



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

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

Doktori értekezés tézisei

DOI: 10.54598/004290

Farkas Eszter Alexandra
Gödöllő
2023

A doktori iskola

megnevezése: Biológia Tudományi Doktori Iskola

tudományága: Biológia tudomány

vezetője: Dr. Nagy Zoltán

tanszékvezető, egyetemi tanár, DSc, MTA doktora

MATE, Szent István Campus

Növénytermesztési-tudományok Intézet,

Növényélettan és Növényökológia Tanszék

Témavezetők: Dr. Bisztray György Dénes

egyetemi tanár, DSc

MATE, Budai Campus

Szőlészeti és Borászati Intézet

Szőlészeti Tanszék

Dr. Deák Tamás

egyetemi docens, PhD

MATE, Budai Campus

Szőlészeti és Borászati Intézet

Szőlészeti Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető(k) jóváhagyása

MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

Az egyik legősibb mezőgazdasági növényünk a szőlő, melynek a termesztésbe vont legnagyobb részét a kerti szőlő *Vitis vinifera* L. teszi ki, mely számos biotikus stresszhatásnak van kitéve.

A gombás és oomikótás megbetegedéseket célzó rezisztenciakutatások elsősorban a biotróf *Erysiphe necator* Schwein (szőlőlisztharmat) és *Plasmopara viticola* (Berk & Curtis) Berl. & De Toni (szőlőperonoszpóra), valamint a nekrotróf *Botrytis cinerea* Pers. (szürkerothadás) fontosságára hívták fel a figyelmet.

Az elmúlt évtizedekben azonban a klímaváltozással járó szélsőséges időjárási körülmények, illetve a kizárólag lisztharmat és peronoszpóra rezisztens szőlő fajták alkalmazása mind elősegítették az olyan másodlagos kórokozók fokozottabb megjelenését a szőlőültetvényekben, mint a feketerothadást okozó *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala et Ravaz. Ennek a hemibiotróf tömlősgomba fajnak a járványszintű pusztítását 2010-ben és 2014-ben tapasztalták Magyarországon, mely jelentős terméskiesést elsősorban a teljes kémiai védekezés nélküli környezetkímélő és biotermesztésben okozott.

Napjainkban egyre sürgetőbbé válik a fenntartható gazdálkodás és a megváltozott éghajlathoz való alkalmazkodás figyelembevétele a szőlőnemesítésben. Ehhez szükséges lehet egyrészt a szőlő természetes ellenállóképességének kihasználása illetve fokozása, a gomba-patógén kapcsolatok biológiai alapjainak feltárása, továbbá a hagyományos fajtákkal szemben az új, ellenálló fajták nemesítése.

A klónszelekció során a termésbiztonság és a borminőség biztosítását elérhetjük az előnyös tulajdonságú, a különböző kórokozókkal szemben ellenálló utódok kiválasztásával, így a szőlőfajták javítását, fennmaradását elősegíthetjük. Másrészt a biotechnológia fejlődésével már lehetőség van a növényi védekezést

segítő gének mint pl. a sztilbén szintázok működésének fokozásával gátolni a patogén gombákat, oomikótákat, másrészt a növényi betegség fogékonysági gének csendesítésével is lehet fokozni a védelmet. Kiemelt szerepük van az olyan másodlagos anyagcseretermékeknek, mint a sztilbének, amelyek egyrészt preformált ellenállóságot, rezisztenciát biztosíthatnak (mint fitoanticipinek) vagy fertőzés hatására emelkedik meg mennyiségük (mint fitoalexinek) és amelyeket a kórokozó gombákkal szembeni rezisztencia biomarkereinek is tekintenek a szőlő esetében.

A transzgenikus növények alacsony támogatottsága miatt ugyancsak cél a genomszerkesztési eljárásokkal, mint pl. a CRISPR/Cas9 alapú módszerekkel kialakított rezisztencia megvalósítása.

Jelen munkámban néhány, a szőlő gombás megbetegedését okozó faj, a nekrotrófok, biotrófok illetve elsősorban a hemibiotrófok elleni védekezéshez kívántam hozzájárulni. A rezisztencianemesítés biológiai alapjainak fejlesztéséhez az alábbi konkrét célokat fogalmaztam meg.

1. A nekrotróf *Botrytis cinerea* elleni védekezési lehetőségek vizsgálata kapcsán terveztem a szürkerothadással szemben kevésbé érzékeny két 'Juhfark' klón értékelését klónszelekciós kísérletben.
2. A szőlő feketerothadásának hemibiotróf kórokozójával szembeni ellenállóság és a sztilbének kapcsolatának vizsgálata kapcsán három célt tűztem magam elé.
 - 2.1. Sztilbén formák mennyiségi meghatározása egészséges és fertőzött levélből laboratóriumi körülmények között nevelt növényeken.
 - 2.2. Feketerothadás ellenálló és fogékony fajták sztilbén szintjének meghatározása levélből szabadföldi kísérletben.
 - 2.3. A sztilbén szintek és az ellenállóság vizsgálata feketerothadás ellenálló és fogékony genotípusok keresztezéséből származó utódnemzedékben. A

tulajdonságok (sztilbén tartalom és feketerothadás) közötti kapcsolat mértékének igazolása.

3. A feketerothadás hemibiotróf kórokozójának fertőzésére adott RNS szintű válaszreakció elemzése kapcsán két célt tűztem ki.
 - 3.1. A feketerothadás fertőzés hatására eltérő expressziós változást mutató gének azonosítása fogékony és ellenálló fajták esetében
 - 3.2. Feltételezett feketerothadás ellenállóságához kapcsolható gének validálása RT-qPCR expressziós kísérletekben
4. A betegségellenállóságban potenciálisan részt vevő gének csendesítésére vonatkozó vizsgálatok előkészítéséhez terveztem továbbá:
 - 4.1. CRISPR konstrukció létrehozását néhány kiválasztott, a kórfolyamatban szerepet játszó növényi gén csendesítéséhez
 - 4.2. Embriogén kallusz indukálásának kidolgozását szőlőlevélből és portokból CRISPR kísérlethez.

