



MAGYAR AGRÁR- ÉS  
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

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

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

# 1 A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

A szőlőt világszerte számos, gombák által okozott betegség támadja meg, amelyek jelentős termés kiesést és szőlőminőség romlást eredményezhetnek (Ramsdell és Milholland, 1988). A lisztharmat (*Erysiphe necator*) 1845-ben, a filoxéra (*Daktulosphaira vitifoliae*) 1863-ban és a peronoszpóra (*Plasmopara viticola*) 1878-ban, a feketerothadás (*Guignardia bidwellii*) 1885-ben jelent meg az európai szőlőtermesztésben. Az Európában termesztett szőlő nagyon érzékeny ezekre a kórokozókra (Töpfer et al., 2011).

A betegséggel kapcsolatos tapasztalatok hiánya miatt a védekezés és a megelőzés lehetőségei korlátozottak, a rezisztenciával kapcsolatosan kevés információval rendelkezünk a szőlő rezisztencia-kutatásban az elmúlt pár évben kiemelt figyelmet kap a feketerothadással szembeni ellenállóság genetikai hátterének kutatása is.

A kórokozókkal szembeni védekezés általános és legjobb megoldása a rezisztencianemesítés (Barna, 1963). Az európai fajták szinte kivétel nélkül fogékonyak a betegségre (Demaree et al., 1937; Barrett, 1953; Hausmann et al., 2017). Az újonnan előállított, magas fokú lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciával rendelkező fajták többsége is fogékony a feketerothadás fertőzésére. Ez a betegség az organikus/bio szőlőtermesztésben súlyos növényvédelmi problémát okozhat, gyakran megoldhatatlan feladatot jelent, ezért a feketerothadás elleni rezisztenciát be kell építeni az új, innovatív rezisztens fajtákba.

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

Megoldandó elméleti problémák, tudományos célok:

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

A tudományos célok elérése érdekében megvalósítandó feladatok:

- Fertőzési kísérletek beállítása, a fertőzések elvégzése
- Új generációs szekvenálás könyvtárainak létrehozásához megfelelő minőségű teljes RNS kivonatok készítése
- A szekvencia adatok feldolgozására alkalmas pipeline kidolgozása, adaptálása
- Fiziológiailag aktív vegyületek vizsgálata fertőzött mintákból:
  - A feketerothadt szőlőbogyók kémiai összetételének vizsgálata
  - Az egyes biológiai aktív vegyületek kialakulásának vizsgálata a feketerothadás hatására

## 2 ANYAG ÉS MÓDSZER

### 2.1 Mesterséges fertőzés

#### 2.1.1 A mesterséges fertőzéshez felhasznált növényanyag

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

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

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

#### 2.1.2 A fertőzés menete

A fertőzést szűrőpapír korongra vitt spóraszuszpenzióval végeztük és a korongot mintavételig (legfeljebb 72 óra) a levélen hagytuk. A mintavétel során így pontosan a fertőzés helyről származó szöveteket tudtuk begyűjteni.

A növényeket 100%-os relatív páratartalom és 36 órán keresztül fenntartott folyamatos levélfelület-nedvesség mellett 27°C-on inkubáltuk a fertőzés elősegítése érdekében.

A mesterséges fertőzésekhez használt *Guignardia bidwellii* izolátumot az egri Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetből Dr. Váczy Kálmán Zoltán biztosította. Az előállított spóraizolátum koncentrációja  $5 \times 10^5$  spóra/ml volt.

A spóraszuszpenzióból 10 µl-t vittünk egy 7 mm átmérőjű steril szűrőpapír korongra, majd ezeket a korongokat helyeztük az előkészített szőlőlevelekre.

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

### **2.1.3 Mintavétel**

A mintavétel során a fertőzési folyamat korai lépéseire koncentráltunk, ezért a fertőzés előtt (0 órás minta), majd azt követően 6, 18, 36 és 72 órával vettünk mintát.

