

Doktori (PhD) értekezés

Kellner Nikolett

Gödöllő

2022



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

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

DOI: 10.54598/001830

Kellner Nikolett

Budapest

2022

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

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

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

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

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető(k) jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

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

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

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A (adenine): adenin

ABA (Abscisic Acid): abszcizinsav

AFB (aflatoxin): aflatoxin

Avr (Avirulence): avirulencia

Aw (Active Water): aktív víz

C (cytosine): citozin

CA (Ciklopiazon Acid): ciklopiazonsav

cDNS (complementary DNA): komplementer DNS

CIT (Citrinin): citrin

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

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

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

DD (Degree Day): hőfoknap

DNS (Deoxyribonucleic acid): dezoxiribonukleinsav

DON (Deoxynivalenol): deoxinivalenol

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

ET (Ethylene): etilén

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

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

EU (European Union): Európai Unió

FB (fumonizine B): fumonizin B

FEM (Fondazione Edmund Mach): Edmund Mach Alapítvány

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

G (guanine): guanin

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

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

HR (Hypersensitive Response): hiperszenzitív válaszreakció

IA (Immunoaffinity): immunaffinitás

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

INRA (Institut National de la Recherche Agronomique): Országos Agronómiai Kutató Intézet
ISR (Induced Systemic Resistance): indukált szisztémás rezisztencia
JA (Jasmonic Acid): jázmonsav
JKI (Julius Kühn Institut): Julius Kühn Intézet
MAB (Marker assisted backcrossing): marker támogatott visszakeresztezés
MAMP (Microbe Associated Molecular Pattern): mikrobához köthető molekuláris mintázat
MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases): mitogén aktivált protein kináz
MAS: (Marker Assisted Selection): marker támogatott szelekció
MLF (Malolactic Fermentation): malolaktikus fermentáció
mRNS (messenger Ribonucleic acid): hírvivő ribonukleinsav
NIV (Nivalenol): nivalenol
OEM: Oltalom alatt álló eredetmegjelöléssel ellátott borászati termékek
OFJ: Oltalom alatt álló földrajzi jelzéssel ellátott borászati termékek
OIV (International Organisation of Vine and Wine): Nemzetközi Szőlészeti és Borászati Szervezet
OTA (Ochratoxin A): ochratoxin A
PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern): patogénhez köthető molekuláris mintázat
PCR (Polymerase Chain Reaction): polimeráz láncreakció
PRR (Pattern Recognition Receptor): mintázat felismerő receptor
PTI (PAMP Triggered Immunity): PAMP molekulák által előidézett immunválasz
QoI (Quinone outside Inhibitor): kinonon kívüli inhibitor
QTL (Quantitative Trait Locus): mennyiségi tulajdonságokat meghatározó lokuszok
RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed): élelmiszerekre és takarmányokra vonatkozó gyors riasztórendszer
RNASeq (RNA sequencing): RNS szekvenálás
RNS (Ribonucleic acid): ribonukleinsav
Rpv (Resistance to Plasmopara viticola): Szőlő peronoszpóra elleni rezisztencia
SA (Salicylic Acid): szalicilsav
SAR (Systemic Acquired Resistance): szisztémás szerzett rezisztencia
SPE (Solid Phase Extraction): szilárd fázisú extrakció
T (thymine): timin
TLC (Thin layer Chromatography): vékonyréteg kromatográfia
UC Davis: University of California, Davis - Kaliforniai Egyetem, Davis
UV (Ultra Violet): ultraibolya
ZEA (Zearalenon): zearalenon

1 BEVEZETÉS

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

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

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

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

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

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

2 CÉLKITŰZÉS

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

Megoldandó elméleti problémák, tudományos célok:

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

A tudományos célok elérése érdekében megvalósítandó feladatok:

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

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A szőlő feketerothadása

3.1.1 A kórokozó megjelenése, elterjedése

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

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

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

3.1.2 Gazdanövényköre

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

3.1.3 A kórokozó és biológiája

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

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

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

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

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

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

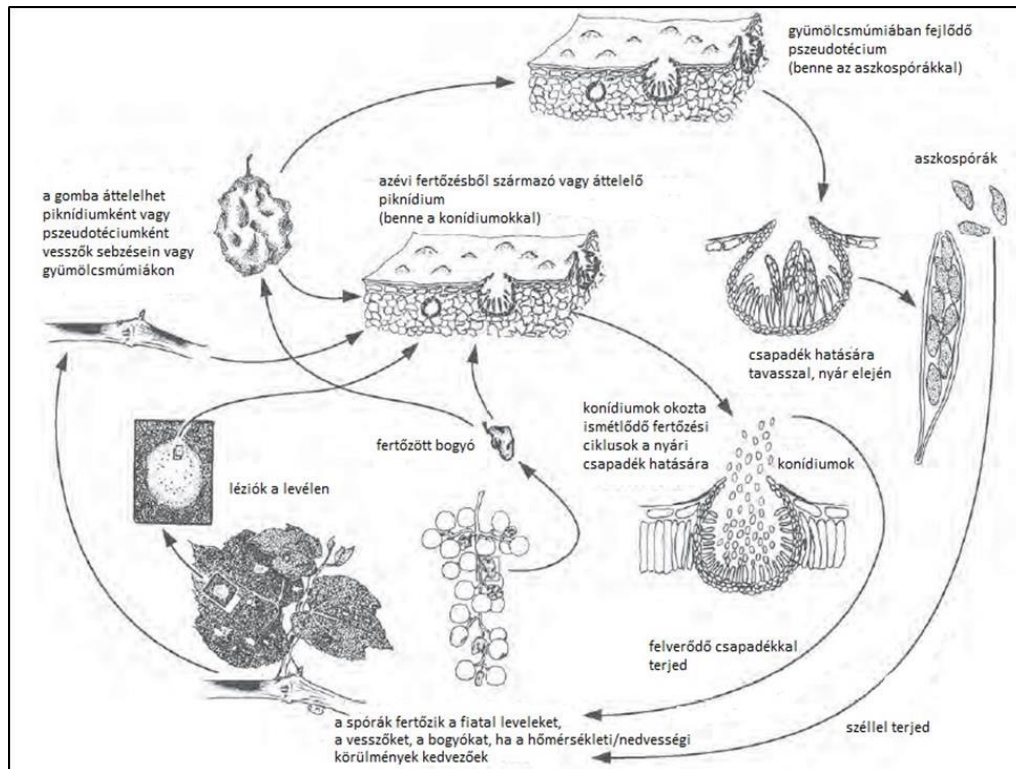
A fertőzés lokalizálásán kívül fontosak a környezeti feltételek is. A feketerothadás fertőzéshez folyamatosan nedves levélfelületre van szükség, minél alacsonyabb a hőmérséklet, annál hosszabb

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

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

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

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



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

3.1.4 A *Guignardia bidwellii* által okozott tünetek

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



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

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



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

3.2 A szőlő feketerothadása elleni védekezés lehetőségei

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

3.2.1 Agrotechnikai megoldások

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

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

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

3.2.2 Kémiai védekezés

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

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

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

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

3.2.3 A kórokozó előrejelzése

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

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

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

3.2.4 A szőlő rezisztencianemesítése

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2.5 Potenciális rezisztenciaforrások a szőlő feketerothadással szemben

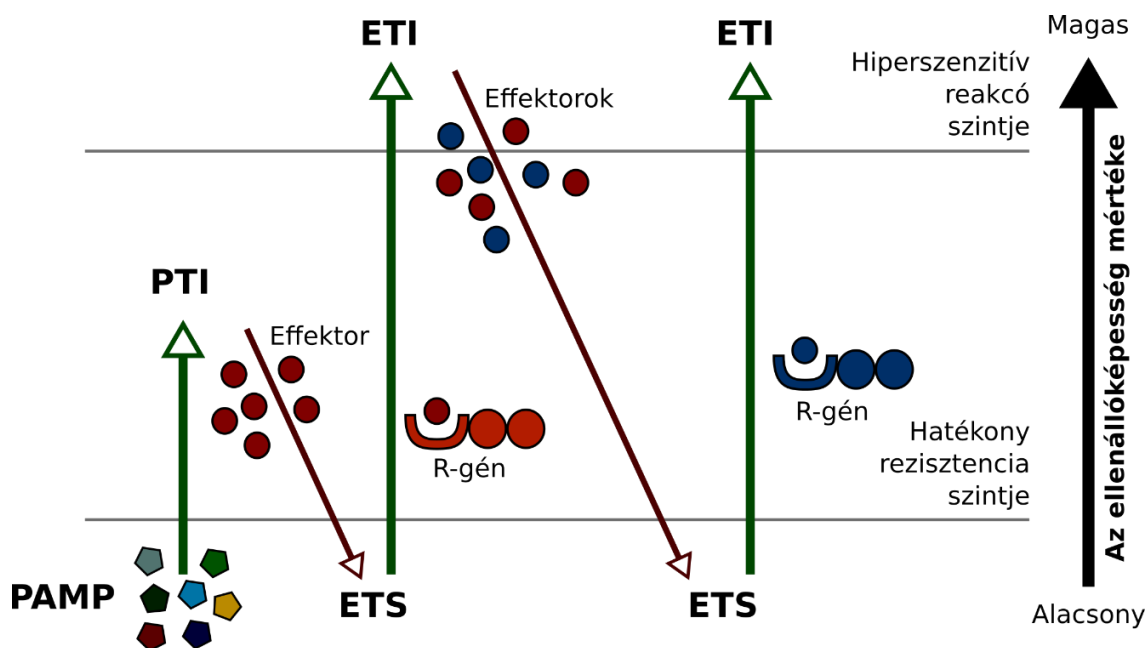
Napjainkban a szőlő rezisztenciakutatások többnyire a vad *Vitis* fajokra irányulnak. Ezek a növények a kórokozókkal való koevolúció eredményeként értékes ellenálló képességért felelős géneket hordoznak. Rezisztencia-forrásként elsősorban az észak-amerikai *Vitis* fajok, valamint ezek rezisztenciáját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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.4 Az RNS szekvenálás technológiája

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.5 Mikotoxin termelő gombák, jelentőségük

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Az a fiziológiai környezet, amelyben a gomba növekszik is nagyban befolyásolja a mikotoxinok termelését. A mikotoxinogén gombákat aeroboknak tekintik, de fakultatívan anaerob körülmények között is növekedhetnek (Taniwaki et al., 2009). Figyelembe véve a légköri gázok okozta hatást, a mikotoxin képződés szabályozható a légkör CO₂-dúsításával vagy az O₂ csökkentésével, míg a gombák növekedését ez nem befolyásolja (Taniwaki et al., 2009). A fény nagyon fontos tényező a penészgombák számára. Különböző élettani reakciókat befolyásol, mint a ivaros fejlődés, az ivartalan szaporodás, a pigmentáció, a másodlagos anyagcsere, stb. (Bayram et al., 2010). Kimutatták, hogy a fehér fény - szemben a sötéttel - csökkentette a mikotoxintermelést (Crespo-