ANYAG ÉS MÓDSZER

'Juhfark' fajta klónjainak botritisz fogékonysága

A klónszelekciós kísérletekben a *Vitis vinifera* cv. 'Juhfark' szőlőfajta két (B.1. és B.2.) kiválasztott klónját a MATE Szőlészeti és Borászati Intézetének badacsonyi kutatóállomásán nevelték. 12 év (2011-2022) meteorológiai adatait (napi minimum, maximum és átlag hőmérséklet, napi csapadékmennyiség) rögzítették és minden évben felvételezésre kerültek a fő fenológiai fázisok: rügyfakadás (BBCH 09, EL 5), virágzás kezdete (BBCH 61, EL 19), virágzás vége (BBCH 69, EL 26), zsendülés (BBCH81, EL 35) és az érés (BBCH 89, EL 38) időpontja és a *Botrytis cinerea* fertőzöttség mértéke teljes érésben. A statisztikai kiértékelést az R programmal végeztük.

Sztilbén szintek vizsgálata tenyészedenyes és szabadföldi kísérletben

A feketerothadás kórokozójának hatását a különböző sztilbén formák (transz-rezveratrol, cisz-rezveratrol, transz-piceid, cisz-piceid, a transz-pterostilbén, transz- ϵ -viniferin, cisz- ϵ -viniferin) mennyiségére egy feketerothadásnak ellenálló 'Csillám' interspecifikus hibriden és egy fogékony 'Csaba gyöngye' *Vitis vinifera* fajtán vizsgáltuk. A 'Csillámot' a NAIK Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet Kecskeméti Kutató Állomásától, a 'Csaba gyöngyét' Balatonboglárról szereztük be, majd kétrügyes dugványukat neveltük perliten 3,5 hónapig 25 °C-on, 16 óra megvilágítással a MATE Talajtani Tanszékének fényszobájában.

A *Guignardia bidwellii* izolátumot az Eszterházy Károly Egyetem Szőlészeti és Borászati Intézetétől kaptuk, melyet a fertőzéshez 4 hónapig

Furmint zöldbogyólevet tartalmazó zabtáptalajon tartottunk fent 25 °C-on, állandó fluoreszcens megvilágítás alatt (50 % Tungshram 36 W F7 Daylight és 50 % Sylvania 36W T8 F Black light blue (UV-A)).

A fertőzéshez steril ecsetekkel egyenletesen vittünk fel $\sim 2 \times 10^5$ spóra/ml szuszpenziót a legfelső, fiatal levelekre, míg a kontroll leveleket steril desztillált vízzel fújtuk le. A levélmintákat 3 biológiai ismétlésben, az inokulációt követően 6, 18, 36 órával gyűjtöttük, majd -80 °C-on tároltuk őket. A fertőzést tripánkék festett levélmintákon validáltuk fénymikroszkóppal.

A szabadföldi kísérleti szőlőfajtáknál nem végeztünk mesterséges fertőzést, az alábbi sztilbének szintjét (transz-rezveratrol, cisz-rezveratrol, transz-piceid, cisz-piceid, a transz-pterostilbén, transz- ϵ -viniferin, cisz- ϵ -viniferin, transz- ω -viniferin, cisz- ω -viniferin, α -viniferin, transz-piceatannol) tanulmányoztuk.

A Pécsi Tudományegyetem Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetének Szentmiklóshegyi Kísérleti Telepén található szőlőültetvényből különböző feketerothadás ellenálló és fogékony szőlőfajtákról szedtünk a virágzás kezdetekor (BBCH 61, EL 19) a vitorlától számítva az első-második 2,5-3 cm (kisméretű, „3 cm”), negyedik-ötödik kiterült 4,5-5,5 cm átmérőjű (nagy méretű, „5 cm”) leveleket 3 biológiai ismétlésben.

A 'Csillám' \times 'SK001/7' és 'Csillám' \times '01-1-797' szülők hasadó nemzedékét is vizsgáltuk, melyek közé feketerothadásnak ellenálló (109, 147, 180, 187, 192) és érzékeny (83, 106, 112, 113, 127, 163, 213, 234) hibridek is tartoztak, melyeknél a biológiai ismétléseket az egyes egyedek jelentették. A 'Csillám', 'SK001/7', '01-1-797' esetén $>7,5$ cm átmérőjű leveleket is kiválasztottunk. A levélmintákat folyékony nitrogénbe helyeztük és -80 °C-on tároltuk őket. A sztilbén szintek meghatározását az MTA martonvásári Agrártudományi Kutatóintézetének Növényélettani Osztálya végezte UPLC-MS/MS technikával.

A feketerothadás ellenállóságban feltételezetten szerepet játszó gének eltérő expressziójának validálása

A *Guignardia bidwellii* fertőzés hatására bekövetkezett génextpressziós változások összehasonlításához a feketerothadás ellenálló 'Csillám'-mal és a fogékony 'Csaba gyöngy'-vel dolgoztunk. Az RNS szekvenálás bioinformatikai vizsgálatával kapott korábbi eredmények (Kellner, 2022) alapján a ($p < 0,01$) szignifikancia szinten 6, 18, 36 hpi differenciált expressziót mutató gének minőségellenőrzését végeztem el és ebből kiválasztottunk néhányat, mely találatok megerősítése céljából RT-PCR-t végeztünk. Ehhez primereket terveztünk 8 kiválasztott génre (*VvSTS10*, *VvSTS20*, *VvSTS21*, *VvPAL12*, *VvOPR2*, *VvWRKY*, *VvRPM1*, *VvDMR6*).

A szőlővesszőket a NAIK Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet, Kecskeméti Kutató Állomásától kaptuk. A kétrügyes dugványokat általános virágföld és perlit 1:1 arányú keverékébe ültettük, majd 6 hónapig 21 °C-on, 16 órás megvilágítással neveltük őket a MATE Talajtani Tanszékének fényszobájában.

