

Doktori értekezés tézisei

Dankó Tamás

Budapest

2021.



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Kertészettudományi Doktori Iskola

A szőlőbogyó-*Botrytis* kölcsönhatás transzkriptom szintű sajátosságai Furmint szőlőfajta aszúsodási folyamata során

Dankó Tamás

Budapest

2021.

Doktori iskola megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola
tudományága: Kertészettudomány

Vezetője: *Zámboriné Dr. Németh Éva*
Egyetemi tanár, az MTA doktora
Magyar Agrár- és Élettudományi
Egyetem
Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezető: *Dr. Horváthné Petróczy Marietta*
Egyetemi docens
Magyar Agrár- és Élettudományi
Egyetem
Növénykórtani Tanszék

Társ témavezető: *Dr. Pogány Miklós*
Tudományos főmunkatárs
ELKH Agrártudományi
Kutatóközpont Növényvédelmi
Intézet
Növényi Kóréletani Osztály

.....
Iskolavezető jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása

.....
Társ-témavezető jóváhagyása

1. A munka előzményei, a kitűzött célok

A tokaji aszú a világ egyik legkülönlegesebb bora, melyet 2013-ban magyarországi hungarikumnak nyilvánítottak. Az aszú borok készítéséhez szükséges aszúbogyókat az érett szőlőfürtök és a *Botrytis cinerea* Pers. gomba különleges kölcsönhatásaként fellépő nemes rothadás folyamata eredményezi. A szőlő számára kedvezőtlen időjárási feltételek esetén ugyanakkor ez a növénygomba kölcsönhatás egy súlyos termésveszteséggel járó fürtbetegség, a szürkerothadás formájában nyilvánulhat meg. A *B. cinerea* becslések szerint 10-100 milliárd dolláros veszteséget okoz évente az agrárszektorban világszerte (Weiberg *et al.* 2013). Jelenleg közel 7 millió hektáron termelnek szőlőt (OIV-International Organisation of Vine and Wine, Nemzetközi Bor és Szőlő szervezet), és az a tény, hogy akár teljes termésveszteséget is okozhat a gomba fertőzése, különösen fontossá teszi a szőlő-*B. cinerea* kapcsolat átfogó vizsgálatát.

A *B. cinerea* által okozott nemesrothadás kialakulásához legalább négy alapvető feltételnek kell együttesen fennállnia (Naár és Szarvas 2012):

1. Nedves időjárás a folyamat korai szakaszában, ami a konídiumok csírázásán túl az erőteljes fertőzés elindításához is szükséges;
2. A szőlőbogyók már érett, vagy túlérett állapotban legyenek;
3. A bogyóhéjnak látszólag épnek, sérülésmentesnek kell lennie, hogy ne következessen be robbanásszerű fertőzés;
4. A penetráció megtörténte után hosszú, csapadékmentes időszak következzen.

E négy feltétel esetén a fertőzést követően a gomba lassan tud csak fejlődni, sőt akár le is állhat a növekedése. Szürkerothadás esetén nedves, párás, felhős időjárás következtében az érett szőlőbogyók héja megreped, ezzel utat engedve a robbanásszerű fertőzésnek.

Korábban már vizsgálták nagy áteresztőképességű totál transzkriptom vizsgálatokkal a szőlő-*Botrytis* kapcsolatot (Agudelo-Romero *et al.* 2015, Blanco-Ulate *et al.*

2015, Kelloniemi *et al.* 2015), de ezekben a munkákban a két fertőzésforma összehasonlítása, markerek azonosítása nem történt meg. Ezért külön hangsúlyt fektetnek a kölcsönhatás két végkimenetelének a szőlőbogyó és a gombasejtek oldaláról történő molekuláris biológiai összehasonlítására, mely magyar (Tokaj-hegyaljai) mintákon még nem történt meg.

A kis RNS-ek nem transzlálódó rövid RNS szakaszok, melyek különböző útvonalakon képesek csökkenteni célgénjük mRNA szintjét. A kis RNS-ek nem csak termelőjük gazdaszervezetének mRNA profilját képesek módosítani, hanem a mikroba-növény interakcióban résztvevő másik fél mRNA profilját is (Huang *et al.* 2019). A szőlő-*Botrytis* kölcsönhatás során fellépő kis RNS profil és annak változása a szőlőben korábban nem került vizsgálatra.

Az aszúsodás megvalósulásához különleges mikroklimatikus viszonyok szükségesek, melyeknek kialakulását Tokaj-Hegyalján a globális klímaváltozás is veszélyezteti. Az aszúsodás klímakamrában történő modellezése ezért előremutató tesztkörnyezetet biztosít.

A szőlő illóanyagok rendkívül fontos aromakomponensei a belőlük készülő boroknak. Az aszú boroknál a szőlő illatanyagai kiegészülnek a *B. cinerea* vegyületeivel, melyek a nemesrothadás során keletkeznek. A nemesrothadt és a szürkerothadt Furmint szőlőbogyók illatanyag profiljának meghatározását szabadföldön nem lehet egyszerre vizsgálni, mert a két fertőzésforma egyszerre nem alakulhat ki. Az aszúsodás modellezése során viszont lehetőség nyílt kontrollált körülmények között a két fertőzésforma által okozott illatanyag profil meghatározására.

2. Célok

1. A Furmint szőlőbogyók botritizálódásának kórszövettani karakterizálása.
2. Különböző aszúsodási fázisban lévő Furmint szőlőbogyók totál transzkriptom analízise. A vizsgálat során a növényi és gomba mRNS mintázat együttes elemzése.
3. Különböző aszúsodási fázisban lévő Furmint szőlőbogyók kis RNS analízise. A növényi és gomba miRNS molekulák kifejeződésének együttes vizsgálata.
4. A Furmint szőlőbogyók totál transzkriptom eredményeinek összehasonlítása más botritizálódott szőlőbogyók totál transzkriptom eredményeivel.
5. Az aszúsodás modellezése laboratóriumi körülmények között, ideális ültetvényi klímáparaméterek beállítása mellett.
6. Botritizálódott Furmint bogyó illatanyag markereinek meghatározása.