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

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

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

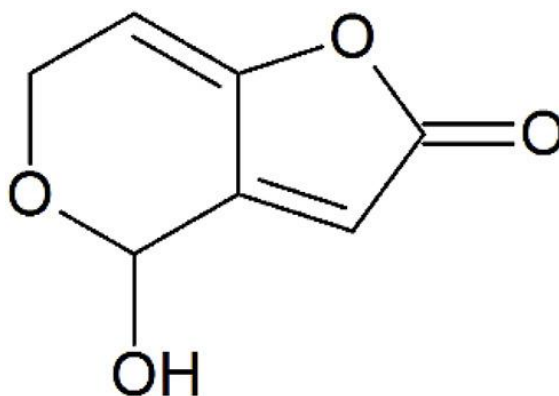
3.5.1 Mikotoxinok a borászatban

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

Patulin

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

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



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

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

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

Ochratoxin

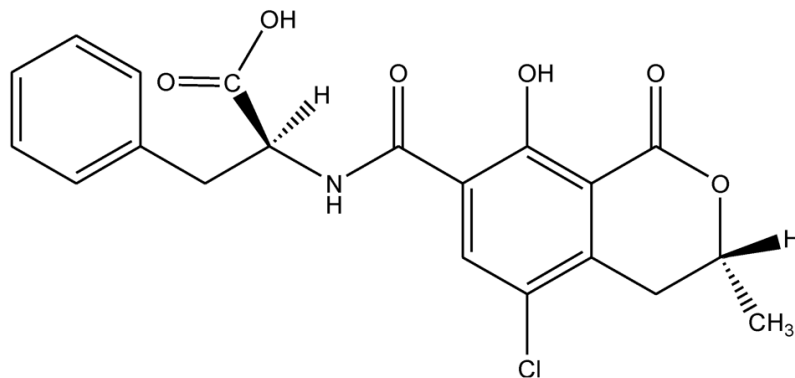
Az ochratoxinok csoportját 3 toxin alkotja, az ochratoxin-A, az ochratoxin-B és az ochratoxin-C, melyeket elsősorban néhány *Penicillium* és *Aspergillus* nemzetséghez tartozó penészgomba termel (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus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

Toxikológiai szempontból a legjelentősebb ezek közül az ochratoxin A (OTA), ami kémiai szerkezetét tekintve (6. ábra) egy hidroxikumarin-karbonsav származék, amely peptidkötéssel kapcsolódik az L-fenil-alaninhoz, klór-atom jelenléte mellett (Téren et al., 1996).

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

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

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



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

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

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

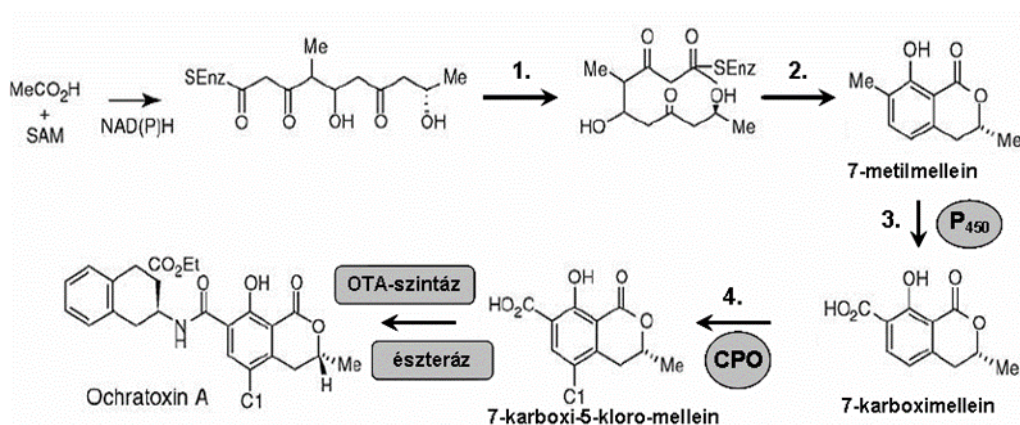
A különböző borok hozzájárulhatnak az OTA akkumulációjához az emberi szervezetben, ezért ezt a tényezőt lényeges élelmiszer-biztonsági veszélyforrásának kell tekinteni. Megelőzésében kulcsszerepet játszik a megfelelő növényvédelem és fitotechnika.

Ochratoxinok bioszintézise

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

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

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



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

3.5.2 Mikotoxinok detektálása

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

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

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

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

3.6 Fiziológiailag aktív vegyületek jelentősége

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

3.6.1 Biogén aminok

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

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

A borban a legfontosabb biogén aminok a tiramin, triptamin, a putreszcin, a hisztamin, a kadaverin, α -alanin, β -alanin, szerotonin, a feniletíl-amin, a spermin és a spermidin.

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

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

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

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

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

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

- Nitrogéntartalmú anyagok metilezése

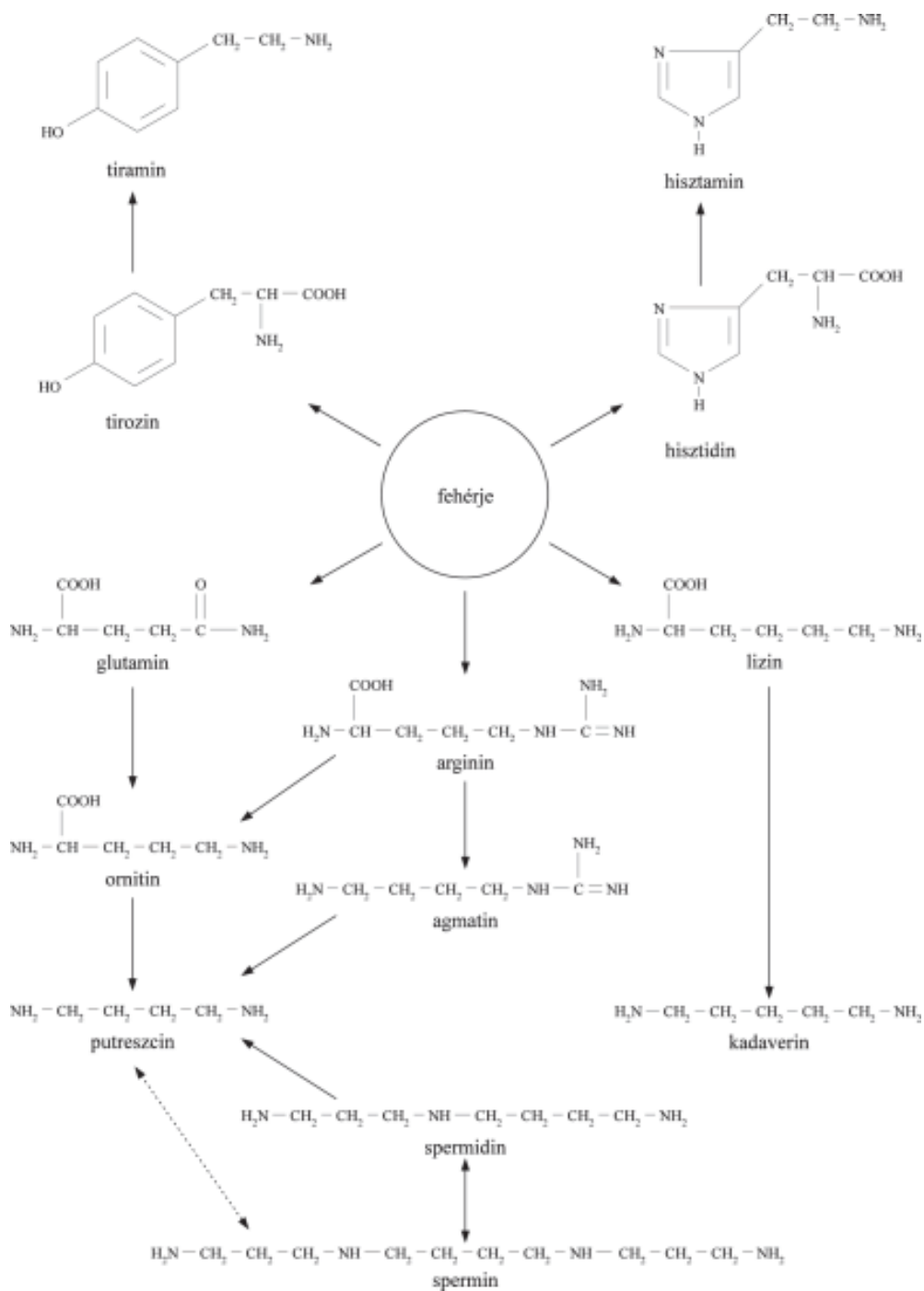
A felsorolt folyamatok közül az aminosavak enzimes dekarboxileződése a legelterjedtebb. Az aminosav-dekarboxileződés révén képződött aminok vagy normál metabolizmus útján a szövetekben termelődnek a fehérje-anyagcsere során vagy a bélflóra dekarboxilázai hatására, vagy táplálékkal és gyógyszerrel kerülhetnek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

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

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

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

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



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

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

Hisztamin

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

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

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

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

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

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

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

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

3.6.2 Polifenolok

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

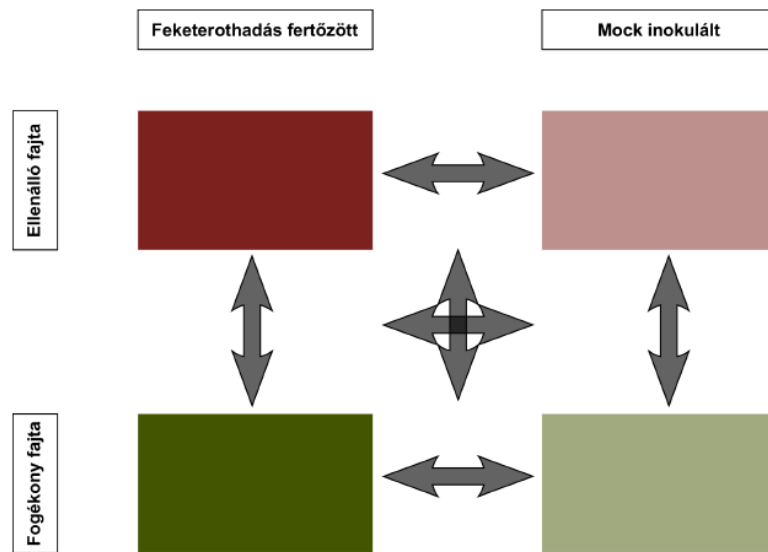
A szőlő kiemelkedően gazdag fenolos vegyületekben (Kállay, 1998). A polifenolok a szőlő különböző részeiben eltérő minőségi és mennyiségi összetételben találhatóak meg. A szőlőből származó polifenolok főként a magokban (60%) és a héjban (30%) koncentrálnak, és kisebb mértékben a gyümölcshúsban és a szárban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

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

4 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Mesterséges fertőzés

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



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

4.1.1 A mesterséges fertőzéshez felhasznált növényanyag

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

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

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

4.1.2 A fertőzés menete

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

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

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

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



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



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

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

4.1.3 Mintavétel

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

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

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

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

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

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

4.1.4 *Guignardia bidwellii* festés tripánkéekkel

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

Szőlő feketerothadás festési protokoll:

– Feltisztítás

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

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

– Festés tripánkéekkel

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

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

4.2 RNS kivonás

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

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

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

Az alkalmazott szőlő RNS kivonás protokollja:

Szükséges anyagok:

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

Az RNS kivonás menete

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

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

4.3 Teljes RNS szekvenálás

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

4.4 Adatelemzés, bioinformatika

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

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

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

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

4.5 Feketerothadt szőlőbogyók kémiai összetételének finomanalitikai vizsgálata

4.5.1 Vizsgált növényanyag

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

4.5.2 Vizsgált összetevők

A bogyó-extraktumokban a következő összetevők mennyiségét vizsgáltuk:

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

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

4.5.3 Az összetevők vizsgálatára alkalmazott mérési módszerek

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

Alapanalitikai vizsgálatok

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

Spektrofotométeres vizsgálatok

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

mértük (Rebelein, 1965). A TAK-érték meghatározását a következőképpen hajtottuk végre: a mintákat desztillált vízzel tízszeresére hígítottuk. Egy 50 ml-es mérőlombikba összemértünk kb. 30 ml desztillált vizet, 0,5 ml hígított bormintát, majd 2,5 ml Folin-Ciocalteu-fenolreagenst és 8 percen belül 7,5 ml 20%-os Na₂CO₃-oldatot adtunk hozzá. Összeráztuk és desztillált vízzel szemben 765 nm-en mértük az abszorbanciát.