A feketerothadást okozó gomba tenyészetét a Pécsi Tudományegyetem Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetétől kaptuk. A tenyészeteket PDA (burgonya-dextróz) táptalajon állandó fluoreszcens megvilágítás alatt (50 % Tungsram 36 W F7 Daylight és 50 % Sylvania 36W T8 F Black light blue (UV-A)) 25 °C-on inkubáltuk 41 napig.

A fertőzéshez Kellner és munkatársai (2014) alapján féllével módszert alkalmaztunk, a szűrőpapírkorongokat 10^4 - 10^5 spóra/ml szuszpenzióval itattuk át, míg a steril desztillált vizes korongok szolgáltak kontrollként. A levélmintákat 3 biológiai ismétlésben, a fertőzést követően 0, 6, 18, 36 órával gyűjtöttük és RNS-t vontunk ki belőlük Gambino (2008) módosított CTAB alapú módszerével. Az RNS mintákat DNáz emésztettük és cDNS-t szintetizáltunk belőlük, majd valós idejű PCR-rel amplifikáltuk a célgén kiválasztott szakaszát. A génextpresszió

relatív kvantifikálásához az összehasonlító $\Delta\Delta\text{CT}$ módszert alkalmaztuk (Schmittgen és Livak, 2008). A real-time PCR eredmények statisztikai kiértékelését a GraphPad Prism szoftverrel végeztük. A fertőzést tripánkék festett (Várallyay et al., 2012) levélmintákon validáltuk fénymikroszkóppal.

CRISPR/Cas9 konstrukciók készítése és embriogén kallusz indukciója

Vitis vinifera cv. 'Furmint' lisztharmat és fekete rothadás rezisztenciájának teszteléséhez MLO gének (*VvMLO6*, 7, 11, 13) és a *DMR6* gén csendesítéséhez terveztünk CRISPR konstrukciókat és állítottunk elő embriogén kalluszokat. A "guide" RNS-ek megtervezéséhez a kódoló régió és az mRNS szekvenciákat az NCBI GenBank és a padovai egyetem V2.1 annotációjú adatbázisából (<https://genomes.cribi.unipd.it>) gyűjtöttük ki és NCBI Blast segítségével illesztettük a 12x-s szőlő referenciagenomhoz, az említett V2.1 annotációjú genomhoz, illetve az általunk megszekvenált Furmint genomhoz.

Az Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) adatbázisa alapján olyan fehérje doméneket választottunk ki, melyek az MLO, *DMR6* működésében lényegesek, majd Geneious szoftverrel terveztük meg a guide RNS-eket.

A CRISPR konstrukciók létrehozásához a pUC gRNA shuttle (Addgene: 47024) és p201N:Cas9 (Addgene: 59175) plazmidokat használtuk fel. A pUC gRNA shuttle vektorból amplifikáltuk az *MtU6* promóter és scaffold régiókat, majd NEBuilder HiFi DNA Assembly segítségével az *MtU6* promóter, gRNS és scaffold szakaszokat építettük össze. Az így kapott gRNS kazetták összekapcsolásához és a p201N-Cas vektorba való ligálásához 5' és 3' túlnyúló végeket hoztunk létre Q5 polimerázzal. A p201N-Cas vektorba ligáltuk az inzertünket vagyis egy gRNS kazettát vagy az összekapcsolt 2-3 gRNS kazettát, majd *E.coli* 10-béta törzsébe transzformáltuk, majd táptalajra oltottuk őket.

Kolónia PCR-rel ellenőriztük a klónokban a ligálás sikerességét, majd Sanger szekvenálással további minőségszűrést végeztünk, melynek eredményét Geneious szoftverrel értékeltük ki.

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

A lefertőtlenített virágzatokból kiperarált portokokat MSE/2 és MST/2 táptalajokon teszteltük 22±2 °C-on sötétben Oláh és munkatársai (2009) alapján. A levéldarabokat 1-naftil-ecetsavat (NAA) és 6-benzilaminopurint (BAP) tartalmazó ½ MS táptalajra és indolecetsav (IAA), kinetin tartalmú ½ MS táptalajon indítottuk el Polylux XL 36 W és Tungsram F7 Daylight 36 W 16 órás megvilágításon 22±2 °C-os hőmérsékleten. Az embriogén kapacitást aktív szénrel kiegészített MSE/2 táptalajokon teszteltük.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Botritisz ellenállóság vizsgálata szabadföldi 'Juhfark' ültetvényben

A 'Juhfark' klónszelekció célja az volt, hogy a termés lazább fűrtű legyen, ezáltal kevésbé érzékeny botritiszre. A klonális különbségek megállapításához minden év fenofázisainak meteorológiai adatai alapján k átlag csoportképzéssel az éveket 3 csoportba soroltuk. Főkomponens elemzés alapján az évjárat csoportok egyértelműen elkülöníthetőek. 'Juhfark' átlagos terméshozama $1,23 \text{ kg/m}^2$ volt 10 év alatt, amely egy őshonos fajtánál jó eredménynek minősül. Terméshozam tekintetében nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a klónok vagy az évjárat csoportok között.

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

A feketerothadás és a sztilbének kapcsolata

Sztilbén formák mennyiségi meghatározása egészséges és fertőzött levélből laboratóriumi körülmények között nevelt növényeken

A feketerothadás fertőzés sztilbén szintekre való hatását ($p < 0,05$) megbízhatósági szinten az ellenálló 'Rayon d'or' \times 'Kékfrankos' szülőkkal rendelkező 'Csillám' és a fogékony 'Csaba gyöngye' fajtákban vizsgáltuk a legfelső, kisméretű levelekből. A 'Csaba gyöngye'-ben alacsonyabb volt a sztilbének szintje az összes időpontban és mintában a 'Csillám'-hoz képest. A 0 hpi időpontban a 'Csaba gyöngye'-ben átlagosan 24454 ng/g FW , míg 'Csillám'-ban $2,4\times$ magasabb sztilbén szintet mértünk.