3. Anyag és módszer

Az aszúsodott Furmint szőlőbogyókat a tokaji borvidéken található Mádról, a Szepsy birtok Betsek dűlőjéből gyűjtöttem 2016, 2017 és 2018 őszén. Négy aszúsodási fázist különítettem el morfológiai jellegek alapján:

- I. fázis: Ép, feszes bőrszövet, melyen látható sérülés nincsen. A bogyó színe zöldes sárga.
- II. fázis: Már megjelentek a gomba tünetei. A bogyónak 25-90%-ban barnás lilás a héja. A bogyó elvesztette feszségét.
- III. fázis: A bogyó teljes egészében barnás lilás. Enyhén töppedt bogyók, akár jelentős mennyiségű gomba képlettel a felszínén.
- IV. fázis: Az aszúbogyók sokkal kisebbek, mint az eredeti szőlőbogyó, színük mély lila vagy barna. Erősen töppedtek, héjszerkezetük megkeményedett, akár látható gomba képletek is vannak rajtuk.

3.1. Gomba biomassza meghatározás

A különböző aszúsodási fázisú Furmint szőlőbogyó minták gomba tartalmának meghatározását *B. cinerea* specifikus, módosított szendvics ELISA kittel (LOEWE) végeztem a gyártó utasításai szerint. A gomba mennyiségének kvantitatív meghatározásához szükséges volt a kalibrációs görbe felvétele, melyhez folyadék kultúrában felnevesztett *B. cinerea*-t használtam.

3.2. Élő-szövet vizsgálat

A szőlőbogyó élősövet meghatározásának alapjai Fuentes és munkatársai (2010) közleményén alapszanak. A félbevágott szőlőbogyók vágott felszínét Fluorescein-diacetát fluorescein festékkel festettem meg, így láthatóvá téve az élő sejteket. GFP szűrővel ellátott fluoreszcens mikroszkóp alatt rögzítettem a fluoreszcencia jelet. A képfeldolgozáshoz a MATLAB szoftver képfeldolgozó modult használtam.

3.3. Totál RNS és kis RNS szekvenálás és adatfeldolgozás

A totál RNS kivonás Reid és munkatársai (2006), a kis RNS kivonás Carra és munkatársai (2007) munkáján alapszanak.

A totál transzkriptom szekvenálását és a nyersadatokat feldolgozását az UD-GenoMed Kft. végezte. A szekvenálást NextSeq500 készüléken (Illumina) végezték. A szekvencia illesztés külön a szőlő (*Vitis vinifera* IGGP 12x) (Jaillon *et al.* 2007) és külön a *B. cinerea* (ASM83294v1) (Van Kan *et al.* 2017) referencia cDNS adatbázisra történt. Nyers expressziós adatok normalizálása DESeq algoritmus alapján történt. Az eltérően expresszálódó gének listáját azonosítottuk Tukey post hoc és Benjamini-Hochberg hamis találati arány korrekcióval (FDR) kiegészített ANOVA teszttel.

A kis RNS szekvenálás Illumina NextSeq500 készüléken történt a teljes transzkriptom szekvenáláshoz hasonlóan. A leolvasott szekvenciák a *V. vinifera* referencia genomra lettek illesztve. Ezt követően a fázisok között eltérően expresszálódó miRNS-ek listáját azonosítottuk Tukey post hoc és Benjamini-Hochberg hamis találati arány korrekcióval (FDR) kiegészített ANOVA teszttel. A növényi miRNS-ek célpontját a PSRNATarget online szerver segítségével prediktáltam (Dai *et al.* 2018).

A totál transzkriptom szekvenálás validálása során a szekvenáláshoz használt RNS mintákban Real-Time PCR technikával megmértem 5-5 *V. vinifera* és *B. cinerea* gén négy aszúsodási fázisban mutatott relatív expresszióját. Az expresszió változás meghatározásához a ddCt módszert alkalmaztam.

A GO kifejezések dúsulásának vizsgálatát a Cytoscape Bingo v3.0.3. szoftver segítségével végeztem. A gének GO annotálási könyvtárát az Ensembl-Biomart és KEGG szerver segítségével készítettem el a *V. vinifera* és *B. cinerea* összes cDNS-re. A teszt során hipergeometrikus statisztikát alkalmaztam és Benjamini & Hochberg hamis találati aránnyal ($p < 0,01$, FDR) korrigáltam az eredményt.

3.4. Az aszúsodás modellezése

A frissen gyűjtött Furmint szőlőfürtöket 10^5 *B. cinerea* konídium/ml koncentrációjú szuszpenzióval permeteztem le és éjszakára közel 100% relatív páratartamon inkubáltam őket szobahőmérsékleten. Másnap az aszúsodás szempontjából kedvező ciklikusan ingadozó (nappal: 20 °C, RH%=60; éjszaka: 5-10 °C, RH%=98) hőmérsékletű és páratartalmú klímakamrába helyeztem őket jól szellőző ládában. Ezzel párhuzamos ugyanígy előkezelt Furmint szőlőfürtöket lezárt, párasított dobozokban is vizsgáltam, melyeken szürkerothadás alakult ki.

3.5. Illatanyag gyűjtés

Az aszúsodás és szürkerothadás klímakamrában történő modellezése során dinamikus illatanyag gyűjtést végeztem a szőlőfürtökről. Az aktívszénrel csapdázott illókomponenseket oldószerrel lemostam és gázkromatográfia kapcsolt tömegspektrométerrel azonosítottam a vegyületeket és határoztam meg a mennyiségüket.

