

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Hegyi Ádám István

Gödöllő

2024



**Magyar Agrár – és Élettudományi
Egyetem**

A szőlő nemesrothadásának transzkriptomikai elemzése

DOI: 10.54598/005510

Hegyi Ádám István

Gödöllő

2024

A doktori iskola

megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

tudományága: Környezettudomány

vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika
egyetemi tanár, az MTA levelező tagja
MATE
Környezettudományi Intézet
Talajtani Tanszék

Témavezető(k): Dr. Cserhádi Mátyás
egyetemi docens
MATE
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Molekuláris Ökológiai Tanszék

Dr. Váczy Kálmán Zoltán
tudományos főmunkatárs, általános rektorhelyettes
EKKE
Kutatási és Fejlesztési Központ

A doktori iskola- és a témavezetők jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Magyar Agrár – és Élettudományi Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárására bocsátható.

.....
Az iskolavezető
jóváhagyása

.....
A témavezető
jóváhagyása

.....
A témavezető
jóváhagyása

1. TARTALOMJEGYZÉK

1.	TARTALOMJEGYZÉK.....	3
2.	BEVEZETÉS	5
3.	CÉLKITŰZÉSEK	7
	3.1 <i>BOTRYTIS CINEREA</i> GÉNEXPRESSZIÓS ADATAI KAPCSÁN MEGFOGALMAZOTT HIPOTÉZISEK ÉS A KUTATÁS SORÁN KITŰZÖTT CÉLOK.....	7
	3.2 CÉLKITŰZÉSEK, AMELYEK AZ ASZÚSODÁS SORÁN A <i>BOTRYTIS CINEREA</i> MELLETT MEGJELENŐ EGYÉB, MÁS GOMBAFAJOK SZEREPÉRE VONATKOZNAK	9
4.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	11
	4.1 <i>BOTRYTIS CINEREA</i> GENERALISTA NÖVÉNYKÓROKOZÓ	11
	4.2 AZ ASZÚSODÁS	14
	4.3 TOKAJ ÉS MÁS BOTRITISZES BORT TERMELŐ BORRÉGIÓK.....	16
	4.4 DNS-VONALKÓD ELEMZÉS ÉS METATRASZKRIPTOM ELEMZÉS	17
	4.5 A <i>BOTRYTIS CINEREA</i> MELLETT ELŐFORDULÓ TÖBBI MIKRÓBA	21
	4.6 A <i>BOTRYTIS CINEREA</i> HATÁSA A BOROK AROMAANYAG-ÖSSZETÉTELÉRE	22
5.	ANYAG ÉS MÓDSZER	24
	5.1 A MINTAVÉTELI HELY BEMUTATÁSA ÉS A MINTAGYŰJTÉS MENETE	24
	5.1.1 <i>A szőlőterület elhelyezkedése</i>	24
	5.1.2 <i>A mintavételi terület:</i>	25
	5.2 SZŐLŐBOGYÓ TEXTÚRA MÉRÉSE	27
	5.3 SZŐLŐBOGYÓ TELJES DNS KIVONÁS	28
	5.4 TELJES RNS KIVONÁS METATRANSZKRIPTOMIKAI SZEKVENÁLÁSHOZ	28
	5.5 DNS AMPLIKON SZEKVENÁLÁS	29
	5.6 RNS METATRANSZKRIPTOMIKAI SZEKVENÁLÁS.....	29
	5.7 DNS AMPLIKON SZEKVENCIA ADATOK FELDOLGOZÁSA.....	30
	5.8 METARNS SZEKVENCIA ADATOK FELDOLGOZÁSA	30
	5.9 ALAPVETŐ STATISZTIKAI MÓDSZEREK	31
	5.10 DNS ADATOK ELEMZÉSE	31
	5.11 RNS ADATOK ELEMZÉSE.....	32
	5.12 HÁLÓZATELEMZÉSI MÓDSZER A METATRANSZKRIPTOMIKAI ADATOK ELEMZÉSÉHEZ	33
6.	EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE	35
	6.1 A ASZÚS ÉS SZÜRKEROTHADT BOGYÓK GOMBAKÖZÖSSÉGÉNEK ÖSSZETÉTELE	35
	EBBEN A FEJEZETBEN AZ ASZÚS ÉS SZÜRKEROTHADT BOGYÓKON DNS AMPLIKON SZEKVENÁLÁSSAL MEGHATÁROZOTT GOMBAKÖZÖSSégeket JELLEMEZZÜK, MELY EREDMÉNYEKET A TOVÁBBIKABAN ARRÁ HASZNÁLJUK, HOGY KIVÁLASZTHASSUK AZOKAT A LEGABUNDÁNSABB FONALASGOMBÁKAT ÉS ÉLESZTŐGOMBÁKAT AMELYEK ESETÉBEN TRANSZKRIPTOMIKAI ELEMZÉST VÉGZÜNK.	35
	6.2 A <i>BOTRYTIS CINEREA</i> GÉNEXPRESSZIÓS PROFILJÁNAK TULAJDONSÁGAI AZ ASZÚSODÁS SORÁN	37
	A KÖVETKEZŐ FEJEZETEKBE RÁTÉRÜNK A KIVONT ÉS SZEKVENÁLT TELJES RNS ADATOKBÓL KAPOTT EREDMÉNYEK TÁRGYALÁSÁRA. ELSŐ KÖRBE AZ ASZÚSODÁS FOLYAMATÁT, TEHÁT AZ I-IV FÁZISOKAT VIZSGÁLJUK, AZON BELÜL IS A <i>BOTRYTIS CINEREA</i> REFERENCIAGENOMJÁHOZ ANNOTÁLT GÉNEKET.....	37
	6.2.1 <i>Súlyozott gén-koexpressziós hálózat analízis (WGCNA)</i>	38
	<i>Az alfejezetben az aszúsodás során expresszált Botrytis cinerea gének alkotta koexpressziós hálózat tulajdonságait ismertetjük, valamint összevetjük azokat a bogyókon mért textúra paraméterekkel.</i>	38
	6.2.2 <i>Differenciált génexpressziós elemzés</i>	41
	<i>A fejezetben az I-IV. aszúsodási fázisú mintákból meghatározott Botrytis cinerea gének differenciális expressziós tulajdonságait elemezzük, majd a következő fejezetben meghatározzuk a differenciálisan expresszált gének funkcióit.</i>	41
	6.2.3 <i>Gén-ontológia és a metabolikus útvonalak feldúsulása</i>	42
	6.3 <i>BOTRYTIS CINEREA</i> GÉNEXPRESSZIÓ KÜLÖNBSEGEI NEMES- ÉS SZÜRKEROTHADÁS ESETÉBEN.....	45
	A KORÁBBIKABAN SZEMBEN A 6.3 FEJEZETBEN AZ ASZÚSODÁS FOLYAMATÁNAK VIZSGÁLATÁRÓL RÁTÉRÜNK A NEMES ÉS SZÜRKEROTHADÁS KÖZÖTTI KÜLÖNBSEGEK VIZSGÁLATÁRA. EBBEN A FEJEZETBEN IS KIZÁRÓLAG A <i>BOTRYTIS CINEREA</i> GÉNEKET VIZSGÁLJUK. AZ ELŐZŐEKHEZ HASONLÓAN ELŐSZÖR MENNYISÉGI ELEMZÉSEKET VÉGZÜNK (ANOVA ÉS	