A 'Csillám' mock és fertőzött levelek között a sztilbén szintben nem volt szignifikáns a különbség Kruskal-Wallis teszt alapján $p=0,2820$ volt a vizsgált időpontokban. Hasonlóképpen a 'Csaba gyöngye' fajtában a mock és a fertőzött levelek között a sztilbén szintben egyetlen mintavételi időpontban sem volt szignifikáns ($p=0,2820$) a különbség Kruskal-Wallis teszt alapján. A 'Csillám' fajta esetében a kezdeti 0 hpi időpontban azonban 59813 ng/g FW átlagos összesített sztilbén szintet mértünk, amely a szabadföldi mintákhoz képest (9489 ng/g FW) $6,3\times$ magasabb volt. A 'Csillám'-hoz hasonlóan 'Csaba gyöngye' esetében a szabadföldihez képest, a sztilbének szintje $2,2\times$ magasabb volt laboratóriumi körülmények között. Annak ellenére, hogy kevesebb sztilbén típust vizsgáltunk, mégis magasabb összesített sztilbén mennyiséget tapasztaltunk laboratóriumi körülmények között.

Feketerothadás ellenálló és fogékony fajták sztilbén szintjének meghatározása levélből szabadföldi kísérletben

Az általunk vizsgált fajták fiatal, kisméretű levelei kevesebb sztilbént tartalmaztak, mint az idősebbek szabadföldi körülmények között. A kétféle levélméret sztilbén tartalma között páros t-próba alapján szignifikáns ($p=0,0006$, $df=14$) volt a különbség. Az eltérő levélméretekből származó különböző sztilbén szintek miatt külön vizsgáltuk tovább a kisméretű és nagyméretű levelek sztilbén szintjeit. A kisméretű levelek esetén Kruskal-Wallis teszt alapján jelentős volt ($p=0,0024$) a különbség az egyes fajták sztilbén tartalmában ($p<0,05$) megbízhatósági szinten.

A feketerothadással szemben ellenálló és arra fogékony fajták és genotípusok leveleinek sztilbén tartalmának vizsgálata alapján *Vitis vinifera cv.* 'Furmint' fajtában volt a legalacsonyabb (átlag 2156 ng/g FW és 2944 ng/g FW) az összesített sztilbén szint kis és nagyméretű levelek vizsgálatánál is egyaránt, de a feketerothadás, lisztharmat és peronoszpóra rezisztens *Vitis vinifera cv.*

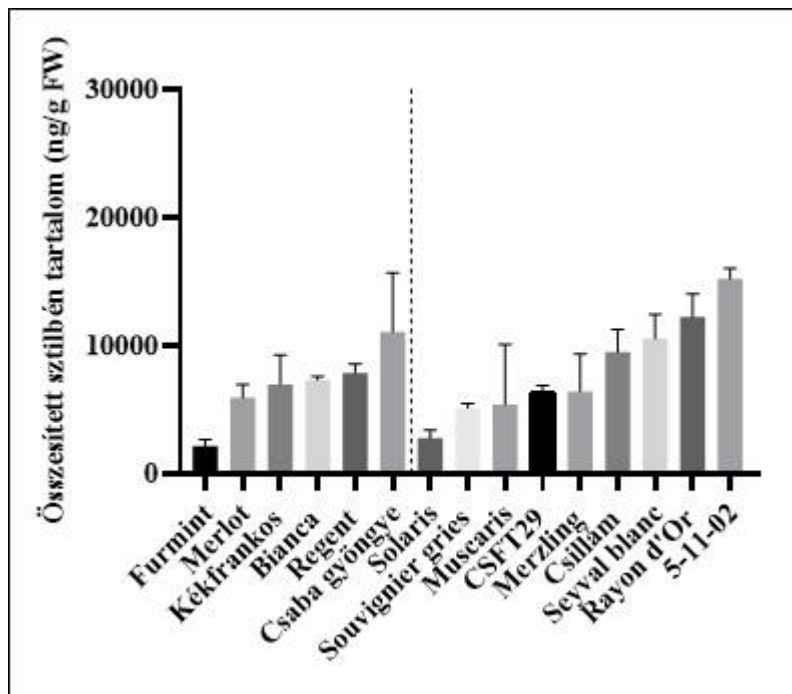
'Solaris' és a 'Souvignier gries' is meglepően alacsony sztilbén szinttel rendelkezett mindkét levélméretnél. A fogékony 'Furmint'-hoz képest csupán $1,3\times$ magasabb a 'Solaris' és $2,4\times$ a 'Souvignier gries' sztilbén szintje a kisméretű levelekben. A kis levélméretű 'Csillám'-nál magasabb lett a 'Csaba gyöngye' sztilbén szintje, viszont nem volt szignifikáns a különbség közöttük kétmintás t-próba alapján ($p=0,6062$) ($p<0,05$) megbízhatósági szinten.

A nagy levélméretű 'Csillám'-nál viszont alacsonyabb lett a 'Csaba gyöngye' sztilbén szintje, Mann Whitney teszt alapján viszont ez sem jelentős eltérés ($p=0,4000$). A legalacsonyabb sztilbén szinteket tanulmányozva, a nagyméretű levelek esetén a fogékony 'Furmint'-hoz képest $1,6\times$ magasabb volt az átlag sztilbén szint az ellenálló 'Solaris'-ban, míg a fogékony 'Kékfrankos'-ban $1,7\times$ -es a különbség mértéke. A legmagasabb sztilbén szintek mindkét levélméretnél (átlag 15180 és 17108,5 ng/g FW) egy *Vitis amurensis* F2 hibridnél volt látható. A 'Rayon d'Or' szülővel rendelkező 'CSFT29' (6378,9 ng/g FW) és 'Rayon d'Or' nagyszülőjű 'Merzling'-ben (6414,4 ng/g FW) szinte megegyezett az összesített sztilbén szintek átlaga (1.ábra). A nagyméretű levelek esetén Kruskal-Wallis teszt alapján számottevő volt ($p=0,0016$) a különbség az egyes fajták sztilbén tartalmában ($p<0,05$) megbízhatósági szinten.

