisense szálán is azonos helyzetben lokalizálódó géneknél előfordult, hogy a bioinformatikai kiértékelés során a két XLOC azonosítóhoz egy VIT azonosítójú gén tartozott.

A differenciált expressziót mutató gének közül kiválasztottunk néhányat, mely találatok megerősítése céljából RT-PCR-t végeztünk. Ehhez szükséges volt primereket tervezni, melyeket az Integrated DNA Technologies

(<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) oldalán található OligoAnalyzer™ Tool segítségével terveztük meg.

Az általunk kiválasztott validálandó gének (2. táblázat) közül a sztilbén szintázok és a fenil-alanin ammónia liázok, illetve WRKY transzkripció faktorok nagy géncsaládot alkotnak, mellyel együtt szekvenciájukban magas szintű homológiát mutatnak. Ezáltal a primerek specifikusságának biztosításához, szükséges volt a teljes géncsalád szekvenciáját ismernünk, melyek V2.1 annotációjú szekvenciáit a padovai egyetem egykori adatbázisából (<https://genomes.cribi.unipd.it>) gyűjtöttük ki. Muscle programban (Edgar, 2004) a géncsaládok egyes tagjainak a szekvenciát egymáshoz illesztettük.

Az illesztett szekvenciákon belül egyedi szekvenciaeltérést kerestünk az általunk validálandó VvSTS génekben (STS10,20,21). A specifikusságot úgy érhetjük el, ha pl. a validálandó gén forward primerének utolsó (3') nukleotidja lesz az egyedi, a géncsalád többi szekvenciájától eltérő nukleotid, a reverz primer pedig a génben megtalálható exon-intron junction pontra van tervezve, amely ideális esetben specifikus.

**2. táblázat.** A kiválasztott feketerothadás válasz gének a szőlőben.

Gén neve	Gén funkciója	Gén azonosítója (VIT v2.1)	Gén lokalizációja a szőlő genomon (v12X.2)
VvSTS10	sztilbén szintáz	VIT_216s0100g00780	chr16:16276379-16278547
VvSTS20	sztilbén szintáz	VIT_216s0100g00900	chr16:16385884-16397049
VvSTS21	sztilbén szintáz	VIT_216s0100g00910	chr16:16398197-16400134
VvPAL12	fenilalanin-ammónia-liáz	VIT_216s0039g01280	chr16:699950-702582
VvOPR2	12-oxo-fitodiénsav-reduktáz	VIT_218s0041g02060	chr18:27186796-27189275
VvWRKY	WRKY transzkripció faktor	VIT_207s0031g01710	chr7:17794258-17797278
VvRPM1	betegség rezisztencia fehérje rpm1-like	VIT_201s0011g00950	chr1:806633- 809936
VvDMR6.1	downy mildew resistance 6	VIT_216s0098g00860	chr16: 21182902- 21186983

Az Emboss primersearch programjával (Rice et al., 2000) a szőlő referencia genomon vagyis a közel homozigóta *V. vinifera* cv. 'Pinot noir' PN40024 genomján illetve Kellner (2022) korábbi munkájából származó *V. vinifera* cv. 'Csaba gyöngye' és 'Csillám' referencia transzkriptumunkon ellenőriztük, hogy specifikusan amplifikálnak-e az általunk megtervezett primerek. Azoknál a primereknél, ahol nem teljesen egyezett az *in silico*

felszorosított szekvencia, vagyis mismatchet találtunk, azokat tovább vizsgáltuk NCBI Blast segítségével. Beazonosítottuk a mismatchek pontos helyét, mivel ha a forward primer 3' bázisait érinti a polimorfizmus, akkor az nem detektálható a valós-idejű PCR során, míg a 5' végi szekvenciákban való eltérés nem okoz gondot. A primerek szekvenciái 3. táblázatban láthatóak.

**3. táblázat.** *A nyolc potenciális feketeeróhadás válasz génre tervezett primerek és a referencia gének szekvenciái és a PCR termékek mérete szőlőben. F: forward, R:reverse primer, félkövér, piros nukleotid a primer specifikusságát jelöli.*

Gén neve	Primer szekvencia (5'-3')	PCR termék mérete (bp)
VvSTS10	AGTCTGATTATGCTGATTACTATTTCA <b>A</b> -F	98
	GATCATTGATTTGTCACATATGCG-R	
VvSTS20	CTGGTGCAGATTATAAACTCGC-F	61
	ATCACTCTTCTGACAGATGG <b>C</b> -R	
VvSTS21	AATCGCATATGTGACAAATCAAT <b>T</b> -F	59
	ATTTCTTCGGTCAAATGAATGTAAC-R	
VvPAL12	TCAACTCTGTGAATGATAACCCC-F	70
	TGGAAGTTGCCACCATGTAC <b>C</b> -R	
VvOPR2	ACACTGCTCAAGGGTATCC-F	81
	CAGCATCTACAATAGGTTTCCA <b>A</b> -R	
VvWRKY	CAGCCCCAATCCAAGGAAC-F	84
	GAGTCTTCCCTATCCCTTTCG-R	
VvRPM1	CCTCCACTTCAACCAATGC-F	117
	GCTTATTTGTAGGCTCCTCAAG <b>G</b> -R	
VvDMR6	GCTCTATGGTTTTTTCCAGGTG-F	68
	CCTCCAACATTTTCTCCATCAT-R	
VvGAPDH	TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA-F	70
	CCACAGACTTCATCGGTGACA-R	
VvSAND	CAACATCCTTTACCCATTGACAGA-F	76
	GCATTTGATCCACTTGCAGATAGG-R	

#### 4.3.2. A kórokozó gomba, *Guignardia bidwellii* in vitro fenntartása és a kísérleti növények fenntartása

A feketerothadásos tenyészetet a Pécsi Tudományegyetem Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetétől kaptuk, melyet tovább oltottunk PDA (burgonya-dextróz) táptalajra. A tenyészeteket állandó fluoreszcens megvilágítás alatt (50 % Tungsram 36 W F7 Daylight és 50 % Sylvania 36W T8 F Black light blue (UV-A)) 25 °C-on inkubáltuk.

A *Guignardia bidwellii* fertőzés hatására bekövetkezett génexpressziós változások összehasonlításához egy, a feketerothadásnak ellenálló interspecifikus hibridet, a 'Kékfrankos' × 'Rayon d'Or' fajták keresztezéséből nemesített 'Csillám'-ot és egy fogékony *Vitis vinifera* fajtát, a 'Madeleine d'Angevine' és a 'Muscat Fleur D'oranger' keresztezéséből származó 'Csaba gyöngyé'-t választottuk.

A szőlővesszőket a NAIK Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet, Kecskeméti Kutató Állomásától kaptuk 2019. január végén. Egy hét hűtött tárolás után csapvízzel lemostuk a vesszőket, majd kétrügyes dugványokra metszettük őket, melyeket másfél napig vízben áztattunk. Ezt követően általános virágföld és perlit 1:1 arányú keverékét tartalmazó fél literes műanyag poharakba ültettük el a vesszőket, majd 6 hónapig 21 °C-on, 16 óras megvilágítással neveltük őket a MATE Talajtani Tanszékének fényszobájában. Ez idő alatt márciusban és áprilisban is a képződő szőlővirágzatokat steril csipesszel eltávolítottuk, hogy segítsük a hajtásnövekedést, illetve májusban és júniusban is visszametsztettük steril metszőollóval a szőlőket, hogy egységes méretűek legyenek és újrainduljon a hónaljajtások növekedése.

#### 4.3.3. Az ellenálló és fogékony szőlőfajták fertőzése a feketerothadás kórokozójával

A transzkriptomikai eredmények (Kellner, 2022) validálásához 41 napos *Guignardia bidwellii* tiszta tenyészeteket alkalmaztunk, melyeket 1-2 ml steril desztillált vízzel nedvesítettünk be és felkapartuk a felszínüket steril spatulával. A steril desztillált víz hozzáadását követően a következő tenyésztetre pipettáztuk át az első tenyészetből nyert spóra szuszpenziót, megismételve ezt a lépést minden egyes tenyészetnél, egyre töményebb a szuszpenziót kaptunk. Végül  $10^4$ - $10^5$  spóra/ml töménységű spóraszuszpenziót állítottunk be Bürker kamrával (Hausmann et al., 2017). A fertőzést Kellner és munkatársai (2014) alapján 2019. július 31-én indítottuk el a féllevel módszert alkalmazva. A mintákat 3 biológiai ismétlésben, a fertőzést követően 6, 18, 36 órával gyűjtöttük.

#### 4.3.4. A fertőzés mikroszkópos vizsgálata

A fertőzés mértékét és előrehaladását a szűrőpapír korongok helyén gyűjtött fertőzött és mock inokulált levélminták tripánkékekkel történő festése (Várallyay et al., 2012) alapján ellenőriztük, majd a fertőzés eredményességét fénymikroszkópos vizsgálattal validáltuk.

#### 4.3.5. Valós idejű PCR-rel történő vizsgálat

Szőlőben a feketerothadásra adott sejt szintű korai válaszban (0, 6, 18, 36 hpi) az RNS szintű változásokat vizsgáltuk. A génextpresszió relatív kvantifikálásához az összehasonlító  $\Delta\Delta CT$  módszert alkalmaztuk (Schmittgen és Livak, 2008). A real-time PCR eredmények statisztikai kiértékelését a GraphPad Prism szoftverrel (<https://www.graphpad.com>) végeztem.

##### 4.3.5.1. RNS kivonás szőlő szövetből

Az RNS kivonáshoz Gambino módszerét alkalmaztuk néhány módosítással (Gambino et al., 2008).

Dörzsmozsarakban azonos mennyiségű levélszövetet tartalmazó mintát (3 levélkorong tett ki egy mintát) homogenizáltunk folyékony nitrogénben, majd 2 ml-es Eppendorf csövekbe tettük át a homogenizált port.

65 °C -on előmelegített, 850  $\mu$ l kivonó puffer (2 % CTAB, 2,5 % PVP, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 25 mM EDTA, 2 M NaCl) és 17  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanol adtunk a mintákhoz, majd vortexeltük és 10 percig 65 °C –on inkubáltuk rendszeres keverés mellett. Ehhez 850  $\mu$ l kloroform-izoamilalkohol 24:1 (CHISAM) arányú keverékét mértük és 1 percig forgattuk a csöveket, majd 11000 g-vel 10 percig, 4 °C -on centrifugáltuk. 800  $\mu$ l felülúszót új, 2 ml-es Eppendorf csövekbe és vele megegyező térfogatú kloroform-izoamilalkoholt mértünk hozzá, majd 1 percig forgattuk a csöveket és az előzőekben leírt módon centrifugáltuk.

500  $\mu$ l felülúszót új, 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe mértünk és fele akkora térfogatú, 250  $\mu$ l 9 M LiCl-t adtunk hozzá, majd finoman forgattuk. 30 p-ig jégen inkubáltuk a mintákat, majd 21000 g-vel 20 percig, 4 °C -on centrifugáltuk.

A pelletet 65 °C-os 500  $\mu$ l SSTE oldat (1 M NaCl, 0,5 % SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) hozzáadását követően vortexeltük, majd 500  $\mu$ l CHISAM-ot mértünk hozzá és a csöveket forgatva kevertük a mintákat. 11000 g-vel 10 percig, 4 °C -on



centrifugáltuk. 400 µl felülúszót új, 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe mértünk és 280 µl -20 °C-os izopropanolt és 40 µl 3 M nátrium-acetátot (pH 5,2) adtunk hozzá, majd forgatva kevertük a mintákat és szobahőmérsékleten 5-10 percig inkubáltuk. 21000 g-vel 20 percig, 4 °C -on centrifugáltuk, ezután a pelletet 500 µl -20 °C-os 70 %-os etanollal mostuk. 11000 g-vel 5 percig, 4 °C -on centrifugáltuk. Beszárítás után 25 µl nukleázmentes vízben oldottuk vissza és -80 °C-on tároltuk őket.

#### 4.3.5.2. *A kivont RNS minták DNázos emésztése, RNS koncentráció meghatározása és reverz transzkripció*

A kivont RNS minták DNázos emésztését TURBO DNA-free™ Kittel (Ambion) végeztük. A kivont illetve a DNázal kezelte RNS mennyiségi és minőségi ellenőrzését Nanodrop segítségével végeztük el.

Az RNS kivonás során a szőlő teljes RNS tartalmát kinyerjük, azonban az mRNS szintű válasz tanulmányozásához a reverz transzkripcióval cDNS-t szükséges szintetizálnunk.

A cDNS szintézishez 2 µg DNáz kezelte RNS mintával dolgoztunk, a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™) segítségével.

#### 4.3.5.3. *Real-time PCR*

A reakcióelegyünk 5 µl SsoFast EvaGreen Supermixet (BioRad), primerenként 1,6 µM koncentrációjú 2,5 µl forward-reverz primer mixet és 2,5 µl tízszeresen hígított cDNS-t tartalmazott. Az összemérést steril fülkében, steril eszközökkel végeztük el.

A cDNS mintákat Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System készülékben szaporítottuk fel. Referencia génként a SAND és GAPDH géekkel dolgoztunk (Lai et al., 2018; Tashiro et al., 2015). A RT-PCR reakció zajlott az alábbi módon (4. táblázat).

Az RT-PCR reakció megbízhatóságát gélelektroforézissel ellenőriztük. Ehhez 10 µl PCR terméket 2 µl töltőpufferban (Thermo Fischer Scientific) futtattam meg 3 µl etídium-bromidot tartalmazó 1,2 %-os agaróz gélben, 80 V-n 25 p-ig.

**4. táblázat.** *A valós idejű PCR általános hőprofilja.*

1.	Kezdeti denaturáció	95 °C	30 másodperc
2. Ciklusszám: 45	Denaturáció	95 °C	10 másodperc
	Anneláció/elongáció	60 °C	20 másodperc
3.Olvadási görbe	Denaturáció	95 °C	15 másodperc
	Reasszociáció	60 °C	1 perc
	Végső extenzió	95 °C	15 másodperc

#### 4.4. CRISPR/Cas9 konstrukciók készítése

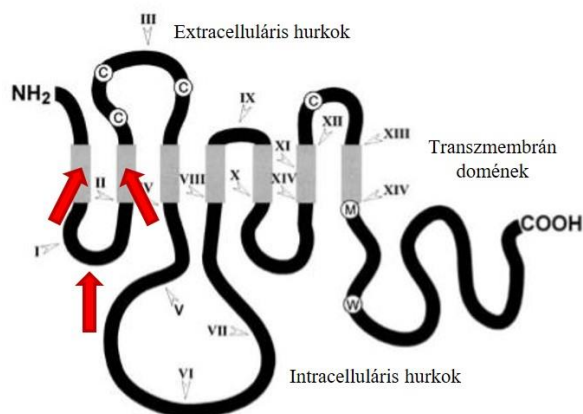
##### 4.4.1. Guide RNS-k megtervezése

A VvMLO géneket, a kódoló régiókat és az mRNS szekvenciákat NCBI GenBank és a padovai egyetem egykori CRIBI adatbázisából (<https://genomes.cribi.unipd.it>) V2.1 annotáció alapján gyűjtöttük ki Winterhagen, Feechan és Oberhollenzer által közölt táblázatokból (Feechan et al., 2008; Oberhollenzer, 2013; Winterhagen et al., 2008). Az összegyűjtött mRNS szekvenciákat NCBI Blast segítségével illesztettük a 12x-s szőlő referenciagenomhoz és V2.1 annotációjú CRIBI genomhoz, illetve a fajtaspecifikus különbségek feltárásához az általunk megszekvenált Furmint genomhoz is. Az MLO, DMR6 aminosavszekvenciákat az Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) adatbázisából kerestük ki. A fehérjék szerkezete alapján olyan doméneket választottunk ki, melyek az MLO, DMR6 működésében lényegesek. A VvDMR6 génhez az adatokat Zeilmaker munkája alapján gyűjtöttük össze (Zeilmaker et al., 2015).

A VvMLO gének guide RNSének megtervezését és Geneious szoftverrel végeztük. A gRNS szekvenciákat 12x szőlő genomra illesztettük. Azokat a gRNS-eket kizártuk, amelyek PAM (protospacer melletti szekvencia) szekvenciája (NGG forward vagy CCN reverz helyzetű) átfedő blast találatokat adott. A szőlőlisztharmat rezisztenciát az MLO 6-7 és az MLO11 és 13 gének célzott csendesítésével tervezünk megvalósítani. Az MLO gén család tagjainak nagyfokú szekvencia hasonlósága megnehezíti a specifikus megcélzást az általunk módosítani kívánt szakasznak. A FuMLO6 és FuMLO7 géneket nem lehet külön megcélzni, ezért a gRNS megtervezésénél lényeges szempont volt, hogy mindkét gént

egyszerre célozzuk meg. A FuMLO11 gén esetében pedig a PAM szekvencia hasonlósága a FuMLO9 génnél nem kívánt off-target hatást okozhat.

Az MLO fehérjék egy egyedi, 7 transzmembrán régióval rendelkeznek. A megfelelő, specifikus módosítási célpont a csendesítéshez az első két transzmembrán domén vagy az első intracelluláris hurok lehet (4.ábra).



**4.ábra**

*Az MLO fehérje felépítése. A nyilak a CRISPR módosítás lehetséges helyeit jelölik. (Panstruga, 2005).*

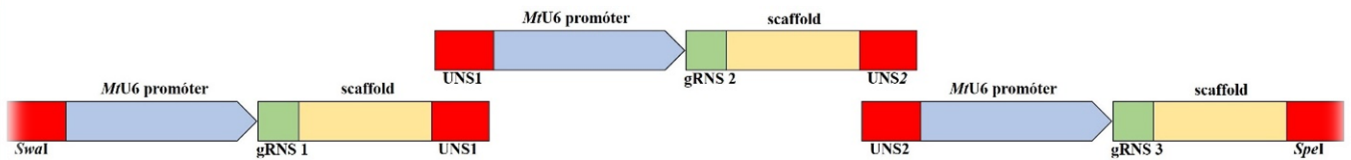
A megtervezett csendesítő konstrukciókat és azok alapvető tulajdonságait az 5. táblázat foglalja össze.

**5. táblázat.** *A CRISPR csendesítésre kiválasztott FuMLO gének és a CRISPR konstrukciók elnevezései. Fu a Furmintot jelenti, EC=extracelluláris , TM=transzmembrán régió.*

Cél gén	Konstrukció	Irányultság
FuMLO11	FuMLO_G14	Sense
FuMLO13	FuMLO_G14	Sense
FuMLO6 és FuMLO7	FuMLO_EC1_3	Antisense
	FuMLO_EC1_3_m7	Antisense
FuDMR6	FuMLO_TM3_1	Sense
	FuDMR6a_G6	Sense
	FuDMR6b_G102	Sense

#### 4.4.2. A CRISPR konstrukciók elkészítése

A CRISPR konstrukciók létrehozásához a pUC gRNA shuttle (Addgene: 47024) és p201N:Cas9 (Addgene: 59175) plazmidokat használtuk fel. A p201N:Cas9 plazmidba az alábbi konstrukció ligálását végeztük el 3 gRNS esetén (MLO6-MLO7) (5.ábra).



**5.ábra**

*A CRISPR/Cas9 konstrukció vázlatos felépítése. A konstitutív expressziót biztosító MtU6 promóter mögött három blokkban a három, FuMLO6 és FuMLO7 géneket egyaránt célzó konstrukció került egybe építésre.*

#### 4.4.3. MtU6 promóter és gRNS scaffold amplitikon előkészítése

##### 4.4.3.1. pUC gRNA shuttle plazmid kivonása és tisztítása

A pUC gRNA shuttle vektort *E.coli*-ban kaptuk a gyártótól, ezért először a baktérium sejteket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB táplevesben, 37 °C-on overnight és 200 rpm-en felszaporítottuk rázó inkubátorban. A plazmidkivonást alkalikus lízissel (miniprep) végeztük az alábbi protokoll alapján:

1. Az üvegcsőben levő baktérium tenyészetet Eppendorf csőbe pipettáztuk át és 30 másodpercig centrifugáltuk 13000 rpm-en, majd a felülúszót leöntöttük és a sejtek feltárásához 100 µl GTE oldatot (0,055 mM glükóz, 25 mM TRIS (pH 8,0), 10 mM EDTA) mértünk, majd a pellet feloldódásáig vortexeltük a mintákat.

2. A mintákhoz 200 µl Solution II oldatot (0,2 M NaOH, 1 %-os SDS) adtunk, majd óvatosan ráztuk a csöveket, amíg nyákossá nem váltak a minták, majd 5 percig jégen inkubáltuk őket.

3. Ezután 150 µl Solution III oldatot (3 M kálium-acetát, 11,5 % ecetsav) pipettáztunk a mintákhoz, majd forgatva kevertük fehér csapadék megjelenéséig a csöveket, majd 5 percig jégen inkubáltuk őket.

4. A mintákat 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót, kb. 400 µl-t egy tiszta Eppendorf csőbe átpipettáztunk és a térfogatával megegyező mennyiségű fenol-CHISAM (1:1) oldatot mértünk hozzá, majd 30 másodpercig vortexeltük. Szobahőmérsékleten 5 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk a mintákat.

5. Tiszta Eppendorf csőbe a felülúszó térfogatához, kb. 300 µl-hez képest 2,5-szeres térfogatú abszolút etanolt, ez esetben 750 µl-t mértünk, majd megforgattuk a mintákat és 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után, 10 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk őket és leöntöttük a felülúszót.

6. 1 ml 70 %-os etanolt mértünk a mintákhoz és 3-4 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk őket, majd leöntöttük a felülúszót és vákuum centrifugával a maradék etanolt eltávolítottuk.

7. 1 µl RNáz A-t tartalmazó 50 µl 1X-es TE puffer oldatot mértünk az egyes pelletet tartalmazó Eppendorff csövekbe, majd 30 percig 37 °C-os vízfürdőben RNáz emésztettük a mintákat.