NMDS) MAJD RÁTÉRÜNK A DIFFERENCIÁLIS EXPRESSZIÓS, GÉN-ONTOLÓGIAI ÉS TOVÁBBI FUNKCIONÁLIS ELEMZÉSEKRE.	45
6.3.1. Differenciális génexpresszió	46
6.3.2. Génontológia és útvonal feldúsulás elemzés	47
6.4 A SZÜRKE- ÉS NEMESROTHADÁS SORÁN SZEREPET JÁTSZÓ EGYÉB GOMBÁK	51
A 6.4 FEJEZETBEN A KORÁBBAN KIVÁLASZTOTT TOVÁBBI FONALASGOMBÁK ÉS ÉLESZTŐGOMBÁK SZEREPÉT VIZSGÁLJUK. A FEJEZET ELSŐ RÉSZÉBEN (6.4.1 ÉS 6.4.2) A NEMES ÉS A SZÜRKEROTHADÁSOS MINTÁK KÖZÖTTI KÜLÖNBBSÉGEKET ELEMMEZZÜK ELŐSZÖR MENNYISÉGI SZEMPONTBÓL (ANOVA, NMDS), MAJD FUNKCIONÁLIS SZEMPONTBÓL IS (DIFFERENCIÁLIS GÉNEXPRESSZIÓ, ÚTVONAL FELDÚSULÁS, GOMBA-NÖVÉNY KAPCSOLATOK).	51
6.4.1 Differenciális génexpresszió a rothadási típusok esetén	54
6.4.2 Génontológia, útvonalak gazdagodása és virulencia BLAST	54
6.5 EGYÉB GOMBÁK GÉNEXPRESSZIÓJA AZ ASZÚSODÁS SORÁN, HATÁSUK A BORAROMÁRA	56
EBBEN A FEJEZETBEN AZ ASZÚSODÁS FOLYAMATA SORÁN, AZAZ AZ I-IV FÁZISÚ MINTÁKBAN AZONOSÍTOTT GÉNEKET VIZSGÁLTUK, MÉGHOZZÁ AZOKAT, AMELYEKET A KIVÁLASZTOTT 4 GOMBANEMZETSÉG (<i>ALTERNARIA</i> , <i>AUREOBASIDIUM</i> , <i>EPICOCCUM</i> , <i>RHODOTORULA</i>) EGY-EGY FAJÁNAK REFERENCIAGENOMJÁHOZ ANNOTÁLTUNK. A FEJEZET MÁSODIK SZAKASZÁBAN (6.5.2) A FUNKCIONÁLIS ELEMZÉSEK ESETÉN KIEMELJÜK AZOKAT A FELDÚSULT ÚTVONALAKAT AMELYEK HATÁSSAL LEHETNEK AZ AASZÚBOGYÓKBÓL KÉSZÜLT BOROK AROMAANYAG ÖSSZETÉTELÉRE.	56
6.5.1. WGCNA elemzés	59
6.5.2. Differenciális génexpressziós és útvonal feldúsulás elemzések	60
7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK	62
7.1 A <i>BOTRYTIS CINEREA</i> GÉNEXPRESSZIÓJA AZ ASZÚSODÁS SORÁN	62
7.1.1. A <i>Botrytis</i> funkcionális génjeinek expressziós dinamikája a nemesrothadás során	62
7.1.2 A bogyóhéj lebontásában részt vevő <i>Botrytis</i> funkcionális gének a nemesrothadás során	63
7.1.3 A <i>Botrytis</i> génfunkciói a nemesrothadás egyéb biokémiai folyamataiban	63
7.1.4. Másodlagos anyagcseretermékekhez kapcsolódó funkcionális gének	64
7.2 A <i>BOTRYTIS CINEREA</i> ÉS A LEGJELENTŐSEBB VIZSGÁLT GOMBANEMZETSÉGEK GÉNEXPRESSZIÓJÁBAN MEGFIGYELT KÜLÖNBBSÉGEK SZÜRKE- ÉS NEMESROTHADÁS ESETÉBEN	65
A 7.2 FEJEZETBEN AZ ASZÚSODÁS ÉS A SZÜRKEROTHADÁS KÖZÖTTI KÜLÖNBBSÉGEK VIZSGÁLATA SORÁN KAPOTT EREDMÉNYEKET ÉRTELMEZZÜK. A 7.2.1 ÉS 7.2.2 ALFEJEZETEKBE A <i>BOTRYTIS CINEREA</i> ÁLTAL EXPRESSZÁLT GÉNEKRE FÓKUSZÁLUNK, MÍG A 7.2.3 ALFEJEZETBEN RÁTÉRÜNK A KIVÁLASZOTT TOVÁBBI GOMBÁK ÁLTAL EXPRESSZÁLT GÉNEK FUNKCIONÁLIS ELEMZÉSÉRE.	65
7.2.1 <i>Botrytis cinerea</i> transzkript gyakoriság és abundancia	66
7.2.2. <i>Botrytis cinerea</i> nemesrothadás és szürkerothadás során expresszált génjeinek funkcionális elemzése	66
7.2.3. Más vizsgált gombanemzetségek potenciális szerepe	69
7.2.4. A vizsgált gombafajok génexpressziós profiljai és a nemesrothadás és szürke-rothadás során	70
7.2.5. A génexpressziós profilok és a mikroba-mikroba vagy mikroba-növény kölcsönhatások közötti kapcsolatok a nemesrothadás és a szürkerothadás során	73
7.3 AZ EGYÉB VIZSGÁLT GOMBAFAJOK POTENCIÁLIS HATÁSA AZ ASZÚBOROK AROMÁJÁRA	75
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	79
9. ÖSSZEFOGLALÁS	81
10. SUMMARY	84
11. MELLÉKLETEK	87
M1. IRODALOMJEGYZÉK	87
M2. AZ RNS KIVONATOLÁSI PROTOKOLL RÉSZLETES LEÍRÁSA	103
M3. AZ ASZÚSODÁS NÉGY FÁZISA SORÁN AZONOSÍTOTT FELDÚSULT <i>BOTRYTIS CINEREA</i> ANYAGCSERE ÚTVONALAK TELJES LISTÁJA	105
M4. A BOROK ÉRZÉKSZERVI ÉS MINŐSÉGI PARAMÉTEREIEHöz HOZZÁJÁRULÓ GÉNEK RÉSZLETES LISTÁJA, AMELY VAGY SZIGNIFIKÁNSAN FELDÚSULT ÚTVONALBÓL, VAGY A KOEXPRESSZIÓS ELEMZÉS ESETÉN AZONOSÍTOTT HUB-GÉNBŐL SZÁRMÁZIK	105
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	106

2. BEVEZETÉS

A *Botrytis cinerea* egy jól ismert növénypatogén gomba, több mint ezerkétszáz különböző gazdanövényt képes fertőzni, ezért jelentős gazdasági károkat okozhat a mezőgazdaságban. A szőlő (*Vitis vinifera* L.) esetében kétarcú gombaként is emlegetik, hiszen kórokozóként az egyik legjelentősebb szőlőpatogén, emellett viszont a *Botrytis cinerea*-nak köszönhetően jön létre a nemesrothadás, melynek eredményeként készülhet el például a Tokaji aszúbor, amely a legkorábbi eredetvédett borászati termék a világon. A Tokaji aszúbor egyediségét a szemenként szüretelt aszúszemekből készülő magas minőségű alapanyag adja. Hazánkban aszúszemnek a teljesen töppedt, ugyanakkor húsos textúrájú, lilás színű, a bogyófelszínen nem mutatkozó gombahifákkal átszőtt szőlőszemeket nevezi a szőlészeti-borászati gyakorlat.

A jelenleg érvényben lévő szabályozás alapján a Tokaj-Hegyalja borvidéken hat szőlőfajtából csaknem tíz különböző borászati terméket lehet előállítani, amelyből hét termék részben vagy teljesen aszúsodott alapanyagból készülhet.

Az elsősorban a *B. cinerea* működésének tulajdonított nemesrothadás folyamatát máig egy összetett jelenségnek tartják, hiszen a gomba jelenlétén kívül számos mikrobiológiai, környezeti és szőlészeti-borászati technológiai tényező befolyásolhatja a folyamatot. Több tanulmány foglalkozik a *Botrytis cinerea* populációgenetikájával, a különböző növényvédőszer rezisztenciákkal vagy éppen érzékenységgel, az ellene alkalmazható antagonista biokontroll ágensekkel, és a patogenezis biokémiai és funkcionális részleteivel. Ezen ismeretek alapján egy gyakorlati szempontból jól használható védekezési módszert sikerült kidolgozni, melynek természetesen megvan az adott borvidékre jellemző sajátossága. Hazánkban a Tokajon kívüli borvidékeken egy átlagos évszázadban virágzáskori és érés előtti növényvédőszeres védekezéssel jól lehet védekezni a kórokozó ellen, sőt fitotechnikai eszközökkel is segíthetjük a növényvédőszeres eredményességét. Tokajban alapvetően az aszú célra termesztett szőlők esetében a késői védekezés elmarad, így segítve a korai ám szórványos bogyófertőződést, amely a későbbi egyöntetű nemesrothadás forrása lehet. Léteznek olyan borvidékek azonban, mint például Champagne Franciaországban, ahol a *Botrytis* legcsekélyebb mértékű megjelenése is nagyban rontja az ott készült termék, a pezsgő, érzékszervi tulajdonságait, ezért a gazdák sokszor gyakorlatilag a szürkepenész megjelenéséhez igazítják a szüret időpontját.