NMR-spektroszkópia

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

Kromatográfia

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

A rezveratrolmérés körülményei és a készülék beállításai:

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

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

A biogén amin-tartalom HPLC-módszerrel történő meghatározása a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Borászati Tanszékén történt (Kállay és Nyitrai Sárdy, 2003). A méréshez a must szűrése 0,45 µm átmérőjű membránszűrőn történt, ezután borát-puffer jelenlétében OPA-val (orto-phtal-aldehid) léptettük reakcióba (Bauza et al., 1995; Lethonen, 1996). Az OPA-reagens a következő módon készült: 45 mg OPA-t 0,5 ml metanolban oldottunk, majd 0,1 ml merkaptotetanolt adtunk hozzá. A borát-puffer készítésekor 1 g H₃BO₃-hoz 38 ml desztillált víz lett hozzáadva. A pH-érték 40 g/100 ml KOH oldattal 10,4-es értékre lett beállítva. Az OPA-reagens és a puffer a vegyítést követően négy perccel később az elegyből 20 µl lett a HPLC-berendezésbe injektálva.

A kromatográfiás körülmények az alábbiak voltak:

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

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

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

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

Az OTA mérés körülményei és a készülék beállításai:

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

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

5 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

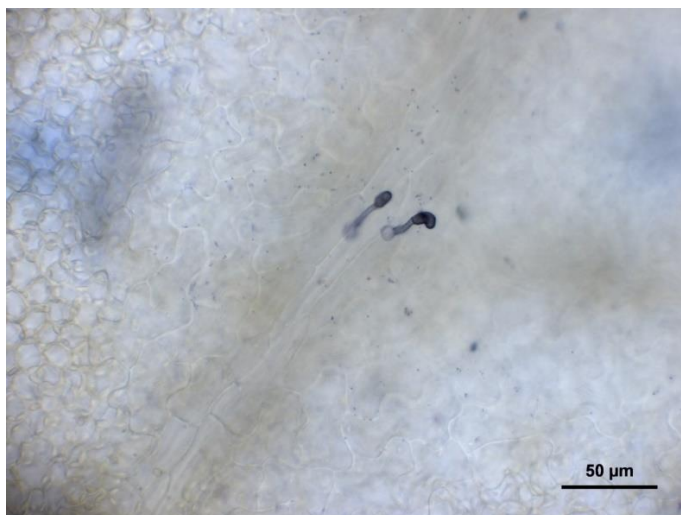
5.1 Feketerothadás érzékenység vizsgálata

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

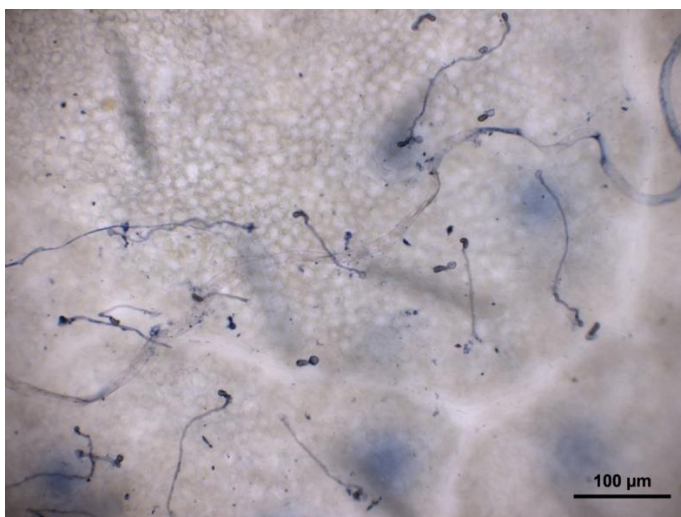
A fajták vagy interspecifikus keresztezések utódnemzedékeinek feketerothadással szembeni ellenállóságát mesterséges fertőzési kísérletekben többen vizsgálták (Spotts, 1977; Rex et al., 2014; Roznik et al., 2017b). A kiértékelés a fertőzés után 2-3 héttel a fertőzött részeken megjelenő tünetek alapján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

5.1.1 A szőlő-feketerothadás kapcsolat vizsgálata szűrőpapírkorongos fertőzéssel

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



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



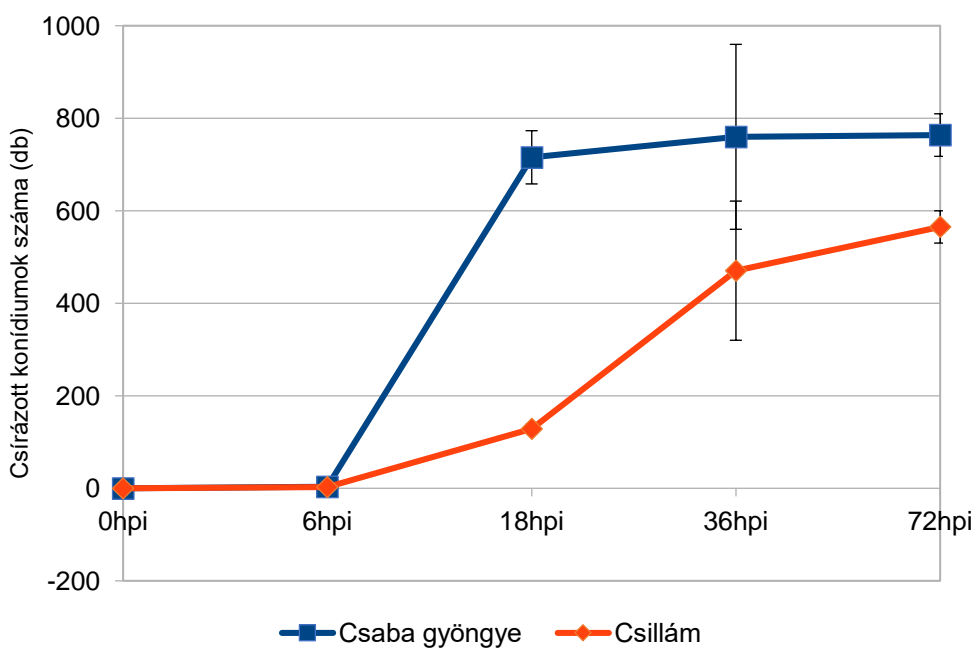
13. ábra: Csírázó spórák 36 órával a fertőzést követően

5.1.2 *Guignardia bidwellii* konídiumok csírázási aránya

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

3. táblázat: Különböző időpontokban vizsgált feketerothadás konídiumok csírázási aránya Csillám és Csaba gyöngye fajtákon

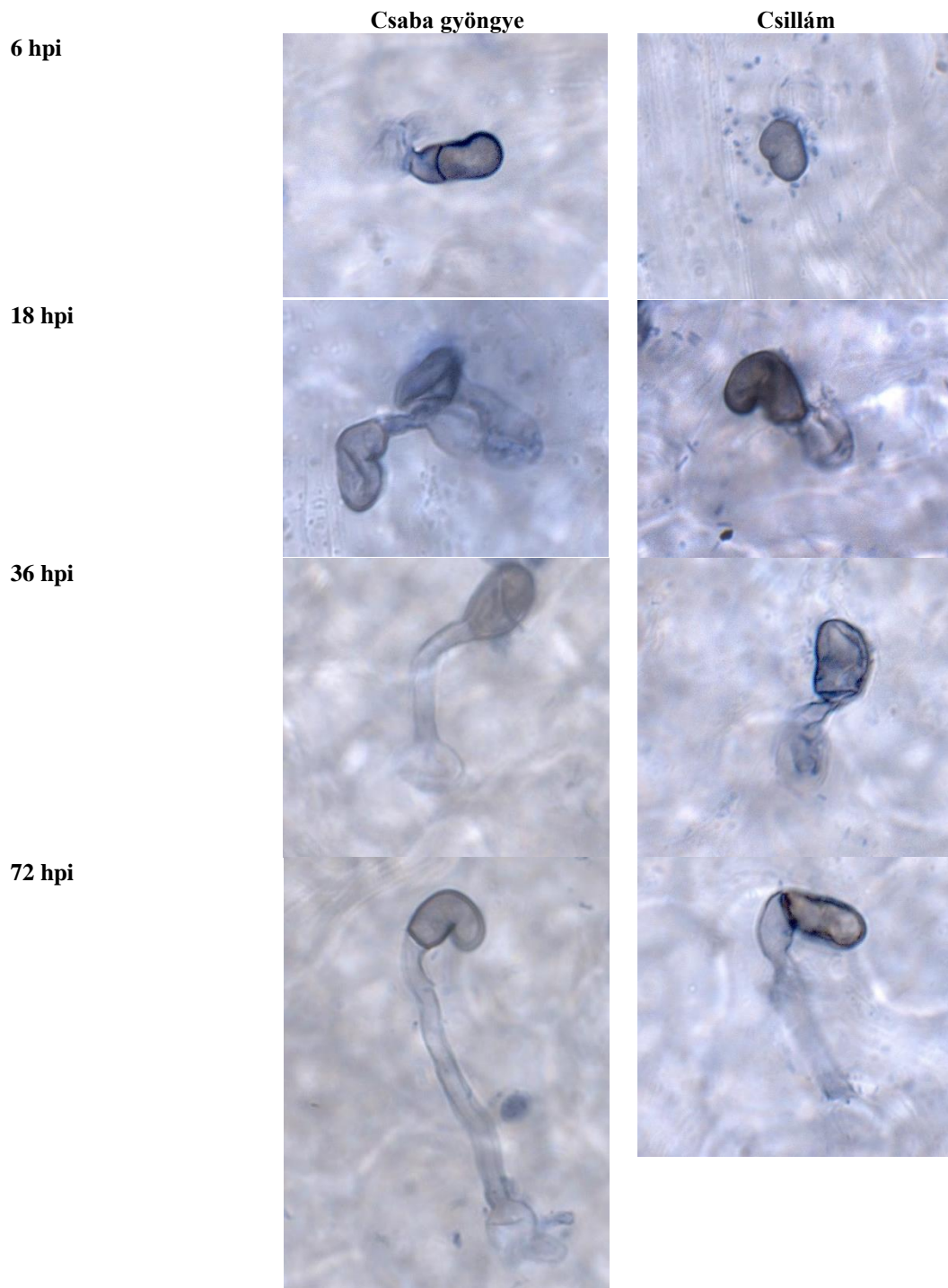
	6hpi	18hpi	36hpi	72hpi
Csaba gyöngye	3,22	715,4444	759,7778	763,5556
Csillám	2,55	128,5556	470,4444	565
p-érték	0,698	6,49E-10	0,003473	3,47E-08
t	0,39627	30,163	3,4695	10,323
df	13,708	8,4686	14,862	14,915