A sztilbén szintek és az ellenállóság vizsgálata fekete-rohadás ellenálló és fogékony genotípusok keresztezéséből származó utódnemzedékben

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

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



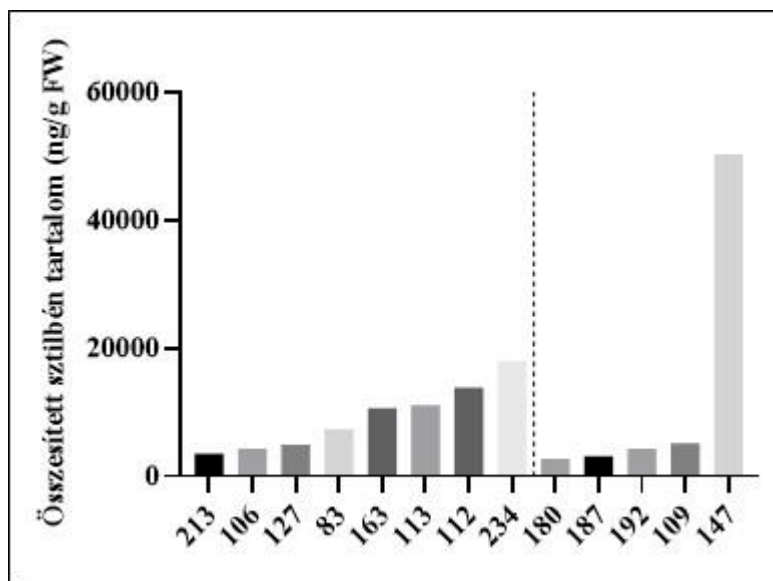
1. ábra

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

A hibridek közül a 109,147,180,187 és 192 BR (feketerothadás) ellenállók. A kis levél esetén a hibridek között a legalacsonyabb sztilbén szinttel a BR rezisztens 180 és 187-es hibrid rendelkezett, 2713 ng/g FW, 3123 ng/g FW sztilbén tartalmuk volt. Azonban a legmagasabb sztilbén tartalma a szintén BR rezisztens 147-es hibridnek volt (50284 ng/g FW). A 147-es hibrid így felülmúlta

a fogékony 'SK001/7' (3836,5 ng/g FW) és a BR rezisztens 'Csillám' (9489 ng/g FW) szülőit (2.ábra).

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



2. ábra

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

Ha összehasonlítjuk a rezisztens hibrdek és a fogékonyak kis leveleit, akkor Mann Whitney teszt alapján nem volt különbség a csoportok között ($p=0,3543$), ez nagyméretű leveleknél is igaz ($p=0,7242$) volt. Mann-Whitney teszt alapján nem volt szignifikáns ($p=0,3543$) a különbség a feketerothadás ellenálló és fogékony hibrdek között ($p<0,05$) a „3 cm”-es leveleknél, de ez az „5 cm-es” leveleknél ($p=0,7242$) is látható volt a sztlbén szintekben. Mindezek alapján a

rezisztencia és a sztilbén szintek kapcsoltsága nem igazolható, ezen tulajdonságok függetlenül öröklődhetnek.

Feketerothadás fertőzésre ellenálló és fogékony fajtában eltérően reagáló gének expressziójának validálása

Szőlőben a feketerothadásra adott sejt szintű korai válaszban (0, 6, 18, 36 hpi) az RNS szintű változásokat vizsgáltuk a rezisztens 'Csillám' és a fogékony 'Csaba gyöngye' esetében. A génkifejeződési adatok alapján feltételeztük, hogy a feketerothadás fertőzésre adott korai válaszban a sztilbén szintáz gének kiemelt szerepet játszanak, mivel a DE (Differenciált expressziót mutató) gének között találtuk meg őket. Az összesített sztilbén szintek viszont nem mutattak összefüggést a szőlő feketerothadásos megbetegedésével, illetve ellenállóságával. Ezért egyenként kielemeztem a minőség szűrt DE gének expressziós mintázatát (0,6,18,36 hpi) időpontokban ($p < 0,01$), mely alapján 32 azonos transzkripciós mintázattal rendelkező csoportot és 49 egyedi expressziójú gént tudtam elkülöníteni a két fajta vizsgálata során.

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

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

'Csillám'-ban 6 hpi-nél a mock expresszió 0,6-ra csökkent a fertőzött levelekben, tehát a nem fertőzött mintában volt magasabb az RPM1 expressziója.

18 hpi-nél a fertőzött levelekben már $1,1\times$ volt magasabb az expresszió a féllevél kontrolljához képest és ez megmaradt 36 hpi-nél is vagyis szinte nem volt különbség ezekben az időpontokban, nem történt a feketerothadás fertőzés hatására jelentős indukció a transzkripcióban.

A *VvDMR6* gént vizsgálva a két fajta között nem volt szignifikáns ($p=0,3381$) a különbség kéttényezős ANOVA teszt alapján Geisser-Greenhouse elemzésben. A 'Csillám'-ban az egyes mintavételi időpontokban a mock és a fertőzött minták között sem igazolható ($p=0,6883$) az expressziós különbség egytényezős ANOVA teszt ($p<0,05$) alapján, míg 'Csaba gyöngyé'-ben szignifikáns volt ($p=0,0470$). A 6 hpi mintában a fertőzött mintában alacsonyabb volt ($0,8\times$) az expresszió, míg 18 hpi-nél $2,16\times$ magasabb, 36 hpi esetében $1,23\times$ volt magasabb a fertőzött levélben a mockhoz képest.