4. Eredmények

4.1. Gomba biomassza meghatározás

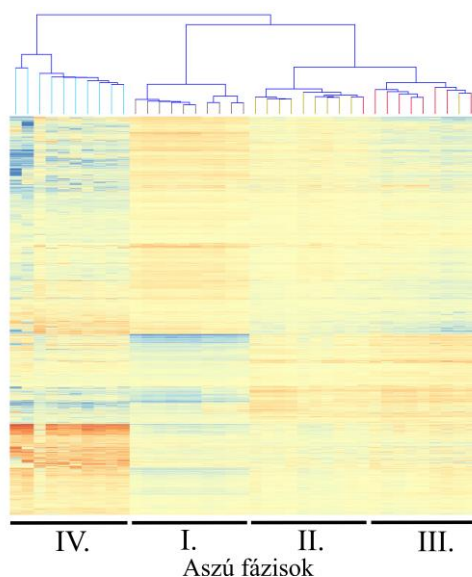
A 2016-os és 2017-es mintagyűjtés alkalmával is meghatároztam az aszúsodott Furmint szőlőbogyókban a *B. cinerea* biomasszájának mennyiségét ELISA tesztel. 2016-ban egész bogyó őrleményből, míg 2017-ben a bogyót elkülönítettem hús, héj, mag szövetekre és külön-külön határoztam meg bennük a gomba mennyiségét. Mindkét évben azt tapasztaltam, hogy az I. aszúsodási fázisban alig vagy nem volt kimutatható a gomba jelenléte. II. fázisban már megemelkedik a *B. cinerea* mennyisége, a III. fázisban eléri az aszúsodás során tapasztalt maximumot, a IV. fázisban pedig már enyhén csökken. A szövetek gombatartalmának vizsgálata során azt tapasztaltam, hogy a gomba először a bogyó héján jelenik meg, majd a III. és IV. aszúsodási fázisra jelentős mértékben a bogyó húzában van jelen.

4.2. Élő-szövet vizsgálat

A 2017-es mintagyűjtés során gyűjtött Furmint szőlőbogyókon meghatároztam, hogy az aszúsodás során mekkora a bogyók élő-szövet aránya az egyes aszús fázisokban. A vizsgálat során az FDA festék bekerül a sejtekbe, ahol nem specifikus észterázok hatására fluorofor vegyületté alakul át. A fluoreszcenciát fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltam és Matlab program használatával analizáltam a képeket. Az eltérő bogyó méretek miatt szükség volt az adatok normalizálására, amit a bogyó területének meghatározásával értem el. A második fázisban mért normalizált élősövet mennyisége 36%-a az első aszúsodási fázisban mértnek, a harmadikban pedig mindössze 4%-a. A négyes fázisban, ami már kész aszúbogyót jelent, fluoreszcens jel nem volt detektálható.

4.3. Totál transzkriptom szekvenálás eredmények

A szőlő és gomba totál transzkriptom szekvenálás expressziós értékeinek vizsgálata során minden esetben az I. aszúsodási fázishoz történt az expressziós értékek viszonyítása. Az élő szövet vizsgálatból nyilvánvalóvá vált, hogy a IV. aszúsodási fázisban kapott szekvenálási eredmények a szőlő tekintetében csak a magból származhatnak, ezért ezeket nem vettem számításba a biológiai folyamatok vizsgálata során. A szekvenálásból nyert génexpressziós profilok a szőlő (1. ábra) és gomba esetében is fázisonként jól elkülönülő, de azonos fázison belül hasonló mintázatot mutatnak.



1. ábra

Furmint szőlőbogyó totál transzkriptom analízisének expressziós értékei aszúsodási fázisonként, hierarchikus klaszterezésben ábrázolva.

A II. aszúsodási fázisban 1637, míg a III. fázisban 2126 indukálódott gént azonosítottam. Ezek közül 1517 gén azonos volt. GO kifejezés dúsulási tesztet végeztem szőlőben végbemenő biológiai folyamatokra. Mindkét aszúsodási fázisban szignifikánsan aktiválódtak a védekezésben szerepet játszó, kitin lebontásért, sejtfal módosításért és redox folyamatokért felelős gének.

4.3.1. A szőlő antioxidáns rendszerek aktiválódása aszúsodás során

A *glutathion-s-transferáz* gének közül 18, *glutathion-peroxidáz* gének közül csak két gén indukálódott az azonosított 17-ből. Két *szuperoxid-dizmutáz* (SOD) gén indukálódott, két *kataláz* gén expressziója csökkent. A 90 azonosított *peroxidáz* génből 16 gén indukálódott a II. és 15 a III. aszúsodott fázisban.

4.3.2. L-fenilalanin lebontásából eredő másodlagos anyagcseretermékek szintézise

A növényi sejtekben az L-fenilalanin lebontásával fenilpropanoid, sztilbén és flavonoid prekursorok képződnek. A nemesrothadás során tíz *fenil-alanin-ammonia-liáz* gén expressziója növekedett meg 1-3 (\log_2) értékkel. A *transz*

fahéjsav-4-monooxygenáz expressziója nagy mértékben megnőtt és a *4-kumaril-Koa-ligáz* gének expressziója is emelkedett. Ezek a gének elengedhetetlenek a fenilpropanoid útvonal további, egymásra épülő metabolikus folyamataiban.

A lignin bioszintézishez vezető út a *p-kumarilsav p-kumaril-3-hidroxiláz* enzim által katalizált hidroxilációjával ágazik le, de ezeknek a géneknek az expressziója nem mutat változást az aszúsodás során. Az így keletkező kávéssav a *kávéssav-3-O-metiltransferáz* (COMT) segítségével metileződés közben ferrulasavvá alakul.

Ezzel ellentétben a *sztilbén-szintáz* gének nagy számban indukálódtak. Az antocianinok bioszintézisében a végső glikolizálásért az *UDP-Glc:flavonoid 3-O-glikoziltransferáz* (UF3GT) a felelős. Furmint szőlő nemesrothadása során több *UF3GT* gén transzkripciója megnövekedett. Továbbá három, a genomban egy klaszterben elhelyezkedő *UF3GT* gén kizárólag a nemesrothadás során indukálódik (Agudelo-Romero *et al.* 2015, Blanco-Ulate *et al.* 2015, Kelloniemi *et al.* 2015).