Az a tény, hogy a *Botrytis cinerea* megjelenése a világ különböző borvidégein ennyire változatos megítéléssel találkozunk arra sarkallja a kutatókat, hogy minél részletesebben tanulmányozzák a gomba fertőzési folyamatát és a környezeti tényezőkkel való kapcsolatát. A jelenlegi Európai Unió agrárpolitikai irányelvek szerint a növényvédőszer felhasználást drasztikusan csökkenteni kell és helyettük alternatív, biológiai és agrár technológiai műveletekkel kell komplex védekezési gyakorlatot bevezetnünk. A növényvédőszer mennyiségi csökkentése mellett az ökológiai szemléletű és biotermelés területének növelése is kitűzött uniós cél.

Az elmúlt évszázadban a számítási kapacitások nagymértékű növekedése és az újgenerációs molekuláris biológiai módszerek költségeinek csökkenése azt eredményezte, hogy számos területen úgynevezett multiomikai módszerekkel kezdték vizsgálni a kutatók a környezeti jelenségeket. Ez a gyűjtőnév a genomika, transzkriptomika, proteomika és metabolomika módszereit foglalja magában, ám manapság olyan új területek is kifejlődtek, mint a lipidomika, az epigenomika vagy a foodomika. Ezek a módszerek külön-külön is hatalmas adatmennyiségeket generálnak, amelyek különböző szinten történő elemzésével számos új eredményt

ismerhetünk meg. Egy részük önállóan nem ad teljes képet az adott jelenség leírásához, ám kombinációjuk alkalmas arra, hogy gén, fehérje vagy metabolit szinten értelmezzünk egy komplex folyamatot.

Ezek a felmerülő gyakorlati igények és technológiai lehetőségek adták meg a lehetőségét annak, hogy transzkriptomikai módszerekkel vizsgáljuk az aszúsodás folyamatát. Munkánk során számos hipotézist állítottunk föl, melyek az igen egyszerű kérdésektől, úgy, mint a funkcionális *Botrytis* gének mennyiségi különbségei a különböző rothadási típusok esetében, a komplex, további vizsgálatok elvégzését igénylő kérdésekig (nem-*Botrytis* gombák szerepe az aszúborok aromájának kialakulásában) terjedtek. A felállított hipotéziseink jelentős része igazolódott, míg néhány esetben eredményeink megcáfolták azokat. Az értekezés négy kérdéskört taglal amelyek mindegyike egy-egy referált folyóiratban közlésre került, ezek a következők: i) A *Botrytis cinerea* expressziós profilja és metabolizmusa a szőlő nemes- és szürkerothadása során (Otto, et al., 2022), ii) A *Botrytis cinerea* funkcionális szerepének metatranszkriptomikai elemzése a szőlő nemesrothadása során bekövetkező biokémiai és texturális változásokban (Hegyi, et al., 2022), iii) A szőlőbogyók metatranszkriptomikai elemzése a fonalas és élesztőgombák funkcionális génjeinek kifejeződésében a nemesrothadás és a szürkerothadás során (Otto, et al., 2023) és iv) Az aszúbogyókból készült borok sajátos aromájának eredete: különböző gombák hogyan járulnak hozzá a botritizált szőlőbogyók aromaprofiljának kialakulásához (Hegyi, et al., 2023).

Jelen munka során felvetett kérdések és a megállapított tézisek a tématerület ismeretanyagát új, gyakorlati jelentőségű eredményekkel egészítik ki, valamint kutatócsoportunk és a tudományos közösség tagjai számára új kutatások alapjául is szolgálhatnak.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az az egyediség amely, a *Botrytis cinerea* és a borszőlő (*Vitis vinifera* L.) kapcsolatát jellemzi, miszerint világszerte az egyik legnagyobb termésvesztést okozó patogén, ám ezzel szemben, bizonyos speciális környezeti feltételek mellett kiemelkedő minőségű, magas hozzáadott értékkel bíró borászati alapanyagot képes létrehozni, lehetőséget ad a növény-gomba kapcsolatrendszer komplexebb vizsgálatára így több részletre kiterjedő képet kaphatunk a fertőzési folyamat mikrobiológiai, fiziológiai, fizikai és kémiai lépéseiről. Munkánk során több egyszerű hipotézist állítottunk föl annak érdekében, hogy ezek igazolása vagy cáfolata lépésről lépésre adjon információt a szürkerothadás és az aszúsodás elemeiről, így megérhetővé válnak nem csak a mikrobiológiai és növényfiziológiai összefüggések, hanem az azokat meghatározó külső körülmények is. Ezek a külső körülmények legtöbb esetben valamilyen mikro- vagy mezoklimatikus tényezők együttes hatását jelentik, ám emellett nagy jelentőséggel bírnak azok a tényezők is, amelyeket lehetőségünk van befolyásolni, úgy, mint a szőlőfajta szerepe, a szőlészeti munkák, amelyek befolyásolják a mikroklimatikus elemeket, a növényvédelem során alkalmazott fungicidek és termésmenvelők, valamint a szüret ideje és módja. Ez olyan sok befolyásoló tényező, amelyet egyszerre vizsgálni nagy kihívást jelent ezért munkánk során ezek egy részét, amelyek úgymond leválaszthatók, azaz egyedileg befolyásolhatók igyekeztünk előtérbe helyezni. A kísérletek beállítható paraméterei mellett kihasználtuk a vizsgált évjáratok adta lehetőségeket, így a meteorológiai viszonyok időbeli változását is figyelembe vettük.

A megfogalmazott hipotézisek és kitűzött vizsgálati célok alapvető, könnyen mérhető, már korábban általunk vagy más kutatók által megvizsgált és bizonyított ismeretekre alapulva egy általánosabb nézőpontból indulva az egyre inkább részletekbe merülő kérdések felé veszi sorra azokat a megfogalmazott kérdéseket, amelyek elősegíthetik a *Botrytis cinerea* szőlőnövényre gyakorolt pozitív vagy negatív hatásának jobb megértését.

3.1 *Botrytis cinerea* génexpressziós adatai kapcsán megfogalmazott hipotézisek és a kutatás során kitűzött célok

- a) Az aszúsodási folyamat során olyan patogén funkciók, mint a gazdaszövet átalakítása gomba biomasszává vagy a gazdanövény védelmi válaszainak leküzdése válnak jelentőssé, amelyek a külső fizikai és belső kémiai körülményektől függően szerteágazó másodlagos metabolitok előállítását eredményező folyamatok formájában valósulnak meg. A későbbi fertőzési szakaszban szerepet játszó gének (Nakajima & Akutsu, 2014) sokkal nagyobb számban vannak jelen a *Botrytis* feltérképezett genomjában (Amselem, et al., 2011), amely alapján megfogalmazhatjuk első hipotézisünket, miszerint: **A *Botrytis cinerea* funkcionális génjeinek expressziós szintje magasabb a nemesrothadt szőlőbogyókban, mint az egészséges (valójában egészségesnek látszó) bogyókban.**
- b) Az aszúbogyók esetében tapasztalható dehidratációhoz hozzájárul a növény (Viannini & Chilosi, 2013) természetes éves vegetációs ciklusának végére jellemző cukorfelhalmozódás a vesszőkben és a gyümölcsökben. Ez a fizikokémiai környezetben bekövetkező változás hat a gombára is, feltételezésünk szerint megváltoztatja annak funkcionális működését, amely egyben azt is jelenti, hogy feltételezésünk szerint **az aszúsodás fázisának előrehaladtával megváltozik a *Botrytis cinerea* által expresszált gének funkcionális összetétele.**