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

5.1.3 Csíratömlő növekedés

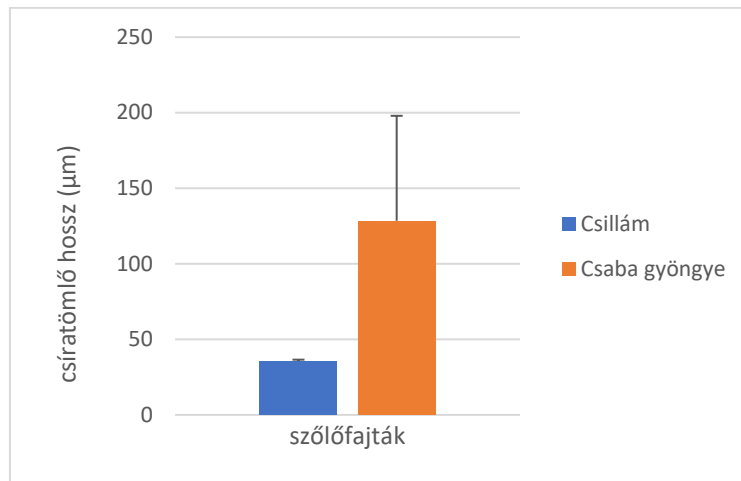
A fogékonyság és ellenállóság jellemzésére a csíratömlők hosszának mérése viszonylag gyors módszer lehet. Megfelelően előkészített növények és megfelelő laboratóriumi körülmények esetén két nap alatt különbséget lehet kimutatni egyes fajták vagy nemesítési anyagok fogékonyságát illetően. Mivel a vizsgálatokat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



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

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

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



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

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

5.2 A feketerothadás fertőzésre adott RNS szintű válaszreakció

5.2.1 Az RNS szekvenálás eredménye

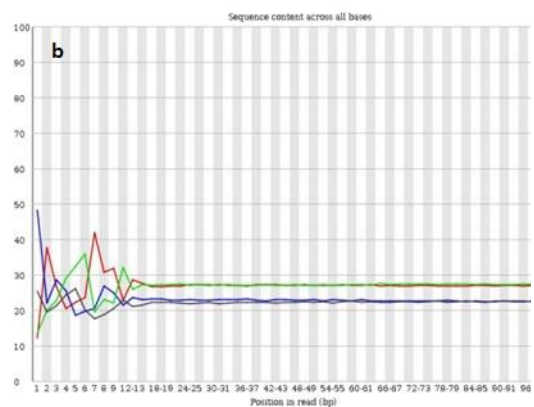
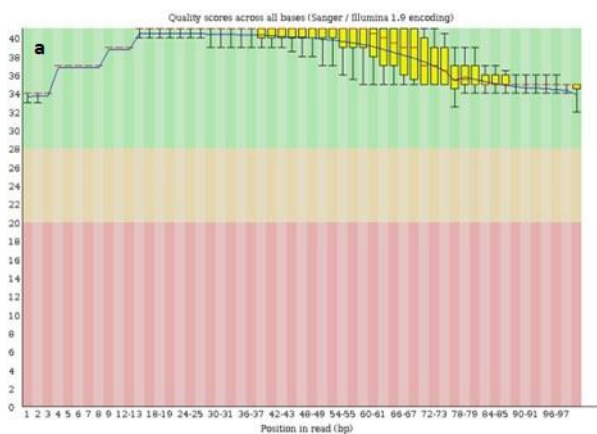
Minőségellenőrzés

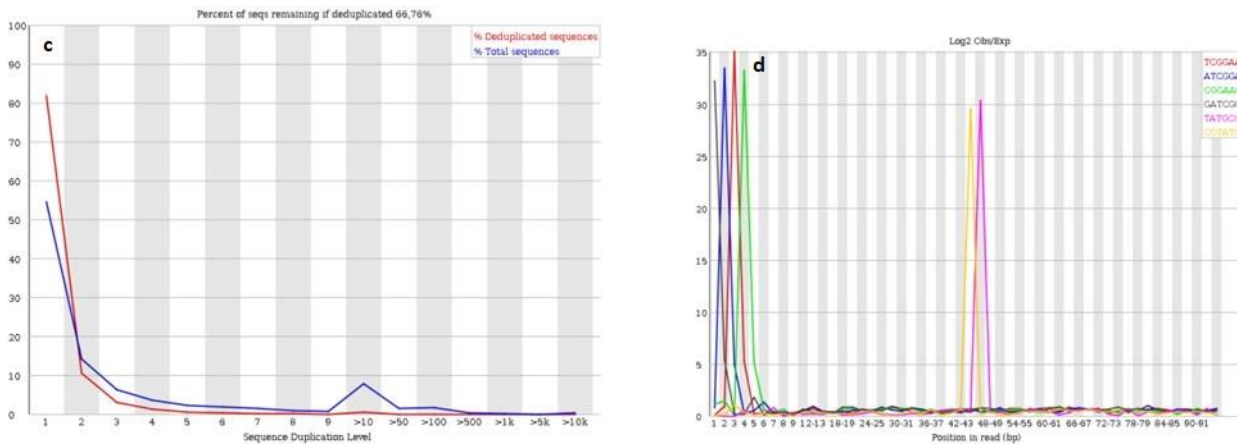
A nyers szekvencia olvasatok számát a 4. táblázat tartalmazza. A minőségellenőrzés alapján a szekvenálás minősége minden esetben kiemelkedő, esetenként a read végén egy-két bázis minősége 30 alá esik (Phred based quality value) (17a ábra). Az egyes pozíciókban található bázis-eloszlás a legtöbb esetben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

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

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

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





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

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

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

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

Adapterek eltávolítása

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

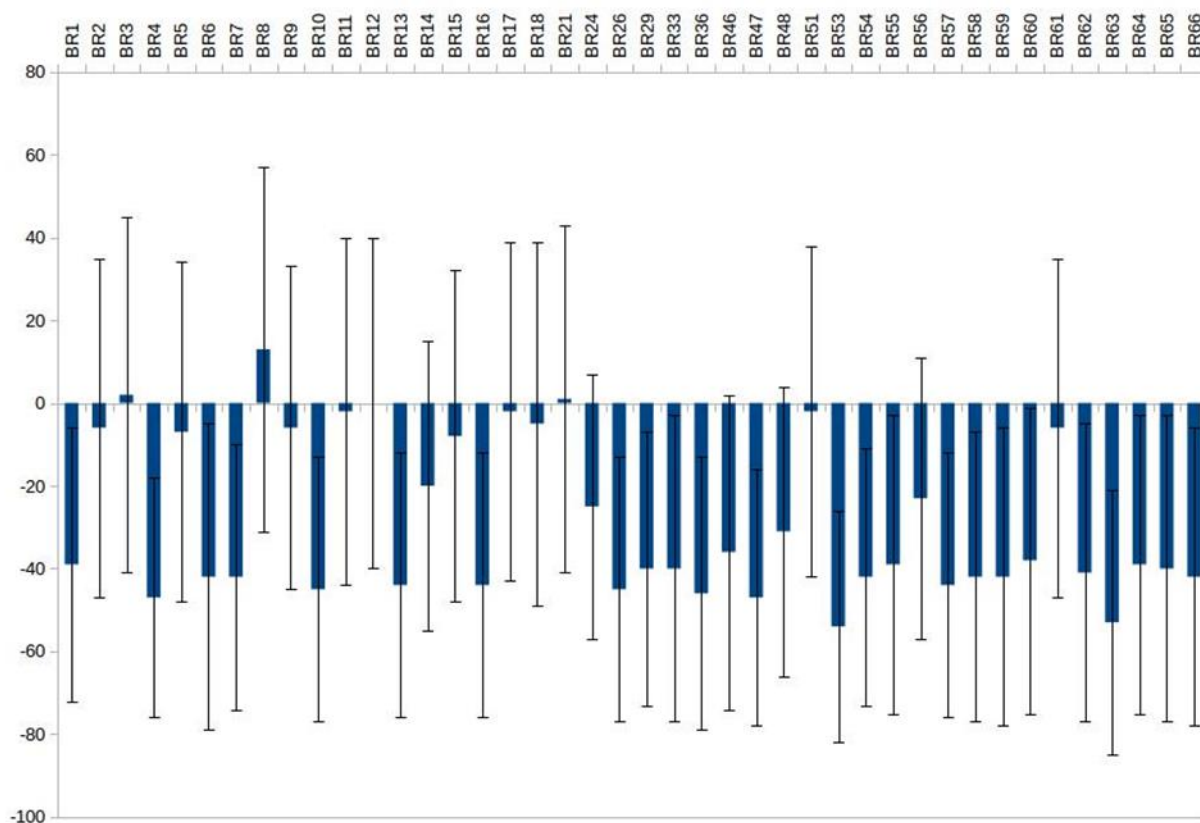
A trimmomatic (Bolger et al., 2014) szoftverrel végeztük el a végső minőségyszűrést. A minőségyszűrést követően megmaradt szekvencia-olvasatok számát az 5. táblázat mutatja.

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

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

5.2.2 Az inzert méret meghatározása

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



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

5.2.3 *De novo* transzkriptom építése

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

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

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

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

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

5.2.4 A génexpresszió mértékének meghatározása

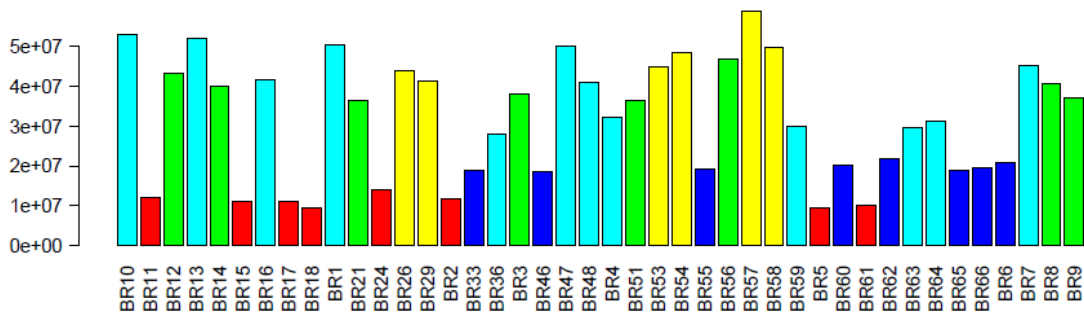
Normalizálás

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

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

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

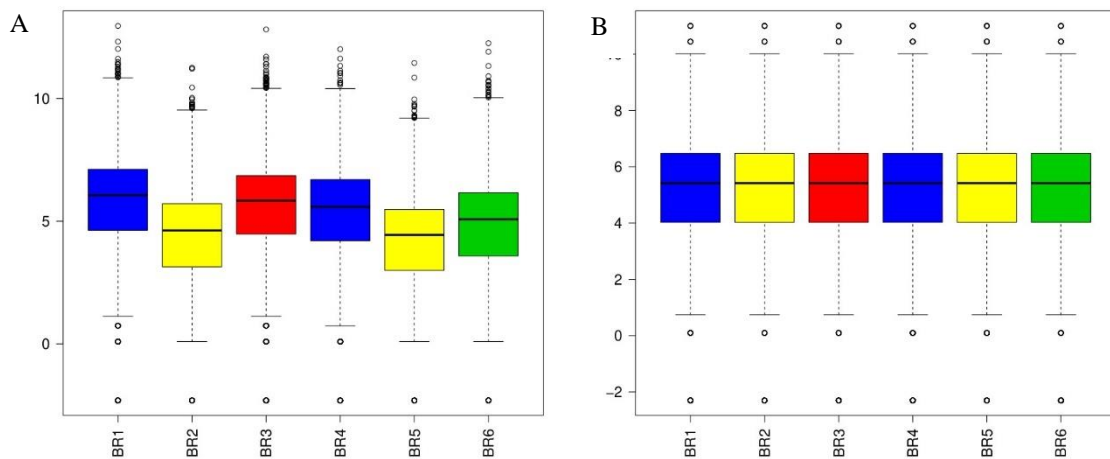
(calcNoemFactors függvény), aminek eredménye egy módosított könyvtárméret, amit a további függvények figyelembe vesznek, így külön erre normalizálni szintén nem szükséges.