8. Ezután szobahőmérsékleten short spin centrifugáltuk a mintákat, a plazmidok kicsapásához 30 µl 20 %-os PEG (6000), 2,5 M NaCl oldatot pipettáztunk, majd 60 percig jégen inkubáltuk.

9. Ezután 10 percig 4 °C-on 13000 rpm-en centrifugáltuk a mintákat, majd hirtelen mozdulattal a pelletről leöntöttük a felülúszót. 1 ml 70 %-os alkoholt mértünk a mintákra, majd 3 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk őket. Ezt követően leöntöttük a felülúszót a mintákról és megismételtük az 1 ml 70 %-os alkohollal való mosást és a centrifugálást.

10. Végül 5 percig vákuum centrifugáltuk a mintákat a maradék alkohol eltávolításához és 50 µl steril, nukleáz mentes vízben feloldottuk a kivont plazmid DNS-t.

#### 4.4.3.2. *MtU6 és a scaffold régió amplifikálása PCR reakcióval a kivont pUC gRNA shuttle vektorból*

Az 50 µl-es PCR reakcióhoz *MtU6* felszaporítása során 0,5 µl 1 ng/µl plazmidot pipettáztunk a 10 µl 5× töménységű Phusion High Fidelity puffert, 1 µl 10 mM dNTP mixet, 2,5 µl 10 µM *MtU6* forward primert (5'-ATGCCTATCTTATATGATCAATGAGG-3'), 2,5 µl 10 µM *MtU6* reverse primert (5'-AAGCCTACTGGTTCGCTTGAAG-3'), 0,5 µl 2 U/µl Phusion Hot Start II High-Fidelity DNS polimerázt és 33 µl steril nukleáz mentes vizet tartalmazó PCR csövekbe. A PCR reakció 6. táblázatban látható.

**6. táblázat.** *MtU6 régió PCR hőprofilja.*

1.	Kezdeti denaturáció	98 °C	1 perc
2. Ciklusszám: 35	Denaturáció	98 °C	10 másodperc
	Anneláció	61 °C	20 másodperc
	Elongáció	72 °C	30 másodperc
3.	Végső extenzió	72 °C	7 perc

A scaffold szakaszt nem sikerült Phusion polimerázzal felszaporítani, ezért KAPA HiFi HotStart Ready mixet használtunk helyette.

A 30 µl-es PCR reakcióhoz a scaffold régió felszaporítása során 0,9 µl 1 ng/µl plazmidot pipettáztunk a 15 µl 2x töménységű KAPA HiFi HotStart Ready mixbe, 0,9 µl 10 µM scaffold forward primert (5'-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCA-3'), 0,9 µl 10 µM scaffold reverse primert (5'-AAAAAAAGCACCGACTCGGTG-3'), 12,3 µl steril nukleázmentes vizet tartalmazó PCR csövekbe és elvégeztük a PCR reakciót (7. táblázat).

**7. táblázat.** *A scaffold régió felszaporításához alkalmazott PCR reakció hőprofilja.*

1.	Kezdeti denaturáció	95 °C	3 perc
2. Ciklusszám: 25	Denaturáció	98 °C	20 másodperc
	Anneláció	62 °C	20 másodperc
	Elongáció	72 °C	1 perc
3.	Végső extenzió	72 °C	1 perc

A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk el, MtU6 esetén 352 bp; míg Scaffold esetén is a várható 83 bp méretű terméket kaptunk. A promóter PCR termékét kitisztítottuk gélből Zymoclean Gel DNA Recovery Kittel. Scaffoldnál magát a PCR terméket DNA Clean & Concentrator Kittel (Zymo Research). Ezt követően meghatároztuk Nanodrop spektrofotométerrel a DNS-k koncentrációját, MtU6: 19,5 ng/µl, Scaffold: 44.4 ng/µl lett.

#### 4.4.3.3. *MtU6, gRNS és Scaffold szakaszok összeépítése, 5' és 3' túlnyúló végek szintézise MtU6 és Scaffold szakaszokra*

A PCR termékek 0,2 pM oldatát készítettük el a NEBuilder reakcióhoz, ehhez *NeBioCalculator*-t (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/dsdnaamt>) használtunk.

Egy 10 µl-es reakcióhoz NEBuilder® HiFi DNA Assembly-t használtuk, 1-1 µl 0,2 pmol megtisztított *MtU6* és Scaffold PCR termékeket, 1 µl 0,2 pmol gRNS-t (adott DNS oligót), 5 µl 2× töménységű NEBuilder Master Mixet és 2 µl steril bidesztillált vizet mértünk össze, majd 50 °C-on 60 percig inkubáltuk.

A p201-Cas vektorba való ligáláshoz és a gRNS kazetták összekapcsolásához szükséges a túlnyúló végek létrehozása során a PCR reakcióban a FuMLO11\_G14 és FuMLO13\_G14 esetén *SwaI\_MtU6* forward és *SpeI\_Scaffold* reverse primert használtuk. DMR6 gén esetén a két gRNS kazetta összekapcsolásához az alábbi primer párokat használtuk *SwaI\_MtU6* forward és UNS1\_Scaffold reverse primert, illetve UNS1\_MtU6 forward és *SpeI\_Scaffold* reverse primert alkalmaztuk. A FuMLO6\_EC1\_3, FuMLO6\_EC1\_3\_m7, FuMLO6\_TM3\_1 esetén pedig három primer párt külön PCR reakcióban (8. táblázat) használtunk.

A primerek szekvenciái:

*SwaI\_MtU6* forward primer:

(5'-

**GATATTAATCTCTTCGATGAAATTTATGCCTATCTTATATGATCAATGAGG-**  
3'),

UNS1\_Scaffold reverse primer:

(5'-**GAGAATGGATGCGAGTAATGAAAAAAGCACCGACTCGGTG**-3'),

UNS1\_MtU6 forward primer:

(5'-**CATTACTCGCATCCATTCTCATGCCTATCTTATATGATCAATGAGG**-3'),

UNS2\_Scaffold reverse primer:

(5'-**TCCGTCTACGAACTCCAGCAAAAAAAGCACCGACTCGGTG**-3'),

UNS2\_MtU6 forward primer:

(5'-**GCTGGGAGTTCGTAGACGGAATGCCTATCTTATATGATCAATGAGG**-3'),

*SpeI\_Scaffold* reverse primer:

(5'-**GTCATGAATTGTAATACGACTCAAAAAAAGCACCGACTCGGTG**-3').

**8. táblázat.** *A guide RNS-ekhez felhasznált primerek.*

<b>Beépítendő guide RNS-k</b>	<b>Forward primer neve</b>	<b>Reverse primer neve</b>
FuMLO11_G14	<i>SwaI_MtU6F</i>	<i>SpeI_ScaffoldR</i>
FuMLO13_G14	<i>SwaI_MtU6F</i>	<i>SpeI_ScaffoldR</i>
FuDMR6a_G6, FuDMR6b_G102	<i>SwaI_MtU6F1</i> , UNS1_MtU6F2	UNS1_ScaffoldR1, <i>SpeI_ScaffoldR2</i>
FuMLO6_EC1_3, FuMLO6_EC1_3_m7, FuMLO6_TM3_1	<i>SwaI_MtU6F1</i> , UNS1_MtU6F2, UNS2_MtU6F3	UNS1_ScaffoldR1, UNS2_ScaffoldR2 <i>SpeI_ScaffoldR3</i>

A PCR reakció (9. táblázat) során Q5 polimerázt használtunk. Egy 12,5 µl-es PCR reakcióban 1 µl-t mértünk külön reakcióelegyekben a háromféle gRNS kazettából, 0,625 µl-t 10 µM forward primerből, 0,625 µl-t 10 µM reverse primerből, 2,5 µl-t az 5× töménységű Q5 reakció pufferből, 0,25 µl-t dNTP-ből, 0,125 µl-t a Q5 polimerázból és 7,375 µl-t a steril bidesztillált vízből.

**9. táblázat.** *PCR hőprofilja (5' és 3' túlnyúló végek).*

1.	Kezdeti denaturáció	98 °C	30 másodperc
2. Ciklusszám: 25	Denaturáció	98 °C	10 másodperc
	Anneláció	63 °C	20 másodperc
	Elongáció	72 °C	1 perc
3.	Végső extenzió	72 °C	2 perc

A PCR termékek minőségét és méretét gélelektroforézissel ellenőriztük, a várt, 495 bp méretű termékeket kaptunk, mely a 3' túlnyúló vég (~20 bp) + MtU6 (352 bp) + gRNS (20 bp) + Scaffold (83 bp) + 5' túlnyúló végből (~20 bp) állt össze.

#### 4.4.3.4. *p201N:Cas9 plazmid kivonása és tisztítása, linearizálása és ismételt tisztítása*

A p201N:Cas9 vektort is *E.coli*-ban kaptuk a gyártótól, ezért először a baktérium sejteket 50 µg/ml kanamicint tartalmazó LB táplevesben, 37 °C-on overnight és 200 rpm-en felszaporítottuk rázó inkubátorban.



A plazmidkivonást alkalikus lízissel (miniprep) végeztük a feljebb említett protokoll alapján. Ezután a kivont plazmidot Zymoclean Gel DNA Recovery Kittel (Zymo Research) tovább tisztítottuk. Plazmid DNS koncentrációját Nanodrop spektrofotométer segítségével meghatároztuk, mely 726,5 ng/μl lett.

A linearizálás a ligálási reakcióhoz szükséges, p201N:Cas9 plazmidot *SwaI* hasítóhelynél nyitottuk fel. Ehhez egy 20 μl-es reakcióba 1 μl *SwaI* (10,000 U/ml) restriktív endonukleázt (<https://www.neb.com/products/r0604-swai>), 2 μl 10× töménységű NEBuffer 3.1-t, 12,87 μl bidesztillált vizet és 4,18 μl tisztított plazmidot vagyis 3 μg mennyiséget mértünk és 25 °C-on 180 percig inkubáltuk. Ezután gélelektroforézissel ellenőriztük a hasítás eredményességét.

A *SwaI* emésztett plazmidot a PCR & DNA Clean-up kittel (Monarch NEB) tisztítottuk ki agaróz gélből.

A plazmid másodlagos emésztését *SpeI* enzimmel végeztük (<https://www.neb.com/products/r0133-spei>). Ehhez 20 μl-es reakcióban 1 μl 20000 U/ml *SpeI* HF enzimet, 2 μl 10× töménységű Cutsmart puffert és 17 μl *SwaI* emésztett, tisztított plazmidot mértünk össze, majd 37 °C-on 120 percig inkubáltuk.

#### 4.4.3.5. Ligálás és transzformáció *E.coli* 10-béta törzsébe, kolónia PCR

Az inzerjeinket a már túlnyúló végekkel rendelkező MtU6 promotor, gRNS, scaffold alkotta vagyis maga a gRNS kazetta.

Az 5 μl-es ligálási reakcióban 2,5 μl 2× töménységű NEBuilder Master mixhez megfelelő térfogatú steril bidesztillált vizet és 50 ng anyagmennyiségnek megfelelő p201N-Cas9 linearizált plazmidhoz 1 μl egyféle inzeret illetve inzerkeveréket mértünk, mivel DMR6 esetén kettő, MLO6 esetén három gRNS kazettánk volt. 50 °C-on 60 percig inkubáltuk.

A transzformálást a High Efficiency Transformation Protocol (C2987H/C2987I) (NEB) alapján végeztük, azonban *E.coli* 5 alfa törzse helyett 10-béta törzsszel dolgoztunk, mivel ez alkalmas nagyobb méretű plazmidokhoz. 50 μg/ml kanamicint tartalmazó LB táptalajokra szélesztettünk a ligátumból 20 illetve 200 μl-ket.

Kiválasztottunk mind a négyféle konstrukcióból több CFU-t is a kolónia PCR-hez, melyeket steril pipettaheggyel emeltünk át a 0,5 μl 10 μM Ubi3P218R (5'-ACATGCACCTAATTTCACTAGATGT-3') forward primerből, 0,5 μl 10 μM P201R (5'-GTGATCGATTACCCTGTTATCCCTAG-3') reverz primerből, 0,5 μl MgCl<sub>2</sub>-ből, 1,25 μl

10× töménységű (Cl) pufferből, 0,25 µl dNTP-ből, 0,08 µl HotStartTaq DNS polimerázból (Quiagen) és 8,92 µl steril bidesztillált vízből álló 12 µl PCR reakcióelegyet tartalmazó csövekbe, majd elvégeztük a kolónia PCR-t (10. táblázat).

**10. táblázat.** *Kolónia PCR hőprofilja.*

1.	Kezdeti denaturáció	95 °C	5 perc
2. Ciklusszám: 25	Denaturáció	95 °C	50 másodperc
	Anneláció	60 °C	20 másodperc
	Elongáció	72 °C	1,5 perc
3.	Végső extenzió	72 °C	5 perc

Ezután gélelektroforézissel megkerestük a megfelelő mérettartományba eső klónokat, egy inzert esetén 764 bp, két inzertnél 1238 bp, három inzertnél 1792 bp méretű termékek jelezték a feltételezhetően sikeres ligálási reakciót. A megfelelő klónokat steril pipettahegy segítségével átoltottuk kanamicint tartalmazó LB táptalajokra, illetve 3 ml 50 µg/ml kanamicint tartalmazó LB táplevesbe, majd 37 °C-on 250 rpm-en inkubáltuk overnight rázógépből.

#### 4.4.3.6. Plazmid kivonás és emésztés

62 µl inzerteket tartalmazó p201N-Cas9 plazmidot Plasmid Miniprep Kittel (GenElute) vontuk és tisztítottuk ki, majd a koncentrációjukat Nanodrop spektrofotométer segítségével ellenőriztük. A rekombináns DNS-eket *AscI* (<https://www.neb.com/products/r0558-asci>) és *NcoI* (<https://www.neb.com/products/r0193-ncoi>) restriktív endonuklázokkal hasítottuk. A p201N:Cas9 vektornak két *AscI* és egy *NcoI* hasítási helye van, ezért három fragmentet kapunk sikeres enzimátikus emésztést követően.

20 µl-es reakcióban 1000 ng tisztított plazmidot hígítunk ki steril bidesztillált vízzel, melyhez 2 µl 10× töménységű CutSmart NEB puffert és 0,5-0,5 µl 10000 U/ml *AscI* és 20000 U/ml *NcoI* HF enzimet mértünk és 37 °C-on 30 percig inkubáltuk.

Gélelektroforézissel ellenőriztük, hogy az adott klónok a megfelelő méretű gRNS kazettát tartalmaznak-e. Az *AscI* által két, egy 4750 bp és egy 7950 bp darabot kapunk inzert nélkül a plazmidból. Az *NcoI* pedig egy 1600 bp vektor szakaszon kívül az adott méretű

gRNS kazettával együtti darabot eredményez. Ez egy gRNS kazetta esetén összesen 1950 bp, kettő esetén 2450 bp, három esetén pedig 2950 bp.

#### 4.4.3.7. Szekvenciaanalízis és a CRISPR konstrukciók felszaporítása, tárolása

Az esetleges mutációk kizárására Sanger szekvenálásra elküldtük a kiválasztott klónokat. Az egy és két gRNS kazettát tartalmazó plazmidok esetén a p201R, három gRNS kazetta esetén külön reakciókban a p201R (5'-CGCGCCGAATTCTAGTGATCG-3') és az UNS2R (5'-GTCTACGAACTCCCAGC-3') szekvenáló primereket mértük a reakcióba. A szekvenálást a Microsynth Austria GmbH végezte ([www.microsynth.at](http://www.microsynth.at)). A szekvenált klónok nukleinsav illesztését Geneious szoftverrel (<https://www.geneious.com>) végeztük.

3 ml 50 µg/ml kanamicint tartalmazó LB táplevest mértem Falcon csövekbe a szekvenancia minőségellenőrzésen átesett megfelelő klónokkal és overnight felszaporítottam 37 °C-on, 220 rpm-n rázatóban őket. 500 µl sejtet tettem el 500 µl 40%-os glicerinnel oldatba kriocsövekben, majd -80 °C-os hűtőben tároltuk őket.

## 4.5. Embriogén kallusz indukció és felszaporítás Furmint levélből

### 4.5.1. Kísérleti növények

Az embriogén kallusz indukcióhoz *Vitis vinifera* cv. 'Furmint' portokokat és leveleket használtunk fel. A szőlővirágzatokat 2019. június 7-én, közvetlenül virágzás előtt gyűjtöttük be egy Bicskén található ültetvényről (GPS: 47°28'21.3"N 18°41'03.2"E). A levelek a kecskeméti NAIK Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetétől kaptak *in vitro* Furmintról származtak.

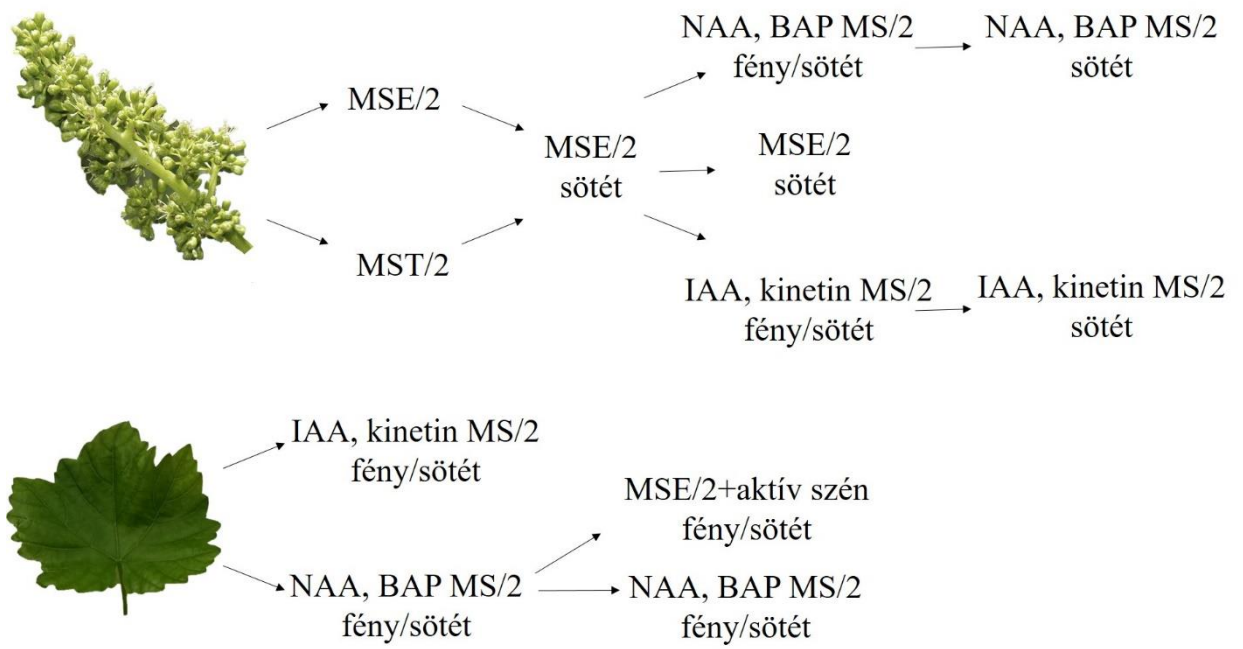
A szőlővirágzatokat 7 napig, 4 °C-on hűtőben tároltuk, majd 70 %-os alkoholban 30 mp-ig és 0,6%-os NaOCl oldatban 10 percig fertőtlenítettük őket, végül háromszoros steril desztillált vizes mosást kaptak. Steril csipesszel és szikével a virágzatban lévő portokokat kipreparáltuk és megvizsgáltuk a fejlettségi állapotukat. Mindegyik virágzathoz származó portokok IV. stádiumú állapotban voltak (Gribaudo et al., 2007). A Furmint portokok embriogén kapacitását MSE/2 és MST/2 táptalajokon teszteltük Oláh és munkatársai alapján (Oláh et al., 2009). A táptalajt tartalmazó Petri-csészékbe 40-50 db portok került 5 ismétlésben, majd 22±2 °C-on sötétben inkubáltuk őket.

2019. december 10-én az in vitro Furmintról steril olló és csipesz segítségével vágtuk le a legfelső három, legfiatalabb levelet, majd szikével daraboltuk fel őket szűrőpapíron steril körülmények között. A levéllemezeket körbe vágtuk, majd úgy daraboltuk fel, hogy levéleret tartalmazzon mindegyik 0,5-1 cm-es nagyságú levéldarab. A levéldarabokat fonáki oldallal lefelé 1-naftil-ecetsavat és 6-benzilaminopurint tartalmazó ½ MS táptalajra és indolecetsav, kinetin tartalmú ½ MS táptalajon indítottuk el Polyflux XL 36 W és Tunggram F7 Daylight 36 W megvilágításon 16 órás, sötétben 8 órás fotoperiódusban, 22+/-2 °C-os hőmérsékleten.

#### 4.5.2. Felhasznált táptalajok

A kísérlet során MS alapú táptalajt használtunk (Murashige és Skoog), melyek fele koncentrációban tartalmazták a makroelemeket az eredeti táptalaj recepthez képest 20 g/l szacharózzal és 7 g/l Oxoid agarral (pH 5,7-5,8), illetve cefotaximot is adtunk a táptalajhoz. Összesen 4 különböző hormon összetételű táptalajt készítettünk (6.ábra).