- c) A *Botrytis cinerea* virulenciafaktorai közül, a kezdeti szakaszban kiemelt jelentőségűek a szőlőbogyó héjának és a sejtfalak lebontásáért felelős enzimek. Ezek a pektolitikus és cellulolitikus enzimek felelősek azért, hogy a gomba bejuthasson a bogyón belüli közegbe ezáltal hozzáférve a szükséges tápanyagokhoz és cukrokhoz, ami a gomba proliferációját tovább segíti (Vefhoeff & Warren, 1972). Ahogy korábbi tanulmányunkban (Hegyi-Kaló, et al., 2020) közzétettük az aszúsodás I. és II. fázisa között egy jelentős mértékű bogyótextúra és bogyóhéj textúra változás következik be, amely akár mérhető indikátora is lehet a szőlőbogyó aszúsodás megindulásának. Ebből arra következtethetünk, hogy **a növényi sejtfal lebontásáért felelős enzimeket kódoló gének az aszúsodás kezdeti fázisaiban feldúsulnak**, felszabályozottak a többi fázisban expresszált mértékhez képest.
- d) A szőlőtermesztők által szerzett gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy jelentősebb mértékben aszúsodott szőlőbogyó 2-3 hét alatt képződik a megfelelő időjárási körülmények esetén (Viannini & Chilosi, 2013). **Azt feltételezzük, hogy a mintavétel időpontja hatással van a *Botrytis* által expresszált gének funkcionális összetételére**, így nem csak alapanalitikai, de akár a boraromák prekursorait is meghatározó különbség is kialakulhat a korábban és később fejlődött aszúszemek között megerősítve a gyakorlati tapasztalatokat.
- e) Fontos tény az, hogy a szürkerothadt bogyók minden mintagyűjtési időpontban megtalálhatóak voltak kisebb-nagyobb arányban csakúgy, mint az egészséges és a nemesrothadt bogyók. Ez alapján azt fogalmazzuk meg, hogy **a bogyók rothadásának típusa a minták között expresszált gének összetételében mutatkozó különbségek nagyobb részét magyarázza**, és a mintagyűjtés időpontja kisebb hatással van arra.
- f) Feltételezhetjük, hogy a nemesrothadás és a szürkerothadás folyamata mikrobiológiai és növényfiziológiai szempontból különböző módon zajlik, különböző növényi és gombagének a különböző fehérjéken keresztül, más-más anyagcseretermékek szintézisével fejtik ki azokat a hatásokat. Az egészséges és nemesrothadt bogyók között tapasztalható génexpressziós különbségek mellett, **a nemesrothadt és szürkerothadással érintett bogyók között is különbséget feltételezünk az expresszált gének számát és eloszlását illetően**.
- g) A szőlőben megtalálható érzékszervi tulajdonságokhoz is hozzájáruló aromaanyagok dehidratáció okozta koncentráltága mellett, a nemesrothadt szőlőből készült borokra egy olyan egyedi íz is jellemző, amelyet a borászatok „botritiszes” íznek és illatnak neveznek (Blanco-Ulate, et al., 2015). Ugyanakkor az is jellemző, hogy a rossz minőségben botritizálódott, azaz a szürkerothadt szőlőszemek, ha bekerülnek a borászati alapanyagba azok negatív módon befolyásolják a borok érzékszervi tulajdonságait, olyan aromavegyületekkel járulnak hozzá a borhoz, amelyek kifejezetten rossz („penészes”) illatot és ízt kölcsönöznek a borhoz (Pinar, et al., 2017). A fentiekből azt a hipotézist feltételezzük, hogy **nemesrothadás esetén a boraromák vagy azok prekursorainak kialakulásához szükséges gének nagyobb mértékben expresszálódnak**, így szürkerothadás esetében nagyobb arányban a **patogenezis folyamatában szerepet játszó gének fejeződnek ki**.
- h) Annak ellenére, hogy a végeredmény szempontjából nagyon különböző a nemesrothadás és a szürkerothadás folyamata, mindkét eset a szőlőbogyó *Botrytis cinerea* fertőzésével indul. Az is megfigyelhető, hogy bizonyos évjáráti körülmények között, amikor kezdetben az aszúsodás megvalósulásához ideális időjárási feltételek adódnak, ám ezek az idő előrehaladtával megváltoznak (tartós nagy mennyiségű csapadék, hideg nappalok) bármely korai aszúsodási fázis (I-III. fázis) szürkerothadássá fejlődhet. **Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a**

szürke és nemesrothadás folyamatában is megtalálhatóak, és szignifikánsan feldúsulva fejeződnek ki a *Botrytis cinerea* virulencia faktoraival kapcsolatos gének.

3.2 Célkitűzések, amelyek az aszúsodás során a *Botrytis cinerea* mellett megjelenő egyéb, más gombafajok szerepére vonatkoznak

- i) A *Botrytis cinerea* mellett a szőlőbogyó mikrobiótáját számos más fonalgomba és élesztőgomba faj alkotja, amelyek szerepe a szőlő-*Botrytis* kölcsönhatásban egy kevésbé széles körben megismert kutatási terület. Az aszúsodás egyik alapfeltétele egy speciális mikro- és mezoklíma, amely nagy hatással van a mikrobiótára. Feltételezhető tehát, hogy az így kialakuló mikrobiális életközösség nagyban meghatározza az aszúsodás folyamatát is. A vizsgálataink egyik célja az volt, hogy **jellemezzük az egészséges, nemesen rothadt és szürkerothadást mutató bogyómintákban jelen lévő legfontosabb fonalgombák és élesztők génexpressziós profilját**, és meghatározzuk, hogyan befolyásolja génexpressziós profiljukat a szüret időpontja arra összpontosítva, hogy ezek milyen szerepet játszanak a fizikai és kémiai változásokban.
- j) Számos olyan tanulmány született, ahol *in vitro* körülmények között tanulmányozzák a *Botrytis* és más gombák kölcsönhatását (Christova & Slavov S. B., 2021) és sok olyan kutatás folyt, amely ugyanezt *in vivo*, a gyakorlati felhasználásra lehetőséget adó módon vizsgálta (Pertot, et al., 2017). Általunk viszont nem ismert olyan tanulmány, amely az aszúsodás folyamata során vizsgálja a *Botrytis cinerea* és egyéb fonalgombák kapcsolatát, így a **kutatásunk egyik fontos célja az volt, hogy tanulmányozzuk az említett élesztőgomba és a fonalgomba fajok közötti kölcsönhatást (pl. antagonizmus, szinergizmus) a szőlőbogyó-rothadás típusai során.**
- k) Az egészséges szőlőbogyók felületén számos fonalgombát azonosítottak, többek között *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans* (Lorenzini, et al., 2018), *Aspergillus niger* (Latorre, et al., 2002), *Botrytis cinerea* (Li, et al., 2021), *Epicoccum nigrum*, *Penicillium expansum* (Lorenzini, et al., 2016), *Plasmopara viticola* (Pithan, et al., 2021), *Rhizopus oryzae* valamint *Erisiphe necator* (Jones & McManus, 2017). Korábbi vizsgálatok megmutatták, hogy a furmint szőlőbogyó nemes- és szürkerothadt állapotában a mikrobiótájának jellemzésére az *A. alternata* és az *E. nigrum* a legmegfelelőbb indikátorfaj. A fonalgombák elsősorban az aszúsodás későbbi szakaszaiban jelentősek, amelyek közül azonban több a növénypatogén, és negatívan befolyásolhatják a borok minőségét az érzékszervi tulajdonságok tekintetében. A nemesrothadásos folyamat előrehaladtával az aszú bogyóin a nem *Botrytis* nemzetségbe tartozó fonalgombák száma csökkenni kezd, mivel a *B. cinerea* kezd dominálni (Hegyi-Kaló, et al., 2017). Az élesztők, mint például a *Saccharomyces* fajok, kisebb előfordulási gyakorisággal jelennek meg az aszúsodott szőlőbogyók felületén, de később természetesen az alkoholos erjedés során fontos szerepet játszanak. A *Saccharomyces* fajok mellett számos más, nem *Saccharomyces* élesztő, például az *Aureobasidium pullulans* és a *Rhodotorula graminis* is jelen van a szüret előtti nemesrothadt szőlőbogyókon. Ezek alapján azt várjuk, hogy **a fonalgombák génexpressziós szintje eltér a szürke- és a nemesrothadás között, méghozzá szürkerothadás esetében lesz magasabb, viszont a vizsgált élesztők által expresszált gének abundanciája nem mutat szignifikáns különbséget a két rothadási típus között.**