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

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

### **2.1.4 *Guignardia bidwellii* festés tripánkéssel**

Szőlő feketerothadás festési protokoll:

Feltisztítás

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

## Festés tripánkéekkel

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

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

## **2.2 RNS kivonás**

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

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

## **2.3 Teljes RNS szekvenálás**

Az RNS szekvenálást a Debreceni Egyetem szekvenáló cége, az UD Genomed Kft. végezte. A szekvenáláshoz az Illumina vállalat technológiáját (SBS, Sequencing By Synthesis) használtuk. Az RNS kivonatokból elkészített szekvenáló könyvtárakat IlluminaHiScanSQ platformon szekvenáltuk.

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

## **2.4 Adatelemzés, bioinformatika**

Először minden minőségszűrt read-et illesztettünk a referencia-genomra, majd ezen illesztések alapján meghatároztuk az inzert méretet. A szekvencia olvasatok referencia genomra történő illesztését bwa (Li és Durbin, 2009) szoftverrel végeztük, az inzert méret statisztikához a picard tools (Broad Institute, 2018) csomagot hívtuk segítségül.

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

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

### **2.5.1 Vizsgált növényanyag**

Hat különböző szőlőfajta fekete rothadt bogyóit vizsgáltuk. Ezek a Borotáról (Koch Borászat) begyűjtött Bácska, Danubius, Hibernál, Palatina, Panonija rezisztens szőlőfajták, valamint Villányból (Koch Borászat) gyűjtött Kékfrankos szőlőfürtök voltak. A minták mindegyike feketerothadt volt.



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

### **2.5.2 Az összetevők vizsgálatára alkalmazott mérési módszerek**

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

#### *Alapanalitikai vizsgálatok*

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

#### *Spektrofotométeres vizsgálatok*

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

### *NMR-spektroszkópia*

A glükonsav, galakturonsav, sikiminsav, borostyánkősav, fumársav és kaftársav meghatározása H NMR technikával történt (Godelmann et al., 2013). H NMR spektrumok rögzítése 26,85 °C-on Bruker AVANCE 400 spektrométerrel és 400'54 ASCEND magnet rendszerrel (Bruker, Karlsruhe, Germany) proton NMR módban, 400.13 MHz frekvencián. Az NMR vizsgálatokra a Dyagnosticum Kft. Szerencsi laboratóriumában került sor.

### *Kromatográfia*

A rezveratrolok (transz-piceid, transz-rezveratrol, cisz-piceid, cisz-rezveratrol) minőségi és mennyiségi meghatározását nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás eljárással (HPLC) végeztük a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Borászati Tanszék kutatói laboratóriumában. A rezveratrolok meghatározásánál Kállay és Török (1997) módszere szerint jártunk el.

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

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

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

## 3 EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 3.1 Feketerothadás érzékenység vizsgálata

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

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

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

#### 3.1.2 *Guignardia bidwellii* konídiumok csírázási aránya

Csillám fajta esetében a fertőzés sikeres volt, de a gombaspórák csírázása időben jelentősen eltolódott a Csaba gyöngye fajtához képest. A Csaba gyöngye fajtánál már a fertőzést követő 6. órában jelentős mértékben, 77,8%-ban csíráztak a spórák. A fertőzést követő 18. órában pedig már 99% felett volt a csírázási százalék, valamint jelentős csíratömlő növekedés volt megfigyelhető.

#### 3.1.3 Csíratömlő növekedés

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

után 18 órával a fogékony Csaba gyöngye fajta levelén átlagosan 120 $\mu$ m hosszúak, míg az ellenálló Csillám fajta levelén átlagosan 40 $\mu$ m hosszúságúak voltak. A feketerothadás rezisztens Csillám fajta levelein igazolhatóan [ $t(98,9) = 11,83, p < 0,001$ ] lassabb a *Guignardia bidwellii* csíratömlőinek növekedése, mint az érzékeny Csaba gyöngye fajtán.