4.3.3. PR fehérjék a tokaji aszúsodás folyamatában

A jellemzően szalicilsav közvetítette jelátviteli útvonalon helyetfoglaló *PR1* (*Pathogenesis-related 1*), *PR2*, *PR5* gének, melyek biotróf kórokozók esetén indukálódnak a Furmint aszúsodása során többnyire repressziót mutatnak. A JA-közvetítette jelátviteli útvonalhoz köthető *PR3* (Endokitináz), *PR4* (Kitináz), és *PR12* (Defenzin) csoportba tartozó gének viszont indukálódnak. Az azonosított *PR6* (Proteináz inhibitor) család génjei közül mindegyiknél indukálódás figyelhető meg, így ez a legintenzívebben aktiválódó PR csoport az egészséges bogyókban mért génexpressziós profilhoz képest.

4.3.4. Transzkripciós faktorok expressziója a Furmint aszúsodása során

A növényi transzkripciós faktoroknak (TF) hat családja (*AP2/ERF*, *bHLH*, *MYB*, *NAC*, *WRKY*, *bZIP*) köthető a kórokozók elleni védekező mechanizmusok szabályozásához. A 100 *AP2/ERF* családba tartozó TF-ok közül 25-nek az

expressziója változott a tokaji minták esetében, melyek közül csak kettő represszálódott. A szőlőben azonosított 115 *bHLH* típusú TF-ból 11 gén expressziója változott szignifikánsan, melyek közül a fele indukálódott. 138 *MYB* típusú TF-ból 14 expressziós értéke változott szignifikánsan, melyeknek a harmada represszálódott. 71 *NAC* típusú TF-ból 11 expressziója változott, melyek közül kilenc indukálódott. 47 *bZIP* TF-ból aszúsodott Furmint mintákban mindössze 11 expressziója változott meg, melyek fele indukálódott. A szőlőben azonosított 59 *WRKY* típusú transzkripciósfaktorból 23 expressziós értéke lépte át a küszöbértéket a kontrollhoz képest, mindössze két gén expressziója csökken.

4.4. Furmint és Semillon nemesrothadás expressziós profiljának összehasonlítása

Összehasonlítottam a Furmint és a Semillon második és harmadik aszúsodási fázisban indukálódó gének profilját (Blanco-Ulate *et al.* 2015). Az összehasonlítási eredmények szerint a második fázisban a Furmint mintákban aktiválódott gének 73%-a (1186/1637) és a Semillon 45%-a (1186/2645) megtalálható mindkét csoportban, míg a harmadik fázisban a tokaji mintákban aktiválódott gének 67%-a (1430/2126) és a Semillon 52%-a (1430/2732) megtalálható mindkét csoportban.

Összehasonlítottam a Furmint és a Semillon II. fázisban lévő nemesrothadt minták transzkripciósfaktorainak változását. Mind a hat vizsgált TF esetében hasonló volt az indukálódott és represszálódott TF-ok aránya TF családon belül. Sok esetben ugyanazok a gének expressziós értéke változott meg, így kialakítva a hasonló TF mRNS profilt.

Összehasonlítottam a Furmint és a Semillon szőlőfajták nemesrothadása során változó expressziót mutató PR típusú gének számát. A két vizsgált szőlőfajtnál azonosított változó expressziót mutató PR proteinek száma a Semillonnál közel másfélszer annyi volt, mint a Furmintnál (Furmint: 46, Semillon: 71). A tokaji mintáktól eltérően – ahol csak a JA (PR3, PR4, PR12) útvonalhoz köthető PR

proteinek aktiválódtak – a Semillon minták esetében mind a SA (PR1, PR5), mind a JA (PR3, PR4, PR12) útvonalhoz köthető PR proteinek aktiválódtak. A PR6 család génjei mindkét esetben hasonlóan határozott indukciót mutatnak.

4.5. A nemesrothadás és a szürkerothadás összehasonlítása

Összehasonlítottam a Furmint nemesrothadt és a Marselan szürkerothadt mintákban aktiválódó gének számát és minőségét (Kelloniemi *et al.* 2015). A Furmint II. aszúsodási fázist összehasonlítva Marselannal alig több mint 600 gén (eltérő expressziót mutató gének 22%-a) volt azonos. A szürkerothadás és a tokaji nemesrothadás során változó expressziót mutató TF-ok expressziós értékeinek összehasonlítása során azt tapasztaltam, hogy a szürkerothadás során kevesebb TF indukálódik a szőlőben. Főleg az *AP2/ERF*, *MYB* és *WRKY* TF indukciója marad el a nemesrothadás során tapasztalttól.

Összehasonlítottam a szürkerothadás és az aszúsodás során változó expressziót mutató *PR* típusú gének számát. A két vizsgált fertőzésformában azonosított változó expressziót mutató *PR* proteinek száma közel azonos (aszú: 46, szürkerothadt: 49). Az aszúsodott minták esetében a gének 70%-ának míg a szürkerothadt minták esetében közel 90%-ának nőtt az expressziója a kontrollhoz képest. A Furmint mintáktól eltérően – ahol csak a JA (*PR3*, *PR4*, *PR12*) útvonalhoz köthető *PR* proteinek génjei aktiválódtak – a szürkerothadt minták esetében mind a SA (*PR1*, *PR2*, *PR5*), mind a JA (*PR3*, *PR4*) útvonalhoz köthető *PR* proteinek aktiválódtak. Szürkerothadás során aktiválódott *PR2* gének közül itt is megfigyelhető a *VIT_06s0080g00420* gén indukciója, hasonlóan a Furmint és Semillon szőlőfajtáknál nemesrothadás során.

Összehasonlítottam az aszúsodás és a szürkerothadás során, hogyan változik a reaktív oxigénszármazékok ellensúlyozásáért felelős gének expressziója. Az aszúsodáshoz hasonlóan kevés *SOD* gén aktiválódott szürkerothadás során. Az indukálódott *SOD* gének eltérőek, de az indukálódás mértéke mindkét fertőzésformánál jellemzően kétszerese volt a kontrollhoz képest. A *glutination-*

peroxidáz izoformák esetében nem volt kimutatható expressziós változás, míg a *kataláz* gének expressziója a tokaji mintákban csökkent, a *peroxidáz* gének esetében azonban sokkal változatosabb a helyzet. Jelentősebb expressziós profil különbséget a ROS elimináló rendszerek közül a *glutation-S-transzferáz*-ok génexpressziós profiljában tapasztaltam. Az aszúsodott mintáknál 18 *GST* gén aktiválódott, míg a szürkerothadt mintáknál alig négy. Ezeknek a géneknek az expresszió növekedése is kisebb az aszús minták esetében tapasztalt 3-8-szoros változásnál.