Az 1) MSE táptalaj (Mozsár és Süle, 1994) 1,1 mg/l 2,4-D-t és 0,1 mg/l BAP-t, az 2) MST táptalaj (Oláh et al., 2003) 1,1 mg/l 2,4-D-t és 0,05 mg/l TDZ-t tartalmazott. Az 3) MS/2 NAA, BAP táptalajok 0,5 mg/l NAA-t, 4 mg/l BAP-t, míg az 4) MS/2 IAA, kinetin tartalmú táptalajok 0,5 mg/l IAA-t és 1,5 mg/l kinetint. Az aktív szénrel kiegészített táptalajokban 0,05 g/l koncentrációban volt aktív szén Thomas munkássága alapján (Thomas, 2008). Az utóbbi két táptalajban az MSE/2 táptalajhoz képest a Fe-EDTA koncentrációja 35,5 mg/l-ről 10,75 mg/l-re csökkentettük, a szacharóz 20 g/l-ről 30 g/l-re emeltük, fitoagar 7 g/l-ről 6 g/l-re csökkentettük és 8 helyett 5 féle vitamint tettünk bele, melyek a thiamin, biotin, Ca-pantotenát, nikotinsav, piridoxin voltak. A 8 féle vitamin közül a riboflavint hagytuk ki, mivel gátolhatja a kallusz képződést (Drew, 1987; Gruselle és Boxus, 1990), ezen kívül szintén elhagytuk a folsavat és a p-aminobenzoesavat. A thiamin mennyiségét is jelentősen növeltük, 0,4 mg/l-ről 10 mg/l-re, nikotinsav 0,4 mg/l-ről 1 mg/l-re, a piridoxin 0,4 mg/l 1 mg/l-re, biotin 0,002 mg/l-ről 0,01 mg/l-re, a Ca-pantotenát pedig 0,4 mg/L-ről 1 mg/l-re., mivel a fászszerűeknek magasabb mennyiségben szükségesek. A BAP mennyiségét 0,1 mg/l-ről 4 mg/l-re emeltük meg a differenciáció elősegítése céljából.



**6.ábra**

*Portok és levél kallusz indukcióhoz felhasznált táptalajok.*

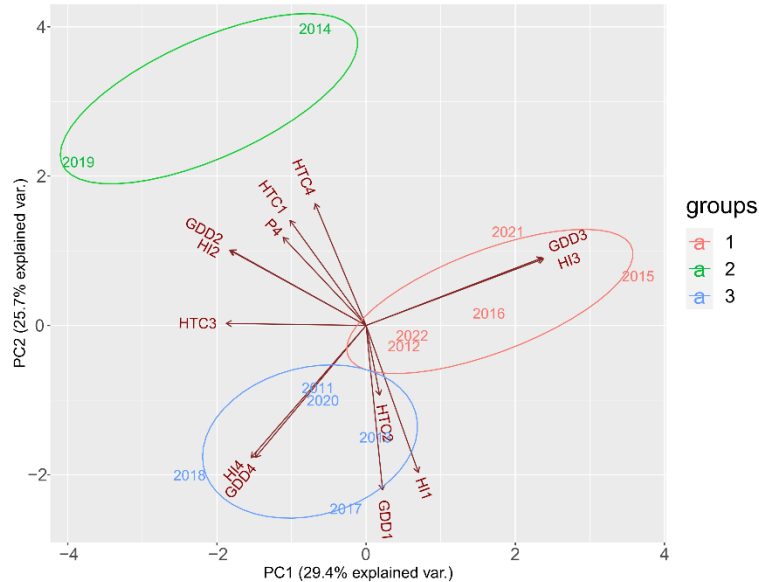


## 5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 5.1. Botritisz ellenállóság vizsgálata szabadföldi 'Juhfark' ültetvényben

Az elmúlt években a klímaváltozással járó változó környezeti feltételek hatása hazánkban is egyre jobban megnyilvánult. Ennek eredményeként az őshonos magyar szőlő fajták toleranciájának csökkenése volt megfigyelhető, amely például a 'Juhfark' szürkerothadásra való fokozott fogékonyságában is megmutatkozott. A MATE Badacsonyi Szőlészeti és Borászati Kutatóállomásán a 'Juhfark' klónszelekció célja az volt, hogy a termés lazább fűrtű legyen, ezáltal kevésbé legyen érzékeny botrítiszre.

A klonális különbségek mértékét az adott évjárat hatása sokszor felülmúlja, így kifejezetten nehéz több éves adatsorokból az évjárat és a klonális különbségek hatását szétválasztani. Ennek a problémának a kiköszöbölésére minden év fenofázisainak meteorológiai adatai alapján átlag csoportképzéssel az éveket 3 csoportba soroltuk. Az első csoportba 2012, 2015, 2016, 2021 és 2022; második csoportba 2014, 2019; míg a harmadik csoportba 2011, 2013, 2017, 2018 és 2020 tartozott (7.ábra).



7.ábra

*K-érték alapján történő csoportosítás és az évjáratok főkomponens analízise. A főkomponens analízisben a klimatikus index száma a rügyfakadástól virágzásig az 1-es szám, virágzás alatt 2-es, virágzás vége és zsendülés között 3-as, zsendülés és érés között 4-es szám értéket kapta.*

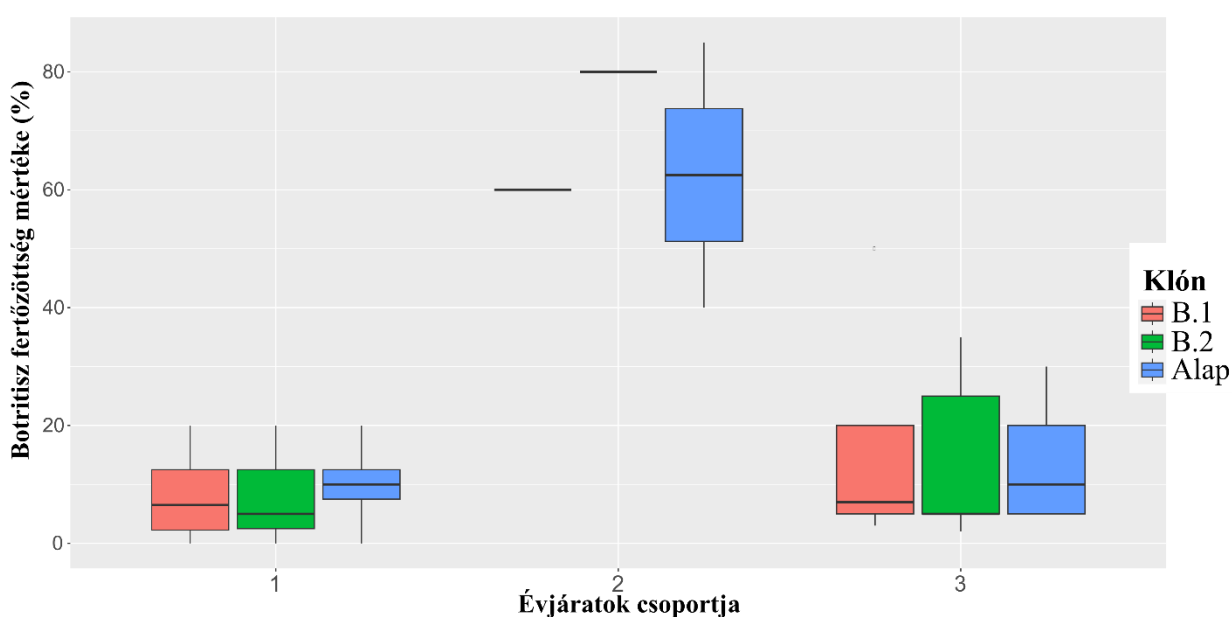
**11. táblázat.** *Juhfark 2011-2021 közötti termés hozama és Botrytis fertőzöttsége. .B.1. és B.2. 'Juhfark' klónok. Base=alap fajta NA=nincs adat (termésvesztés madarak miatt)*

Klón	Év	Ternéshozam	Botrytis fertőzöttség
		kg/m <sup>2</sup>	%
B.1.	2011	0,28	50
B.2.	2011	0,64	35
Base	2011	0,87	30
B.1.	2012	1,38	0
B.2.	2012	1,34	0
Base	2012	1,06	0
B.1.	2013	1,35	3
B.2.	2013	1,56	2
Base	2013	1,08	5
B.1.	2014	0,73	60
B.2.	2014	0,21	80
Base	2014	0,21	85
B.1.	2015	1,01	3
B.2.	2015	1,21	5
Base	2015	1,46	10
B.1.	2017	1,31	5
B.2.	2017	1,28	5
Base	2017	1,57	5
B.1.	2018	2,26	7
B.2.	2018	1,99	5
Base	2018	2,02	10
B.1.	2019	NA	NA
B.2.	2019	NA	NA
Base	2019	1,43	40
B.1.	2020	1,01	20
B.2.	2020	1,06	25
Base	2020	1,55	20
B.1.	2021	1,12	20
B.2.	2021	1,09	20
Base	2021	1,48	20
B.1.	2022	0,96	10
B.2.	2022	NA	NA
Base	2022	2,25	10
B.1.	2011-2022	1,16	17,8
B.2.	2011-2022	1,15	19,67
Base	2011-2022	1,36	21,36
Átlag	-	1,23	19,67



A PC1 és PC2 főkomponensek a teljes variancia 29,4% és 25,4%-át magyarázták az évjárat csoportok között 'Juhfark' fajt fenofázisainak tekintetében. Az évjárat csoportok egyértelműen elkülöníthetőek.

A szürkerothadás fertőzöttséget (%) vizuális becslés alapján követtük nyomon. A 'Juhfark' fajta 2011 és 2022 közötti 11 éves monitorozása során, 2016-ban az ültetvényt madárkár sújtotta olyan mértékben, hogy nem lehetett megfelelő minőségű szőlőt találni. 2019-ben csak a 'Juhfark' alapfajta, míg 2022-ben csak a B.1. klón és az alapültetvényben levő szőlőket lehetett kiértékelni.



**8.ábra**

*A Botrytis fertőzöttség mértéke (%) egyes évjáratcsoportokban a standard 'Juhfark' fajta és a B.1. és B.2. klónokkal összehasonlítva.*

'Juhfark' átlagos terméshozama 1,23 kg/m<sup>2</sup> 10 év alatt, amely egy őshonos fajtánál jó eredménynek minősül és a gazdasági elvárás felett van. Termésmennyiség tekintetében nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a klónok vagy az évjárat csoportok között.

A botritisz fertőzöttség átlagos mértéke az évek során 19,67% volt, amely magas értéknek számít és a fajtára jellemző. Szignifikáns különbségek csak a botritisz sújtotta évjárat csoportok között volt. A legtöbb évben a szürkerothadás mértéke alacsonyabb volt a klónokban az alapfajtaéhoz képest, kifejezetten az évjárat csoportokban, amelyben a teljes rothadás elég alacsony volt (1 és 3 évjárat csoport). Az átlagos fertőzöttség mértéke

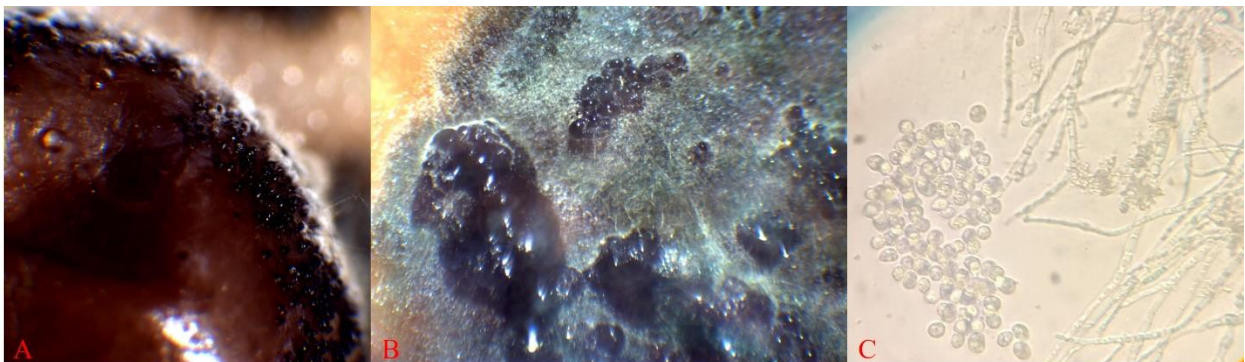
alacsonyabb volt a B.1. klónban az alapfajtához képest minden évjárat csoportban, azonban ez a különbség statisztikailag nem alátámasztható (8.ábra).

## 5.2. A feketerothadás és a sztilbének kapcsolata

A szőlőben a sztilbén szintek és a gombás megbetegedésekkel szembeni ellenállóság összefüggő kapcsolatát feltételezik (Viret et al., 2018). A feketerothadás kórokozójával való fertőzésnek a szőlő sztilbén tartalmára kifejtett hatását eddig még nem vizsgálták.

### 5.2.1. Feketerothadás kórokozó fertőzőképességének ellenőrzése

A 81 napig -80C-on tárolt *Phyllosticta ampellicida* izolátum életképességét és patogenitását Furmint zöldbogyón és a zöldbogyó levét tartalmazó zabtáptalajon teszteltük. 10 nappal a fertőzést követően a bogyó nedvességét veszítette és teljesen ellepte a gomba fekete telepe, fehér gombafonalakkal átszőve. A táptalajra oltott gombatelepeken pedig fehér, tejszerű nedv képződött, melyet fénymikroszkóppal megvizsgálva, intenzív spóráképződést volt látható (9.ábra).



**9.ábra**

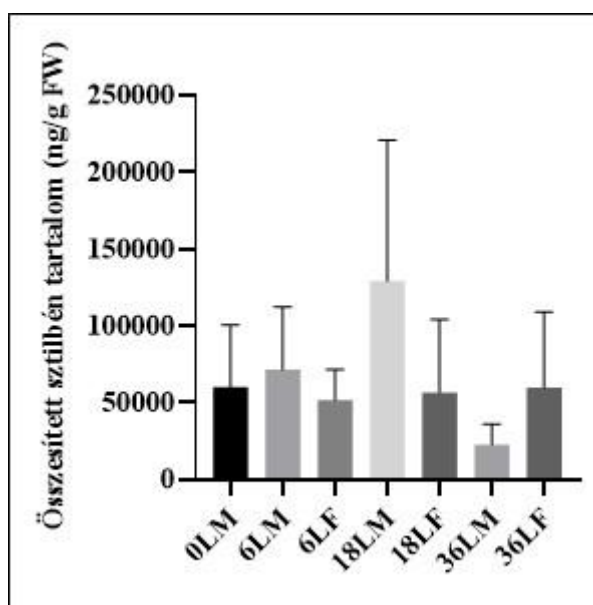
*Az A ábrán a fertőzött bogyón lévő fekete telepek láthatóak fehér gombaszövedékkel 10 nappal a fertőzés után 10× nagyítás, sztereomikroszkóp, a B ábrán zabtáptalajon a sporuláló 57 napja tenyésztett gombatelepek, 20× nagyítás, sztereomikroszkóp, a C ábrán spórák és hifaszövedék a táptalajon lévő 57 napos tenyészetről, 40× nagyítás, fénymikroszkóp.*

A sztilbén mérésre szánt növények fertőzését követően 14 nappal pedig megjelent a fogékony 'Csaba gyöngye' fajta levelein is tünet, amely szintén alátámasztotta a gombaizolátum fertőzőképességét.

5.2.2. A feketerothadás fertőzés hatása a sztilbén szintekre tenyészedényes kísérletben 'Csillám' és 'Csaba gyöngye' fajtán

A feketerothadás fertőzés sztilbén szintekre való hatását az ellenálló 'Csillám' és a fogékony 'Csaba gyöngye' fajtákban vizsgáltuk. A legfelső, kisméretű levelekkel dolgoztunk. Az összesített sztilbének szintjében különbség volt a szabadföldi kísérlethez képest abban, hogy kevesebb sztilbén típust vizsgáltunk (transz-rezveratrol, cisz-rezveratrol, transz-piceid, cisz-piceid, transz-pterosztilbén, transz- $\epsilon$ -viniferin, cisz- $\epsilon$ -viniferin).

A 'Csillám' mock és a fertőzött levelek között a sztilbén szintben nem volt szignifikáns a különbség Kruskal-Wallis teszt alapján  $p=0,2820$  volt (10.ábra).



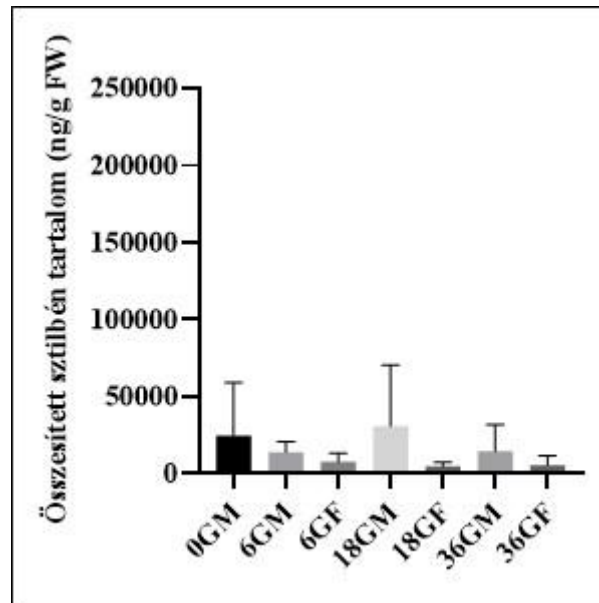
**10.ábra**

*Az összesített sztilbén szintek a 0 hpi, 6 hpi, 18 hpi, 36 hpi mock és BR fertőzött 'Csillám' levelekben.*

A 'Csillám' fajta esetében a kezdeti 0 hpi időpontban azonban 59813 ng/g FW átlagos összesített sztilbén szintet mértünk, amely a szabadföldi mintákhoz képest (9489 ng/g FW) 6,3× magasabb volt. Annak ellenére, hogy kevesebb sztilbén típust vizsgáltunk, mégis magasabb összesített sztilbén mennyiséget tapasztaltunk laboratóriumi körülmények között vizsgált növényekben.

'Csaba gyöngye' fajtában a mock és a fertőzött levelek között a sztlbén szintben nem volt szignifikáns a különbség Kruskal-Wallis teszt alapján ( $p=0,2820$ ) (11.ábra).

A 'Csaba gyöngyé'-ben alacsonyabb volt a sztlbének szintje az összes időpontban és mintában a Csillámhoz képest. A 0 hpi időpontban a Csaba gyöngyében átlagosan 24454 ng/g FW, míg Csillámban  $2,4\times$  magasabb sztlbén szintet mértünk. A Csillámhoz hasonlóan 'Csaba gyöngye' esetében a szabadföldihez képest, a sztlbének szintje  $2,2\times$  magasabb volt laboratóriumi körülmények között.

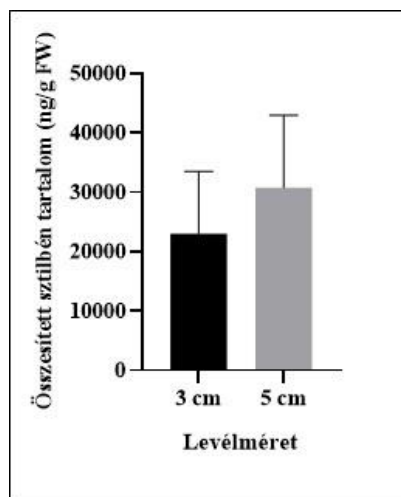


**11.ábra**

*Az összesített sztlbén szintek a 0 hpi, 6 hpi, 18 hpi, 36 hpi mock és BR fertőzött Csaba gyöngye levelekben.*

### 5.2.3. A sztlbéntartalom és a levélméret összefüggése szabadföldi minták alapján

Az általunk vizsgált fajták fiatal, kisméretű levelei kevesebb sztlbént tartalmaztak, mint az idősebbek szabadföldi körülmények között. A kétféle levélméret sztlbén tartalma között páros t-próba alapján szignifikáns ( $p=0,0006$ ,  $df=14$ ) volt a különbség ( $p<0,05$ ) megbízhatósági szinten (12.ábra).



**12.ábra**

A kis („3 cm”) és nagy („5 cm”) méretű levelek összesített sztilbén tartalma

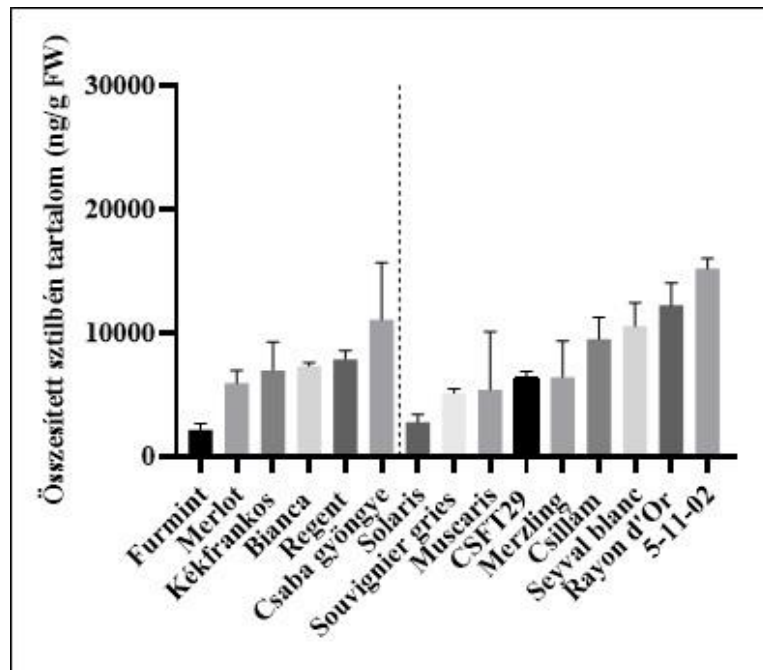
Az eltérő levélméretekből származó különböző sztilbén szintek miatt külön vizsgáltuk tovább a kisméretű és nagyméretű levelek sztilbén szintjeit. A kisméretű levelek esetén Kruskal-Wallis teszt alapján szignifikáns volt ( $p=0,0024$ ) a különbség az egyes fajták sztilbén tartalmában ( $p<0,05$ ) megbízhatósági szinten.

5.2.4. A feketerothadással szemben ellenálló és arra fogékony fajták és genotípusok leveleinek sztilbén tartalma

*Vitis vinifera* cv. 'Furmint' fajtában volt a legalacsonyabb (átlag 2156 ng/g FW és 2944 ng/g FW) az összesített sztilbén szint kis és nagyméretű levelek vizsgálatánál is egyaránt, de a feketerothadás, lisztharmat és peronoszpóra rezisztens *Vitis vinifera* cv. 'Solaris' és a 'Souvignier gries' is meglepően alacsony sztilbén szinttel rendelkezett mindkét levélméretnél. A fogékony 'Furmint'-hoz képest csupán 1,3× magasabb a 'Solaris' és 2,4× a 'Souvignier gries' sztilbén szintje a kisméretű levelekben (13.ábra).