- l) A *Botrytis cinerea* természetesen dominálja az aszúsodás és a szürkerothadás folyamatát is. Ez a dominancia mind a szőlőnövény, mind az egyéb jelenlévő mikroorganizmusok funkcióira is nagy hatással vannak. Az idő előrehaladtával (későbbi szüretidőpontok) azt feltételezzük, hogy a *Botrytis cinerea* génexpressziója ugyan mutat különbséget ám az aszúsodás fázisa és a rothadás típusa jobban meghatározza a transzkriptomikai profilt, mint a mintagyűjtés időpontja. Úgy gondoljuk, hogy ez hasonló módon **történik a további gombák esetében is, mégpedig, hogy a rothadás típusa nagyobb hatással van a génexpresszióra mint a mintagyűjtés, azaz a szüret időpontja.**
- m) Ahogy a *Botrytis* génexpressziójára vonatkozó g) célkitűzésünk feltételezi, a nemesrothadás esetében nagyobb arányban vannak jelen a boraromát valamilyen mértékben meghatározó metabolitok anyagcsere útvonalaiban meghatározó gének, mint szürkerothadás esetében, ezt a feltételezést a többi mikrobára is érvényesnek feltételezzük. Egyik **célunk tehát annak vizsgálata, hogy a legjelentősebb gombák által expresszált azon gének, amelyek boraromát meghatározó összetevő anyagcsereútjában szerepet játszó enzimet kódolnak, nagyobb mértékben vannak-e jelen a nemesrothadás esetében, mint a szürkerothadásában.**
- n) A szürkerothadás esetében egy olyan bogyóállapot alakul ki, amely nem képes a szőlőkocsányon megmaradni, onnan leperreg, a bogyóhús folyóssá válik és lecseppen vagy kiszárad, szemben az aszúbogyóval, ami viszonylag hosszú ideig eltartható és a szőlőnövényen is ellenáll az időjárás viszontagságainak. Ezekből a megfigyelésekből azt feltételezzük, **hogy a nemesrothadás esetében egy olyan mikrobiológiai szempontból stabilnak nevezhető életközösség alakul ki a szőlőbogyóban, amely a fonalasgombák és élesztők között kompetitív dinamikát stabilizálják, és feltételezzük, hogy az ebben szerepet játszó géneket megtaláljuk a nemesrothadt szőlőbogyókban.**
- o) Feltételeztük, hogy a *B. cinerea* mellett más fonalas gombák, mint például az *A. alternata* és az *E. nigrum*, valamint az aszúsodó bogyókhoz gyakran társuló *A. pullulans* és *R. graminis* élesztők is hozzájárulnak az aszúborok aromaprofiljához a botritizálódás során, amit eddig nem igazán vizsgáltak. **A bogyó mikrobiomjának a nemesrothadás során a bor aromájára gyakorolt legjelentősebb hatásainak azonosítása érdekében értékeltük és elemeztük a legfontosabb biokémiai útvonalakat és génfunkciókat, amelyek mindegyike további vizsgálatok révén hozzájárulhat a nemesrothadás folyamatának teljes megértéséhez.**

A kutatásunk célja a megfogalmazott hipotézisek vizsgálata és megerősítése. Ennek érdekében az alábbi kutatási célokat fogalmazzuk meg:

- 1) Az aszúsodás és a szürkerothadás, a két ellentétes kimenetelű folyamat közti transzkriptomikai különbségek meghatározása
- 2) A szőlőbogyó textúra és a *Botrytis cinerea* által expresszált szénhidrátbontó gének közti összefüggések elemzése
- 3) A *Botrytis* mellett további mikrobák szerepének leírása az aszúsodás és a szürkerothadás során
- 4) Ezen mikrobák hatásának meghatározása az aszúborok aromaanyag-összetételére

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1 *Botrytis cinerea* generalista növénykórokozó

A *Botrytis cinerea* egy világszerte elterjedt nekrotrof életciklusú növénykórokozó, ami jellemzően a szürkerothadás gombás megbetegedést okozza a növényekben. Sokáig a gomba által kiválasztott szekréciós sejtfallbontó enzimeknek és szelektív toxinoknak tulajdonították a fertőzési útvonal kialakulását, azonban mára a *B. cinerea* patogenitásának gazdag eszköztárát írták le, ami sokoldalú fertőzési útvonalakat tárt fel, amelyek egymásra hatva járulnak hozzá a betegség kialakulásához. A gomba ellen teljesen egyik gazdanövény sem mutat rezisztenciát, de a gazdanövény-specifikus immunválasz mintázatok feltérképezése alapján jelentősen csökkenthető a betegség előrehaladása.

Bi és munkatársai áttekintő munkájukban (Bi, et al., 2022) leírták a *Botrytis cinerea* aktuális taxonómiai és kórtani jellemzőit, mely szerint a *Sclerotiniaceae* családon belül elhelyezkedő *Botrytis* nemzetség az egyik legrégebben és legszélesebb körben tanulmányozott gomba taxon. A taxonómiai elemzések szerint jelenleg több, mint 35 *Botrytis* gombafaj ismert, melyek közül a *B. cinerea* a legismertebb és legszélesebb körben vizsgált faj. A *Botrytis* fajok többségétől eltérően a *B. cinerea* generalista kórokozó, a gazdanövények széles skáláját képes megfertőzni, köztük a legjelentősebb mezőgazdasági növénykultúrákat is. Éppen ezért világszerte elterjedt kórokozó, ami leginkább az ökológiai károsítók közé tartozik, mind betakarítás előtt és betakarítás után óriási termésvesztést képes okozni.

A korábban említett áttekintő munka kiterjed arra is, miszerint a *Botrytis cinerea* fertőzési útvonalának lépéseit számos külső fizikai, kémiai és biológiai tényező befolyásolja. Jelenleg ismert, hogy legnagyobb arányban a *B. cinerea* fertőzést a növényi szövetek felszínén megtapadó ovális alakú gomba konídiumok indítják el. A megtapadó konídiumok csírázásnak indulnak, majd a megnyúlt gomba hifák differenciálódnak és appresszóriumokon, illetve fertőzési pontokon keresztül hatolnak be a gazdanövénybe, de a növényi gázcserenyílásokon keresztül is bejuthatnak a növényi szövetekbe. A kezdeti bejutást követően két további fázisa ismert a fertőzésnek, egy korai és egy késői szakasz. A gomba a korai szakaszban inkább a lokalizációra, megtelepedésre összpontosít, majd a nektrózist követően a gomba biomassza terjedése, illetve az elváltozások szétterjedése a későbbi fázisra tehető.

A Bi és munkatársai leírták (Bi, et al., 2022), hogy a korai fertőzési fázisban a *B. cinerea* számos olyan növényi sejtfallbontó enzim, illetve sejtpusztulást elősegítő fehérje termelését kezdi meg, ami a növényi gazdasejtek gyors elpusztítását okozza ezzel indukálva a korai fertőzési fázis kialakulását. Ezzel párhuzamosan a *B. cinerea* gombasejtek pusztulása is megkezdődik, melyet a növényi antimikrobiális anyagok indukálnak. Ebben a szakaszban a gomba túlélését az úgynevezett „antiapoptotikus” anyagszere útvonalak bekapcsolása segíti, ezzel megőrizve a már kialakult gomba biomasszát. A fertőzés tovább haladását a növényi és gombasejtek pusztulása közötti egyensúly határozza meg, hogy a gomba növekedése, terjedése „megreked-e” vagy képes tovább fertőzni a gazdanövényt.

Függetlenül attól, hogy a gomba életben marad és kialakul a biotrof korai fertőzési fázis vagy sejthalál következtében elpusztul, egy olyan mértékű sejtfelhalmozódás történik, amely lehetővé teszi az újabb fertőzési pont kialakulását.

Összefoglalva elmondható, hogy a fertőzés következtében a növényen kialakult elváltozás terjedését elősegítik a növényi szabályozott sejthalált indukáló molekulák, illetve a sejthalált indukáló fehérjék és toxinok is elősegítik a nektrózist a fertőzés korai szakaszában. Azonban a nektrózis terjedésében, további sejthalál kialakulásában nem ismert, hogy mely molekulák hogyan vesznek részt. Ez alól kivétel az oxálsav, amiről

eddig kiderült, hogy szabályozott sejthalált indukálhat és részt vehet a sejthalál kiterjesztésében is, tehát a fertőzés terjedését elősegíthetik a szabályozott sejthalált indukáló vegyületek, míg az adott fertőzési pont kialakulásáért a nekrotikus sejthalál a felelős.