4.6. A *B. cinerea* gomba transzkripciósi eredményei

A *B. cinerea* transzkripciósi eredményei mind a négy aszúsodási fázisban értékelhető eredményeket hoztak, mert a IV. aszúsodási fázisban is élő gomba található az elhalt bogyóban. A GO kifejezés dúsulási tesztet elvégezve azt az eredményt kaptam, hogy leginkább a transzport folyamatok aktiválódnak. A kettes fázisban kevesebb transzport folyamat aktiválódik a hármashoz képest és azok is jellemzően aminosavak és polimerizátumok transzportjára irányulnak. Ezzel szemben a hármashoz jelentős mennyiségű szénhidrát, peptid és kofaktor transzport-folyamat jelenik meg. A korábban azonosított 275 extracellulárisan megjelenő szénhidrátbontó enzim (Blanco-Ulate *et al.* 2014) génexpressziós vizsgálata során az *endo-poligalakturonáz-1* és az *endo-poligalakturonáz-2* már a korai aszúsodási fázisban magas expressziót mutatott hasonlóan a *pektin-metiltranszferáz*-ok, *pektin-liáz*-ok és *pektát-liázok*-hoz. Addig az *endo-poligalakturonáz-6*-nak csak a II., III., IV. fázisban emelkedik meg a transzkriptum szintje, hasonlóan az *endo-ramnogalakturonáz*, *endo- β -glukanáz* és *ramnogalakturonáz* génekhez.

A Furmint aszúsodása során a *B. cinerea* ROS elimináló enzimeinek génexpressziós mintázatát is vizsgáltam. A szőlőhöz hasonlóan a *SOD* gének indukálódása a gomba oldaláról sem történt meg, de három *kataláz* gén, három *peroxidáz* és kilenc *glutation-s-transzferáz* gén indukálódott az aszúsodás során.

A *B. cinerea* másodlagos anyagcseretermékeinek szintéziséért 44 kulcsenzim tehető felelőssé (Collado 2015), melyeket megvizsgáltam aszúsodott Furmint mintákban. Tizenhat génnél találtam szignifikáns változást akár pozitív akár negatív irányban. A *poliketid-szintáz-6* gén, ami a gomba által termelt fitotoxin, a botciniksav szintézisének kulcsenzime (Dalmais *et al.* 2011) az aszúsodás korai szakában indukálódott.

4.7. Kis RNS szekvenálás eredménye

A kis RNS szekvenálás során azonosítottam 36 *V. vinifera* kis RNS variánst (21 miRNS főcsoport), amelyek eltérően fejeződnek ki az aszúsodás folyamata alatt. A kettes fázisban 15 kis RNS expressziója változott, amiből kilencnek nőtt a mennyisége. A hármas fázis esetében 34 kis RNS-ből 19 expressziója nőtt meg szignifikánsan. A kettes aszúsodott fázisban megnövekedett expressziót mutató kis RNS-ek célgénjei között van két kis RNS biogenezishez köthető gén, egy feltételezhetően NB-LRR fehérjét kódoló gén és egy *HD-Zip* transzkripciós faktor. Ezeknek az azonosított célgéneknek az expressziója 1,7-2,5 érték között csökken a II. aszúsodási fázisban a kontrollhoz képest.

A második fázisra csökkent expressziót mutató *Vvmir408* kis RNS célgénje a *VIT_19s0177g00260* szőlő gén, ami egy szerin/treonin protein-kináz-t kódol. Ennek a génnek az expressziós értéke a második fázisban több, mint háromszorosára nő az egészséges bogyóban mért értékhez képest.

A hármas fázisban megnövekedett expressziót mutató azonosított kis RNS-ek célgénjei között van több transzkripciós faktor: három *GRAS* családba, kettő *HD-Zip* családba, kettő *SBP* családba és egy *MYB* transzkripciós faktor családba tartozó gén. Az egyes TF családok csendesítéséért jellemzően néhány kis RNS felelős, így a *GRAS* családot a *VvmiR171b* és a *VvmiR171i*, a *HD-Zip* TF családot a *VvmiR166a*, az *SBP* TF családot a *VvmiR156b* és a *MYB* családot a *VvmiR159c* csendesíti. A TF-ok csendesítésének hatására az expressziójuk 1,6-4,7-szer

alacsonyabb, mint a kontroll mintákban. A kettes fázishoz hasonlóan megjelennek a kis RNS biogenezishez köthető gének és az *NB-LRR* receptor típusú fehérjét kódoló gén csendesítéséért felelős kis RNS-ek.

A *V. vinifera*-ban azonosított kis RNS-eket illesztettem a *B. cinerea* genomra is, azt vizsgálva, hogy a növény-gomba kölcsönhatás során létrejöhet-e *B. cinerea*-ban géncsendesítés a szőlő kis RNS-ek által. A kettes fázisban mindössze egy, feltételezhetően gomba dajkafehérje (chaperon) gént tudtam előrejelezni. A hármas fázisban két célgént tudtam azonosítani, melyeknek az expressziója az adott aszúsodási fázisban csökkent is.