## **3.2 A feketerothadás fertőzésre adott RNS szintű válaszreakció**

### **3.2.1 Az RNS szekvenálás eredménye**

#### **Minőségellenőrzés**

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

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

### **3.2.2 Az inzert méret meghatározása**

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

### **3.2.3 *De novo* transzkriptom építése**

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

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

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

### **3.2.4 A génextpresszió mértékének meghatározása**

*Normalizálás GC-arányra és könyvtárméretre*

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

### **3.2.5 Differenciáltan expresszáló gének**

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

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

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

A folyamatban résztvevő differenciáltan expresszálo gének közül a sztilbén szintázok közül a legtöbb a fertőzést követő 6. órában játszik szerepet, a sztilbén szintázok szerepe azok száma alapján a fertőzés során fokozatosan csökken, a fertőzést követő 36. órában nem mutatnak eltérő expressziót a fogékony és ellenálló fajtában. Az eredmények alapján a fertőzést követő 18. órában az oxidatív folyamatoké a főszerep, majd a 36. órában megemelkedik az ismeretlen funkciójú, illetve a specifikus stresszválaszhoz köthető gének aránya.

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

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

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

### **3.3 Fiziológiailag aktív vegyületek vizsgálata**

#### **3.3.1 Feketerothadt szőlőbogyók összetétele**

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

A feketerothadt bogyókban 0,056-01,00 g/kg (+)-tejsavat mértünk, legnagyobb mennyiségben a Bácska szőlőfajtában, mely szignifikánsan eltért többi mintától. A borkősav koncentráció 8,2-15,9 g/kg között alakult. A minták között szignifikáns különbség volt, csak a Danubius, Bácska, Kékfrankos minták között nem.

A polifenolok az irodalmi adatoknak megfelelő mennyiségben voltak jelen (Kállay, 2010), jelentős eltérést nem találtam a mérési eredményeim között. A Palatina, Panonija fajták kivételével a minták között szignifikáns különbség volt. A mért értékek katechin esetében 3452-5796 g/kg között változtak. A minták között szignifikáns különbség volt. Epikatechin mennyisége 100-1156 g/kg között alakult. A minták között szignifikáns különbség volt. Leukoantocianinok esetében 3276-5180 mg/kg közötti értékeket kaptunk. A minták között szignifikáns különbség volt. A teljes antioxidáns kapacitás 100,8-122,8 mmol/kg között változott. Szignifikánsan legkisebb értéket a Danubius minta mutatta.

Ahogy az várható volt, csak piceidek (rezveratrol glükozidok) fordulnak elő a szőlőbogyóban. A mért transz-piceid értékek 0,28-3,28 mg/kg között változtak. A szignifikánsan magasabb értéket a Bácska és Kékfrankos szőlőbogyók mutattak. A rezveratrol koncentrációra jelen vizsgált mintákban és évjáratban nincs befolyással a feketerothadás.

Vizsgáltuk a feketerothadással fertőzött minták biogén amin tartalmát. A mért tiramin tartalom 0,06 és 0,11 mg/kg között alakult. A szerotonin mennyiségét tekintve 0,04-0,10 mg/kg között változott. A hisztamin tartalom esetében 8,8-11,6 mg/kg közötti értéket kaptunk. A tiramin és hisztamin tartalmat tekintve elmondható, hogy nincs szignifikáns különbség a fajták között. A Kékfrankos mintában mért szerotonin tartalom szignifikáns nagyobb a többi mintához viszonyítva.

### **3.3.2 Feketerothadással fertőzött bogyók mikotoxin tartalmának vizsgálata**

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

### **3.3.3 Feketerothadás tüneteket mutató bogyók mikotoxin tartalma**

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



## 4 KÖVETKEZTETÉSEK

Viszonylag gyors módszer lehet a feketerothadás fogékonyság és ellenállóság jellemzésére a csíratömlők hosszának mérése. Mindössze két nap alatt különbséget lehet kimutatni a fogékonyság tekintetében. Ez lényegesen megkönnyítheti a nemesítő munkáját, mivel gyors előrejelzést kap a növényanyagról, míg a 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 expresszálo gén között különböző protein kinázok és egy rpm-1-szerű rezisztencia gén is található volt. Általánosságban kevés specifikus jelet észleltünk.