A fertőzés következő szakaszában, miután a gomba áttörte a növényi sejtfal külső rétegét, a gombának meg kell „küzdenie” a növény által termelt, a fertőzés hatására indukált antimikrobiális vegyületekkel, melyek jelentősen befolyásolhatják a betegség kialakulását és súlyosságát. E folyamatban a *B. cinerea* a antifungális növényi metabolitok tolerálásával olyan mechanizmust fejlesztett ki, melynek segítségével folytathatja a gazdanövény fertőzését. A *B. cinerea* fertőzést elősegítő eszköztárába tartoznak a különböző virulencia faktorok, fitotoxikus metabolitok és sejtfalbontó enzimek.

A legújabb molekuláris megközelítések szerint, például a jelátviteli útvonalak összetételének jellemzései azt mutatják (Escobar-Nino, et al., 2019), hogy ez a gomba más növénykórokozókhoz közös konzervált virulenciafaktorokat használ, ugyanakkor említésre méltó néhány *Botrytis*-specifikus jellemző is. Az első törzs-specifikus virulenciafaktorok felfedezése a populációs adatokkal együtt még a törzsek lehetséges gazdaszervezeti adaptációjára is utalt.

Az egyik kérdés, hogy a *B. cinerea* rendelkezik-e specifikus virulenciafaktorokkal más, szűkebb gazdaszervezeti körrel rendelkező gombakórokozókhoz képest. Egy másik megválaszolandó kérdés, hogy a *B. cinerea* valamennyi törzse közös fegyverarszállal rendelkezik-e, vagy vannak-e törzs-specifikus adaptációk. A legújabb adatok megerősítik, hogy a szürkepenész kórokozója konzervált virulenciafaktorokat oszt meg más növényi kórokozókhoz, de egyedi jellemzőket és a törzsek közötti nagyfokú variabilitást is feltártak, ami összefügg a nekrotrof és polifág viselkedésével (Fillinger, et al., 2016).

A közelmúltban végzett filogenetikai vizsgálatok a *B. cinerea* (teleomorf *Botryotinia fuckeliana*) faj jobb megismerését eredményezték. A *Botrytis Persoon* (P. Micheli ex. Pers., Index Fungorum) nemzetség (*Ascomycota*, *Leotiomyces*, *Sclerotiniaceae*) két kládot foglal magában (Staats, et al., 2005), amelyek közül az egyikbe négy olyan faj tartozik, melyek csak a kétszikű növényeket támadják meg, a másikba pedig a fennmaradó 18 faj, amelyek főként az egyszikű növényeket támadják meg. A szürkepenész kórokozójától eltekintve a legtöbb *Botrytis* fajnak nagyon szűk a gazdanövény-spektruma. Ennek okait az, hogy a *cinerea* faj kitartóképletei nagyon ellnállóak a környezeti hatásokkal szemben, a túlélésüknek nem feltétele speciális növényi részben való elhelyezkedés. A közelmúltban a többlókuszos molekuláris genetikai vizsgálatok kimutatták, hogy a *B. cinerea* morfológiai faj két genetikailag elkülönült csoportra oszlik, amelyeket I. és II. csoportnak neveztek el, és amelyeket ezért filogenetikai fajoknak javasoltak. Az I. csoport (más néven "*Botrytis pseudocinerea*") és a II. csoport (*B. cinerea sensu stricto*) törzsei ökológiájukban és a fungicidekkel szembeni rezisztenciáikban is eltérnek (Fournier, et al., 2003) (Fournier, et al., 2005), ráadásul nem képesek egymással kereszteződni (Choquer, et al., 2007).

A *B. cinerea* szőlőbogyón kialakuló fertőzési folyamatát általában a következő szakaszokra bontják: behatolás a gazdaszervezet felületére, a gazdaszövet elpusztítása/elsődleges lézió kialakulása, a lézió kiterjedése/szöveti maceráció és sporuláció (van Kan, 2006). A gomba protoplaszt transzformációján és a céllokuszon történő homológ rekombináción alapuló géninaktiválásai (Siewers, et al., 2004) lehetővé tették a betegségi ciklus valamennyi szakaszában részt vevő gének azonosítását (például az apresszórium penetrációért felelős Bcpls1 gén, a gomba sejtfal integritásért felelős Bcchs1 gén vagy a toxin bioszintéziséért felelős Bcbot1 gén).

A *B. cinerea* konídiumait tekintik a fő termelt és terjesztett inokulumnak (Viret, et al., 2004). Csírázásuk és a növényi felületeken való megtapadásuk döntő lépéseket jelent a gazdaszervezetbe való behatolást és kolonizációt megelőzően, amelyek során a gazdaszervezet felszíni jellemzőinek - beleértve a hidrofobicitást és a cukorforrásokat - érzékelése és felismerése alapvető fontosságúnak tűnik (Doehlmann, et al., 2006 és 2005). A csírák extracelluláris mátrixot választanak ki, amely a hidrofób kölcsönhatások révén a rögzülést szolgálja, de számos extracelluláris enzimet is felszabadítanak, amelyek a növény fizikai akadályainak áttörésével elősegíthetik a behatolásukat (Doss, 1999). A *Botrytis cinerea* feltehetően elsősorban lebontó enzimek termelésével és oxidatív robbanás előidézésével hatol be a gazdaszervezetbe, nem pedig fizikai nyomás alkalmazásával. A *B. cinerea*-ban gyakran találtak duzzadt csúcsokként ábrázolt appresszoriumszerű struktúrákat (Rolke, et al., 2004).

Ez a struktúra egy olyan konzervált membránfehérje képlet, a tetraspanin, amely szükséges az appressorium által közvetített behatoláshoz a gazdanövényekben (Gourgues, et al., 2004).

Nekrotróf és polifág kórokozóként a *B. cinerea* nem specifikus fitotoxinokat választ ki, amelyek a növények széles spektrumának sejtjeit pusztítják el. A fermentációs tápközegből izolált számos metabolit közül (Collado, et al., 2007) a legismertebb a szeszkviterpén botrydial, ami a növényi fertőzés során termelődik, (Deighton, et al., 2001) klorózt és sejtösszeomlást idéz elő, ami a jelek szerint megkönnyíti mind a penetrációt, mind a kolonizációt (Colmenares, et al., 2002). A botrydial bioszintetikus útvonal génjei egy fizikai klaszterbe szerveződnek, koreguláltak és felülreprezentáltak a növényben, amit makro-array vizsgálatok is kimutattak (Viaud, et al., 2003), (Gioti, et al., 2006). Az egyik ilyen gén (CND5/Bcbot1) inaktiválása három különböző törzsben kimutatta, hogy a botrydial törzsfüggő virulencia faktor (Siewers, et al., 2005). A botrydial és származékai mellett a *B. cinerea* agresszív izolátumai a botcinsavból származó toxinok egy második osztályát is termelik (Rieno, et al., 2004), (Tani, et al., 2006) ami magyarázhatja a Bcbot1 inaktiválásának törzsfüggő hatását. E toxinok mellett a *B. cinerea* reaktív oxigénfajokat (ROS) is termel a fertőzés során (Schouten, et al., 2002) (Rolke, et al., 2004), mint például a hidrogén peroxid (H_2O_2) vagy más szuperoxidok. A H_2O_2 felhalmozódik a fertőzés korai szakaszában a csírázó spórákban. Továbbá a SOD géninaktiválása jelezheti, hogy ez a H_2O_2 -t termelő enzim virulenciafaktor, amely hozzájárul a fitotoxikus H_2O_2 -szintek felhalmozódásához.