A *VvDMR6* egy betegség fogékonyági gén, a fogékony fajtában vártuk a magasabb expressziós szintjét, amely a 18 órás időpontban jelentősen meg is emelkedett.

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

Az *OPR2* és a *WRKY* gén esetében kéttényezős ANOVA elemzése alapján nem volt szignifikáns a két fajta között az expressziós különbség ($p=0,3497$) és ($p=0,3914$), azonban az *OPR2* relatív expressziója a 36 órás időpontban a nagy szórás miatt nem is értékelhető. A transzkriptomikai adatok eredményei a valós idejű PCRrel kapott relatív expressziós adatokkal nem fedtek

át. Ez alól egy gén, az RPM1 volt kivétel, amely valóban DE gén volt, csak az ellenálló 'Csillám'-ban expresszáldott.

CRISPR konstrukciók elkészítése és embriogén kallusz indukció fejlesztése 'Furmint' fajtánál

Eddig három konstrukciót készítettünk el és áll rendelkezésre a szőlő lizstharman fogékonyságában szerepet játszó MLO gének esetében, melyek közül egy a FuMLO11, egy a FuMLO13 géneket veszi célba egy-egy célponttal, míg a harmadik konstrukció a FuMLO6 és FuMLO7 géneket célozza három pontban. Ezen kívül szintén rendelkezésre áll a FuDMR6 gént célzó egy db konstrukció, amely a gén két pontját célozza egyszerre. A csendesítés folytatásához azonban szükség van egy, a 'Furmint' fajtában hatékony növényregenerációs rendszerre, aminek kidolgozását szintén megkezdjük.

A 'Furmint' fajta 4 különböző virágzatából (A, B, C, D) kipreparált portokokat MSE/2 és MST/2 táptalajokra helyeztük az alábbi elnevezéssel: MSE_A, MSE_B, MST_C, MST_D. Az A és B virágzat portokjai voltak MSE/2-n, C és D virágzat portokjai voltak MST/2-n táptalajon elindítva. Egy hónap múlva az összes portokot MSE/2 táptalajra tettük át és 22+/-2°C-os hőmérsékleten sötétben inkubáltuk. Egy hónapos inkubáció után, vagyis a kísérlet elindítása után 2 hónappal halvány és sötétsárga kallusz jelent meg a portokok nagy részén és elvéve fehér színű kalluszosodást is megfigyeltünk.

A kísérlet kezdetétől számított 6. hónapban NAA, BAP illetve IAA és kinetin tartalmú táptalajokra került át a kalluszok egy része az MSE/2 táptalajokról, melyek 22+/-2°C-on meleg és hidegféher (Polylux XL 36W és Tungram F7 Daylight 36W) megvilágítású fényszobába kerültek 16 óra világos és 8 óra sötét szakaszokban. Az MSE/2 táptalajokon továbbra is fenntartottunk a portokon fejlődött kalluszokból, melyek továbbra is sötétben voltak 22+/-2°C-on.

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

A kísérletünkben sikeresen végeztünk embriogén kallusz indukciót Furmint szőlőfajta levelekből NAA, BAP tartalmú MS/2 és aktív szenet tartalmazó MSE/2 táptalajon. Az IAA, kinetin tartalmú táptalajokon 30 nap elteltével a levelek széle bebarnult. A kísérlet kezdetétől számított 80 nap elteltével pedig kismértékű fehér kallusz képződés volt megfigyelhető.

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

50 nappal az aktív szenet tartalmazó MSE/2 táptalajra való áttöltés után pedig sötétsárga, feltehetően embriogén kallusz jelent meg és globuláris proembrió is képződött, amely a 'Furmint' levél embriogenezisre való képességére utal. Az NAA/BAP tartalmú táptalajon maradt kalluszokon 87 nappal a kísérlet kezdete után halványsárga, embriogén kalluszképződés indult, mely egyre jobban fejlődött, kb. 180 nappal a kísérlet kezdete után egyre sárgábbá váltak a kalluszok.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK

***Botrytis cinerea* ellenállóság szabadföldi vizsgálata klónkísérletben**

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

Rezisztencia gének és a sztilbén szintek a szőlő feketerothadásában, Csillám és Csaba gyöngye fajtákban laboratóriumi körülmények között

A sztilbén szinteket egyrészt azért vizsgáltuk meg, mivel a differenciált expressziót mutató gének között találtunk sztilbén szintázokat, másrészt a feketerothadás térképezés legelső eredményei alapján találtak egy olyan feketerothadással kapcsolatos QTL-t, amely átfedett egy rezveratrol bontó QTL-lel a 16-os kromoszómán, amelyen olyan sztilbén szintáz gének lokalizálódnak (VvSTS7-48), amelyek a stresszválaszban vesznek részt (Vannozzi et al., 2012).

Hasonlóképp a transzkriptom szekvenálás alapján kiválasztott sztilbén szintáz génjeink (VvSTS10, 20 és 21) is a 16-os kromoszómán lokalizálódtak. Ha

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

A sztilbén szintázok közül az STS10 és az STS21 expressziójában nem volt szignifikáns különbség a rezisztens és a fogékony fajtában, míg az STS20-nál jelentős volt a különbség. Vezzulli és munkatársai (2019) a szőlőperonoszpóra rezisztencia és a polifenol tartalom vizsgálatában a DE gének között találta meg az STS10, STS20, STS21 gént. Az STS10 potenciális szerepét a cisz-piceid szintézissel hozta összefüggésbe.

Az egyik génjelöltünk az rpm1-like rezisztencia gén, melynek szőlő oomikótás megbetegedésre való szerepét már leírták. Az RPM1 szintje megnőtt a szőlőperonoszpórára fogékony *Vitis vinifera* cv. 'Centennial Seedless' fajtában *Plasmopara viticola* fertőzés hatására (Liu et al., 2020).

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

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

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

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

Az eredmények alapján viszont igazolódott a fajták közti különbség, a BR ellenálló 'Csillám'-ban a 'Csaba gyöngyé'-hez képest mért magasabb sztilbén szintekben.