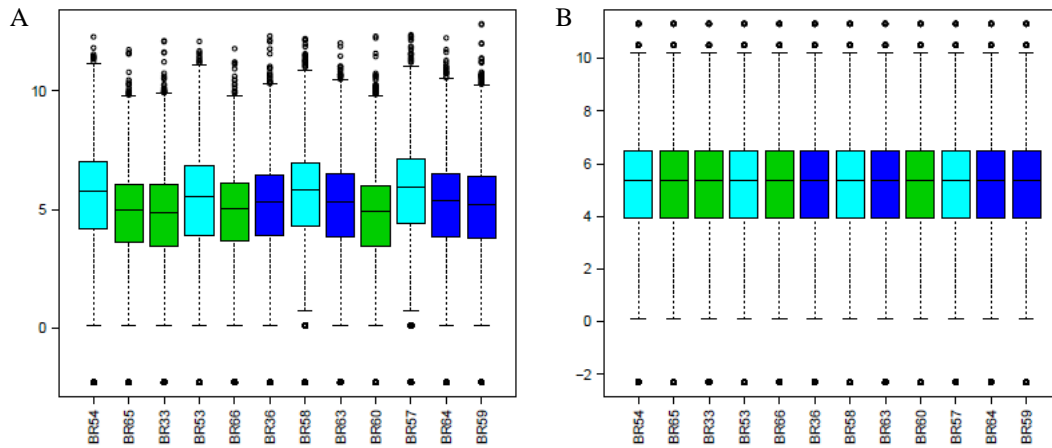
19. ábra: A szőlő feketeerohadás RNaseq szekvenáló csatornáiról kapott, a transzkriptumokra illeszkedő read-ek száma. A színek a különböző szekvenálási egységeket (un. lane-eket, csatornákat) jelölik.

Normalizálás GC-arányra és könyvtárméretre

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



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



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

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

5.2.5 Differenciáltan expresszáló gének

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

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

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

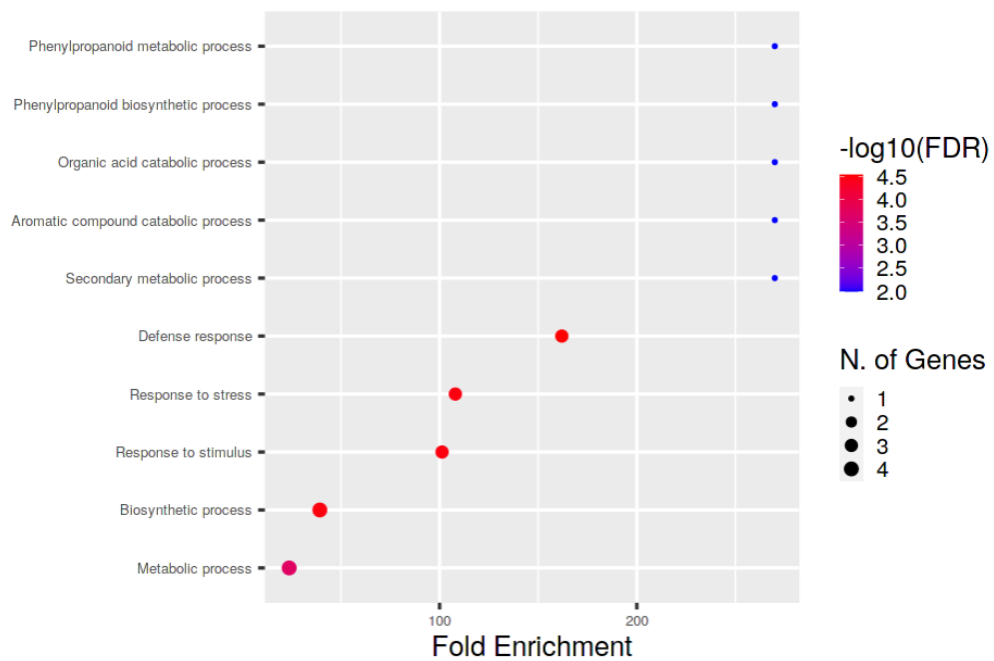
7. táblázat: Különböző P-érték mellett differenciáltan expresszáló gének száma a különböző időpontokban

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

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

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

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



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



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

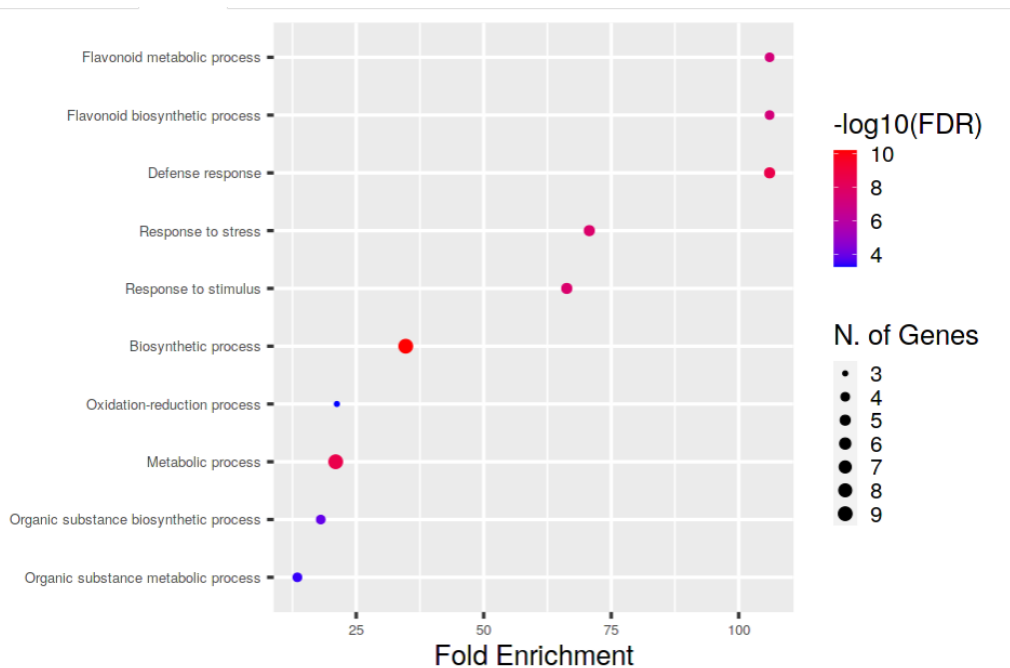
8. táblázat: A statisztikailag legmegbízhatóbban különböző expressziójú gének 6hpi időpontban. A referencia gén a publikus referencia kódot jelenti, a *de novo* lókuszt a referencia transzkriptom azonosítóját mutatja. LFC (log-fold change): a különbség logaritmus alapú mértéke. A valószínűsíthető funkciót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

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

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

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

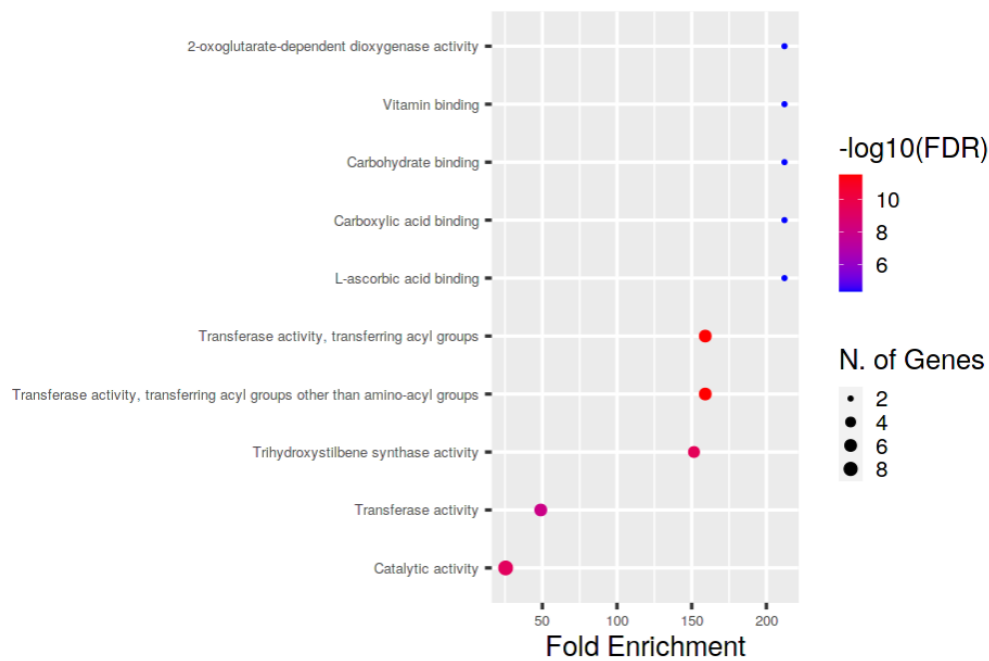
A GO dúsítás alapján a molekuláris funkciók közül (25. ábra) a 18 órás mintákban a fogékony és ellenálló fajta közötti különbségek tekintetében dioxigenáz, vitamin-, aszkorbinsav-, karboxilsav és szénhidrát-kötő funkciók, valamint 6 órás mintákhoz hasonlóan a trihidroxi sztilbén szintáz funkciók aránya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



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

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

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



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

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

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

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

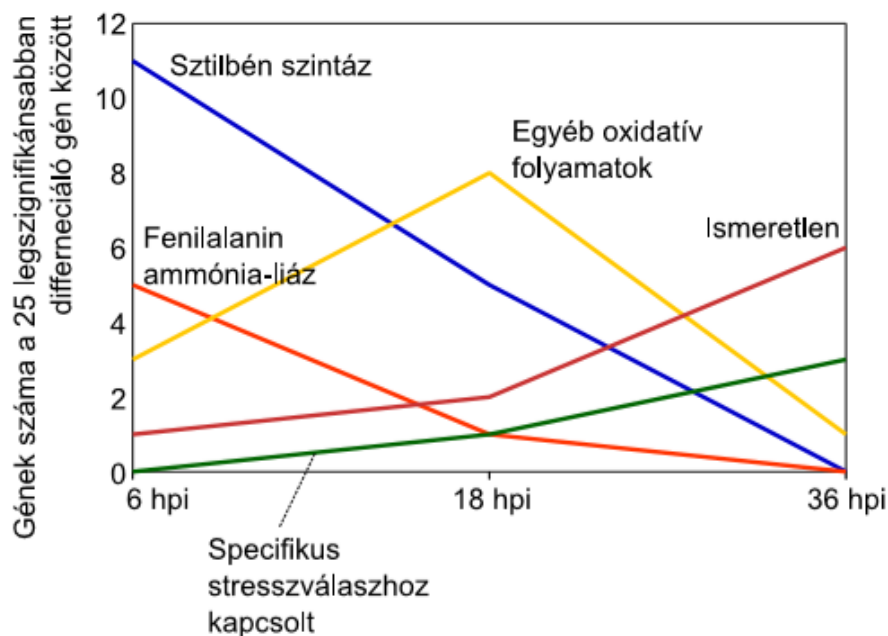
Referencia gén	<i>de novo</i> lókuszt	LFC	P érték	Kromoszóma	Funkció
VIT_213s0064g01260	XLOC_007389	-4.66893210553257	0.000139244360207196	chr13	leucine-rich repeat receptor-like protein
VIT_204s0023g00640	XLOC_022278	2.71649898480436	0.000879758060591401	chr4	receptor-like protein kinase 5-like
VIT_201s0150g00460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