A *B. cinerea* fertőzésére reagálva növényi sejtpusztulás a növényi gazdaszervezet által termelt oxidatív robbanás révén is bekövetkezik (Govrin & Levine, 2000). Eredetileg ismert volt, hogy a növény gyors ROS-termelése szükséges a védekező gének kifejeződéséhez és a hiperszenzitív reakciókhoz (HR), a programozott sejthalál (PCD) egyik típusához, amelyről úgy gondolták, hogy korlátozza a kórokozó vízhez és tápanyagokhoz való hozzáférését. Mindazonáltal egyes gazdatest-patogén kölcsönhatásokban a PCD-nek egyértelmű szerepe van a patogén növekedésének elősegítésében (Greenberg & Yao, 2004). Egyre több bizonyíték van arra is, hogy a gombák PCD-t elősegítő molekulákat hoznak létre virulenciafaktorokként. Például a *B. cinerea* endo-poligalakturonáz 1 (BcPG1), amelyet először virulenciafaktornak ismertek (Have, et al., 1998), védelmi válaszokat vált ki a szőlőben, beleértve a ROS termelését is (Aziz, et al., 2003), (Kunz, et al., 2006). A közelmúltban kimutatták, hogy egy nem patogén, a BcPG1-et túltermelő mutáns hiperszenzitív-szerű reakciót vált ki a szőlő és a bab levelein, amely a szöveti kolonizáció megszűnésével korrelál. Független vizsgálatok az alacsony virulenciájú törzseket is összefüggésbe hozták a bab levéllemezek erős hiperszenzitív reakcióival (Unger, et al., 2005). A PCD tehát fontos szerepet játszik a *B. cinerea* virulenciájában, de az időzítésétől és erősségétől függően, valamint a gazdaszervezettől függően a PCD a rezisztenciával is korrelálhat.

A *B. cinerea* esetében széles körben vizsgálták a növényi gazdaszervezet kutikula és sejtfal lebontásának képességét (Diaz, et al., 2002) (Kars & van Kan, 2007). Nekrotróf gombaként ez a faj több sejtfalbontó enzimmel (CWDE, cell wall degrading enzyme) rendelkezik, amelyek lehetővé teszik a növényi szövetek kolonizációját és a szénhidrátok felszabadítását. A pektint, a gazdaszervezet fő sejtfal-összetevőjét a gombák pektinázai képesek lebontani. Ezek közül a poligalakturonáz gének (BcPG1-6) a fertőzés stádiumától és a gazdaszervezettől függően differenciáltan expresszálódhatnak, ami a pektolitikus aktivitás speciális funkcióira utalhat (Have & Pauline, 2001). A pektinmetilészterázok feltehetően elősegítik a poligalakturonáz gének hatását azáltal, hogy a pektint pektáttá demetiléznek, és a bcpm1 gén inaktiválása a virulencia erős csökkenését eredményezte több növényi gazdaszervezetben. A nem pektinolitikus sejtfalbontó enzimek, mint a cellulázok vagy hemicellulázok szintén elősegítik a *B. cinerea* fertőzést, amint azt egy endo- β -1,4-xilánáz gén inaktiválása is mutatja, amely csökkent virulenciához vezethet (Brito, et al., 2006).

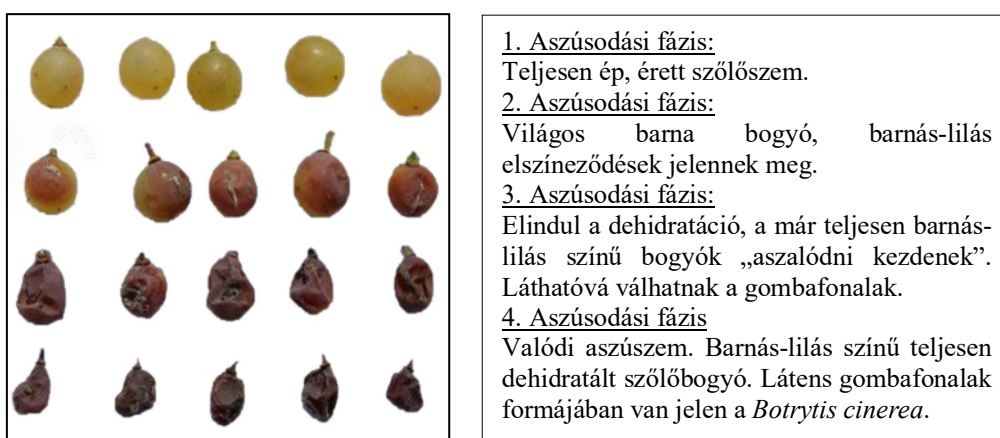
A legújabb tanulmányok rávilágítanak arra, hogy a *B. cinerea* egyes jelátviteli komponenseinek sajátos szerepe van a patogenitásban. Egy génexpressziós vizsgálat kimutatta, hogy a botrydiális génklasztert (beleértve a Bcbot1-et is) a kalcineurin-függő útvonal irányítja (Viaud, et al., 2003). A kalcineurin-foszfatáznak alapvető szerepe van a gombák morfogenezisében és virulenciájában (Fox & Heitman, 2002) valamint kimutatták, hogy részt vesz a *Magnaporthe grisea* és a *B. cinerea* appressorium képződésben (Viaud, et al., 2003) (Viaud, et al., 2003). Az a megfigyelés, hogy a Bcbot1 nevű *Botrytis* gént a BCG1 és a kalcineurin egyaránt szabályozza, egy közös jelátviteli útvonalra utal, amely a fertőzéssel kapcsolatos funkciókat szabályozza, beleértve a másodlagos metabolitok termelését is (Schumacher, 2012).

Az eddig megfigyelt fenotípusos változékonyság és a törzsfüggő virulenciafaktorok arra utalhatnak, hogy a *B. cinerea* populációk törzsfüggő fertőzési stratégiákat alakítottak ki, amelyekben az egyes toxinok vagy CWDE-k fontos szerepet játszanak. További kutatások arra a fontos kérdésre keresik a választ, hogy milyen szerepet játszik a gazdanövény a virulenciafaktorok evolúciójában a *B. cinerea* populációk esetében. A szerzők tudomása szerint ezzel a kutatási kérdéssel még nem foglalkoztak közvetlenül, de már létezik néhány közvetett bizonyíték a gazdanövény szerepére a *B. cinerea* populációk alkalmazkodásában. Először is, a paradicsomból izolált *B. cinerea* törzsek konídiumai gyorsabban tapadtak és csíráztak a paradicsom levelein, mint a szőlőből izolált törzseké (Cotoras & Silva, 2005). Továbbá, a *B. cinerea* II. csoportjának tíz franciaországi, szőlőfajtán és szederfa fajtán mintavételezett populációjának mikroszatellit markerekkel történő genotipizálása (Albertini, et al., 2002) azt mutatta, hogy a génáramlás a két gazdanövényből származó populációk között enyhén, de szignifikánsan csökkent, még szigorú szimpatria esetén is (Fournier, et al., 2005). Ezért a *B. cinerea* populációk enyhén, de hatékonyan alkalmazkodhatnak a különböző gazdanövényeikhez, inkább a gazdanövény-preferencia, mint a valódi gazdaspecializáció szempontjából.

4.2 Az aszúsodás

Megfelelő körülmények között a *B. cinerea* a szőlőbogyó „fertőzés” egy speciális formáját, a nemes rothadást eredményezi. A nemesrothadáshoz vezető fő tényezők: a megfelelő éghajlati és mezoklimatikus viszonyok, a megfelelő szőlőfajta, valamint a szőlő teljes vagy túlérése a *Botrytis* terjedése idején (amikor a szőlőnövény és a szőlőbogyó közötti tápanyagutánpótlás, illetve víztartalom utánpótlás megszűnik). Az egész világon csak néhány olyan földrajzi-kulturális környezet van, ahol mindezek a feltételek rendszeresen egybeesnek. Jelenlegi ismereteink alapján a szürke- és

nemesrothadás közötti különbségek a folyamat körülményeiben rejlenek, a nemesrothadást a gomba metabolizmusának biokémiai folyamatai és a szőlő töppedésének fizikai változásai együttesen eredményezik (Magyar, 2011), (Fournier, et al., 2013) (Blanco-Ulate, et al., 2015). A nemesrothadás során a túlérlett szőlő fürtkocsánya elfásodik, így nincs lehetőség a töppedő bogyóból elpárolgó víz szőlőnövény általi pótlására, ami a bogyó beltartalmának koncentrálódását eredményezi. Az érett szőlőben ekkorra már kialakult a fajtára jellemző cukor- és savtartalom, a „zöld” ízt okozó fenolos anyagok pedig lebomlottak (Magyar, 2011) (Fournier, et al., 2013). A gomba növekedése az epidermisz külső rétegeire korlátozódik, megemészteti a bogyóhéjat, kémiai vegyületeket von ki a bogyóból, és anyagcsere-termékeket juttat a gyümölcsbe. Az áteresztővé váló bogyóhéj segíti a víz elpárolgását napos és szeles időjárás esetén, ami a bogyó töppedéséhez és a must többszörösére való koncentrálódásához vezet. A koncentrálódás miatt jelentős cukorkoncentráció növekedés tapasztalható, amely 600 g/l fölé is emelkedhet (Magyar & Soós, 2016), (Kallitsounakis & Catarino, 2020). Blanco-Ulate és munkatársai a nemesrothadás folyamatának *Semillon* cv. szőlőfajtán tapasztalt fázisai alapján