A szabadföldi kísérletben a kisméretű levelek vizsgálatában ez nem mutatkozott meg, sőt alacsonyabb volt a sztilbének szintje is, annak ellenére, hogy kevesebb sztilbén formát vizsgáltunk a laboratóriumi körülmények között nevelt növényekben. Azt feltételezzük, hogy a hajtatott, mesterséges fényen nevelt szőlő nem biztos, hogy alkalmas ilyen jellegű mérések vizsgálatára, mert a mesterséges környezet stresszhatást válthat ki.

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

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

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

A vizsgált fajták között szerepel a 'CSFT29', a 'Csillám' testvére, amely szintén BR ellenállónak bizonyult. A 'Rayon d'Or' ('Seibel 4986') pedig a 'Csillám' apai szülője, melynek *Vitis rupestris* őseitől eredhet a feketerothadás ellenállósága. A 'Csillám' anyai szülője a 'Kékfrankos' viszont BR fogékony. A 'Rayon d'Or' ugyanakkor a szintén feketerothadás ellenálló 'Merzling' fajta nagyszülője is egyben.

A 'Csillám' × 'SK001/7' és 'Csillám' × '01-1-797' szülők által létrejött hasadó nemzedék tagjait is vizsgáltuk, melyek között feketerothadásnak ellenálló és érzékeny hibridek is voltak. A 'Merzling' egyik szülője a BR ellenálló 'Seyval blanc'.

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

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

A legmagasabb sztilbén szintű 5-11-02 *Vitis amurensis* hibrid feketerothadás ellenállóságán kívül, nincs adat a többi kórokozóval szembeni rezisztenciájáról. A magas sztilbén szintekkel rendelkező 'Rayon d'Or' és

'Seyval blanc' viszont feketerothadás, szőlőlisztharmat, peronoszpóra ellenálló és *Botrytis cinerea*ra kevésbé érzékeny.

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

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

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

A levelek kora alapvetően befolyásolja a sztlbén szintet. A nagyon fiatal és idős levelekben nem magas a sztlbén szint, a sztóma nem fejlődött ki teljesen vagy zárva van, mely korlátozhatja bizonyos patogének bejutását és így a sztlbének indukált szintézisét.

Az összes általunk vizsgált szőlőfajta közül a legalacsonyabb összesített sztlbén szintet a *Vitis vinifera* cv. 'Furmint' fajtában mértünk, amely fogékony szőlőlisztharmat, -peronoszpóra, szürke- és feketerothadásra is egyaránt. A sztlbének fontos védő metabolitok, gátolják az olyan gombák fejlődését a szőlőben, mint a *Botrytis cinerea* (szürkerothadás), *Plasmopara viticola* (szőlőperonoszpóra) és *Erysiphe necator* (szőlőlisztharmat).

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

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

A hasadó nemzedékek vizsgálata pedig igazolta, hogy a magas sztilbén szint és a magas fokú ellenállóság függetlenül öröklődő tulajdonságok lehetnek.

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

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A szőlő feketerothadás ellenállóság kapcsán még nem vizsgálták a sztilbén szinteket szőlőlevélben. Megállapítottam, hogy a fiatal 2,5-3 cm átmérőjű levelekben az összesített sztilbén szint alacsonyabb, mint a fejlettebb 4,5-5cm-es levelekben, a fogékony és az ellenálló fajták esetében is, ami összhangban van az ontogenetikus rezisztencia kialakulásának jelenségével.
2. Laboratóriumi mesterséges fertőzési kísérletben, a feketerothadásra fogékony Csaba gyöngye fajta levelében alacsonyabb volt a sztilbének szintje az összes időpontban és mintában az ellenálló Csillámhoz képest.
3. Csaba gyöngyében és a Csillámban a mock és a fertőzött levelek között a sztilbén szintben nem volt szignifikáns a különbség az egyes mintavételi időpontokban, ami kiemeli a sztilbének (mint fitoanticipinek) szerepét a preformált rezisztenciában.
4. Feketerothadás ellenálló és fogékony fajták sztilbén szintjei és fajták feketerothadással szembeni ellenállósága közt nincs egyértelmű összefüggés, a sztilbén szintek önmagukban nem magyarázzák meg az ellenállóságot.
5. A feketerothadással szemben ellenálló és fogékony szülők keresztezéséből származó utódnemzedékben a feketerothadás ellenállóság és a sztilbén szint függetlenül öröklődhet. A nagyszámú populációból 3 éves ellenőrzés alapján kiválasztott fogékony és ellenálló egyedek sztilbén szintjei nem mutatnak kapcsoltságot az ellenállósággal.

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

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

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

1. **Farkas, E.**; Kellner, N. ; Bisztray, Gy D.; Deák, T. Comparative transcriptome analysis of a resistant and a susceptible grapevine cultivar to *Guignardia bidwellii* using RNAseq technique. In: Klára, Benedek (szerk.) 4th Transylvanian Horticulture and Landscape Studies Conference. Marosvásárhely, Románia: Sapiientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Marosvásárhelyi Kar (2017) p. 16, 1 p.
2. Deák, T.; **Farkas, E.**; Lózsa, R.; Kellner, N ; Bálo, B.; Bisztray, Gy D. Differential expression of susceptible and tolerant grape cultivars on black rot infection expression. In: 20th GiESCO International Meeting. Mendoza, Argentína (2017) 1,261 p. pp. 246-250. 5 p.
3. **Farkas, Eszter**; Kellner, Nikolett; Deák, Tamás; Bisztray, György Dénes. Comparative transcriptome profiling of resistant and susceptible grapevine varieties infected with black rot. In: Pintér, Gábor; Zsiborács, Henrik; Csányi, Szilvia (szerk.) Arccal vagy háttal a jövőnek? : LX. Georgikon Napok. Keszthely, Magyarország: Pannon Egyetem Georgikon Kar (2018) pp. 79-86. ,8 p.
4. Deák, Tamás; **Farkas, Eszter**; Bálo, Borbála; Bisztray, György Dénes. Fitoalexinek szerepe a szőlő betegség-ellenállóságában, a nemesítés lehetőségei. Agrofórum Extra 76: 1 pp. 67-69., 3 p. (2018).
5. **Eszter, Farkas**; Markus, Freudhofmaier; Sonja, Gierlinger; Tamás, Deák; Fatemeh, Maghuly. Enhancing powdery mildew resistance in grapevine using the CRISPR/Cas9 system. Plant Genome Editing & Genome Engineering II Conference. Bécs, Ausztria (2019). pp.1-31, 12 p.