A kis levélméretű 'Csillám'-nál magasabb lett a 'Csaba gyöngye' sztilbén szintje, viszont nem volt szignifikáns a különbség közöttük páratlan t teszt alapján ( $p=0,6062$ ) ( $p<0,05$ ) megbízhatósági szinten. A nagy levélméretű 'Csillám'-nál viszont alacsonyabb lett a 'Csaba gyöngye' sztilbén szintje, Mann Whitney teszt alapján  $p=0,4000$  viszont ez sem szignifikáns eltérés. A legalacsonyabb sztilbén szinteket tanulmányozva, a nagyméretű levelek esetén a fogékony 'Furmint'-hoz képest 1,6× magasabb volt az átlag sztilbén szint az ellenálló 'Solaris'-ban, míg a fogékony 'Kékfrankos'-ban 1,7×-es különbség. A legmagasabb sztilbén szintek mindkét levélméretnél (átlag 15180 és 17108,5 ng/g FW) egy

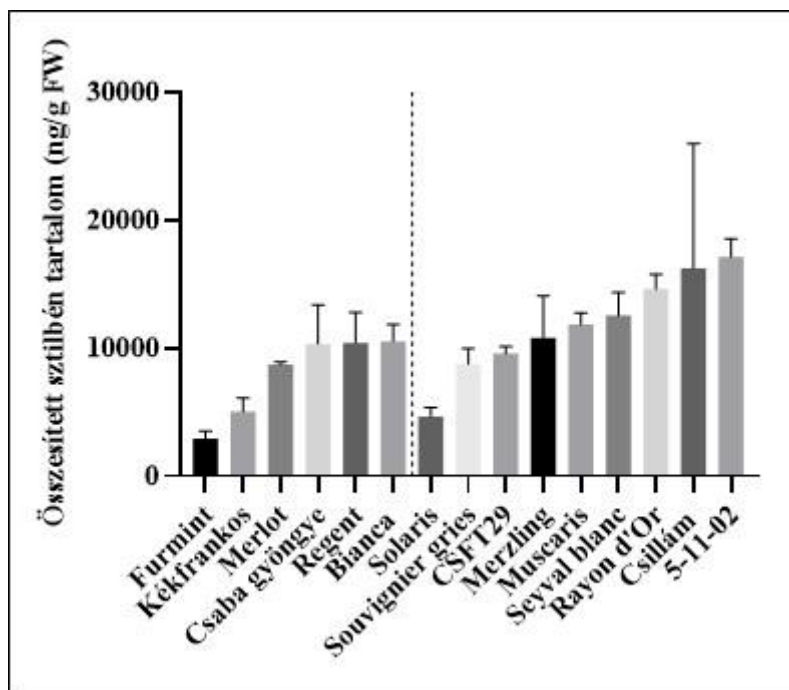
*Vitis amurensis* F2 hibridnél volt látható. A 'Rayon d'Or' szülővel rendelkező 'CSFT29' (6378,9 ng/g FW) és 'Rayon d'Or' nagyszülőjű 'Merzling'-ben (6414,4 ng/g FW) szinte megegyezett az összesített sztilbén szintek átlaga.



**13.ábra**

*A kis méretű („3 cm”) levelek és az általunk mért összesített sztilbén szintek a különböző szőlő fajtákban. A szaggatott vonaltól jobbra a feketerothadásra rezisztens, míg balra a fogékony fajtákat jelöltük.*

A nagyméretű levelek esetén Kruskal-Wallis teszt alapján szignifikáns volt ( $p=0,0016$ ) a különbség az egyes fajták sztilbén tartalmában ( $p<0,05$ ) megbízhatósági szinten (14.ábra).

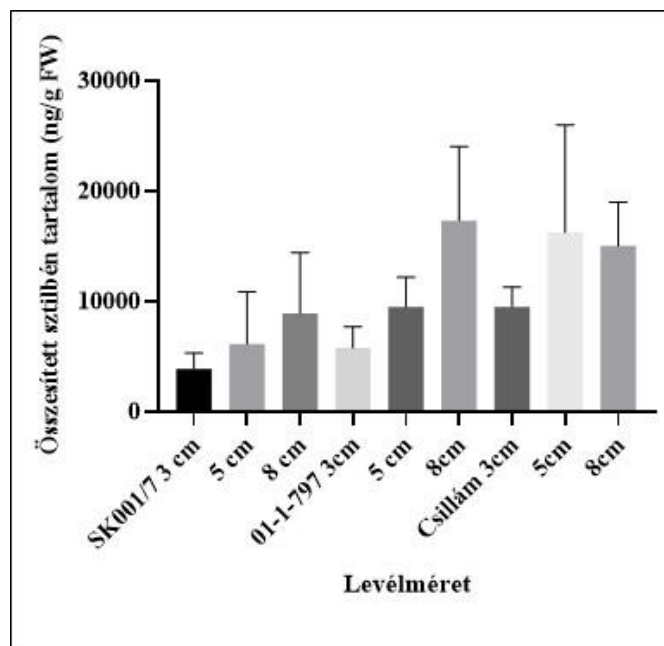


**14.ábra**

*Az összesített sztilbén tartalom különböző szőlőfajták nagy méretű („5 cm”) leveleiben. A szaggatott vonaltól jobbra a feketetrohadásra rezisztens, míg balra a fogékony fajtákat jelöltük.*

#### 5.2.5. Sztilbén szintek a feketetrohadás ellenállóságra hasadó nemzedék leveleiben

Bizonyos fajtáknál, mint a 'Csillám', 'SK001/7', '01-1-797' megvizsgáltuk a kisméretű, nagyméretű és a még idősebb (7,5 cm-nél nagyobb) leveleket is (15.ábra), mivel a Csillám × SK001/7 és a Csillám × 01-1-797 szegregációs populációjában is vizsgáltunk hibrideket. A szülő fajtákat vizsgálva pedig az SK001/7-nél ( $p=0,3393$ ) nem szignifikáns, '01-1-797'-nél ( $p=0,0425$ ) szignifikáns, míg 'Csillám'-ban ( $p=0,1679$ ) nem jelentős a sztilbén szintek különbsége a levélméreteket összehasonlítva (15.ábra).



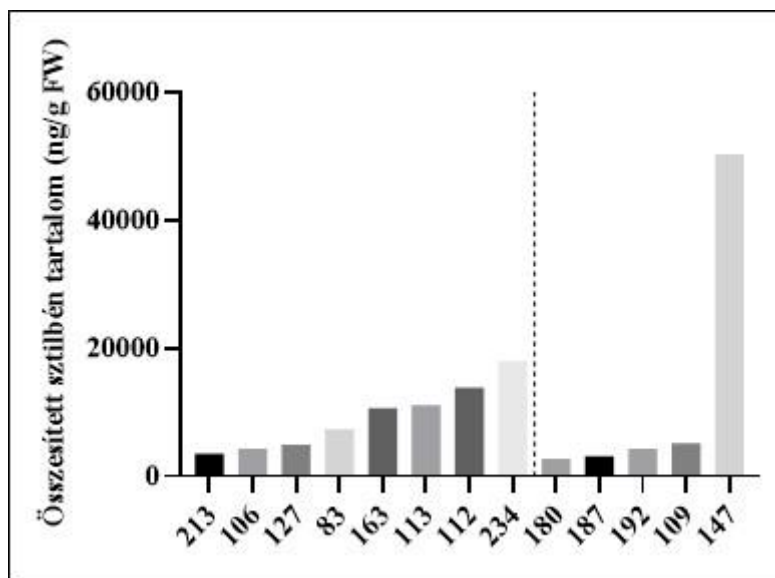
**15.ábra**

*A levélméretek és a sztilbén szint a hasadó nemzedék szüleiben.*

A szülők kisméretű leveleinek összesített sztilbén tartalma között Kruskal-Wallis teszt alapján nem volt számottevő a különbség ( $p=0,0857$ ), nagy levelek esetén még kevésbé ( $p=0,3821$ ) és a még idősebb, még nagyobb méretű leveleknél egytényezős ANOVA teszt alapján ( $p=0,2328$ ) sem volt szignifikáns a különbség 95%-os megbízhatósági szinten a sztilbén szintekben.

A hibridek közül a 109,147,180,187 és 192 BR ellenállók. A kis levél esetén a hibridek között a legalacsonyabb sztilbén szinttel a BR rezisztens 180 és 187-es hibrid rendelkezett, 2713 ng/g FW, 3123 ng/g FW sztilbéntartalmuk volt (16.ábra). Azonban a legmagasabb sztilbén tartalma a szintén BR rezisztens 147-es hibridnek volt (50284 ng/g FW). A 147-es hibrid így felülmúlta a SK001/7 (3836,5 ng/g FW) és a BR rezisztens Csillám (9489 ng/g FW) szülőit.





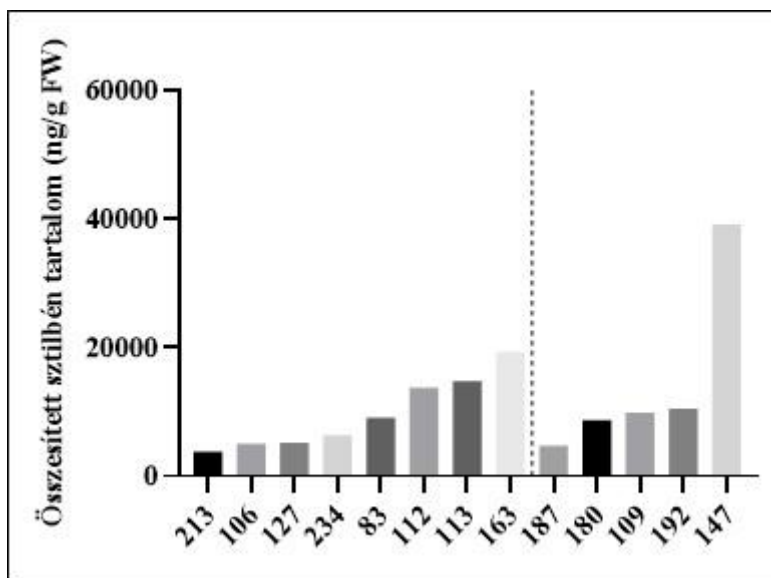
**16.ábra**

*A hasadó nemzedék hibridjeinek sztilbén tartalma kis („3 cm”) levélben. A szaggatott vonaltól jobbra a feketerothadásra rezisztens, míg balra a fogékony fajtákat jelöltük.*

A nagy levél tanulmányozása során a hibridek között a legalacsonyabb sztilbén szinttel a 213-as, a BR fogékony hibrid rendelkezett (3835 ng/g FW), viszont továbbra is a BR ellenálló 147-es utód lett a legmagasabb (39248 ng/g FW) sztilbén szintű a hibridek közül (17.ábra).

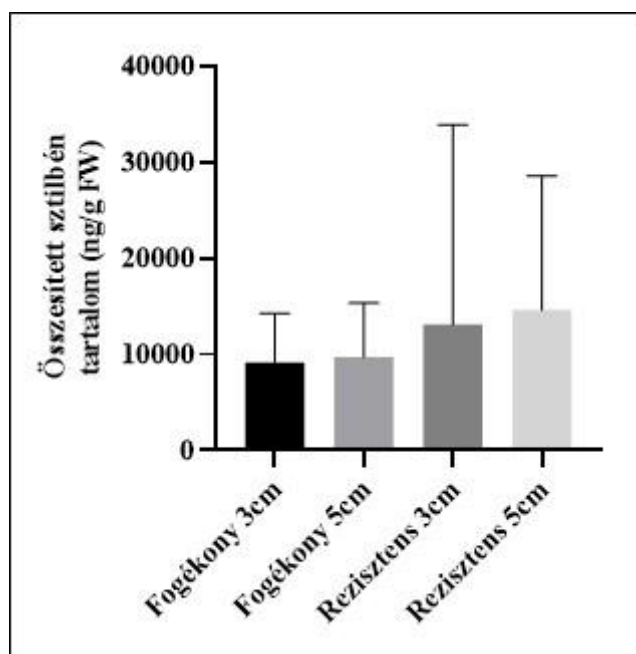
Ha összehasonlítjuk a rezisztens hibridek és a fogékonyak kis leveleit, akkor Mann-Whitney teszt alapján nem volt különbség a csoportok között ( $p=0,3543$ ), ez nagyméretű leveleknél is igaz ( $p=0,7242$ ) volt.

Mann-Whitney teszt alapján nem volt szignifikáns ( $p=0,3543$ ) a különbség a feketerothadás ellenálló és fogékony hibridek között ( $p<0,05$ ) a „3 cm”-es leveleknél, de ez a az „5 cm-es” leveleknél ( $p=0,7242$ ) is látható volt a sztilbén szintekben (18.ábra). Mindezek alapján a rezisztencia és a sztilbén szintek kapcsoltsága nem igazolható, ezen tulajdonságok függetlenül öröklődhetnek.



**17.ábra**

*A hasadó nemzedék hibridjeinek sztilbén tartalma nagy („5 cm”) levélben. A szaggatott vonaltól jobbra a feketerothadásra rezisztens, míg balra a fogékony fajtákat jelöltük.*



**18.ábra**

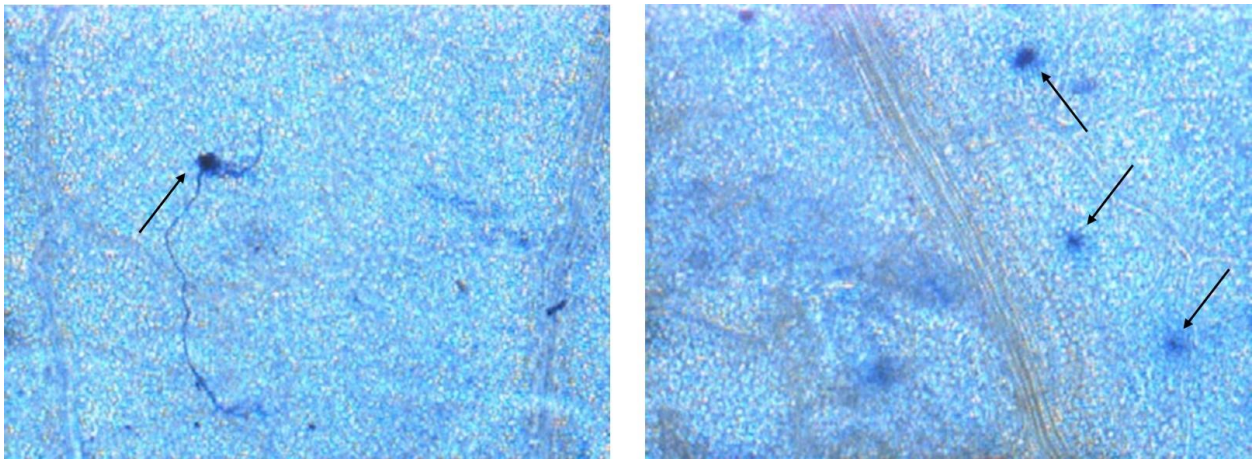
*A fogékony és ellenálló hibridek összesített sztilbén tartalmában mutatkozó különbségek a kis méretű („3 cm”) és nagy méretű („5 cm”) levelek esetében*

### 5.3. Feketerothadás fertőzésre ellenálló és fogékony fajtában eltérően reagáló gének expressziójának validálása

A transzkriptomikai adatok alapján feltételeztük, hogy a feketerothadás fertőzésre adott korai válaszban a sztilbén szintáz gének kiemelt szerepet játszanak, mivel a DE gének között találtuk meg őket. Az összesített sztilbén szintek viszont nem mutattak összefüggést a szőlő feketerothadásos megbetegedésével, illetve ellenállóságával. A valós idejű PCRrel lehetőség nyílik egy adott időpillanatban a PCR termékek pontos mennyiségének a meghatározására, ezért tovább tanulmányoztuk a különböző 6, 18 és 36 órás, a fertőzéstől eltelt időpontokban a gének expresszióját.

#### 5.3.1. Feketerothadás fertőzés vizsgálata fénymikroszkóppal

A feketerothadás gomba spórákkal inokulált, tripánkéssel festett levélkorongokon igazoltuk fénymikroszkóppal a fertőzés sikerességét. A fogékony Csaba gyöngye fajtán a 6 órás mintákon még nem, míg a 18 órás mintákon már látható volt, hogy a spórák csíratömlőt hajtottak. A 36 órás mintákban pedig hifanövekedést tapasztaltunk, míg az ellenálló Csillám fajtán ebben a fertőzést követő időpontban sem indultak csírázásnak a spórák (19.ábra).



**19.ábra**

*Bal oldalt a Csaba gyöngye levelén a csírázó spórából elágazó hifák 36 hpi, jobb oldalt Csillám levelén a nem csírázó spórák 36 hpi, nyilak a spórákat jelölik. 20× nagyítás.*

#### 5.3.2. A differenciáltan expresszáló gének listájának ellenőrzése, szűkítése

Egyenként kielemeztem a minőség szűrt DE gének expressziós mintázatát (0,6,18,36 hpi) időpontokban ( $p < 0,01$ ), mely alapján 32 azonos transzkripció mintázattal

rendelkező csoportot és 49 egyedi expressziójú gént tudtam elkülöníteni a két fajta vizsgálata során.

A feketerothadás ellenállóság szempontjából potenciálisan jelentős gének kiválasztásában olyan expressziós mintázatúakat választottunk ki, melyek 'Csillám'-ban magasabb expressziót mutattak, mint a 'Csaba gyöngyé'-ben, kizárólag a fertőzött mintákban fejeződtek ki, míg a mockban nem. Ezek között a gének között korábban már növényi megbetegedésben leírt, pl. rezisztencia gén analógok voltak.

**12. táblázat.** A 0 órás időpontban még nem expresszálódó gének. Az általunk expressziós validálásra kiválasztott géneket félkövér betűtípussal jelöltem.

XLOC azonosító	VIT azonosító	Gén (fehérje)	Csillám-Csaba gyöngye
XLOC_002163	VIT_210s0042g00930	stilbene synthase	0,5-0
XLOC_012383	VIT_216s0100g00960	stilbene synthase 4-like	0,5-0
XLOC_011341	VIT_216s0039g01240	phenylalanine ammonia-lyase	0,5-0
<b>XLOC_011342</b>	<b>VIT_216s0039g01280</b>	<b>phenylalanine ammonia-lyase</b>	<b>0,5-0</b>
XLOC_011336	VIT_216s0039g01130	phenylalanine ammonia-lyase	0,5-0,5
XLOC_021061	VIT_204s0008g02260	probable flavin-containing monooxygenase 1-like	1-0
XLOC_012377	VIT_216s0100g00880	stilbene synthase 4-like	1-0,5
XLOC_025097	VIT_206s0009g02590	pectinesterase 2-like	1-0,5
<b>XLOC_015049</b>	<b>VIT_218s0041g02060</b>	<b>12-oxophytodienoate reductase</b>	<b>1-0,5</b>

A 0 órás időpontban sem a Csillámban, sem a Csaba gyöngyében nem expresszálódó: a *Guignardia bidwellii* fertőzés indukált gének között 31 volt, mely Csillámban magasabb, Csaba gyöngyében alacsonyabb vagy ugyanolyan mértékű expressziót mutatott és csak egy kivétel volt, mely csak a Csillámban nem mutatott expressziót, míg a Csaba gyöngye mock és fertőzött mintákban is egyaránt működött.

A 0 órás időpontban még nem, illetve már expresszálódó gének közül olyanokat választottunk ki, melyek jellegzetes expressziós mintázattal rendelkeztek, vagyis a 6 és 36 órás időpontban megemelkedett a transzkripciós szintjük. Az így talált géneken belül elkülönítettünk 0 órás időpontban nem kifejeződő (**12. táblázat**) és a kezdeti időpontban már expresszálódó géneket (**13. táblázat**).