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

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

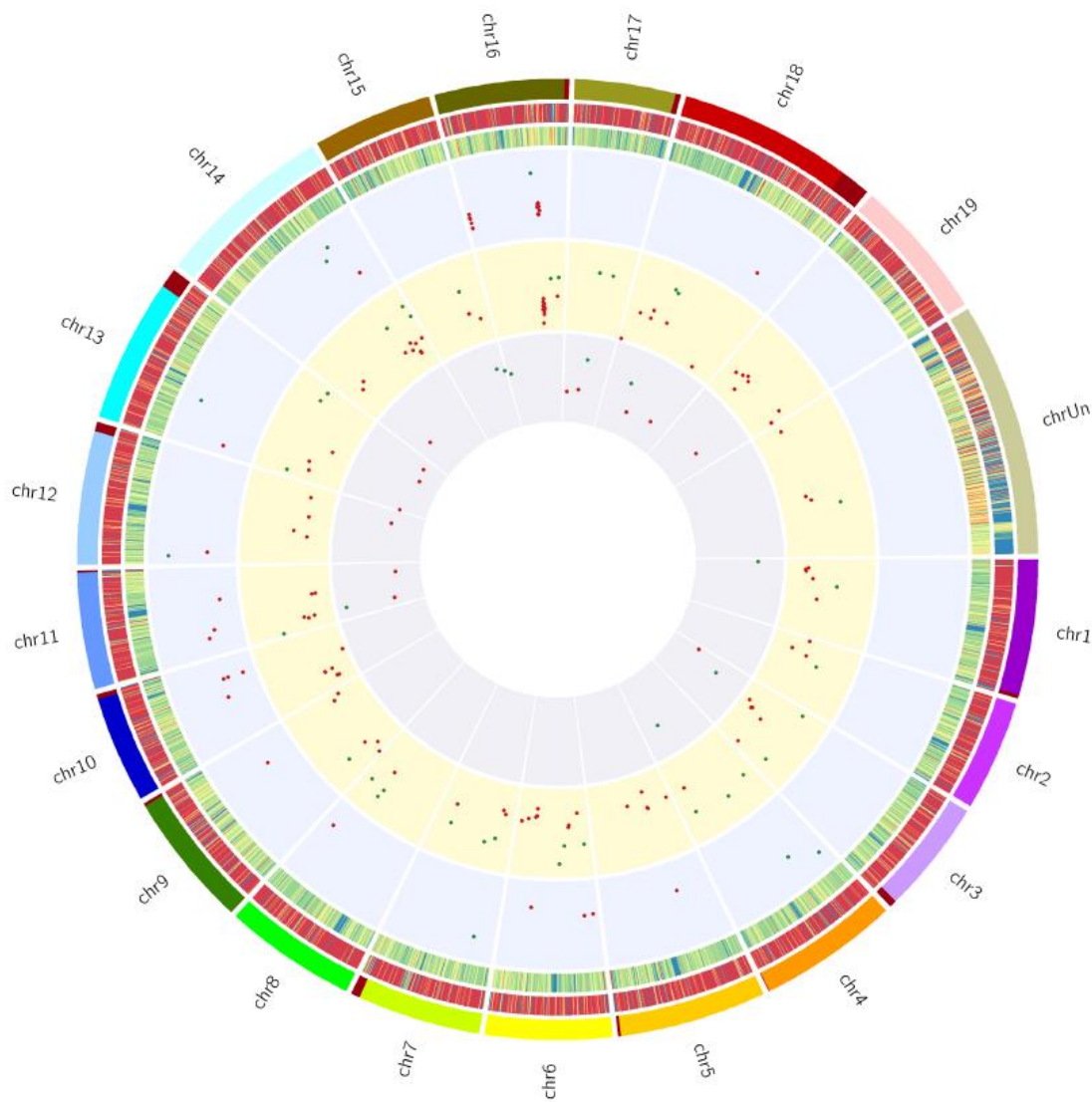
A fertőzés hatására különbözőképpen expresszálo gének közül a fenilpropanoid útvonalban résztvevő gének száma a sztilbén szintáz génekhez hasonló lefutást mutat.

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



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

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



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

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

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

5.3 Fiziológiailag aktív vegyületek vizsgálata

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

5.3.1 Feketerothadt szőlőbogyók összetétele

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

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

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

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

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

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

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

n.d.: nem detektálható

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

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

12. táblázat: Szerves savak mennyisége feketerohadt szőlőbogyókban

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

n.d.: nem detektálható

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

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

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

13. táblázat: Polifenolok mérési eredményei feketeterohadt szőlőbogyókban

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

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

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

magasabb értéket a Bácska és Kékfrankos szőlőbogyók mutattak. A feketerothadást okozó mikroorganizmus tehát nem termel β -glükozidáz enzimet, ahogy ez a botritisznél is tapasztalható (Kállay, 2010). A rezveratrol koncentrációra jelen vizsgált mintákban és évjáratban nincs befolyással a feketerothadás.

Vizsgálatainkat érdemes lenne folytatni más innovatív fajták bevonásával.

14. táblázat: A rezveratrolok mérési eredményei feketerothadt szőlőbogyókban

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

n.d.: nem detektálható

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

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

15. táblázat: Biogén aminok mérési eredményei feketerohadt szőlőbogyóban

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

n.d.: nem detektálható

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

5.3.2 Feketerohadással fertőzött bogyók mikotoxin tartalmának vizsgálata

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

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

5.3.3 Feketerothadás tüneteket mutató bogyók mikotoxin tartalma

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

16. táblázat: OTA mérési eredményei feketerothadt szőlőbogyókban

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

n.d.: nem detektálható

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

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

6 KÖVETKEZTETÉSEK

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

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

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

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

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

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

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

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

7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

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

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

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

8 ÖSSZEFOGALÁS

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

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

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

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

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

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

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

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

9 SUMMARY

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

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

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

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

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

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

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

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

10 MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

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

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

Selection: Springer India. pp. 173-186.

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

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

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

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

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

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

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

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

201. Peltola, J., M. A. Andersson, T. Haahtela, M. Mussalo-Rauhamaa, F. A. Rainey, R. M. Kroppenstedt, R. A. Samson, M. S. Salkinoja-Salonen. (2001). Toxic-metabolite-producing bacteria and fungus in an indoor environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3269-3274.
202. Pérez-Jiménez, J. és Saura-Calixto, F. (2008). Grape products and cardiovascular disease risk factors. *Nutrition Research Reviews*, 21 (02): 158-173.
203. Peri, C., Pompei, C. (1971). An assay of difference phenolic fractions in wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 22:55–58.
204. Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., and Richter, H. (2004). Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis-Geilweilerhof* 43 (3), 145–148.
205. Pirrello, C., Mizzotti, C., Tomazetti, T. C., Colombo, M., Bettinelli, P., Prodorutti, D., Peressotti, E., Zulini, L., Stefanini, M., Angeli, G., Masiero, S., Welter, L. J., Hausmann, L., Vezzuli, S. (2019). Emergent Ascomycetes in Viticulture: An Interdisciplinary Overview. *Frontiers in Plant Science*. 10, Article 1394. doi: 10.3389/fpls.2019.01394
206. Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3rd Edition. London; New York: Blackie Academic & Professional. doi: 10.1007/978-0-387-92207-2
207. Rajamuthiah, R., Mylonakis E. (2014). Effector triggered immunity: activation of innate immunity in metazoans by bacterial effectors. *Virulence* 5, 697–702. doi:10.4161/viru.29091
208. Ramsdell, D.C., Milholland, R. (1988). Black-rot, in: *Compendium of grape diseases*. Pearson, R., Goheen, A. (Eds.), APS Press, St. Paul, pp. 15–17.
209. Rebelein, H. (1965). Beitrag zur Bestimmung des Catechingehaltes in Wein. *Dtsch. Lebensm.-Rundschau*. 61:182–183.
210. Reddick, D. (1911). The black-rot disease of grapes. *Cornell University Agricultural Experiment Station Bulletin* 293, 289-364.
211. Reisch, B., Owens, C., Cousins, P. (2012). Grape. In: *Badenes ML, Byrne DH, editors. Fruit Breeding: Springer US*. pp. 225-262.
212. Rex, F., Fechter, I., Hausmann, L., Töpfer, R. (2014). QTL mapping of black rot (*Guignardia bidwellii*) resistance in the grapevine rootstock ‘Börner’ (*V. riparia* Gm183 × *V. cinerea* Arnold). *Theoretical Applied Genetetics* 127, 1667-1677. doi: 10.1007/s00122-014-2329-4
213. Reynolds, A. (eds) (2015). *Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 268. UK: Elsevier.
214. Richard, J.L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview. *International Journal of Food Microbiology*. 119 (1–2): 3-10.
215. Rinaldi, P. A., Brogini, G. A. L., Gessler, C., Molitor, D., Sofia, J., and Mugnai, L. (2013). *Guignardia bidwellii*, the agent of grape black rot of grapevine, is spreading in European vineyards. *Acta Phytopathol. Sin.* 43:11.
216. Rinaldi, P.A., Mugnai, L. (2012). Marciume nero degli acini, potenziale pericolo in viticoltura. *Informatore Agrario* 15, 68–71.
217. Risso, D., Schwartz, K., Sherlock, G., Dudoit, S. (2011). GC-Content Normalization for RNA-Seq Data. *BMC Bioinformatics*, 12 (1), 480.
218. Roznik, D., Hoffmann, S., Kozma, P. (2017a). Screening a large set of grape accessions for resistance against black rot (*Guignardia bidwellii* (Ell.)). *Mitteilungen Klosterneuburg*. 67, 149-157.
219. Roznik, D., Hoffmann, S., Kozma, P. (2017b). Feketerothadás, az új kihívás a szőlő rezisztencianemesítésében. *Jelenkori társadalmi és gazdasági folyamatok*, (2017) XII. 3., 113-117. doi: 10.14232/jtgf.2017.3.113-117
220. Rui, D. (1935). Il black rot o marciume nero dell’uva nell’isola di Veglia (Jugoslavia).