4.8. Illatanyag gyűjtés az aszúsodott és szürkerothadt szőlőfürtökről

Az aszúsodás klímakamrában történő modellezése során intakt, egészséges Furmint szőlőfürtöket használtam kiindulási mintáknak. Az aszúsodással párhuzamosan ugyanilyen hőmérsékleti profil mellett, de folyamatosan magas relatív páratartalmat fenntartva szürkerothadt szőlőfürtöket is előállítottam. A szőlőfürtök légtéréből 4 órás dinamikus illatanyaggyűjtést végeztem. Az illatanyag mintákat GC-MS műszerrel vizsgáltam. A kromatogramokat kiértékelve 35 csúcs mennyiségét értékeltem és ezek közül 32 vegyületet sikerült azonosítanom. Az aszúsodott és szürkerothadt illatanyag profilok komponenseiket tekintve hasonlóak. Mindkét mintatípusnál többféle alifás alkohol, monoterpén és aromás vegyület jelent meg. Jelentős mennyiségben jelen vannak a karbonsav származékú illatanyag komponensek, amik a növényi sejtmembrán sérülés hatására keletkeznek. Statisztikai elemzés során kilenc komponens mennyisége különbözött szignifikánsan az eltérő minta típusokban. Ezek közül a fenetil-alkohol, [S,S]-2,3-butándiol, esetsav, 1-oktén-3-ol, acetoin, izoamil-alkohol és izobutanol mennyisége szignifikánsan nagyobb volt a szürkerothadt mintákban. A transz-geranil-aceton és szulkaton, vegyületek mennyisége az egy hete aszúsodott mintákban emelkedett meg.

5. Következtetések

Disszertációmban a nemesrothadásban résztvevő *Furmint szőlő* és *B. cinerea* gomba kölcsönhatásának vizsgálati eredményeit mutattam be. A munkám kiterjedt makroszkópikus vizsgálatokra, növény és gomba totál transzkriptom vizsgálatra, kis RNS szekvenálási eredményekre és illatanyagprofil meghatározásra.

ELISA technikával meghatároztam a *B. cinerea* gomba eloszlását különböző aszúsodási fázisú szőlőbogyókban. Az érett, de sértetlen bogyó esetében csak a bogyó héján tudtam kimutatni gombát, majd az aszúsodás előrehaladtával egyre nagyobb mennyiségű gombát detektáltam a bogyó belsejében. A harmadik aszúsodási fázisban tetőzött a gomba mennyisége, ezt követően csökkent.

A szőlőbogyó élőszövet vizsgálata során egy szemi-automatizált élőszövet meghatározó rendszert adaptáltam, amellyel gyümölcsök vitalitását lehet kvantitatívan meghatározni. A rendszer alapja a fluoreszcein-diacetát festék, mely élő sejtekben UV fény hatására fluoreszcens fényt bocsát ki, amit nagy érzékenységű kamerával rögzítettem, majd saját készítésű algoritmussal elemeztem ki a képeket. A vizsgálatból kiderült, hogy a bogyó sejtjei a második aszúsodási fázisban már jelentős számban elpusztultak, a harmadik fázisban pedig szinte csak a mag közvetlen környezetében tudtam kimutatni élő sejtet. Ezek az eredmények összhangban vannak az RNS szekvenálás során kapott nyers leolvasási szekvenciák szőlő referencia cDNS adatbázisra illesztett arányaival is – ahol a szőlőre illeszkedő leolvasási szekvenciák az aszúsodás előrehaladtával csökkennek.

A transzkripció eredményekből kiderült, hogy a *Furmint* aszúsodásának II. és III. fázisában hasonló biológiai folyamatok játszódnak le a bogyóban. Erősen indukálódnak a sejtfal módosításáért felelős enzimek, antioxidáns rendszerek (GST, peroxidázok), hősokkfehérjék, PR fehérjék, biotikus stressz elleni

védekezésben szerepet játszó transzkripciós faktorok és a fenil-propanoid útvonal enzimeit kódoló gének.

A Furmint aszúsodásának génexpressziós mintázata nagy hasonlóságot mutat más fajtájú nemesrothadt szőlőbogyók génexpressziós profiljával, amiből következik, hogy a nemesrothadás alapvetően nem szőlőfajta specifikus, tehát általánosan előforduló biológiai folyamat. A Furmint aszúsodás ezen belül mutat egyedi jellegeket más nemesrothadási folyamatokkal szemben, mint pl.: jelentős a *JAZ* gének indukciója, aminek következtében a *bHLH* transzkripciós faktorok erős indukciója is megfigyelhető, továbbá kizárólag a jázmonsav indukálta *PR3,4,12* gének aktiválódnak.

Kutatásom során sikerült azonosítanom több a nemesrothadásra jellemző génexpressziós mintázatot a szürkerothadás és éretlen szőlőbogyó fertőzésével összehasonlítva.

Ilyen marker folyamat a nemesrothadás során a *GST*, *peroxidáz* és *PR6* gének erős aktivitása, melyek a szürkerothadás során szinte teljesen hiányoznak. A biotikus stressz elleni védekezésben is szerepet játszó *AP2/ERF* transzkripciós faktor család indukciója egy nagyságrenddel nagyobb a nemesrothadás során, feltételezhetően a töppedés okozta ozmotikus stressz miatt. Azonosítottam egy nemesrothadás során specifikusan indukálódó *WRKY* transzkripciós faktort, mely feltételezhetően szerepet játszik az aszúsodásban. A *MYB14* és *MYB15* gének expressziója megnő nemesrothadás során, és az általuk indukált *sztilbén-szintáz* gének expressziója is sokkal nagyobb, mint a szürkerothadás során. Ép fehér szőlőben nem indukálódnak az *UF3GT* gének, melyek az antocianin bioszintézis egyik kulcslépéséért felelnek. Azonban kutatási eredményeim megerősítik azt, hogy nemesrothadás során jelentősen indukálódnak ezek a gének, ami megmagyarázza az aszúbogyók barnás-lila színét.

A totál transzkriptom vizsgálat és a klímakamrában modellezett aszúsodás eredményeiből arra lehet következtetni, hogy a két eltérő fertőzési forma

kialakulásáért felelős kulcs tényező a *B. cinerea* megjelenését követő időjárási körülmény. Amennyiben a fertőzés után a gomba számára kedvezőtlen meleg, száraz időjárás köszönt be, akkor a gomba növekedése lelassul, amivel a szőlő időt nyer, és ha nem is megállítani, de sztilbénekkal, sejtfalmódosításokkal, redox rendszer aktiválással képes lassítani a gomba terjedését. Ekkor megy végbe a nemesrothadás.