**13. táblázat.** *A 0 órás időpontban már expresszálódott gének. Az általunk expressziós validálásra kiválasztott géneket félkövér betűtípussal jelöltem.*

<b>XLOC azonosító</b>	<b>VIT azonosító</b>	<b>Gén (fehérje)</b>	<b>Csillám-Csaba gyöngye</b>
XLOC_012392	VIT_216s0100g01120	stilbene synthase	1-0
XLOC_012385	VIT_216s0100g00990	stilbene synthase	1-0
XLOC_011773	VIT_216s0100g00750	stilbene synthase	1-0
XLOC_012381	VIT_216s0100g00940	stilbene synthase 4-like	1-0
XLOC_024574	VIT_206s0004g01040	disease resistance response protein 206	1-0
XLOC_004307	VIT_212s0028g01940	8-hydroxyquercetin 8-o-methyltransferase	1-0
XLOC_028471	VIT_208s0007g05830	unnamed protein product [Vitis vinifera]	1-0
<b>XLOC_011778</b>	<b>VIT_216s0100g00910</b>	<b>stilbene synthase</b>	<b>1-0,5</b>
XLOC_011777	VIT_216s0100g00830	stilbene synthase	1-0,5
XLOC_012380	VIT_216s0100g00930	stilbene synthase	1-0,5
XLOC_012371	VIT_216s0100g00800	stilbene synthase	1-0,5
XLOC_012373	VIT_216s0100g00840	stilbene synthase	1-0,5
XLOC_012388	VIT_216s0100g01020	stilbene synthase	1-0,5
XLOC_012397	VIT_216s0100g01170	stilbene synthase	1-0,5
XLOC_012379	VIT_216s0100g00920	stilbene synthase	1-0,5
XLOC_011775	VIT_216s0100g00770	stilbene synthase	1-0,5

XLOC_011777	VIT_216s0100g00830	stilbene synthase	1-0,5
XLOC_012390	VIT_216s0100g01070	stilbene synthase	1-0,5
XLOC_012396	VIT_216s0100g01160	stilbene synthase	1-0,5
XLOC_012391	VIT_216s0100g01100	stilbene synthase	1-0,5
XLOC_012375	VIT_216s0100g00860	stilbene synthase 4-like	1-0,5
XLOC_011779	VIT_216s0100g01040	stilbene synthase 4-like	1-0,5
XLOC_025435	VIT_206s0004g02620	phenylalanine ammonia-lyase	1-0,5
XLOC_017270	VIT_219s0027g01400	disease resistance protein rga4-like	2-0
<b>XLOC_000038</b>	<b>VIT_201s0011g00950</b>	<b>disease resistance protein rpm1-like</b>	<b>2-0</b>
<b>XLOC_012378</b>	<b>VIT_216s0100g00900</b>	<b>stilbene synthase 4-like</b>	<b>2-0,5</b>
<b>XLOC_011776</b>	<b>VIT_216s0100g00780</b>	<b>stilbene synthase</b>	<b>2-0,5</b>
<b>XLOC_027511</b>	<b>VIT_207s0031g01710</b>	<b>wrky transcription factor</b>	<b>2-0,5</b>
XLOC_029716	VIT_209s0002g02970	protein	2-0,5
XLOC_008118	VIT_214s0030g01890	protein	2-0,5
XLOC_030258	VIT_209s0054g00430	uncharacterized protein	2-0,5
XLOC_009364	VIT_214s0083g00250	uncharacterized protein loc100853032	3-0
XLOC_010427	VIT_215s0046g00170	protein	3-0,5
<b>XLOC_012607</b>	<b>VIT_216s0098g00860</b>	<b>2og-fe oxygenase family expressed (flavanone 3-dioxygenase-like)</b>	<b>3-0,5</b>
XLOC_025551	VIT_206s0004g05080	zinc transporter vagy protein binding	3-1

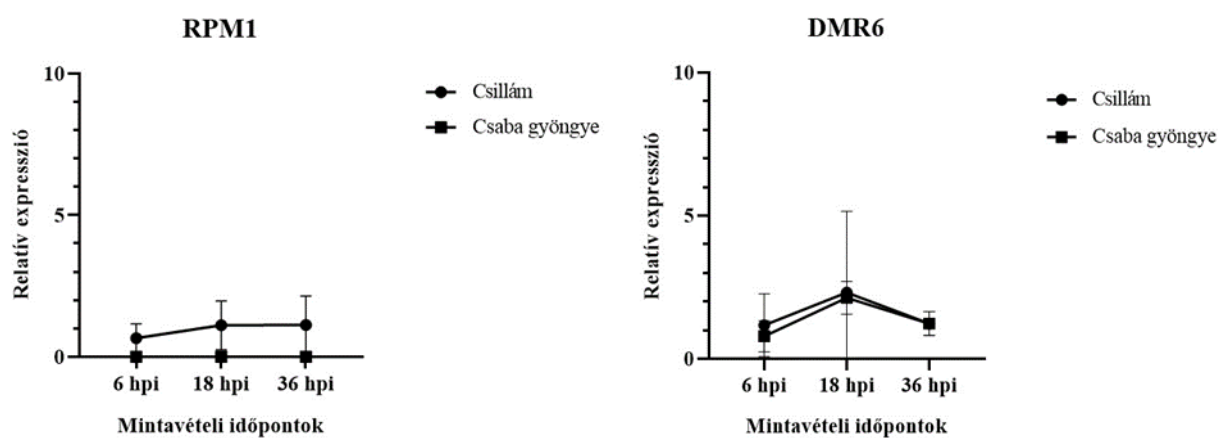
Az ellenálló Csillám és a fogékony Csaba gyöngye közötti expressziós különbségeket egy szubjektív arányszámmal jelöltem a táblázat negyedik oszlopában a Csillám mock mintához viszonyítottan.

### 5.3.3. Differenciáltan expresszáló gének validálása valós idejű PCR-rel

Az eredmények kiértékelését mindegyik gén esetén  $p < 0,05$  szignifikancia szinten végeztük. A relatív expresszió értéke a mock kontrollhoz képest a fertőzött minta génkifejeződési értékét mutatja.

A *VvRPM1* gén a feketerothadásra fogékony Csaba gyöngye fajtában a nem fertőzött és a spóraizolátummal inokulált levelekben sem expresszálódott egyik általunk vizsgált időpontban sem. A rezisztens Csillám fajta viszont a mock inokulált és a fertőzött levelekben is expresszálta az *RPM1* gént. Az egyes időpontok (6, 18, 36 hpi) között azonban nem volt szignifikáns ( $p = 0,7417$ ) a különbség egytényezős ANOVA teszt alapján (20.ábra).

Csillámban 6 hpi-nél a mock expresszió 0,6-ra csökkent a fertőzött levelekben, tehát a nem fertőzött mintában volt magasabb az *RPM1* expressziója. 18 hpi-nél a fertőzött levelekben már  $1,1\times$  volt magasabb az expresszió a féllével kontrolljához képest és ez megmaradt 36 hpi-nél is vagyis szinte nem volt különbség ezekben az időpontokban, nem történt a feketerothadás fertőzés hatására indukció a transzkripcióban (20.ábra). A transzkriptomikai adatok alapján várt 2-0 különbség a két fajta között igazolódott.



**20.ábra**

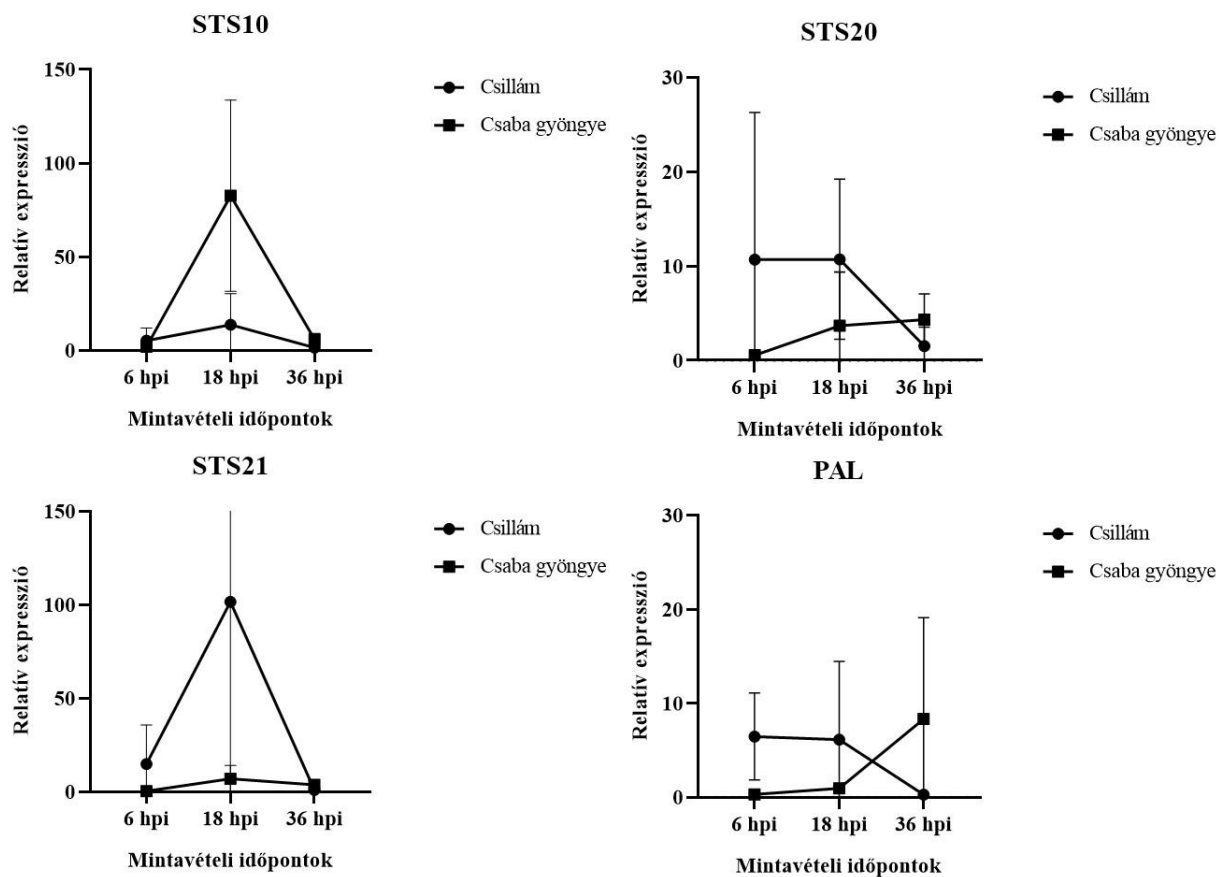
*Az RPM1 és a DMR6 gén relatív expressziója (6, 18, 36 hpi) a két vizsgált fajtában.*

A *VvDMR6* gént vizsgálva a két fajta között nem volt szignifikáns a különbség kéttényezős ANOVA teszt alapján Geisser-Greenhouse elemzésben ( $p = 0,3381$ ) (20.ábra).

A 'Csillám'-ban az egyes mintavételi időpontokban a mock és a fertőzött minták között sem igazolható ( $p = 0,6883$ ) az expressziós különbség egytényezős ANOVA teszt ( $p < 0,05$ ) alapján, míg 'Csaba gyöngyé'-ben szignifikáns volt a különbség ( $p = 0,0470$ ). A 6

hpi mintában a fertőzöttben alacsonyabb volt  $0,8\times$  az expresszió, míg 18 hpi-nél  $2,16\times$  magasabb volt, 36 hpi esetében  $1,23\times$  volt magasabb a fertőzött levélben a mockhoz képest. A VvDMR6 egy betegség fogékonysági gén, a fogékony fajtában vártuk a magasabb expressziós szintjét, amely a 18 órás időpontban jelentősen meg is emelkedett.

A sztilbén szintáz géneket és a PAL gént 3 biológiai ismétlésben vizsgálva bizonyos időpontokban magas volt a szórás értéke, ezért nem tudtam egyértelmű következtetéseket levonni a relatív expressziójukról. Az STS10 és STS21-nél kéttényezős ANOVA elemzés alapján nem volt igazolható a különbség a két fajta között ( $p=0,0629$ ) és ( $p=0,2304$ ), addig STS20-nál szignifikáns ( $p=0,0407$ ) lett. A PAL ( $p=0,6306$ ) sem volt jelentős eltérés a 'Csillám' és 'Csaba gyöngye' között (21.ábra).



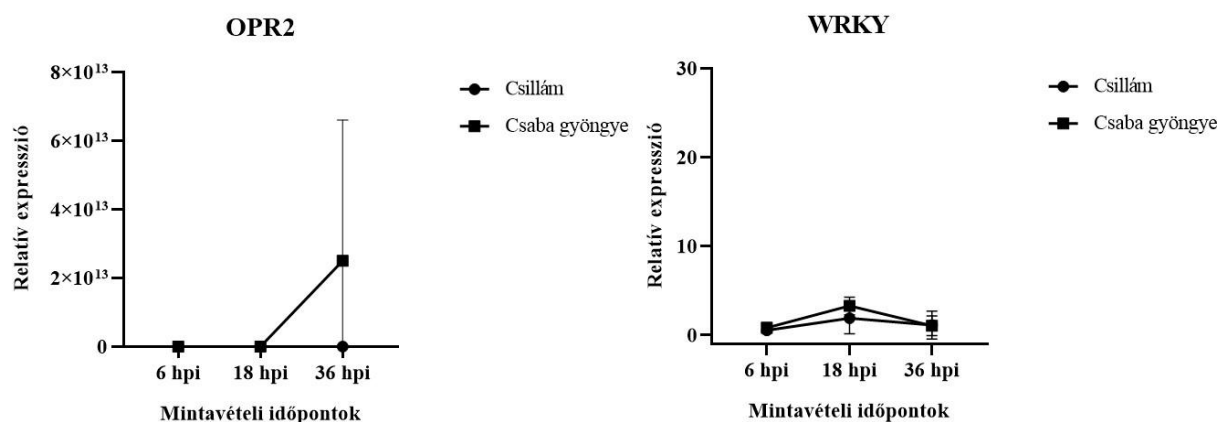
**21.ábra**

*A sztilbén szintáz gének és PAL gén relatív expressziója (6,18,36 hpi) a két vizsgált fajtában.*

Az OPR2 és a WRKY gén esetében kéttényezős ANOVA elemzése alapján nem volt jelentős a két fajta között az expressziós különbség ( $p=0,3497$ ) és ( $p=0,3914$ ), azonban



az OPR2 relatív expressziója a 36 órás időpontban nagy szórás miatt nem értékelhető (22.ábra).



**22.ábra**

*Az OPR2 és WRKY gének relatív expressziója (6,18,36 hpi) a két vizsgált fajtában.*

A transzkriptomikai adatok eredményei a valós idejű PCRrel kapott relatív expressziós adatokkal nem fedtek át. Ez alól egy gén, az RPM1 volt kivétel, amely valóban DE gén volt, csak az ellenálló Csillámban expresszáldott.

#### 5.4. Fogékonyság gének génszerkesztéssel történő csendesítésének előkészítése

##### 5.4.1. CRISPR konstrukciók megtervezése és elkészítése

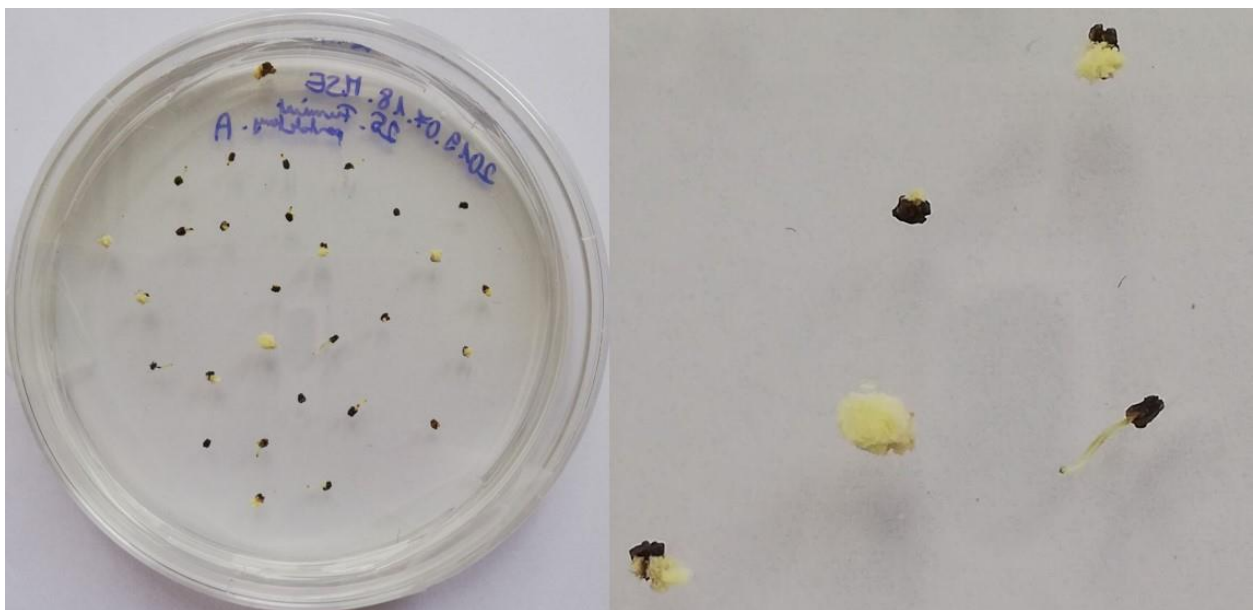
A CRISPR konstrukció megtervezése és transzformációja NEB 10-béta kompetens *E. coli* sejtekben a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Szőlészeti és borászati Intézet, Szőlészeti Tanszékén és a bécsi Természettudományi és Élettudományi Egyetemen (BOKU) való közös együttműködésben készült el. Jövőbeli célunk az, hogy a transzformáció és CRISPR mutagenézist követő növényregeneráció után a 'Furmint' növényeket tesztelni lehessen lisztharmat és feketerothadás rezisztenciára és ki lehessen értékelni az új genomszerkesztési eljárás hatékonyságát.

Az Anyag és módszer fejezetben leírtaknak megfelelően elkészítettük a megtervezett CRIPR/Cas9 konstrukciókat. Három konstrukció áll rendelkezésre a szőlő lisztharmat fogékonyságában szerepet játszó MLO gének esetében, melyek közül egy a FuMLO11, egy a FuMLO13 géneket veszi célba egy-egy célponttal, míg a harmadik

konstrukció a FuMLO6 és FuMLO7 géneket célozza három pontban. Ezen kívül szintén rendelkezésre áll a FuDMR6 gént célzó egy db. konstrukció, amely a gén két pontját célozza egyszerre. A csendesítés folytatásához azonban szükség van egy, a 'Furmint' fajtában hatékony növényregenerációs rendszerre, aminek kidolgozását szintén megkezdtük.

#### 5.4.2. Embriogén kallusz indukció fejlesztése 'Furmint' fajtánál

2019. június 14-én indítottunk el Furmint 4 különböző virágzatából (A, B, C, D) kiperarált portokokat MSE/2 és MST/2 táptalajokra helyeztük az alábbi elnevezéssel: MSE\_A, MSE\_B, MST\_C, MST\_D. Az A és B virágzat portokjai voltak MSE/2-n, C és D virágzat portokjai voltak MST/2-n táptalajon elindítva. Egy hónap múlva az összes portokot MSE/2 táptalajra tettük át és  $22\pm 2^\circ\text{C}$ -os hőmérsékleten sötétben inkubáltuk. Egy hónapos inkubáció után vagyis a kísérlet elindítása után 2 hónappal halvány és sötétsárga kallusz jelent meg a portokok nagyrészen és elvétve fehér színű kalluzosodást is megfigyeltünk (23. ábra).



**23. ábra**

*MSE/2 táptalajon található halványsárga kalluszok portokból 2 hónap után*

A kísérlet kezdetétől számított 6. hónapban NAA, BAP illetve IAA és kinetin tartalmú táptalajokra került át a kalluszok egy része az MSE/2 táptalajokról, melyeket  $22\pm 2^\circ\text{C}$ -on meleg és hidegfehér (Polylux XL 36W és Tungsram F7 Daylight 36W) megvilágítású fényszobába kerültek 16 óra világos és 8 óra sötét periódusos szakaszokban.

Az MSE/2 táptalajokon továbbra is fenntartottunk a portokon fejlődött kalluszokból, melyek továbbra is sötétben voltak 22+/-2°C-on.

Az új NAA, BAP és IAA, kinetines táptalajokon 2,5 hónappal később a portokok nyele bezöldült (**24. ábra**), míg az MSE/2-n lévő portokok nem mutattak továbbra sem változást.



**24. ábra**

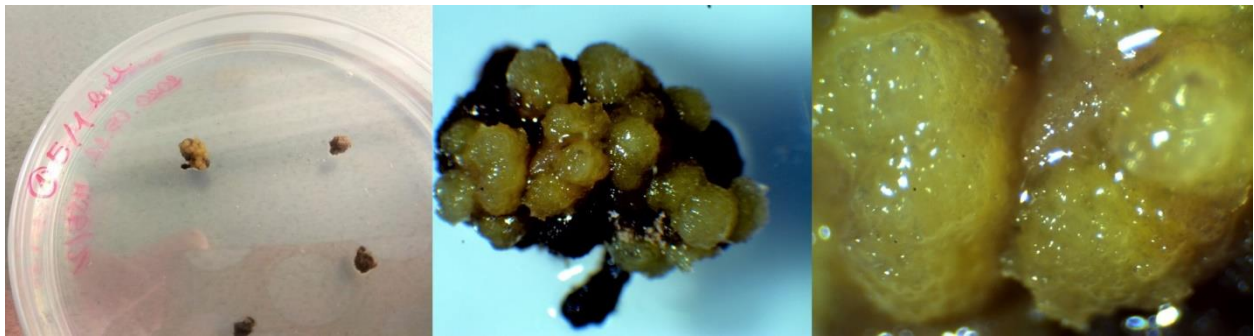
*A: 2019.augusztusi MSE/2, B: 2020.áprilisi NAA, BAP MS/2 táptalajon lévő portokon fejlődött kalluszok*

A kísérletünkben sikeresen végeztünk embriogén kallusz indukciót Furmint szőlőfajta levelekből NAA, BAP tartalmú MS/2 és aktív szénen tartalmazó MSE/2 táptalajon.

Az IAA, kinetin tartalmú táptalajokon 30 nap elteltével a levelek széle bebarapult. A kísérlet kezdetétől számított 80 nap elteltével pedig kismértékű fehér kallusz képződés volt megfigyelhető.

A kísérlet indítása után 30 nappal az NAA/BAP tartalmú táptalajon már grízszerű fehér kallusz képződés volt megfigyelhető, 60 nappal később pedig a fehér kallusz régióin kívül rózsaszínű is megjelent, pedigezért átettünk kalluszokat 0,05 g/l aktív szénen tartalmazó MSE/2 táptalajokra, hogy teszteljük, valóban embriogének-e.

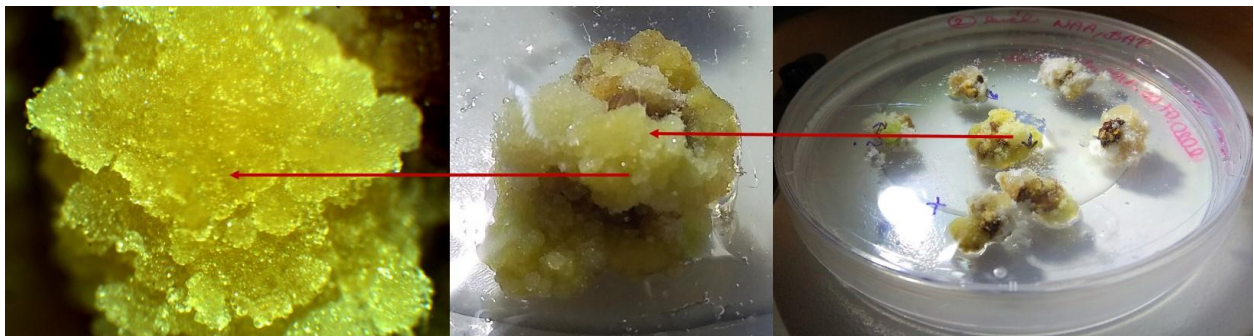
50 nappal az aktív szénen tartalmazó MSE/2-táptalajra való áttöltés után pedig sötétsárga, feltehetően embriogén kallusz jelent meg és globuláris proembrió képződés is látható volt (**25. ábra**), amely a 'Furmint' levél embriogenezisre való képességére utal.