- Annuario della Regia. Stazione di viticoltura e di enologia di Conegliano 5:285-289.
221. Sanger, F. (1975). Nucleotide sequences in DNA. Proc. R. Soc. Lond B. Biol. Sci., , 191, 317–333.
 222. Scalbert, A. és Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. The Journal of Nutrition, 130 (8): 2073-2085.
 223. Scalbert, A., Johnson, I. T., Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. The American Journal of Clinical Nutrition, 81 (1): 215S-217S.
 224. Schälller, G. (1966). Ergebnisse der Rebenunterlagenzüchtung mit *Vitis cinerea* Arnold. Der Züchter 35, 250-255
 225. Schoch, C.L., Shoemaker, R.A., Seifert, K.A., Hambleton, S., Spatafora, J.W., Crous, P.W. (2006). A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. Mycologia 98, 1041–1052.
 226. Schoene, P., Köhl, J. (1999). Biologische Bekämpfung von *Botrytis cinerea* mit *Ulocladium atrum* in Reben und Cyclamen. Gesunde Pflanze 51:81–85
 227. Schwanck, A. A., Savary, S., Lepenetier, A., Debaeke, P., Vincourt, P., and Willocquet, L. (2016). Predicting quantitative host plant resistance against phoma black stem in sunflower. Plant Pathol. 65 (8), 1366–1379. doi: 10.1111/ ppa.12512
 228. Schwander, F., Eibach, R., Fechter, I., Hausmann, L., Zyprian, E. (2012). Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. Theoretical and Applied Genetics 124: 163-176.
 229. Scribner, F.L. (1886). Report on the Fungus Diseases of the Grapevine. U. S. Dep. Agric. Bot. Div. Sect. Plant Pathol. Bull. 2 GPO, Washington D. C.
 230. Scudamore, K.A., Banks, J., MacDonald, S.J. (2003). Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. Food Addit. Contam. 20, 1153–1163.
 231. Serra, R., Lourenço, A., Alípio, P., Venâncio, A. (2006). Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. Mycol. Res. 110, 971–978.
 232. Shaw, B.D., Hoch, H.C. (2000). Ca²⁺ regulation of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospore germination and appressorium formation. Fungal Genetics and Biology 31, 43-53.
 233. Silla-Santos, M.H., (1996). Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology. 29: 213-231
 234. Singleton, V.L., Esau, P. (1969). Phenolic substances in grapes and wine and their significance. Academic Press, New York, London. 8–14.
 235. Smith, D.L. (2009). Grape pathology research update: Black-Rot advisory. Le Vigneron 4, 7-8.
 236. Smith, D.L. (2012). Mesonet grape black-rot advisor. Eds. Oklahoma State University Albert Sutherland.
 237. Smith, J.E. (1985). Mycotoxin hazards in the production of fungal products and byproducts. Pract of Biotech, Spec Prod and Serv Act.
 238. Smith, L., Sanders, J., Kaiser, R. et al. (1986). Fluorescence detection in automated DANN sequence analysis. Nature. 321, 674–679.
 239. Song, Peng, Lei Wu, Wenxian Guan. (2015). Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. Nutrients 7(12): 9872–95.
 240. Sosnowski, M. R., Emmett, R. W., Wilcox, W. F., Wicks, T. J. (2012). Eradication of black rot (*Guignardia bidwellii*) from grapevines by drastic pruning. Plant Pathology. 61, 1093-1102. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02595.x
 241. Sosnowski, M. R., Tan, Y-P. (2017). National Diagnostic Protocol for *Phyllosticta ampellicida*- NDP13 V2. (Eds. Subcommittee on Plant Health Diagnostics) Ed.: Alwis, S.K.,

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

- Chemistry, 45(6), 2036-2041.
259. Velasco, R., Zharkikh, A., Troglio, M., Cartwright, DA., Cestaro, A. (2007). A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. PLoS ONE 2: e1326.
 260. Venuti, S., Copetti, D., Foria, S., Falginella, L., Hoffmann, S., Bellin, D. (2013). Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the Asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. PloS One 8 (4), e61228. doi: 10.1371/journal.pone.0061228
 261. Viala, P., Ravaz, L. (1886). Mémoire sur une nouvelle maladie de la vigne, le Black Rot (pourriture noir). Annales de l'École National d'Agriculture de Montpellier, 2:17-58. p.
 262. Viñas, I., Vela, E., Sanchis, V. (1993). Capacidad productora de patulina de cepas de *Penicillium expansum* procedentes de centrales hortofrutícolas de Lleida. Revista Iberoamericana de Micología 10, 30-32.
 263. Wan, Y., Schwaninger, H., He, P., Wang, Y. (2007). Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes. Vitis 46, 132- 136
 264. Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. In: Nature Reviews Genetics 10.1, pp. 57–63.
 265. Weisshaar, B. és Jenkins, G. I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. Current Opinion in Plant Biology, 1 (3): 251-257.
 266. WHO IARC. (1990). Patulin. WHO Food Additives Series. 26: 143-165.
 267. Wichmann, G., Herbarth, O., Lehmann, I. (2002). The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon- γ rather than interleukin-4 production in human blood cells. Environmental Toxicology, 17(3), 211-218.
 268. Wikee, S., Udayanga, D., Crous, P.W., Chukeatirote, E., McKenzie, E.H.C. (2011). Phyllosticta – an overview of current status of species recognition. Fungal Diversity 51, 43–61.
 269. Wilcox, W. (2003). Grapes: Black rot (*Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala and Ravaz.) Cornell Cooperative Extension Disease Identification Sheet No. 102GFSG-D4, Cornell University.
 270. Wilcox, W., Walter, G., Uyemoto, J. (2015). Compendium of Grape Diseases, Disorders and Pests. Second Edition. Minnesota: APS PRESS. 232. p.
 271. Wilcox, W. F., Hoffman, L. E. (2015). Black rot. Pages 28-33 in: Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests, Second Edition. W. F. Wilcox, W. D. Gubler, and J. K. Uyemoto, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
 272. Windels, C.E. (2000). Economic and social impacts of Fusarium head blight: Changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. Phytopathology 90, 17–21.
 273. Wingett, S.W., Andrews, S. (2018). FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. F1000Research 7:1338. doi: 10.12688/f1000research.15931.2.
 274. Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Current Opinion in Plant Biology, 5 (3): 218-223.
 275. Woloshuk, C.P., Shim, W.-B. (2013). Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. FEMS Microbiol. Rev. 37, 94–109. doi:10.1111/1574-6976.12009
 276. Xing, Y., Jia, W., Zhang, J. (2008). AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in Arabidopsis. Plant J 54(3):440-451.
 277. Zadoks, J.C. (1972). Modern concepts in disease resistance in cereals. The way ahead in plant breeding In Proceedings of Sixth Congress of Eucarpia (Lupton, F.A.G.H. et al. eds.) 89–98.
 278. Zern, T. L. és Fernandez, M. L. (2005). Cardioprotective effects of dietary polyphenols. The Journal of Nutrition, 135 (10): 2291-2294.

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

M2. További mellékletek

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

Minta	Forward				Reverse				Illesztett	Read párok			
	read#	illesztve	többszörös		read#	illesztve	többszörös			illesztett	többszörös	ellentmondó	összhangban
BR10	28834470	24932199 (86.5%)	980194 (3.9%)		28834470	24961319 (86.6%)	983230 (3.9%)	86.5%	23435285	903819 (3.9%)	102184 (0.4%)	80.9%	
BR11	6819667	5894191 (86.4%)	137221 (2.3%)		6819667	5868015 (86.0%)	135903 (2.3%)	86.2%	5430271	120214 (2.2%)	27091 (0.5%)	79.2%	
BR12	23321155	20773049 (89.1%)	535384 (2.6%)		23321155	20688291 (88.7%)	533053 (2.6%)	88.9%	19475061	475928 (2.4%)	138922 (0.7%)	82.9%	
BR13	28977256	25121802 (86.7%)	575927 (2.3%)		28977256	25119361 (86.7%)	576858 (2.3%)	86.7%	24148655	538197 (2.2%)	79727 (0.3%)	83.1%	
BR14	22093828	19417827 (87.9%)	387238 (2.0%)		22093828	19368418 (87.7%)	385957 (2.0%)	87.8%	18559372	357189 (1.9%)	69568 (0.4%)	83.7%	
BR15	6009306	5428743 (90.3%)	105633 (1.9%)		6009306	5408892 (90.0%)	105156 (1.9%)	90.2%	5149663	95957 (1.9%)	22105 (0.4%)	85.3%	
BR16	22419345	20162741 (89.9%)	438002 (2.2%)		22419345	20161494 (89.9%)	438461 (2.2%)	89.9%	19395830	412940 (2.1%)	55991 (0.3%)	86.3%	
BR17	5998577	5417104 (90.3%)	110394 (2.0%)		5998577	5398874 (90.0%)	109766 (2.0%)	90.2%	5127998	99170 (1.9%)	26884 (0.5%)	85.0%	
BR18	5021238	4526628 (90.1%)	85940 (1.9%)		5021238	4511876 (89.9%)	85621 (1.9%)	90.0%	4298026	77999 (1.8%)	19007 (0.4%)	85.2%	
BR1	27693650	24143720 (87.2%)	693806 (2.9%)		27693650	24148234 (87.2%)	694912 (2.9%)	87.2%	22671299	639611 (2.8%)	85210 (0.4%)	81.6%	
BR21	20061745	17733637 (88.4%)	351202 (2.0%)		20061745	17665131 (88.1%)	349909 (2.0%)	88.2%	16355609	310450 (1.9%)	93666 (0.6%)	81.1%	
BR24	7728177	6781247 (87.7%)	114163 (1.7%)		7728177	6743798 (87.3%)	113337 (1.7%)	87.5%	6255336	101783 (1.6%)	23727 (0.4%)	80.6%	
BR26	24012055	21252732 (88.5%)	463039 (2.2%)		24012055	21246115 (88.5%)	463823 (2.2%)	88.5%	20483254	433827 (2.1%)	69080 (0.3%)	85.0%	
BR29	21721541	20046456 (92.3%)	412191 (2.1%)		21721541	20040720 (92.3%)	412412 (2.1%)	92.3%	19296116	385751 (2.0%)	64222 (0.3%)	88.5%	
BR2	6509721	5706231 (87.7%)	117454 (2.1%)		6509721	5674658 (87.2%)	116540 (2.1%)	87.4%	5256650	104228 (2.0%)	27542 (0.5%)	80.3%	
BR33	10664461	9069006 (85.0%)	224965 (2.5%)		10664461	9052415 (84.9%)	224582 (2.5%)	85.0%	8504950	206087 (2.4%)	24886 (0.3%)	79.5%	
BR36	15576723	13455778 (86.4%)	405869 (3.0%)		15576723	13434193 (86.2%)	405240 (3.0%)	86.3%	12695339	376667 (3.0%)	41151 (0.3%)	81.2%	
BR3	23875549	18523707 (77.6%)	367535 (2.0%)		23875549	18453634 (77.3%)	365903 (2.0%)	77.4%	17091969	322073 (1.9%)	104703 (0.6%)	71.1%	
BR46	10206734	8918527 (87.4%)	184103 (2.1%)		10206734	8901490 (87.2%)	183880 (2.1%)	87.3%	8578664	171538 (2.0%)	31191 (0.4%)	83.7%	
BR47	27932043	24109151 (86.3%)	592096 (2.5%)		27932043	24134007 (86.4%)	594769 (2.5%)	86.4%	22771730	544524 (2.4%)	73154 (0.3%)	81.3%	
BR48	22436022	19718087 (87.9%)	489856 (2.5%)		22436022	19722670 (87.9%)	491167 (2.5%)	87.9%	18512237	444076 (2.4%)	77691 (0.4%)	82.2%	
BR4	17919076	15558099 (86.8%)	327386 (2.1%)		17919076	15540716 (86.7%)	327541 (2.1%)	86.8%	14918293	304743 (2.0%)	70726 (0.5%)	82.9%	
BR51	20509476	17623309 (85.9%)	360334 (2.0%)		20509476	17565309 (85.6%)	358757 (2.0%)	85.8%	16746070	326221 (1.9%)	105813 (0.6%)	81.1%	
BR53	24836668	21436476 (86.3%)	575050 (2.7%)		24836668	21449651 (86.4%)	576160 (2.7%)	86.3%	20292715	529561 (2.6%)	83274 (0.4%)	81.4%	
BR54	26645000	23198484 (87.1%)	626413 (2.7%)		26645000	23217765 (87.1%)	628268 (2.7%)	87.1%	21850234	571609 (2.6%)	106604 (0.5%)	81.6%	
BR55	10493851	9247585 (88.1%)	204877 (2.2%)		10493851	9222092 (87.9%)	204152 (2.2%)	88.0%	8870377	191260 (2.2%)	32892 (0.4%)	84.2%	
BR56	24844813	22442195 (90.3%)	520701 (2.3%)		24844813	22386159 (90.1%)	519633 (2.3%)	90.2%	21420122	476499 (2.2%)	111703 (0.5%)	85.8%	
BR57	31706201	28132971 (88.7%)	696494 (2.5%)		31706201	28131103 (88.7%)	697574 (2.5%)	88.7%	27089089	652460 (2.4%)	108958 (0.4%)	85.1%	
BR58	27090771	23888527 (88.2%)	587732 (2.5%)		27090771	23886525 (88.2%)	588954 (2.5%)	88.2%	22990216	550498 (2.4%)	94019 (0.4%)	84.5%	
BR59	16210970	14464342 (89.2%)	292594 (2.0%)		16210970	14442749 (89.1%)	292031 (2.0%)	89.2%	13936770	274539 (2.0%)	40896 (0.3%)	85.7%	
BR5	5061339	4624946 (91.4%)	77566 (1.7%)		5061339	4605748 (91.0%)	76966 (1.7%)	91.2%	4385311	70921 (1.6%)	18216 (0.4%)	86.3%	
BR60	11147019	9730184 (87.3%)	189040 (1.9%)		11147019	9714106 (87.1%)	188893 (1.9%)	87.2%	9353578	176570 (1.9%)	27274 (0.3%)	83.7%	
BR61	5648024	4875341 (86.3%)	105355 (2.2%)		5648024	4855111 (86.0%)	104735 (2.2%)	86.1%	4506601	93134 (2.1%)	22876 (0.5%)	79.4%	
BR62	12182648	10552503 (86.6%)	237613 (2.3%)		12182648	10525554 (86.4%)	236563 (2.2%)	86.5%	9920250	217018 (2.2%)	33235 (0.3%)	81.2%	
BR63	17284602	14171509 (82.0%)	355420 (2.5%)		17284602	14155108 (81.9%)	355215 (2.5%)	81.9%	13651431	336347 (2.5%)	46723 (0.3%)	78.7%	