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

A szőlőbogyó beltartalmi értékeit tekintve a feketerothadás okozta változások jelenlegi tudásunk szerint elhanyagolhatóak. A nemkívánatos vegyületek, mint az ochratoxin vagy a hisztamin szempontjából is. A feketerothadás több hisztamint képez, mint a botritisz. Termel a bogyóban melatonint, tiramint és szerotonint, ám azok mennyisége is elhanyagolható. Ebből az következik, hogy a feketerothadason átesett szőlőszemet minőségileg érdemes válogatni, de ha belekerül sem okoz gondot.

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

## 5 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kidolgoztam egy levélkorongos fertőzési módszert, ami biztosítja, hogy a *Guignardia bidwellii* kórokozóval fertőzött levélen a kórokozó szaporítóképlete lokalizáltan és nagy koncentrációban legyen jelen. A módszer egyben célzott mintavételt tesz lehetővé.
2. Igazoltam a Csillám fajta feketerothadással szemben mutatott toleranciáját konídium csírázás és csíratömlő növekedés alapján. A csíratömlők eltérő növekedési ütemét fogékony és ellenálló fajtán korábban nem vizsgálták.
3. Elsőként hasonlítottam össze egy feketerothadással szemben ellenálló és arra fogékony szőlőfajta RNS szintű válaszát és a transzkripciós mintázat változásának időbeli lefutását. Kimutattam, hogy a fertőzést követő első 36 órában a patogén által kiváltott immunitáshoz köthető folyamatokban (pl. fitoalexin termelés) szerepet játszó gének eltérően válaszolnak a fertőzésre.
4. Eredményeim alapján a Csillám feketerothadás toleranciája a kórfolyamat korai fázisában az eredendően magas sztilbén termeléshez köthető.
5. Elsőként vizsgáltam feketerothadás hatását a szőlőbogyó kémiai összetételére vonatkozóan.

6. Elsőként vizsgáltam a feketerothadás hatását az általános beltartalmi értékekre és savösszetételre vonatkozóan. Megállapítottam, hogy feketerothadt bogyókban képződik glicerin, valamint vele arányosan glükonsav is. Megállapítottam, hogy bár almasavat, sikiminsavat, citromsavat nem tudtam detektálni, azonban a (+)-tejsav jelenléte kimutatható volt a mintákban. Jelentős koncentrációban volt mérhető a borostyánkősav, a fumársav és a kaftársav is.
7. Elsőként vizsgáltam a feketerothadás hatását a polifenol-összetételre. Megállapítottam, hogy a polifenol-összetétel (összes polifenol, leukoantocianin, katechin, epikatechin) az irodalmi adatoknak megfelelő mennyiségben volt mérhető. Méréseim alapján megállapítható, hogy a feketerothadás inkább a katechin koncentráció változását befolyásolta.
8. Elsőként vizsgáltam a feketerothadás hatását, a polifenol-összetételen belül a pozitív élettani hatású rezveratrol koncentrációra (*transz*-piceid, *transz*-rezveratrol, *cisz*-piceid, *cisz*-rezveratrol). Méréseim alapján egyértelműen megállapítható, hogy a feketerothadás a piceidek előfordulását befolyásolta a bogyókban.
9. Elsőként vizsgáltam a feketerothadás hatását a biogén aminokra (a legjelentősebb élettani hatású vegyületek: tiramin, hisztamin, szerotonin). Megállapítottam, hogy a biogén aminok az eddigi irodalmi adatoknak megfelelő mértékben voltak jelen. Azaz a feketerothadás nem volt befolyással az általam vizsgált aminokra.

## 6 A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

### Impakt faktoros folyóiratcikk

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

### Lektorált folyóiratban (MTA listás) megjelent közlemények

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

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

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

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

### **Egyéb tudományos cikk**

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

### **Konferencia közlemények**

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

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

### **Konferencia összefoglalók**

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

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