**25. ábra**

*Globuláris proembrió az aktív szenes MSE/2 MSE/2 táptalajon.*

Az NAA/BAP tartalmú táptalajon maradt kalluszokon 87 nappal a kísérlet kezdete után halványsárga, embriogén kalluszképződés indult, mely egyre jobban fejlődött, kb. 180 nappal a kísérlet kezdete után egyre sárgábbá váltak a kalluszok (**26. ábra**).



**26. ábra**

*Sárga embriogén kallusz NAA, BAP tartalmú MS/2 táptalajon*

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK

### 6.1. *Botrytis cinerea* ellenállóság szabadföldi vizsgálata klónkísérletben

A 'Juhfark' erősen fogékony a szürkerothadásra, ehhez a szőlőfürt tulajdonságai, mint a bogyóhéj vastagsága, a fürt tömöritsége mind hozzájárulhatnak (Grimplet et al., 2019). Az eredmények alapján a *Vitis vinifera* cv. 'Juhfark' esetében az évjárat-érzékenység a fajta jellegéből, a fürtrohadásra való érzékenységgel függött össze. Mindkét klón szignifikánsan eltérő érzékenységet mutatott a *Botrytis* fertőzéssel szemben a különböző évjáratú fürtökben. A 2. évjárat csoportban magasabb értékeket, vagyis rosszabb eredményeket kaptunk, mint a többi évjáratcsoportban. A *Botrytis cinerea* által okozott fürtrohadást nagymértékben befolyásolják a szőlő érése során az időjárási körülmények. Az eredmények alapján a klónszelekció nem jelent teljeskörű megoldást az éghajlatváltozás negatív hatásainak kiküszöbölésére.

### 6.2. Rezisztencia gének és a sztilbén szintek a szőlő feketetrohadásában, Csillám és Csaba gyöngye fajtákban laboratóriumi körülmények között

A sztilbén szinteket egyrészt azért vizsgáltuk meg, mivel a differenciált expressziót mutató gének között találtunk sztilbén szintázokat, másrészt a feketetrohadás térképezés legelső eredményei alapján találtak egy olyan feketetrohadással kapcsolatos QTL-t, amely átfedett egy rezveratrol bontó QTL-lel a 16-os kromoszómán, melyen olyan sztilbén szintáz gének lokalizálódnak (*VvSTS7-48*), melyek a stresszválaszban vesznek részt (Vannozzi et al., 2012). Hasonlóképp a transzkriptom szekvenálás alapján kiválasztott sztilbén szintáz génjeink a (*VvSTS10,20* és *21*) is a 16-os kromoszómán lokalizálódtak.

A sztilbén szintázok közül az *STS10* és az *STS21* expressziójában nem volt szignifikáns különbség a rezisztens és a fogékony fajtában, míg az *STS20*-nál jelentős volt a különbség.

Vezulli és munkatársai (2019) a szőlőperonoszpóra rezisztencia és a polifenol tartalom vizsgálatában a DE gének között találta meg az *STS10*, *STS20*, *STS21* gént. Az *STS10* potenciális szerepét a cisz-piceid szintézissel hozta összefüggésbe. Szőlőlevelekben az UV-B/C stressznek való kitettség a *VvMYB14* és a *VvWRKY8* transzkripciós faktorok és a *VvSTS15/21* gének átírását aktiválja, de elnyomja a *VvMYB30* transzkripciós faktort a

szőlőlevelekben. A VvMYB14 képes serkenti a VvSTS15/21 gének expresszióját, viszont a VvMYB30-al verseng az említett sztilbén szintáz promoterekhez való kapcsolódásban (Mu et al., 2023).

Ha valós szerepüket szeretnénk feltárni a feketerothadás folyamatában, akkor arra alkalmas lehet a sztilbén szintek vizsgálata.

Az egyik génjelöltünk az rpm1-like rezisztencia gén, mely homológ génjének rezisztenciában való jelentőségét *Arabidopsis thaliana*-ban kimutatták *Pseudomonas syringae*-vel szemben (Grant et al., 1995). Szőlőben expressziója szignifikánsan megemelkedett *Plasmopara viticola* és *Lobesia botrana* rovar hatására (Liu et al., 2020; Reineke és Selim, 2019). *Vitis vinifera* cv. Crimson magvatlan szőlőbogyóban is a szőlő bogyó belső nekrozis vírussal (GINV) történő fertőzés során felülszabályozódott (Wang et al., 2022). *Vitis vinifera* L. cv. 'Muscat Hamburg' gyökérzetét vizsgálva szintén megnőtt az RPM1 szintje, a miR482-vel együtt, melynek a célpontja ez a rezisztencia gén. Az RPM1-gyel kölcsönható fehérje 4 (RIN4) egy konzervatív növényi immunitás szabályozó, amely a PTI és ETI folyamatában is részt vesz. A RIN4 fehérjét a kórokozó effektor fehérjéi képesek módosítani. A szőlőperonoszpórára fogékony *Vitis vinifera* cv. 'Centennial Seedless' fajtában *Plasmopara viticola* fertőzés hatására csökkent a RIN4 gén expressziója, míg az RPM1 gén szintje megnőtt (Liu et al., 2020).

A DMR6 egy szőlőlisztharmat fogékonysági gén, mely egy oxidoreduktázt kódol a 2 oxoglutarát (2OG)- Fe(II) oxigenáz családban. Először a szőlőperonoszpóra vizsgálatokban *Arabidopsis thaliana*-ban mutatták ki a fertőzési folyamatban fontos szerepét (van Damme et al., 2008). Szőlőlisztharmat kísérletében differenciált expressziót mutató géneket között tudta Makovecz-Tóth (2016) kimutatni. A DMR6 expressziója megemelkedett flavescence dorée fitoplazma fertőzés hatására a tünetek megjelenése előtt (Prezelj et al., 2016).

A VvOPR2 a jázmonsav szintézis kulcs enzime, UV sugárzásnak kitett szőlőbogyókban a VvOPR2 felülexpresszáldott (He et al., 2020). A WRKY transzkripciósfaktorok pedig a növényi fejlődést szabályozzák, másrészt a sztilbén szintázok szabályozásában is részt vehetnek a növényi stresszválaszban (Mu et al., 2023; Wu et al., 2022).

### **6.3. A sztilbén szintek kapcsolata a levélmérettel Csillámban, Csaba gyöngyében és más BR rezisztens és fogékony fajtákban szabadföldi körülmények között**

Dolgozatomban azt a feltételezést vizsgáltam, hogy a magasabb sztilbén szint valóban magasabb ellenállóképességgel jár-e a levelekben. Ehhez először laboratóriumban hajtattott 'Csaba gyöngye' és 'Csillám' fajtán vizsgáltam meg féllével módszerrel a legfelső levelekben a feketerothadás hatását a korai válaszban (0-36 h között).

A fajtákon belül az általunk vizsgált összesített sztilbén szinteket tanulmányozva a feketerothadás fertőzés hatására nem figyeltünk meg szignifikáns különbségeket a fertőzéstől számított 0, 6, 18, 36 órás minták között sem a 'Csillám', sem a 'Csaba gyöngye' fajtában. A fajtán belül az egyes mintavételi időpontokban nem volt különbség a féllével módszer alapján felhelyezett mock és a fertőzött párja közötti sztilbén szintekben. Ez arra utal, hogy az adott rendszerben a fertőzés nem váltott ki olyan reakciót, mely jelentősen megemelte volna a sztilbén szinteket a vizsgált időintervallumban.

Az eredmények alapján viszont igazolódott a fajták közti különbség, a BR ellenálló 'Csillám'-ban a 'Csaba gyöngye'-hez képest mért magasabb sztilbén szintekben. A szabadföldi kísérletben a kisméretű levelek vizsgálatában ez nem mutatkozott meg, sőt alacsonyabb volt a sztilbének szintje is, annak ellenére, hogy kevesebb sztilbén formát vizsgáltunk a laboratóriumi körülmények között nevelt növényekben. Azt feltételezzük, hogy a hajtattott, mesterséges fényen nevelt szőlő nem biztos, hogy alkalmas ilyen jellegű mérések vizsgálatára, mert a mesterséges környezet stresszhatást válthat ki.

Az összes fajtában szabadföldi kísérletben mért összesített sztilbén szintek levélméret alapján történő megkülönböztetése szerint a kisebb levélméret kevesebb, míg a nagyobb levélméret magasabb sztilbén szintekkel jár. Ez alátámaszthatja a korábbi ontogenetikai rezisztenciával kapcsolatban leírt eredményeket.

Az egyik tanulmányban a feketerothadással szembeni ellenállóság mértékét a kórokozó gomba csírázási, appresszórium képzési és a szubkutikuláris hifaképződése alapján vetették össze a levél helyzetével és méretével üvegházi körülmények között (Kuo és Hoch, 1996a). Kuo és Hoch (1996a) alapján tehát a konídium csírázást és az appresszórium képződését nem befolyásolta a levél mérete, de az idősebb, hajtáscsúcstól számított 6. levél esetén jelentősen visszaesett a szubkutikuláris hifa, nem kolonizálja az idősebb leveleket a hifa, ezért tünet sincs ezeken. A leveleket méretük alapján az alábbi kategóriákba sorolták: 0,1-1,9 cm, 2,0-3,9 cm, 4,0-5,9 cm, 6,0-7,9 cm és 8,0 cm feletti

levelek. Mi alapvetően a kisméretű, fiatal 2,5-3,5 cm-es, nagyméretű idősebb 4,5-5,5 cm, de néhány esetben az óriási, még idősebb korú 7,5 cm feletti leveleket is vizsgáltuk.

Összességében a kisebb méretű levelek fogékonyabbak lehetnek részben az alacsonyabb sztilbén szint miatt. Az, hogy a magas sztilbén szint oka vagy következménye az ontogenetikus rezisztencia kialakulásának, nem ismert. A levelek növekedésével és a sztilbén szintek emelkedésével együtt a teljes rezisztencia áll be. Kizárólag a fiatal levelek esetében beszélhetünk fogékonyaságról és ellenálláságról. Hasonló a helyzet a bogyók esetében is, de a munkámban a bogyókkal nem foglalkoztam.

Szabadföldi körülmények között már nem volt lehetőségem a fertőzés hatását megvizsgálni, viszont a fertőzést megelőző állapotokat 'Csaba gyöngy'-n és 'Csillám'-on kívül több fajtában is megvizsgáltunk. A 'Csillám' tünetmentes rezisztenciája mögött rejlő okokat is kerestük, a differenciált expressziót mutató gének és a sztilbén szintek, illetve a BR indukált sztilbén szintek alapján.

A vizsgált fajták között szerepel a 'CSFT29', a 'Csillám' testvére, amely szintén BR ellenállónak bizonyult. A 'Rayon d'Or' ('Seibel 4986') pedig a 'Csillám' apai szülője, melynek *Vitis rupestris* őseitől eredhet a feketerothadás ellenállósága. A 'Csillám' anyai szülője a 'Kékfrankos' viszont BR fogékony. A 'Rayon d'Or' ugyanakkor a szintén feketerothadás ellenálló 'Merzling' fajta nagyszülője is egyben. A 'Csillám' × 'SK001/7' és 'Csillám' × '01-1-797' szülők által létrejött hasadó nemzedék tagjait is vizsgáltuk, melyek között feketerothadásnak ellenálló és érzékeny hibridek is voltak. A 'Merzling' egyik szülője a BR ellenálló 'Seyval blanc'.

A feketerothadás ellenállóság szempontjából a szabadföldi vizsgálataink során, az általunk mért összesített sztilbének szintjében nem találtunk egyértelmű összefüggést ellenálló és fogékony fajták között.

A legalacsonyabb sztilbén szintű 'Furmint' azonban nemcsak a hemibiotróf szőlő feketerothadás, hanem a biotróf szőlőlisztharmat, peronoszpóra és nekrotróf szürkerothadásra is fogékony. A biotróf kórokozók általában a fiatal, kisméretű leveleket kedvelik, míg az öregedő, szenescens szövetek a nekrotrófok célpontjai. Ez azt jelentheti, hogy a szőlőnek a biotróf kórokozókkal, illetve a hemibiotróf (mivel kezdetben biotróf) kórokozók ellen a fiatal levelek védelmére lenne szüksége.

A legmagasabb sztilbén szintű 5-11-02 *Vitis amurensis* hibrid feketerothadás ellenállóságán kívül, nincs adat a többi kórokozóval szembeni rezisztenciájáról. A magas sztilbén szintekkel rendelkező 'Rayon d'Or' és 'Seyval blanc' viszont feketerothadás, szőlőlisztharmat, peronoszpóra ellenálló és *Botrytis cinerea*-ra kevésbé érzékeny.



Az ellentmondó eredményeket a 'Souvignier gris' fajta elemzése alapján találtuk, mivel nagyfokú rezisztenciája van az előbb említett gombás megbetegedésekkel szemben, mégis kis (5120 ng/g FW) és nagyméretű (8761 ng/g FW) levelekben viszonylag alacsony sztlbén szinteket figyeltünk meg, mely a feketerothadásra érzékeny, lisztharmat és peronoszpóra ellenállósággal nem rendelkező 'Merlot' fajtához hasonló értékeket vett fel.

A kisebb méretű, BR érzékeny levelek a BR ellenálló fajtákban magasabb sztlbén szinttel rendelkeztek, de találunk kivételeket is a fajták között.

A 'Csillám', és a fogékony 'SK001/7' és '01-1-797' szülőket vizsgálva kizárólag a 01-1-797-ben volt a háromféle levélméret között sztlbén tartalommal szignifikáns a különbség. A hasadó nemzedék vizsgálatával változatos sztlbén tartalommal rendelkező hibridek jöttek létre a BR fogékony szülőtől és az ellenállóság mértékétől függetlenül. A különböző sztlbének eltérő hatással bírhatnak, ami a szőlő esetében nem teljesen felderített.

A levelek kora alapvetően befolyásolja a sztlbén szintet. A nagyon fiatal és idős levelekben nem magas a sztlbén szint, a sztóma nem fejlődött ki teljesen vagy zárva van, mely korlátozhatja bizonyos patogének bejutását és így a sztlbének indukált szintézisét. Egy tanulmányban a *Botrytis cinerea* fertőzésre képződött sztlbén mennyisége és a sztlbén termelődése korrelált a szürkerothadás rezisztenciával, azonban ez alól kivételt képezett a 'Pollux' (B6-18) interspecifikus hibrid fajta, melyben kevés sztlbén képződött pedig enyhén volt csak fogékony. A sztlbén képződés mértéke a levél pozíciójával a hajtásban nem egyértelműen korrelált (Stein és Blauch, 1985).

Malacarne és munkatársai (2011) a szőlőperonoszpóra rezisztens 'Merzling' (egy *V. vinifera* hibrid *Vitis rupestris* és *Vitis lincecumii* ősökkel) × fogékony *V. vinifera* cv. 'Teroldego' hasadó nemzedékét vizsgálva, három csoportot tudott elkülöníteni sztlbén profil és mennyiség alapján. A legmagasabb sztlbén szintet tartalmazó csoportban transz-rezveratrol, transz-piceid, transz-pterosztlbén és 13 féle viniferin volt. Ezeknek a sztlbéneknek a felhalmozódása a levélben a rezisztens fenotípusokban fordult elő (Malacarne et al., 2011). Negatív korreláció volt a különböző sztlbének tartalma és fertőzést követően a sporuláció százalékos eloszlását tekintve. Kevés kivétellel, de a magas sztlbén termelő utódok mutattak a legkevésbé sporulációs tüneteket. Ez viszont nem egyezett a monomer sztlbének, mint transz-rezveratrol és transz-piceid esetében, melyek magas sporulációval lévő egyedekben is alacsony szintűek voltak.

Az összes általunk vizsgált szőlőfajta közül a legalacsonyabb összesített sztlbén szintet a *Vitis vinifera* cv. 'Furmint' fajtában mértünk, amely fogékony szőlőlisztharmat, -peronoszpóra, szürke- és feketerothadásra is egyaránt is. A sztlbének fontos védő

metabolitok, gátolják az olyan gombák fejlődését a szőlőben, mint a *Botrytis cinerea* (szürkerothadás), *Plasmopara viticola* (szőlőperonoszpóra) és *Erysiphe necator* (szőlőlisztharmat). A *Vitaceae* családban a rezveratrol és az  $\alpha$ -,  $\beta$ -, illetve  $\epsilon$ -viniferineket tartják fitoalexineknek, melyek *de novo* keletkeznek a fertőzés helyén (Viret et al., 2018). A szőlő fekete-rothadás során azonban nem vizsgálták még szőlőben a sztilbén szinteket.

A 'Csaba gyöngy'-ben és a 'Csillám'-ban is a mock inokulált levelek magasabb sztilbén szintje volt megfigyelhető a fertőzött levelekhez képest.

Összeségében az adott méretű levelekben lévő sztilbén szint és a fekete-rothadás ellenálló fajták között nem találtunk egyértelmű kapcsolatot. A sztilbén szint önmagában nem magyarázza meg az ellenállóságot.

A hasadó nemzedékek vizsgálata pedig egyértelműen igazolta, hogy a magas sztilbén szint és a magas fokú ellenállóság függetlenül öröklődő tulajdonság lehet.

Az ellenállóságban mind a preformált tolerancia (pl. magas sztilbén szintek) vagy az indukált rezisztencia is szerepet játszik. A sztilbén szint önmagában nem magyarázza meg az ellenállóságot. A 'Csillám' esetében magas sztilbén szint segíthet a kimagasló ellenállóképességben, de alacsony sztilbén szintű fajták, mint a 'Solaris' is lehetnek, ha nem is ennyire kiemelkedő, de mégis ellenállók.

## 7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A szőlő feketerothadás ellenállóság kapcsán még nem vizsgálták a sztilbén szinteket szőlőlevélben. Megállapítottam, hogy a fiatal 2,5-3 cm átmérőjű levelekben az összesített sztilbén szint alacsonyabb, mint a fejlettebb 4,5-5cm-es levelekben, a fogékony és az ellenálló fajták esetében is, ami összhangban van az ontogenetikus rezisztencia kialakulásának jelenségével.

Laboratóriumi mesterséges fertőzési kísérletben, a Csaba gyöngye fajta levelében alacsonyabb volt a sztilbének szintje az összes időpontban és mintában az ellenálló Csillámhoz képest.

Csaba gyöngyében és a Csillámban a mock és a fertőzött levelek között a sztilbén szintben nem volt szignifikáns a különbség az egyes mintavételi időpontokban, ami kiemeli a sztilbének, mint fitoanticipinek szerepét a preformált rezisztenciában.

Feketerothadás ellenálló és fogékony fajták sztilbén szintjei és fajták feketerothadással szembeni ellenállósága közt nincs egyértelmű összefüggés, a sztilbén szintek önmagukban nem magyarázzák meg az ellenállóságot.

A feketerothadással szemben ellenálló és fogékony szülők keresztezéséből származó utódnemzedékben a feketerothadás ellenállóság és a sztilbén szint függetlenül öröklődhet. A nagyszámú populációból 3 éves ellenőrzés alapján kiválasztott fogékony és ellenálló egyedek sztilbén szintjei nem mutatnak kapcsoltságot az ellenállósággal.

Az ellenállóság molekuláris hátterét vizsgálva mesterséges fertőzés hatására bekövetkező génexpressziós vizsgálatokkal azonosítottam egy gént (RPM1), amely csak az ellenálló Csillám fajtában fejeződött ki.

Célzott génbevitellel történő gombarezisztens szőlő előállításához CRISPR konstrukciókat állítottam elő az általam vizsgált és liztharmat rezisztenciában fontos génekkel, (DMR6 és MLO) melyek a gombarezisztenciában illetve fogékonyságban (MLO) szerepet játszanak. Növény transzformációs kísérletekhez, génbevitelhez.



## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

1. *Botrytis cinerea* fertőzéssel szemben kevésbé érzékeny 'Juhfark' klónok kiértékelése alapján választ kaptam arra, hogy önmagában a klónszelekció nem volt elegendő a szürkerothadás ellenállóság javítására. A lazább fürtszerkezet csökkenti a szürkerothadással való fertőzöttség mértékét. Ezek alapján a gomba-patogén kapcsolat mélyebb szintű, a biológiai háttér vizsgálatára van szükség, mely egy nekrotróf gomba esetén nehezebb a rezisztencia poligénes öröklődése miatt.
2. A szőlő feketerothadás ellenállóság kapcsán először vizsgáltunk sztilbén szinteket szőlőlevélben laboratóriumi és szabadföldi körülmények között. A laborkísérlet alapján a 'Csaba gyöngye' fajta levelében alacsonyabb volt a sztilbén szintje az összes fertőzési időpontban (6, 18, 36 h) kezelt és mock kontroll mintában a 'Csillám'-hoz képest. A 0 hpi időpontban a 'Csillám'-ban  $2,4\times$  magasabb, 59813 ng/g FW átlag sztilbén szintet mértünk a 'Csaba gyöngye'-hez képest. A laboratóriumban nevelt 'Csillám'  $6,3\times$  és 'Csaba gyöngye'  $2,2\times$  magasabb összesített sztilbén szinttel rendelkeztek a szabadföldi körülmények között termesztettekhez képest.
3. Feketerothadás ellenálló és fogékony fajtákban az általunk mért összesített sztilbén szintjei alapján nem volt egyértelmű összefüggés a feketerothadással szembeni ellenállósággal szabadföldi és laboratóriumi körülmények között sem. A levélméretek vizsgálatát és a sztilbén szintek közötti kapcsolatában az ontogenetikus rezisztencia igazolni látszódott. A szabadföldi feketerothadás fogékony fiatal 2,5-3 cm átmérőjű levelekben az általunk mért összesített sztilbén szint alacsonyabb volt, mint 4,5-5 cm-es fejlettebb levelekben. Kimutattuk, hogy a szabadföldi körülmények között lévő szőlők között a feketerothadás rezisztens 'Solaris' és a 'Souvignier gries' is meglepően alacsony sztilbén szinttel rendelkezett mindkét levélméretnél.
4. A feketerothadás rezisztens és fogékony genotípusok keresztezéséből származó populációból először vizsgáltuk a sztilbén szintek és az ellenállóság összefüggését. A nagyszámú populációból 3 éves ellenőrzést követően választottunk ki a fogékony és ellenálló egyedeket, melyek sztilbén szintjei nem mutatnak kapcsoltságot az ellenállósággal. A hibridek között magas vagy alacsony sztilbén szinttel rendelkezők is voltak.
5. A szőlő feketerothadását vizsgálva lehetőségünk adódott gomba-kórokozó kölcsönhatások molekuláris módszerekkel történő feltárására. Ehhez egy korábbi

feketerothadással való fertőzést követő teljes transzkriptom elemzés alapján azonosítottunk differenciált expressziót mutató rezisztencia géneket, melyek közül RT-PCR-rel validáltuk az RPM1 gént a feketerothadás ellenálló 'Csillám' fajtában.