Ezzel ellentétben, ha a fertőzés megindításáért felelős csapadékos, magas relatív páratartalmú, felhős időjárás elhúzódik, akkor a gomba olyan agresszíven képes fejlődni, hogy a bogyónak nincs ideje reagálni rá, és szürkerothadás történik.

Kutatásom során elsőként készítettem kis RNS szekvenálást nemesrothadt szőlőbogyókból. A kis RNS szekvenálás eredményei arra utalnak, hogy az aszúsodás korai szakaszában a kis RNS-ek többnyire a növekedés gátlását idézik elő, továbbá a korábban kis RNS-ek által csendesített proteázok, lakkázok, szuperoxid-dizmutázok és további védekezésben szerepet játszó gének felszabadulnak a gátlás alól. Az aszúsodás későbbi szakaszában a növekedés gátlása erősödik, és a kis RNS-ek fő célpontjai a transzkripció faktorok lesznek.

A Furmint aszúsodását okozó *B. cinerea* gombában kevesebb *kutináz*, *kataláz*, másodlagos anyagcseretermékért felelős gén és *peroxidáz* gén indukálódik, mint szürkerothadás során. Ezeknek a különbségeknek az ellenére a nemesrothadt és szürkerothadt fertőzésformát mutató gomba génexpressziós profilja hasonló, ami azt sugallja, hogy a fertőzés kimenetele kevésbé függ a gomba anyagcseréjétől.

Párhuzamosan modelleztem a szürkerothadás és az aszúsodás folyamatát klímakamrában, imitálva a hosszantartó esős időszakot, mely a szürkerothadásnak kedvez és az aszúnak kedvező száraz-párás váltakozó időjárást.

A keletkezett szürkerothadt és aszús fürtök légtéréből illatanyag gyűjtést végeztem, majd azonosítottam és meghatároztam az illatanyagok mennyiségét.

Az aszúsodás előrehaladtával a szőlőfürt illatanyag profilja változik. A szürkerothadt illatanyag profil hasonlít az aszúsodott mintáéhoz, azonban néhány, főleg erjedésből származó alkohol mennyisége kiugróan megnő.

6. Új tudományos eredmények

- 1) Kimutattam, hogy az aszúsodás során a Furmint szőlőbogyó sejtjei a folyamat korai szakaszában elpusztulnak.
- 2) Összeállítottam a Furmint szőlőfajta aszúsodásának transzkripciós mintázatát mind a szőlő-, mind a *B. cinerea* sejtjeire vonatkozóan.
- 3) A Furmint aszúsodása során a *glutathion-S-transzferáz* gének és a fenilpropanoid anyagcserében szerepet játszó bizonyos gének (*VvMyb14*, *VvMyb15*, *VvMybPA1*, *VvMybC2-L1*, *VvUF3GT*) transzkripciója markánsan eltér a szőlő szürkerothadása során tapasztalt génexpressziós változásoktól.
- 4) Aszúsodás során a *B. cinerea* sejtjeiben nem következik be a *kutináz* gének aktiválódása, szürkerothadás során viszont a *kutináz* gének (*Bcin01g10830*, *Bcin01g09430*, *Bcin07g01240*) működése fokozódik.
- 5) Összeállítottam a Furmint nemesrothadásának kis RNS mintázatát és szekvenciaelemzés segítségével prediktáltam az eltérően kifejeződő kis RNS-ek szőlő célgénjeit.
- 6) Meghatároztam több olyan illatanyag jelenlétét, melyek a szürkerothadt és nemesrothadt Furmint szőlőbogyókban eltérő mennyiségben termelődnek. A szürkerothadt mintákban több ecetsav, izoamil-alkohol, fenetil-alkohol és 1-oktén-3-ol mutatható ki, a nemesrothadt minták pedig több transz-geranil-acetont és szulkatont termelnek.

7. Irodalom jegyzék

1. Agudelo-Romero P., Erban A., Rego C., Carbonell-Bejerano P., Nascimento T., Sousa L., Martínez-Zapater M., J., Kopka J., Fortes M., A. (2015) Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany* 66(7):1769–1785.
2. Blanco-Ulate B., Amrine K.C., Collins T.S., Rivero M. R., Vicente R. A., Morales-Cruz A., Doyle I. C., Ye Z., Allen G., Heymann H., Ebeler E. S., Cantu D. (2015) Developmental and Metabolic Plasticity of White-Skinned Grape Berries in Response to *Botrytis cinerea* during Noble Rot. *Plant Physiology* 169(4):2422-2443
3. Blanco-Ulate B., Morales–Cruz A., Amrine K.C., Labavitch J.M., Powell A.L., Cantu D. (2014) Genome–wide transcriptional profiling of *B. cinerea* genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. *Frontiers in Plant Science* 5:435
4. Carra A., Gambino G., Schubert A. (2007) A cetyltrimethylammonium bromide–based method to extract low–molecular–weight RNA from polysaccharide–rich plant tissues. *Analytical Biochemistry* 360(2):318–20
5. Collado I.G., Viaud M. (2015) Secondary metabolism in *Botrytis cinerea*:Combining genomic and metabolomic approach 296-302 p. In: Fillinger S., Elad Y. (Szerk) *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* Svájci Springer International kiadó 486
6. Dai X., Zhuang Z., Zhao P.X. (2018) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research* 46(W1):W49–W54
7. Dalmais B., Schumacher J., Moraga J., LE Pêcheur P., Tudzynski B., Collado I.G., Viaud M. (2011) The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology* 12(6):564–79
8. Fuentes S., Sullivan W., Tilbrook J., Tyerman S. (2010) A novel analysis of grapevine berry tissue demonstrates a variety–dependent correlation between tissue vitality and berry shrivel. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16(2):327–336
9. Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Huguency P., Dasilva C., Horner D., Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyère C., Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard

- S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pè M.E., Valle G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A.F., Weissenbach J., Quétier F., Wincker P; French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449(7161):463-467
10. Kelloniemi J., Trouvelot S., Héloir M.C., Simon A., Dalmais B., Frettinger P., Cimerman A., Fermaud M., Roudet J., Baulande S., Bruel C., Choquer M., Couvelard L., Duthieuw M., Ferrarini A., Flors V., Le Pêcheur P., Loisel E., Morgant G., Poussereau N., Pradier J.M., Rascle C., Trdá L., Poinssot B., Viaud M. (2015) Analysis of the molecular dialogue between gray mold (*Botrytis cinerea*) and grapevine (*Vitis vinifera*) reveals a clear shift in defense mechanisms during berry ripening. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 28(11):1167–1180
 11. Naár Z., Szarvas J. (2012) *Borászati Mikrobiológia*. Eger: Eszterházy Károly Főiskola nyomda, 196 p.
 12. Huang C.Y., Wang H., Hu P., Hamby R., Jin H. (2019) Small RNAs - Big Players in Plant-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe* 26(2):173-182.
 13. Reid K.E., Olsson N., Schlosser J., Peng F., Lund S.T. (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology* 6:27
 14. van Kan J.A., Stassen J.H., Mosbach A., Faino L., Farmer A.D., Papanastasiou D.G., Zhou S., Seidl M.F., Cottam E., Edel D., Hahn M., Schwartz D.C., Dietrich R.A., Widdison S., Scalliet G. (2017) A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 18(1):75-89
 15. Weiberg A., Wang M., Lin F.M., Zhao H., Thang Z., Kaloshian I., Huang H., Jin H. (2013) Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* 342(6154):118-123

8. Publikációk listája

Impakt faktoros folyóiratcikkek

Dankó T., Szelényi M., Janda T., Molnár B.P., Pogány M. (2021) Distinct volatile signatures of bunch rot and noble rot, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *accepted*

Balogh E., Juhász Cs., **Dankó T.**, Fodor J., Tóbiás I., Gullner G. (2020) The expression of several pepper fatty acid desaturase genes is robustly activated in an incompatible pepper-tobamovirus interaction, but only weakly in a compatible interaction, *Plant Physiology and Biochemistry* 148:347-358. IF: 3,7

Kámán-Toth E., **Dankó T.**, Gullner G., Bozsó Z., Palkovics L., Pogány M. (2018) Contribution of cell wall peroxidase- and NADPH oxidase -derived reactive oxygen species to *Alternaria brassicicola* -induced oxidative burst in *Arabidopsis*, *Molecular Plant Pathology* 20(4):485-499. IF.: 4,18

Kámán-Toth E., Pogány M, **Dankó T.**, Szatmári Á., Bozsó Z. (2018) A simplified and efficient *Agrobacterium tumefaciens* electroporation method, *3Biotech* 8:148 IF.: 1,36

Fodor J., Kámán-Toth E., **Dankó T.**, Schwarczinger I., Bozsó Z., Pogány M. (2018) Description of the *Nicotiana benthamiana*-*Cercospora nicotianae* Pathosystem, *PHYTOPATHOLOGY* 108(1):149-155. IF: 2,9

Fodor J., Köblös G., Kákai Á., Kárpáti Zs., Molnár B.P., **Dankó T.**, Bozsik G., Bognár Cs., Szöcs G., Fónagy A. (2017) Molecular cloning, mRNA expression and biological activity of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) from the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, *Insect Molecular Biology* 26(5):616-632. IF.: 2,9

Pogány M., **Dankó T.**, Kámán-Tóth E., Schwarczinger I., Bozsó Z. (2015) Regulatory Proteolysis in *Arabidopsis*-Pathogen Interactions, *International Journal of Molecular Science* 16(10): 23177-23194. IF.: 3,2

Köblös G.¹, **Dankó T.**¹, Sipos K., Geigner Á., Fodor J., Fónagy A. (2014) The Regulation of *Δ11-desaturase* gene expression in the pheromone gland of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera; Noctuidae) during pheromonogenesis, *General and Comparative Endocrinology* 221:217-227. IF.: 2,4

Lektorált folyóiratban megjelent magyar nyelvű közlemények

Oláh Cs., Nagy T., **Dankó T.**, Petróczy M., Pogány M. (2019) A *Botrytis cinerea* látens fertőzése Tokaj-hegyalján *Növényvédelem* 80(55):101-109.

Balogh E., Juhász Cs., **Dankó T.**, Fodor J., Tóbiás I., Gullner G. (2019) A zsírsav-deszaturáz gének aktiválódása paprika levelekben tobamovírus fertőzések hatására *Növényvédelem* 80(55):443-453.

Dankó T., Kámán-Tóth E., Petróczy M., Pogány M. (2017) Abiotikus paraméterrel hatása a *Botrytis cinerea* produkció biológiájára *Növényvédelem* 78(11): 497-506.

Konferencia összefoglalók

Dankó T., Kámán-Tóth E., Vági P., Pogány M., (2018) Grape berry and *Botrytis cinerea* parameters during noble rot of Tokaj's grape samples, Denmark, Copenhagen: Plant biology Europe ISBN: 978-87-996274-1-7 pp. 193

Dankó T., Kámán-Tóth E., Vági P., Pogány M., (2018) Description of grape berry (cultivar Furmint) and *Botrytis cinerea* parameters in the process of botrytization, Budapest, Magyarország, Fialat Biotechnológusok Országos Konferenciája

Dankó T., Kámán-Tóth E., Vági P., Gellért Á., Bozsó Z., Pogány M. (2017) Az *Arabidopsis AT4G10540* szubtiláz befolyásolja a növény kórokozókkal szembeni válaszát, Budapest, Magyarország: Magyar Növényvédelmi Társaság, ISSN: 0231 2956 pp. 91

Köblös G., **Dankó T.**, Sipos K., Geigner Á., Fodor J., Fónagy A. (2014) The Regulation of *Δ11-desaturase* gene expression in the pheromone gland of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera; Noctuidae) during pheromonogenesis, Renne, Franciaország: *The 27th Conference of European Comparative Endocrinologists*, VIII. pp. 25-29.