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

7. Tamás, Deák; **Eszter, Alexandra Farkas**; Hakim, Tafer; György, Dénes Bisztray; Pál, Kozma; Diána, Nyitrai Sárdy; Fatemeh, Maghuly. Structural Variation Analysis on Two Grapevine Hybrid Families Segregating for Economical Important Traits. In: Gerard, Lazo; David, Grant; Victoria, Carollo Blake Plant and Animal Genome XXIX Abstract Book (2022) Paper: PO0157

8. Olah, Robert; Turcsan, Mihály; Olah, Krisztina; **Farkas, Eszter**; Deák, Tamás; Jahnke, Gizella; Sárdy, Diana Agnes Nyitrai. Somatic Embryogenesis: A Tool for Fast and Reliable Virus and Viroid Elimination for Grapevine and other Plant Species. Horticulturae 8: 6 p. 508 (2022) doi.org/10.3390/horticulturae8060508

9. **Farkas, Eszter**; Kellner, Nikolett; Szabó, Márton; Szóke, Antal; Kiss, Erzsébet; Bisztray, György Dénes; Kozma, Pál; Deák, Tamás; Nyitrai, Sárdy Diána Ágnes. A sztilbének szerepe a szőlő feketetrohadás fertőzésre adott korai válaszreakciójában. In: Polgár, Zsolt; Karsai, Ildikó; Bóna, Lajos; Matuz, János; Taller, János (szerk.) XXVIII. Növénynevelési Tudományos Napok: Összefoglaló kötet Keszthely, Magyarország: Magyar Növénynevelők Egyesülete (2022) 122 p. pp. 75-75., 1 p.

10. Tamás, Deák; **Eszter, Farkas**; György, Dénes Bisztray; Pál, Kozma; Fatemeh, Maghuly. Genome wide identification of Structural Variations in Grapevine Hybrid Families. In: Arif, Atak (szerk.) Abstract book - XIII

International Conference on Grapevine Breeding, Genetics and Management (2023) p. 42, 1 p.

11. Szabó, Márton; Csikász-Krizsics, Anna; Dula, Terézia; **Farkas, Eszter**; Roznik, Dóra; Kozma, Pál; Deák, Tamás. Black rot of grapes (*Guignardia bidwellii*)-A Comprehensive overview. Horticulturae 9: 2 Paper: 130, 20 p. (2023). doi.org/10.3390/horticulturae9020130

12. **Farkas, Eszter Alexandra**; Jahnke, Gizella; Szőke, Barna; Deák, Tamás; Oláh, Róbert; Oláh, Krisztina; Knolmajerné Szigeti, Gyöngyi; Németh, Csaba; Nyitrai Sárdy, Diána Ágnes.

Clonal selection of autochthonous grape varieties in Badacsony, Hungary. Horticulturae 9: 9p. 994 (2023). doi.org/10.3390/horticulturae9090994

FELHASZNÁLT IRODALOM

- Gambino, G., Perrone, I., Gribaudo, I., 2008. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem. Anal.* 19, 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>
- Kellner, N., Deák, T., Bisztray, G.D., Váczy, K.Z., Dula, B., 2014. A szőlő feketerothadása és a fertőzésre adott növényi válasz vizsgálata RNS szinten. *Agrofórum* 25, 120–124
- Kellner, N., 2022. A szőlő (*Vitis vinifera*) feketerothadás (*Guignardia bidwellii*) fertőzésre adott transzkriptom szintű válasza és a fertőzött bogyók finomanalitikai összetétele, in: PhD Disszertáció.
- Liu, L., Zhang, B., Wang, H., Yu, S.Y., Guan, T.S., Huang, Y.F., Chang, Y.L., 2020. Candidate resistance genes selection and transcriptome analysis for the early responses to *Plasmopara viticola* infection in grape cultivars. *J. Plant Pathol.* 102, 857–869. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00546-x>
- Makovecz-Tóth, Z., 2016. Lisztharmat indukálta génexpresszió egy fogékony szőlő fajtában – egy új NAC transzkripciós faktor szerepe a fertőzésre adott válaszreakcióban.
- Oláh, R., Zok, A., Pedryc, A., Howard, S., Kovács, L.G., 2009. Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes. *Sci. Hortic.* 120, 134–137. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.10.003>
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- van Damme, M., Huibers, R.P., Elberse, J., Van den Ackerveken, G., 2008. *Arabidopsis* DMR6 encodes a putative 2OG-Fe(II) oxygenase that is defense-associated but required for susceptibility to downy mildew. *Plant J.* 54, 785–793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03427.x>
- Várallyay, É., Giczey, G., Burgyán, J., 2012. Virus-induced gene silencing of Mlo genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*. *Arch. Virol.* 157, 1345–1350. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1286-y>
- Vezzulli, S., Malacarne, G., Masuero, D., Vecchione, A., Dolzani, C., Goremykin, V., Mehari, Z.H., Banchi, E., Velasco, R., Stefanini, M., Vrhovsek, U., Zulini, L., Franceschi, P., Moser, C., 2019. The Rpv3-3 Haplotype and Stilbenoid Induction Mediate Downy Mildew Resistance in a Grapevine Interspecific Population. *Front. Plant Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00234>