6. A kiválasztott validálandó gének között volt egy betegség fogékonyságért felelős DMR6 gén a 'Csaba gyöngye' és a 'Csillám' fajtában is egyaránt, amely az eredményeink alapján a feketerothadás rezisztenciában nem feltétlenül játszik fontos szerepet, viszont szőlőlisztharmat fogékonyságban fontos lehet, ezért lisztharmatgomba rezisztens szőlő előállításához CRISPR konstrukciókat készítettünk DMR6 és MLO gének csendesítéséhez.
7. A célzott génbevitelhez 'Furmint' fajta leveléből először sikerült embriogén kallusztenyészetet elindítanunk, míg portokokból nem alakultak ki.

## 9. SUMMARY

1. Evaluation of less susceptible 'Juhfark' clones to *Botrytis cinerea* infection provided an answer that clonal selection solely was not sufficient to improve resistance to gray mold. The less compact bunch structure reduces the degree of infection with gray mold. These findings suggest that a deeper level of investigation of the fungal-pathogen relationship is needed to investigate the biological background, which is more difficult in a necrotrophic fungus due to polygenic inheritance of resistance.
2. For the first time, stilbene levels in grapevine leaves were tested for resistance to black rot in laboratory and field conditions. The laboratory experiment showed lower levels of stilbene in leaves of the cultivar 'Csaba gyöngye' compared to 'Csillám' in treated and mock control samples at all infection time points (6,18,36 h). At time 0 hpi, the average stilbene level was 2,4 times higher in 'Csillám' (59813 ng/g FW) compared to 'Csaba gyöngye'. The 'Csillám' and 'Csaba gyöngye' cultivated in laboratory conditions had 6,3× and 2,2× higher total stilbene levels compared to those grown under field conditions.
3. Based on our measurements of total stilbene levels in susceptible and resistant varieties, there was no clear correlation with resistance to black rot under field and laboratory conditions. The relationship between leaf size analysis and stilbene levels appeared to confirm ontogenetic resistance. In young leaves of 2.5-3 cm diameter susceptible to black rot in the field, we measured total stilbene levels to be lower than in more developed leaves of 4.5- 5 cm diameter. We showed that among vines under field conditions, both the black rot resistant 'Solaris' and 'Souvignier gries' had surprisingly low stilbene levels at both leaf sizes.
4. We first investigated the relationship between stilbene levels and resistance in a segregating population from crosses between black rot resistance and susceptibility genotypes. From this large population, we selected susceptible and resistant individuals after 3 years of monitoring and showed that stilbene levels had no linkage with resistance. Hybrids included those with high or low stilbene levels.
5. Investigating the black rot of grapes has given us the opportunity to unravel fungal-pathogen interactions using molecular methods. For this purpose, we identified resistance genes with differential expression based on a whole transcriptome analysis

following a previous infection with black rot, of which the RPM1 gene was validated by RT-PCR in the black rot resistant cultivar 'Csillám'.

6. The selected genes to be validated included a DMR6 gene responsible for disease susceptibility in both 'Csaba gyöngye' and 'Csillám', which, based on our results, may not play an important role in black rot resistance, but may be important in grape powdery mildew susceptibility, therefore, CRISPR constructs were prepared to silence DMR6 and MLO genes to produce powdery mildew resistant grapes.
7. For targeted gene transfer, we first succeeded in starting embryogenic callus culture from 'Furmint' variety leaves but they did not develop from anther.



## 10. MELLÉKLETEK

### M1. Irodalomjegyzék

- Albert, S., Horbach, R., Deising, H.B., Siewert, B., Csuk, R., 2011. Synthesis and antimicrobial activity of (E) stilbene derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 5155–5166. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.07.015>
- Balga, I., Kállay, M., Leskó, A., Gál, L., 2014. Polifenol vegyületek vizsgálata szőlőhéj extraktumban az Egri Borvidéken. Presented at the XV. Szőlészeti és Borászati Konferencia, Károly Róbert Főiskola, Eger, p. 47.
- Balint-Kurti, P., 2019. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol. Plant Pathol.* 20, 1163–1178. <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>
- Bényei, F., Lőrincz, A., 2005. Borszőlőfajták, csemegeszőlő-fajták és alanyok. Mezőgazda kiadó.
- Bettinelli, P., Nicolini, D., Costantini, L., Stefanini, M., Hausmann, L., Vezzulli, S., 2023. Towards Marker-Assisted Breeding for Black Rot Bunch Resistance: Identification of a Major QTL in the Grapevine Cultivar “Merzling.” *Int. J. Mol. Sci.* 24, 3568. <https://doi.org/10.3390/ijms24043568>
- Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., Sharon, A., 2023. Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends Plant Sci.* 28, 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>
- Bigot, G., Mugnai, L., Baleani, M., Bossio, D., Cotromino, M., Faccini, F., Reggiori, F., 2014. Airone fungicida rameico: risultati sperimentali di efficacia su Black-rot (*Phyllosticta ampellicida*/*Guignardia bidwellii*) della vite in Friuli Venezia Giulia e Toscana. *ATTI Giornate Fitopatol.* 2, 339–346.
- Birch, R.G., 1997. PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 297–326. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.297>
- Brulé, D., Villano, C., Davies, L.J., Trdá, L., Claverie, J., Héloir, M.-C., Chiltz, A., Adrian, M., Darblade, B., Tornero, P., Stransfeld, L., Boutrot, F., Zipfel, C., Dry, I.B., Poinssot, B., 2019. The grapevine (*Vitis vinifera*) LysM receptor kinases VvLYK1-1 and VvLYK1-2 mediate chitooligosaccharide-triggered immunity. *Plant Biotechnol. J.* 17, 812–825. <https://doi.org/10.1111/pbi.13017>
- Capriotti, L., Baraldi, E., Mezzetti, B., Limera, C., Sabbadini, S., 2020. Biotechnological Approaches: Gene Overexpression, Gene Silencing, and Genome Editing to Control Fungal and Oomycete Diseases in Grapevine. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5701. <https://doi.org/10.3390/ijms21165701>
- Claverie, J., Balacey, S., Lemaître-Guillier, C., Brulé, D., Chiltz, A., Granet, L., Noirot, E., Daire, X., Darblade, B., Héloir, M.-C., Poinssot, B., 2018. The Cell Wall-Derived Xyloglucan Is a New DAMP Triggering Plant Immunity in *Vitis vinifera* and *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01725>
- Coleman, C., Copetti, D., Cipriani, G., Hoffmann, S., Kozma, P., Kovács, L., Morgante, M., Testolin, R., Di Gaspero, G., 2009. The powdery mildew resistance gene REN1 cosegregates with an NBS-LRR gene cluster in two Central Asian grapevines. *BMC Genet.* 10, 89. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-89>

- Collado, I.G., Sánchez, A.J.M., Hanson, J.R., 2007. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Nat. Prod. Rep.* 24, 674. <https://doi.org/10.1039/b603085h>
- Crandall, S.G., Spsychalla, J., Crouch, U., Acevedo, F., Naegele, R.P., Miles, T.D., 2022. Rotting grapes don't improve with age: cluster rot disease complexes, management, and future prospects. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-21-0695-FE>
- Dalbó, M.A., Weeden, N.F., Reisch, B.I., 2000. QTL analysis of disease resistance in interspecific hybrid grapes. *Acta Hortic.* 217–222. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.528.29>
- Deák, T., Farkas, E., Bálo, B., Bisztray, G.D., 2018. Fitoalexinek szerepe a szőlő betegségellenállóságában, a nemesítés lehetőségei. *Agrofórum Extra* 76, 67–69.
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., Sharon, A., 2017. Plant Pathogenic Fungi. *Microbiol. Spectr.* <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0023-2016>
- Drew, R.A., 1987. The effects of medium composition and cultural conditions on in vitro root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). *J. Hortic. Sci.* 62, 551–556. <https://doi.org/10.1080/14620316.1987.11515820>
- Dubrovina, A.S., Kiselev, K.V., 2017. Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta* 246, 597–623. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2730-8>
- Dula, B., Hegyi, T., Horváth, C., Németh, I., Mikulás, J., Kürti, A., 2012. Diagnosztikai és szőlővédelmi kézikönyv. Conint-Print Kft.
- Dula, B., Lázár, J., Kölber, M., 2016. A szőlő növényvédelme II: Betegségek. *Növényvédelem* 77(52), 221 – 262.
- Dwibedi, V., Saxena, S., 2019. Diversity and phylogeny of resveratrol-producing culturable endophytic fungi from *Vitis* species in India. *3 Biotech* 9, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1712-x>
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Eichmeier, A., Díaz-Losada, E., Hakalova, E., Pecenka, J., Stuskova, K., Ojeda, S., Gramaje, D., 2022. Draft genome sequence of *Phyllosticta ampellicida*, the cause of grapevine black rot. *Phytopathol. Mediterr.* 61, 240–413.
- Eleftherianos, I., Boundy, S., Joyce, S.A., Aslam, S., Marshall, J.W., Cox, R.J., Simpson, T.J., Clarke, D.J., French-Constant, R.H., Reynolds, S.E., 2007. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 2419–2424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610525104>
- Engelman, G., 1861. Remarks on two species of fungi destructive to vineyards. *Trans. Acad. Sci. St Louis* 2, 165–166.
- Eyres, N., Wood, C., Taylor, A., 2006. Black-rot - *Guignardia bidwellii* Department of Agriculture and the State of Western Australia., Replaces Factsheet 6/2000.
- FAO, 2021. World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2021. FAO, Rome, Italy.
- Farkas, B., Kocsis, L., Horváth, J., Takács, A., 2016. A *Botrytis cinerea elleni* rezisztencia biológiája. *Növényvédelem* 77, 495–502.
- Feechan, A., Jermakow, A.M., Torregrosa, L., Panstruga, R., Dry, I.B., 2008. Identification of grapevine MLO gene candidates involved in susceptibility to powdery mildew. *Funct. Plant Biol.* 35, 1255–1266. <https://doi.org/10.1071/FP08173>
- Ferrin, D.M., Ramsdell, D.C., 1977. Ascospore Dispersal and Infection of Grapes by *Guignardia bidwellii*, the Causal Agent of Grape Black Rot Disease. *Phytopathology* 77, 1501. <https://doi.org/10.1094/Phyto-67-1501>
- Flor, H.H., 1956. The Complementary Genic Systems in Flax and Flax Rust, in: *Advances in Genetics*. Elsevier, pp. 29–54.

- Gambino, G., Perrone, I., Gribaudo, I., 2008. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem. Anal.* 19, 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>
- Gong, P., Kang, J., Sadeghnezhad, E., Bao, R., Ge, M., Zhuge, Y., Shangguan, L., Fang, J., 2022. Transcriptional Profiling of Resistant and Susceptible Cultivars of Grapevine (*Vitis L.*) Reveals Hypersensitive Responses to *Plasmopara viticola*. *Front. Microbiol.* 13, 846504. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.846504>
- Goufo, P., Singh, R.K., Cortez, I., 2020. A Reference List of Phenolic Compounds (Including Stilbenes) in Grapevine (*Vitis vinifera L.*) Roots, Woods, Canes, Stems, and Leaves. *Antioxidants* 9, 398. <https://doi.org/10.3390/antiox9050398>
- Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W., Dangl, J.L., 1995. Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269, 843–846. <https://doi.org/10.1126/science.7638602>
- Gribaudo, I., Gambino, G., Vallania, R., 2007. Optimization of somatic embryogenesis in grapevine, in: *International Workshop on Advances in Grapevine and Wine Research* 754. pp. 97–104.
- Grimplet, J., Ibáñez, S., Baroja, E., Tello, J., Ibáñez, J., 2019. Phenotypic, Hormonal, and Genomic Variation Among *Vitis vinifera* Clones With Different Cluster Compactness and Reproductive Performance. *Front. Plant Sci.* 9, 408289. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01917>
- Gruselle, R., Boxus, P., 1990. WALNUT MICROPROPAGATION. *Acta Hortic.* 45–52. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.284.3>
- Hane, J.K., Paxman, J., Jones, D.A.B., Oliver, R.P., de Wit, P., 2020. “CATAStrophy,” a Genome-Informed Trophic Classification of Filamentous Plant Pathogens – How Many Different Types of Filamentous Plant Pathogens Are There? *Front. Microbiol.* 10, 492799. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03088>
- Hausmann, L., Rex, F., Töpfer, R., 2017. Evaluation and genetic analysis of grapevine black rot resistances. *Acta Hortic.* 285–290. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1188.37>
- He, L., Xu, X.-Q., Wang, Y., Chen, W.-K., Sun, R.-Z., Cheng, G., Liu, B., Chen, W., Duan, C.-Q., Wang, J., Pan, Q.-H., 2020. Modulation of volatile compound metabolome and transcriptome in grape berries exposed to sunlight under dry-hot climate. *BMC Plant Biol.* 20, 59. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2268-y>
- Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Z., Testolin, R., Kozma, P., 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine “Kishmish vatkana” is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* 116, 427–438. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0680-4>
- Hoffmann, S., Roznik, D., Kozma, P., Dula, B., 2018. Fokozódó jelentőségű, új kihívást jelentő betegség a szőlőültvényekben: a feketerothadás. *Agrofórum Extra* 60–63.
- Horváth, Á., Kiss, L., Váczy, K.Z., Váczy, Z., Onesti, G., Regő, C., Molnár, O., Bereczky, Z., 2018. Resistance to *Qoi* fungicides in the grape black rot pathogen, *Guignardia bidwellii*, and related species, in the light of the CYTB gene structure. *Magy. Mikrobiol. Társ. 2018 Évi Nagygyűlése És XIII Fermentációs Kollok. Absztrakt füzet*, 24.
- Hou, S., Liu, Z., Shen, H., Wu, D., 2019. Damage-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Plants. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00646>
- ICV, 2013. Les cépages résistants aux maladies cryptogamiques. *Panorama européen. Ouvrage Réalisé Sous Dir. Groupe ICV* 228.

- 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. <https://doi.org/10.21273/JASHS.110.6.762>
- Jayatilake, G.S., Baker, B.J., McClintock, J.B., 1995. Isolation and Identification of a Stilbene Derivative from the Antarctic Sponge *Kirkpatrickia variolosa*. *J. Nat. Prod.* 58, 1958–1960. <https://doi.org/10.1021/np50126a028>
- Jones, J., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system | *Nature*. *Nature* 444, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kato, E., Tokunaga, Y., Sakan, F., 2009. Stilbenoids Isolated from the Seeds of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) and Their Biological Activity | *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2544–2549. <https://doi.org/10.1021/jf803077p>
- Kellner, N., Deák, T., Bisztray, G.D., Váczy, K.Z., Dula, B., 2014. A szőlő feketerothadása és a fertőzésre adott növényi válasz vizsgálata RNS szinten. *Agrofórum* 25, 120–124.
- Kellner, N., Bisztray, G.D., Deák, T., Nyitrai Sárdy, D.Á., 2021. A feketerothadást okozó *Guignardia bidwellii* konídiumok csírázása fogékony és ellenálló szőlőfajták levelén. *Borászati Füzetek* 31, 30–33.
- Kellner, N., 2022. A szőlő (*Vitis vinifera*) feketerothadás (*Guignardia bidwellii*) fertőzésre adott transzkriptom szintű válasza és a fertőzött bogyók finomanalitikai összetétele, in: PhD Disszertáció. [https://doi.org/még\\_nincs](https://doi.org/még_nincs)
- Kikuchi, H., Takahashi, N., Oshima, Y., 2004. Novel aromatics bearing 4-O-methylglucose unit isolated from the oriental crude drug *Bombyx Batryticatus*. *Tetrahedron Lett.* 45, 367–370. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.10.159>
- Kim, M.C., Panstruga, R., Elliott, C., Müller, J., Devoto, A., Yoon, H.W., Park, H.C., Cho, M.J., Schulze-Lefert, P., 2002. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416, 447–451. <https://doi.org/10.1038/416447a>
- Kiss, E., Tóth-Lencsés, K., Szőke, A., Kerekes, A., Veres, A., Roznik, D., Kozma, P., 2017. Origin of 'Csillám', a promising source for black rot resistance. *Vitis -Geilweilerhof-* 56, 53–54. <https://doi.org/10.5073/vitis.2017.56.53-54>
- Kozma, P., 2022. Kórokozókkal szemben ellenálló borszőlőfajták új generációja. *Borászati Füzetek* 1, 24–29.
- Kumar, S.N., Siji, J.V., Rajasekharan, K.N., Nambisan, B., Mohandas, C., 2012. Bioactive stilbenes from a *Bacillus* sp. N strain associated with a novel rhabditid entomopathogenic nematode. *Lett. Appl. Microbiol.* 410–417.
- Kuo, K., Hoch, H.C., 1995. Visualization of the extracellular matrix surrounding pycnidiospores, germlings, and appressoria of *Phyllosticta ampellicida*. *Mycologia* 87, 759–771. <https://doi.org/10.1080/00275514.1995.12026597>
- Kuo, K. C., Hoch, H.C., 1996a. The parasitic relationship between *Phyllosticta ampellicida* and *Vitis vinifera*. *Mycologia* 88, 626–634. <https://doi.org/10.1080/00275514.1996.12026695>
- Kuo, K.C., Hoch, H.C., 1996b. Germination of *Phyllosticta ampellicida* Pycnidiospores: Prerequisite of Adhesion to the Substratum and the Relationship of Substratum Wettability. *Fungal Genet. Biol.* 20, 18–29. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1996.0005>
- Lacaze, A., Joly, D.I., 2020. Structural specificity in plant-filamentous pathogen interactions. *Mol. Plant Pathol.* 21, 1513–1525. <https://doi.org/10.1111/mpp.12983>
- Lai, C., Pan, H., Huang, X., Fan, L., Duan, C., Li, S., 2018. Validation of reference genes for gene expression analysis of response to anthocyanin induction in cell cultures of

- Vitis davidii* (Rom. Caill.) Foëx. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 54, 642–657. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9937-7>
- Lan, X., Liu, Y., Song, S., Yin, L., Xiang, J., Qu, J., Lu, J., 2019. *Plasmopara viticola* effector PvRXLR131 suppresses plant immunity by targeting plant receptor-like kinase inhibitor BKI1. *Mol. Plant Pathol.* 20, 765–783. <https://doi.org/10.1111/mpp.12790>
- Langcake, P., Pryce, R.J., 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9, 77–86. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(76\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0048-4059(76)90077-1)
- Li, M.-Y., Jiao, Y.-T., Wang, Y.-T., Zhang, N., Wang, B.-B., Liu, R.-Q., Yin, X., Xu, Y., Liu, G.-T., 2020. CRISPR/Cas9-mediated VvPR4b editing decreases downy mildew resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Hortic. Res.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00371-4>
- Liao, C.-J., Hailemariam, S., Sharon, A., Mengiste, T., 2022. Pathogenic strategies and immune mechanisms to necrotrophs: Differences and similarities to biotrophs and hemibiotrophs. *Curr. Opin. Plant Biol.* 69, 102291. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102291>
- Liu, L., Zhang, B., Wang, H., Yu, S.Y., Guan, T.S., Huang, Y.F., Chang, Y.L., 2020. Candidate resistance genes selection and transcriptome analysis for the early responses to *Plasmopara viticola* infection in grape cultivars. *J. Plant Pathol.* 102, 857–869. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00546-x>
- Loskill, B., Molitor, D., Koch, E., Harms, M., Berkelmann-Löhnertz, B., Hoffmann, C., Kortekamp, A., Porten, M., Louis, F., Maixner, M., 2009. Strategien zur Regulation der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) im ökologischen Weinbau (Report). Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, D-Bernkastel-Kues.
- Luo, L., 2012. Plant cytokine or phyto cytokine. *Plant Signal. Behav.* 7, 1513–1514. <https://doi.org/10.4161/psb.22425>
- Luttrell, E.S., 1948. Physiologic specialization in *Guignardia bidwellii*, cause of black rot of *Vitis* and *Parthenocissus* species. *Phytopathology* 38, 716–723.
- Ma, F., Yao, W., Wang, L., Wang, Y., 2019. Dynamic translocation of stilbene synthase VpSTS29 from a Chinese wild *Vitis* species upon UV irradiation. *Phytochemistry* 159, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.12.019>
- Makovecz-Tóth, Z., 2016. Lisztharmat indukálta génexpresszió egy fogékony szőlő fajtában – egy új NAC transzkripciós faktor szerepe a fertőzésre adott válaszreakcióban.
- Malacarne, G., Vrhovsek, U., Zulini, L., Cestaro, A., Stefanini, M., Mattivi, F., Delledonne, M., Velasco, R., Moser, C., 2011. Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC Plant Biol.* 11, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-114>
- McCombe, C.L., Greenwood, J.R., Solomon, P.S., Williams, S.J., 2022. Molecular plant immunity against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic fungi. *Essays Biochem.* 66, 581–593. <https://doi.org/10.1042/EBC20210073>
- Mikulás, J., 2019. Sokfelé fertőzött a szőlő feketerothadás. *Kert. És Szőlészet* 68, 14–15.
- Mikulás, J., Tomcsányi, E., 1999. Megjelent hazánkban is a feketerothadás. *Kert. És Szőlészet* 11–12.
- Molitor, D., Beyer, M., 2014. Epidemiology, identification and disease management of grape black rot and potentially useful metabolites of black rot pathogens for industrial applications – a review. *Ann. Appl. Biol.* 165, 305–317. <https://doi.org/10.1111/aab.12155>
- Moreno-Velázquez, M., Hernández-Ramos, L., Preuss-Angeles, A.K., Ronces-Frutos, L.E., Morales-González, I., Carrillo-Ortiz, N., Cárcamo-Rodríguez, A., Moreno-