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

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

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

19. táblázat: A differenciáltan expresszázó gének részletes listája kromoszómánként (18 hpi, p<0.01)

Kromoszóma	helyzet	LFC	gén	megjegyzés
chr1	2.632.427	-5.28	VIT_201s0011g02960	leucoanthocyanidin reductase
	3.167.509	-5.91	VIT_201s0011g03490	3-ketoacyl- synthase
	3.678.832	-5.74	VIT_201s0011g04030	reticulon-like protein b9-like
	6.034.187	-4.09	VIT_201s0011g06240	cyto chrome b-561 protein
	12.259.928	-2.76	VIT_201s0026g02620	expansin
	7.926.124	1.48	VIT_201s0127g00560	probable nucleoredoxin 1-like
chr2	7.184.140	1.37	VIT_202s0012g01160	nitrate transporter -like
	4.282.027	-5.38	VIT_202s0025g04720	anthocyanidin synthase
	5.130.968	-1.70	VIT_202s0154g00300	14 kda proline-rich protein
chr3	17.193.257	3.30	VIT_203s0017g01300	white-brown-complex abc transporter family
	19.008.977	-4.17	VIT_203s0017g02240	carbohydrate-binding x8 domain-containing protein
chr4	1.527.899	3.84	VIT_203s0038g02220	actin depolymerizing factor 5
	8.252.443	-6.95	VIT_203s0088g00260	serine carboxypeptidase-like 18
	8.252.443	-6.95	VIT_203s0088g00260	serine carboxypeptidase-like 18-like
	6.338.109	-8.32	VIT_203s0091g00040	limonoid udp-glucosyltransferase
	7.950.976	-6.74	VIT_203s0091g01290	serine carboxypeptidase-like 18-like
	3.279.191	2.31	VIT_204s0008g03940	burp domain-containing protein
chr5	19.929.438	-2.93	VIT_204s0023g03370	flavanone 3-hydroxylase
	20.134.581	3.08	VIT_204s0023g03610	mlo-like protein 4-like
chr6	1.239.180	-2.95	VIT_205s0077g01540	pathogenesis-related protein 10
	13.597.238	-3.97	VIT_205s0136g00260	chalcone synthase
chr7	1.790.969	2.68	VIT_206s0004g01460	linoleate 13s-lipoxygenase 2-chloroplastic-like
	3.233.332	-4.46	VIT_206s0004g02620	phenylalanine ammonia-lyase
	5.817.040	-1.85	VIT_206s0004g04860	expansin
	6.012.395	-1.38	VIT_206s0004g05080	protein binding
	7.301.207	2.91	VIT_206s0004g06570	vacuolar cation proton exchanger
	8.695.880	6.94	VIT_206s0004g07970	expansin
	15.670.201	-5.50	VIT_206s0009g02810	flavonoid 3 -hydroxylase 2-like
	15.714.588	-3.79	VIT_206s0009g02840	flavonoid 3 -hydroxylase 2
	16.008.909	-3.51	VIT_206s0009g02970	flavonoid 3 -hydroxylase 2-like
	18.257.401	-3.06	VIT_206s0061g00730	tonoplast intrinsic
	20.242.801	-2.32	VIT_206s0080g00330	esterase lipase thioesterase-like protein
	3.730.365	-3.96	VIT_207s0005g01210	transcription factor myb12
	4.490.769	2.68	VIT_207s0005g02070	protein nim1-interacting 1-like
	7.226.206	4.01	VIT_207s0005g04130	had subfamily iiib acid phosphatase
	17.794.258	2.26	VIT_207s0031g01710	probable wrky transcription factor 51-like
18.105.237	-2.25	VIT_207s0031g01980	ap2 erf domain-containing transcription factor	
chr8	2.806.800	-3.14	VIT_207s0104g01800	glutathione s-transferase f13
	15.293.254	3.43	VIT_208s0007g01180	receptor protein kinase 1-like
	15.578.678	5.39	VIT_208s0007g01480	tpr repeat-containing thioredoxin ttl1-like
	16.006.138	-1.33	VIT_208s0007g01940	gdp-mannose-dependent alpha-mannosyltransferase-like
chr9	19.866.070	3.03	VIT_208s0007g06020	beta- -glucanase
	240.600	-2.80	VIT_209s0002g00320	pectin methylesterase
	2.678.232	-4.06	VIT_209s0002g02970	protein
	4.850.834	3.38	VIT_209s0002g05150	auxin-induced protein
	5.316.083	-1.96	VIT_209s0002g05590	pleiotropic drug resistance protein 1-like
chr10	20.967.249	-2.30	VIT_209s0054g00430	uncharacterized protein
	3.210.601	-5.76	VIT_210s0003g01740	uncharacterized protein
	5.539.131	-3.57	VIT_210s0003g03340	uncharacterized protein loc100253775

	5.673.052	-3.57	VIT_210s0003g03430	uncharacterized protein loc100257299
	5.698.653	-5.41	VIT_210s0003g03440	uncharacterized protein loc100855345
	10.224.104	-9.38	VIT_210s0003g05550	reticuline oxidase-like
chr11	583.486	2.20	VIT_211s0016g00590	21 kda protein
	3.394.623	-4.22	VIT_211s0016g04160	sulfate transporter
	3.975.392	-3.17	VIT_211s0016g04670	unnamed protein product [Vitis vinifera]
	10.804.182	-5.82	VIT_211s0037g01350	uncharacterized protein loc100854873
	10.879.650	-6.70	VIT_211s0037g01370	uncharacterized protein loc100262122
chr12	20.686.814	-4.41	VIT_212s0035g01000	serine-type endopeptidase inhibitor
	14.484.489	-4.91	VIT_212s0055g01010	bacterial-induced peroxidase
	9.713.036	-1.89	VIT_212s0057g01020	fasciclin-like arabinogalactan protein
	8.133.136	-5.01	VIT_212s0134g00500	d6-type cyclin
chr13	3.455.870	-2.17	VIT_213s0019g02170	tropinone reductase homolog at1g07440
	5.881.261	-1.53	VIT_213s0019g04460	phenylalanine ammonia-lyase
	23.127.104	2.63	VIT_213s0064g01260	leucine-rich repeat receptor-like protein
	1.578.476	2.62	VIT_213s0067g02930	expansin
	11.335.596	-5.64	VIT_213s0147g00230	protein
chr13_random	1.544.839	2.20	VIT_213s0067g02840	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase
chr14	4.785.645	-3.55	VIT_214s0030g00650	bifunctional 3-dehydroquinone dehydratase
				shikimate chloroplastic-like
	6.654.605	-2.32	VIT_214s0030g01790	pollen-specific protein sf21
	26.536.958	-5.71	VIT_214s0066g00010	uncharacterized protein loc100249294
	26.610.469	-6.01	VIT_214s0066g00060	uncharacterized protein loc100254392 isoform 2
	26.622.115	-3.54	VIT_214s0066g00070	uncharacterized protein loc100244128 isoform 2
	24.673.233	-4.46	VIT_214s0068g00920	chalcone synthase
	25.221.282	-2.77	VIT_214s0068g01500	glycerophosphodiester phosphodiesterase
				gde1-like isoform 1
	22.298.923	3.10	VIT_214s0083g00250	uncharacterized protein loc100853032
	22.332.992	-3.86	VIT_214s0083g00290	uncharacterized protein loc100853032
	29.183.985	5.18	VIT_214s0108g00420	transcription factor bhlh135-like
	29.210.967	-3.17	VIT_214s0108g00440	alpha tubulin 1
	29.649.186	2.35	VIT_214s0108g01020	expansin protein
chr15	13.742.179	2.57	VIT_215s0021g02710	pethy zpt4-1
	17.211.622	-4.77	VIT_215s0046g00170	protein
	14.297.045	-2.91	VIT_215s0048g00190	phosphorus starvation-induced protein
chr16	18.908.189	1.62	VIT_216s0050g01960	atp binding
	20.787.131	-2.44	VIT_216s0098g00360	zinc finger protein constans-like protein
	21.182.902	1.89	VIT_216s0098g00860	flavanone 3-dioxygenase-like
	16.238.950	-5.40	VIT_216s0100g00750	stilbene synthase
	16.268.744	-8.46	VIT_216s0100g00770	stilbene synthase
	16.276.379	-4.53	VIT_216s0100g00780	stilbene synthase
	16.335.550	-3.63	VIT_216s0100g00830	stilbene synthase
	16.398.197	-3.82	VIT_216s0100g00910	stilbene synthase
	16.503.220	-2.93	VIT_216s0100g01020	stilbene synthase
	16.503.220	-2.93	VIT_216s0100g01020	stilbene synthase 4-like
	16.525.933	-5.82	VIT_216s0100g01070	stilbene synthase
	16.555.604	-6.51	VIT_216s0100g01100	stilbene synthase
	16.627.150	-4.13	VIT_216s0100g01140	stilbene synthase
	16.673.901	-5.34	VIT_216s0100g01160	stilbene synthase
	16.697.908	-4.94	VIT_216s0100g01170	stilbene synthase
	16.682.384	-5.10	VIT_216s0100g01170	stilbene synthase
chr17	12.697.439	3.36	VIT_217s0000g10370	uncharacterized protein loc100246199

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

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

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

Az egytényezős varianciaanalízis eredményei:

Cukortartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Glicerintartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Glükonsav tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Galakturonsav tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Borkósav tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

(+)-tejsav tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Borostyánkósav tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Fumársav tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Kaftársav tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Összes polifenol tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

(+)-katechin tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

(-)-epikatechin tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Leukoantocianin tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Teljes antioxidáns kapacitás tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Transz-piceid tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Tiramin tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Szerotonin tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Hisztamin tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

Melatonin tartalom

VARIANCIAANALÍZIS

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

11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

Köszönöm, hogy részese lehettem a KTIA_AIK_12-1-2013-0001: Korszerű genomikai és biotechnológiai technikák bevezetése a szőlő és gyümölcs (fásszárúak) egészséges szaporítóanyag előállításban, növényvédelemben és a fajtanemesítésben pályázatnak, mely a Magyar Kormány támogatásával, a Kutatási és Technológiai Innovációs Alap finanszírozásával valósult meg. A dolgozatban bemutatott eredmények jelentős részét ennek köszönhetem.

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

Köszönöm!