- Velázquez, M., Hernández-Ramos, L., Preuss-Angeles, A.K., Ronces-Frutos, L.E., Morales-González, I., Carrillo-Ortiz, N., Cárcamo-Rodríguez, A., 2019. PCR detection of *Guignardia bidwellii*, causal agent of grape black rot. *Rev. Mex. Fitopatol.* 37, 383–398. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1905-5>
- Mozsár, J., Süle, S., 1994. A rapid method for somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured anthers of *Vitis riparia*. *Vitis* 245–246. <https://doi.org/10.5073/VITIS.1994.33.245-246>
- Mu, H., Li, Y., Yuan, L., Jiang, J., Wei, Y., Duan, W., Fan, P., Li, S., Liang, Z., Wang, L., 2023. MYB30 and MYB14 form a repressor–activator module with WRKY8 that controls stilbene biosynthesis in grapevine. *Plant Cell* 35, 552–573. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac308>
- Murashige, T., Skoog, F., 1. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Narduzzi-Wicht, B., Jermini, M., Gessler, C., Broggini, G.A.L., 2014. Microsatellite markers for population studies of the ascomycete *Phyllosticta ampellicida*, the pathogen causing grape black rot. *Phytopathol. Mediterr.* 53, 470–479. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-14481](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14481)
- Nascimento, T.L., Oki, Y., Lima, D.M.M., Almeida-Cortez, J.S., Fernandes, G.W., Souza-Motta, C.M., 2015. Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. *Fungal Ecol.* 14, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.10.004>
- Németh, K., 2019. Rezisztens szőlőfajták kontra feketerothadás. *Borászati Füzetek* 31–33.
- Ngou, B.P.M., Jones, J.D.G., Ding, P., 2022. Plant immune networks. *Trends Plant Sci.* 27. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.08.012>
- Noda, J., Brito, N., González, C., 2010. The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity. *BMC Plant Biol.* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-38>
- Oberhollenzer, K., 2013. Histochemical and molecular studies of the interaction of hop with the hop powdery mildew fungus, in: PhD Disszertáció. Technische Universität München.
- Oláh, R., Szegedi, E., Ruthner, S., Korbuly, J., 2003. Thidiazuron-induced regeneration and genetic transformation of grapevine rootstock varieties. *VITIS - J. Grapevine Res.* 42, 133–133. <https://doi.org/10.5073/vitis.2003.42.133-136>
- Oláh, R., Zok, A., Pedryc, A., Howard, S., Kovács, L.G., 2009. Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes. *Sci. Hortic.* 120, 134–137. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.10.003>
- Olah, R., Turcsan, M., Olah, K., Farkas, E., Deak, T., Jahnke, G., Sardy, D.A.N., 2022. Somatic Embryogenesis: A Tool for Fast and Reliable Virus and Viroid Elimination for Grapevine and other Plant Species. *Horticultrae* 8, 508. <https://doi.org/10.3390/horticultrae8060508>
- Onesti, G., González-Domínguez, E., Rossi, V., 2016. Production of Pycnidia and Conidia by *Guignardia bidwellii*, the Causal Agent of Grape Black Rot, as Affected by Temperature and Humidity. *Phytopathology®* 107, 173–183. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-16-0255-R>
- Onesti, G., González-Domínguez, E., Rossi, V., 2017. Production of *Guignardia bidwellii* conidia on grape leaf lesions is influenced by repeated washing events and by alternation of dry and wet periods. *Eur. J. Plant Pathol.* 147, 949–953. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1052-1>

- Onesti, G., González-Domínguez, E., Manstretta, V., Rossi, V., 2018. Release of *Guignardia bidwellii* ascospores and conidia from overwintered grape berry mummies in the vineyard. *Aust. J. Grape Wine Res.* 24, 136–144. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12321>
- Pál, M., Ivanovska, B., Oláh, T., Tajti, J., Hamow, K.Á., Szalai, G., Khalil, R., Vanková, R., Dobrev, P., Misheva, S.P., Janda, T., 2019. Role of polyamines in plant growth regulation of Rht wheat mutants. *Plant Physiol. Biochem.* 137, 189–202. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.02.013>
- Pálfi, X., Karácsony, Z., Csikós, A.C., Bencsik, O., Szekeres, A., Zsófi, Z., Váczy, K.Z., 2020. The potential use of the culture filtrate of an *Aspergillus niger* strain in the management of fungal diseases of grapevine. *J. Cent. Eur. Agric.* 21, 839–850. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/21.4.2942>
- Panstruga, R., 2005. Discovery of Novel Conserved Peptide Domains by Ortholog Comparison within Plant Multi-Protein Families. *Plant Mol. Biol.* 59, 485–500. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-0353-0>
- Pap, D., Riaz, S., Dry, I.B., Jermakow, A., Tenschler, A.C., Cantu, D., Oláh, R., Walker, M.A., 2016. Identification of two novel powdery mildew resistance loci, Ren6 and Ren7, from the wild Chinese grape species *Vitis piasezkii*. *BMC Plant Biol.* 16, 170. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0855-8>
- Parage, C., Tavares, R., Réty, S., Baltenweck-Guyot, R., Poutaraud, A., Renault, L., Heintz, D., Lugan, R., Marais, G.A.B., Aubourg, S., Huguene, P., 2012. Structural, Functional, and Evolutionary Analysis of the Unusually Large Stilbene Synthase Gene Family in Grapevine. *Plant Physiol.* 160, 1407–1419. <https://doi.org/10.1104/pp.112.202705>
- Peng, X.-L., Xu, J., Sun, X.-F., Ying, C.-J., Hao, L.-P., 2015. Analysis of trans-resveratrol and trans-piceid in vegetable foods using high-performance liquid chromatography. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66, 729–735. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1088934>
- Peressotti, E., Wiedemann-Merdinoglu, S., Delmotte, F., Bellin, D., Di Gaspero, G., Testolin, R., Merdinoglu, D., Mestre, P., 2010. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biol.* 10, 147. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-147>
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- 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., Vezzulli, S., 2019. Emergent Ascomycetes in Viticulture: An Interdisciplinary Overview. *Front. Plant Sci.* 10, 1–30. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01394>
- Prezelj, N., Covington, E., Roitsch, T., Gruden, K., Fragner, L., Weckwerth, W., Chersicola, M., Vodopivec, M., Dermastia, M., 2016. Metabolic Consequences of Infection of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. “Modra frankinja” with Flavescence Dorée Phytoplasma. *Front. Plant Sci.* 7, 190632. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00711>
- Qin, S., Veloso, J., Baak, M., Boogmans, B., Bosman, T., Puccetti, G., Shi-Kunne, X., Smit, S., Grant-Downton, R., Leisen, T., Hahn, M., van Kan, J.A.L., 2023. Molecular characterization reveals no functional evidence for naturally occurring cross-kingdom RNA interference in the early stages of *Botrytis cinerea* –tomato interaction. *Mol. Plant Pathol.* 24, 3–15. <https://doi.org/10.1111/mpp.13269>
- Ramsdell, D.C., Milholland, R.D., 1988. Black rot. *Compendium of grape diseases* 15–17.
- Reineke, A., Selim, M., 2019. Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations alter grapevine (*Vitis vinifera*) systemic transcriptional response to European grapevine moth

- (*Lobesia botrana*) herbivory. *Sci. Rep.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39979-5>
- Reinstädler, A., Müller, J., Czembor, J.H., Piffanelli, P., Panstruga, R., 2010. Novel induced mlo mutant alleles in combination with site-directed mutagenesis reveal functionally important domains in the heptahelical barley Mlo protein. *BMC Plant Biol.* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-31>
- Reisch, B.I., Luce, R.S., Mansfield, A.K., 2014. “Arandell”—a Disease-resistant Red Wine Grape. *HortScience* 49, 503–505. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.4.503>
- Rex, F., 2012. Resistenz gegen die Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) in der Weinrebe (*Vitis spec.*) - Etablierung phänotypischer Erfassungsmethoden und genetische Kartierung von Resistenzloci. Diss. Aus Dem Julius Kühn-Inst. <https://doi.org/10.5073/20141114-104255>
- 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). *Theor. Appl. Genet.* 127, 1667–1677. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2329-4>
- Rice, P., Longden, I., Bleasby, A., 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16, 276–277. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02024-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02024-2)
- Rivière, C., Pawlus, A.D., Mérillon, J.-M., 2012. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1317–1333. <https://doi.org/10.1039/C2NP20049J>
- Roat, C., Saraf, M., 2015. Stilbenes: chemistry and pharmacological properties. *J. Appl. Pharm. Res.* 3, 01–07.
- Robinson, J., Harding, J., Vouillamoz, J., n.d. Wine grapes: A complete guide to 1368 vine varieties, including their origins and flavours. Penguin Books Ltd., London.
- Rousseau, J., Chanfreau, S., Bontemps, É., 2013. Les cépages résistants aux maladies cryptogamiques: Panorama européen; Guide technique. Groupe ICV, Lattes.
- Roznik, D., Hoffmann, S., Kozma, P., 2017. Screening a large set of grape accessions for resistance against black rot (*Guignardia bidwellii* (Ell.)). *Mitteilungen Klosterneubg.* 67, 149–157.
- Roznik, D., 2019. A feketerothadás (*Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala et Ravaz) elleni rezisztencia források azonosítása és felhasználhatósága a szőlő rezisztencia nemesítésében, in: PhD (Doktori) Értekezés. Szent István Egyetem, Budapest.
- Rutto, L.K., Mersha, Z., Nita, M., 2021. Evaluation of Cultivars and Spray Programs for Organic Grape Production in Virginia. *HortTechnology* 31, 166–173. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04726-20>
- Santos, R.B., Figueiredo, A., 2021. Two sides of the same story in grapevine–pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* 72, 3367–3380. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab091>
- Schmidt, Á., Hoffmann, P., 2021. A szőlő feketerothadás. *Bor És Piac* 29–31.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Sharma, I., Thakur, A., Sharma, Aditi, Singh, N., Kumar, R., Sharma, Ashutosh, 2022. Phytoalexins: Implications in Plant Defense and Human Health, in: *Plant Secondary Metabolites*. Springer, Singapore, pp. 329–353. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-4779-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-16-4779-6_10)
- Shi, J., Zeng, Q., Liu, Y., Pan, Z., 2012. *Alternaria* sp. MG1, a resveratrol-producing fungus: isolation, identification, and optimal cultivation conditions for resveratrol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 369–379. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4045-9>



- Sidlovits, D., 2019. Vegyszerek, amiket nem akarunk elfogyasztani. Borászati Füzetek 21–25.
- Sivanesan, A., Holliday, P., 1981. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonw Mycol Inst Kew Surrey Engl 701–710.
- Soliman, H.I.A., 2018. Production of Genetically Modified Grape (*Vitis vinifera* L.) Plants. Int. J. Hortic. Agric. Food Sci. 2, 111–120. <https://doi.org/10.22161/ijhaf.2.4.1>
- Sommart, U., Rukachaisirikul, V., Trisuwan, K., Tadpetch, K., Phongpaichit, S., Preedanon, S., Sakayaroj, J., 2012. Tricycloalternarene derivatives from the endophytic fungus *Guignardia bidwellii* PSU-G11. Phytochem. Lett. 5, 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2011.11.010>
- Sosnowski, M., Tan, Y.P., 2017. National Diagnostic Protocol for *Phyllosticta ampellicida*-NDP13 V2, in: National Diagnostic Protocol for *Phyllosticta Ampellicida*. Ed.: Alwis, S.K., Tan, Y P., Baskarathevan, J.
- Spitzmüller, Z., Molnár, E., Szalóki, N., Váczy, K.Z., 2018. Genetic variability of grape black rot (*Guignardia bidwellii*) populations in Hungary. Magy. Mikrobiol. Társ. 2018 Évi Nagygyűlése És XIII Fermentációs Kollok. Absztrakt füzet, 56.
- Stein, U., Blaich, R., 1985. Studies on stilbene production and susceptibility to *Botrytis* in *Vitis* species. *Vitis* 24, 75–87.
- Szabó, M., Csikász-Krizsics, A., Dula, T., Farkas, E., Roznik, D., Kozma, P., Deák, T., 2023. Black Rot of Grapes (*Guignardia bidwellii*)—A Comprehensive Overview. *Horticulturæ* 9, 1–30. <https://doi.org/10.3390/horticulturæ9020130>
- Taillis, D., Becissa, O., Pébarthé-Courrouilh, A., Renouf, E., Palos-Pinto, A., Richard, T., Cluzet, S., 2023. Antifungal Activities of a Grapevine Byproduct Extract Enriched in Complex Stilbenes and Stilbenes Metabolization by *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 71, 4488–4497. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07843>
- Tani, H., Koshino, H., Sakuno, E., Cutler, H.G., Nakajima, H., 2006. Botcinins E and F and Botcinolide from *Botrytis cinerea* and Structural Revision of Botcinolides. *J. Nat. Prod.* 69, 722–725. <https://doi.org/10.1021/np060071x>
- Tashiro, R.M., Philips, J.G., Winefield, C.S., 2015. Identification of suitable grapevine reference genes for qRT-PCR derived from heterologous species. *Mol. Genet. Genomics* 291, 483–492.
- Teka, T., Zhang, L., Ge, X., Li, Y., Han, L., Yan, X., 2022. Stilbenes: Source plants, chemistry, biosynthesis, pharmacology, application and problems related to their clinical Application-A comprehensive review. *Phytochemistry* 113–128. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113128>.
- Thomas, T.D., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol. Adv.* 26, 618–631. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003>
- Thomma, B.P.H.J., Nürnberger, T., Joosten, M.H.A.J., 2011. Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *Plant Cell* 23, 4–15. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082602>
- Thordal-Christensen, H., 2020. A holistic view on plant effector-triggered immunity presented as an iceberg model. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 3963–3976. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03515-w>
- Töpfer, R., Trapp, O., 2022. A cool climate perspective on grapevine breeding: climate change and sustainability are driving forces for changing varieties in a traditional market. *Theor. Appl. Genet.* 135, 3947–3960. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04077-0>
- Ullah, C., Schmidt, A., Reichelt, M., Tsai, C.-J., Gershenzon, J., 2022. Lack of antagonism between salicylic acid and jasmonate signalling pathways in poplar. *New Phytol.* 235, 701–717. <https://doi.org/10.1111/nph.18148>

- Ullrich, C.I., Kleespies, R.G., Enders, M., Koch, E., 2008. Biology of the black rot pathogen, *Guignardia bidwellii*, its development in susceptible leaves of grapevine *Vitis vinifera*. *J. Für Kult.* 61, 82–90.
- Valletta, A., Iozia, L.M., Leonelli, F., 2021. Impact of Environmental Factors on Stilbene Biosynthesis. *Plants* 10, 90. <https://doi.org/10.3390/plants10010090>
- van Damme, M., Huibers, R.P., Elberse, J., Van den Ackerveken, G., 2008. Arabidopsis DMR6 encodes a putative 2OG-Fe(II) oxygenase that is defense-associated but required for susceptibility to downy mildew. *Plant J.* 54, 785–793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03427.x>
- van der Aa, H.A., 1973. Studies in Phyllosticta. *Stud. Mycol.* 5, 1–110.
- Vannozzi, A., Dry, I.B., Fasoli, M., Zenoni, S., Lucchin, M., 2012. Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *BMC Plant Biol.* 12, 1–22. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-130>
- Várallyay, É., Giczey, G., Burgyán, J., 2012. Virus-induced gene silencing of Mlo genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*. *Arch. Virol.* 157, 1345–1350. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1286-y>
- Vezzulli, S., Malacarne, G., Masuero, D., Vecchione, A., Dolzani, C., Goremykin, V., Mehari, Z.H., Banchi, E., Velasco, R., Stefanini, M., Vrhovsek, U., Zulini, L., Franceschi, P., Moser, C., 2019. The Rpv3-3 Haplotype and Stilbenoid Induction Mediate Downy Mildew Resistance in a Grapevine Interspecific Population. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00234>
- Viala, P., Ravaz, L., 1886. Mémoire sur une nouvelle maladie de la vigne, le Black Rot (pourriture noire). *Ann. L'École Natl. D'Agriculture Montp.* 2, 17–58.
- Viret, O., Spring, J.-L., Gindro, K., 2018. Stilbenes: biomarkers of grapevine resistance to fungal diseases. *OENO One* 52, 235–241. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2018.52.3.2033>
- Wan, D.-Y., Guo, Y., Cheng, Y., Hu, Y., Xiao, S., Wang, Y., Wen, Y.-Q., 2020. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of VvMLO3 results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*). *Hortic. Res.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0339-8>
- Wang, J., Cox, D.G., Ding, W., Huang, G., Lin, Y., Li, C., 2014. Three New Resveratrol Derivatives from the Mangrove Endophytic Fungus *Alternaria* sp. *Mar. Drugs* 12, 2840–2850. <https://doi.org/10.3390/md12052840>
- Wang, W., Tang, K., Yang, H.-R., Wen, P.-F., Zhang, P., Wang, H.-L., Huang, W.-D., 2010. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.12.002>
- Wang, X., Liu, Y., Guo, L., Shen, J., Hu, H., Zhou, R., 2022. Transcriptome analysis of Crimson seedless grapevine (*Vitis vinifera* L.) infected by grapevine berry inner necrosis virus 3. <https://doi.org/10.1016/j.crviro.2022.100024>
- Weiskirchen, S., Weiskirchen, R., 2016. Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? *Adv. Nutr.* 7, 706–718. <https://doi.org/10.3945/an.115.011627>
- Winterhagen, P., Howard, S.F., Qiu, W., Kovács, L.G., 2008. Transcriptional Up-Regulation of Grapevine MLO Genes in Response to Powdery Mildew Infection. *Am. J. Enol. Vitic.* 59, 159–168. <https://doi.org/10.5344/ajev.2008.59.2.159>
- Wu, W., Fu, P., Lu, J., Wu, W., Fu, P., Lu, J., 2022. Grapevine WRKY transcription factors. *Fruit Res.* 2, 1–8. <https://doi.org/10.48130/FruRes-2022-0010>

- Yao, X., Wang, X., Hu, X., Liu, Z., Liu, J., Zhou, H., Shen, X., Wei, Y., Huang, Z., Ying, W., Wang, Y., Nie, Y.-H., Zhang, C.-C., Li, S., Cheng, L., Wang, Q., Wu, Y., Huang, P., Sun, Q., Shi, L., Yang, H., 2017. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res.* 27, 801–814. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.76>
- Zeilmaker, T., Ludwig, N.R., Elberse, J., Seidl, M.F., Berke, L., Van Doorn, A., Schuurink, R.C., Snel, B., Van den Ackerveken, G., 2015. Downy mildew resistant 6 and dmr6-like oxygenase 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in *Arabidopsis*. *Plant J.* 81, 210–222. <https://doi.org/10.1111/tpj.12719>
- Zhang, K., Zhang, N., Cai, L., 2013. Typification and phylogenetic study of *Phyllosticta ampellicida* and *P. vaccinii*. *Mycologia* 105, 1030–1042. <https://doi.org/10.3852/12-392>
- Zhang, X., Wu, Y., Li, Z., Song, C., Wang, X., 2021. Advancements in plant regeneration and genetic transformation of grapevine (*Vitis* spp.). *J. Integr. Agric.* 20, 1407–1434. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63586-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63586-9)
- Zhou, N., Chen, Q., Carroll, G., Zhang, N., Shivas, R.G., Cai, L., 2015. Polyphasic characterization of four new plant pathogenic *Phyllosticta* species from China, Japan, and the United States. *Fungal Biol.* 119, 433–446. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.08.006>
- Zhu, W., Ronen, M., Gur, Y., Minz-Dub, A., Masrati, G., Ben-Tal, N., Savidor, A., Sharon, I., Eizner, E., Valerius, O., Braus, G.H., Bowler, K., Bar-Peled, M., Sharon, A., 2017. BcXYG1, a Secreted Xyloglucanase from *Botrytis cinerea*, Triggers Both Cell Death and Plant Immune Responses. *Plant Physiol.* 175, 438–456. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00375>



## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Bisztray György Dénesnek és Dr. Deák Tamásnak a sok évnyi támogatását, biztatását, valamint Dr.Kellner Nikolettnek, a MATE Szőlészeti Tanszék minden munkatársának segítségét. A MATE Növénykórtani Tanszék kutatóinak a támogatását.

Köszönöm Dr. Oláh Róbertnek és a kecskeméti kutatóintézet munkatársainak, Dr.Jahnke Gizellának, a pécsi kutatóintézet munkatársainak, Dr. Spitzmüller Zsoltnak és az egri kutatóintézetnek, valamint a bécsi BOKU egyetemről Fatemeh Maghulynak, Souleyman Badónak a hasznos tanácsait, valamint Markus Freudhofmaier segítségét.

Köszönöm a családom, párom, barátaim támogatását és pszichológusom tanácsait.