1. ábra: az aszúsodás 4 fázissal történő leírásának szemléltetése furmint szőlőbogyókkal.

végezték kísérleteiket (Blanco-Ulate, et al., 2015). Carbajal-Ida és munkatársai (Carbajal-Ida, et al., 2016) három stádiumra osztották a botritizálódás folyamatát, az első (0. szint) fázist úgy jellemezték, hogy a szőlőbogyón még nincs látható jele a gomba jelenlétének, csak a kocsány-szőlőbogyó érintkezésénél látható barnás elszíneződés. A második fázisú (1. szint) bogyók már lilás színűek, a gombafonalak láthatók, de nincs jele töppedésnek, a harmadik fázis (2. szint) esetében pedig a lilás színű bogyóknál már elindult a töppedés (Carbajal-Ida, et al., 2016). A szerzők által leírt aszúsodási fázisok hasonlóan megfigyelhetők a tokaji szőlőterületeken is, azonban Tokajban a valódi aszúszemnek nevezett, teljesen töppedt, ugyanakkor megfelelően „húsos”, lilás színű, enyhén gombafonalakkal átszőtt aszúszem, a Tokaji aszúbor készítésének alapanyaga egy negyedik fázis leírását teszi szükségessé, mely az 1. ábrán látható (Hegy-Kaló, et al., 2020).

A nemesrothadás kialakulásához a termőterület talajadottságai, a szőlőnövény gyökérzete és a művelésmód kialakítása is nagymértékben hozzájárulhat. Amikor a bogyók a túlérés stádiumában vannak és a botritiszesedés a cél, minél intenzívebb a csapadék, annál nagyobb a bogyórothadás lehetősége felületen, nem mélyreható gyökérzet esetén. A jó vízelvezetésű, mély talajok és a mély gyökérzet kialakítására képes szőlőalanyok elengedhetetlenek a jó minőségű botritiszes borok előállításához (Pucheu-Planté & Seguin, 1978). Sauternes-i szőlőültetvényekben beállított kísérletek

szerint a keskenyebb sortávolság és az alacsonyabb tőkefej kialakítás előnyösebb a nemesrothadás kialakulásához (Carbonneau & Casteran , 1986).

4.3 Tokaj és más botritiszes bort termelő borrégiók

A nemesen rothadt szőlőből készült borokat világszerte csupán néhány borvidékeken készítik, melyek közül a leghíresebbek a magyarországi Tokaj borvidékről és a franciaországi Sauternes borrégióból származnak. A fő különbség a botritiszes borok és más, nem erősített édes borok, például a késői szüretelésű borok, a jégborok (Eiswein) vagy a szalmaborok között a botritisz által termelt aromavegyületek rendkívüli változatossága és gazdagsága. A mikrobiális aktivitás következtében néhány más komponensben (pl. glicerin, savösszetétel) is jelentős különbségek mutatkoznak. Az e borokra leggyakrabban alkalmazott leírások szerint barack, sárgabarack, körte, birs, mazsola és méz aromák jellemzik őket, amelyekhez jellegzetes "botritiszes" vagy "roti" jegyek társulnak.

Az első ismert természetes édes botritiszes bor, amelyet szándékosan nemes rothasztott szőlőből készítettek, a Tokaji Aszú volt. Magyarországon legalább egy évszázaddal korábban készítették, mint a hasonló borokat a Rajna-völgyben, és valószínűleg két évszázaddal korábban, mint Sauternes-ben (Robinson & Harding, 2015). A Tokaj elnevezés egy magyar városra és egy borvidékre is utal, a régió szőlőültetvényei az elsők között voltak, amelyeket 1773-ban királyi rendelet alapján osztályoztak. A XVIII. századra a tokaji aszú Európa-szerte bekerült a királyok udvarába (Robinson & Harding, 2015). A tokaji borok földrajzát, szőlőtermesztését, borkészítési gyakorlatát, kereskedelmét és tudományos ismereteit e korszakban (Szabó & Török, 1867) dokumentálták, akiknek munkája új kiadásban is megjelent 2001-ben.

Ma Tokaj-Hegyalja 5500 hektárnyi szőlőültetvényt foglal magában, amelynek talajtípusai a túlnyomórészt vörös agyagtól a löszig terjednek, néhány vulkáni törmelékkal, fehér riolit, habkő és perlit keverékével együtt. A Tokaji borvidék mikroklimáját jótékonyan befolyásolja a zempléni dombok védő hatása, valamint a Tisza és a Bodrog folyókból eredő páratartalom. A szőlőfajtákat a törvény néhány fehér fajtára korlátozza. A helyi fajták, a furmint (70%) és hárslevelű (25%) mellett kis százalékban a sárgamuskotály, a zéta (helyi hibrid) és a kövérszőlő is megtalálható. Az éghajlati viszonyok, a termesztett fajták és a késői szüret szinte minden évben kedveznek a nemes rothadás kialakulásának, bár az évjáratok nem egyformán jók. A nemesrothadás kialakulásának elősegítése érdekében a legtöbb szőlőültetvényben nagyon alacsony terméshozamot állítanak be.

A legenda szerint az első nemesrothadásos szőlőből készült német borokat akaratlanul is a Schloss Johannisberg szőlőskertjében termelték 1775-ben. Ez a különleges évjárat jelentette a szándékosan késői szüretelésű botritiszes szőlő kezdetét, és ez adta a botritiszes borok különböző stílusainak kialakulását Németországban. Ez az ősi borászat a Rheingau szívében, a Rajna-völgyben található. A vidék hűvös klímájának ellenére a völgyekben megülő magasabb páratartalom kedvez a *B. cinerea* szőlőbogyón való megjelenésének. A rizlingen kívül fűszeres traminiből, szürkebarátból, scheurebe-ből, silvaner-ből és huxelrebe szőlőfajtából is készítenek botritiszes borokat (Benson, 1977). Szabályozásuk szerint háromféle bortípus készíthető nemesen rothadt szőlőből: az Auslese, ami teljes érésű botritiszes vagy csupán töppedt szőlőből is készülhet, lehet száraz és magas alkoholtartalmú, de inkább maradékcukorral készülő és alacsony alkoholtartalmú termék. A Berenauslese (BA), ami túlérdest szőlőből, a botritizálódás következtében magasabb cukortartalommal

készül, a szokásos szüretidőponthoz képest később szüretelt, és általában édes borkategóriájú. A Trockenbérenauslese (TBA), ami a legmagasabb minőségi kategóriát képviseli a német botritiszes borok tekintetében. A német botritiszes borok néha túlzóan édes ízűek és alacsony alkoholtartalmúak (Magyar, 2011) (Robinson & Harding, 2015).

A német borkategóriákhoz hasonló késői szüretelésű borkategóriákat ismer el az osztrák bortörvény is, bár a szőlő előírt cukortartalma a melegebb éghajlat miatt valamivel magasabb. A BA és TBA kategóriák mellett létezik egy további típus, az Ausbruch. Ez opcionálisan, kizárólag a legtökéletesebben nemes rothadt bogyók szelektív szedésével és a Tokaji Aszúhoz hasonló macerációval történő feldolgozásával készíthető. A leghíresebb osztrák botritiszes bor a Ruster Ausbruch, amelyet a Burgenland borvidéken készítenek. Elsősorban erősen botritizált furmintból és muskotályból készül, de készülhet pinot blanc, pinot gris, chardonnay, neuburger, tramini és welschriesling szőlőfajtákból is. A Fertő-tó közelségéből származó nedvesség rendszeresen kedvez a nemes rothadásnak. A borok minősége ezen a vidéken is elérheti a TBA szintet. A borokat általában tölgyfahordóban érlelik. Gumpoldskirchen településen is készítenek botritiszes borokat, főként a Zierfandler és a Rotgipfler szőlőfajtákból.

4.4 DNS-vonalkód elemzés és metatranszkriptom elemzés

A talajban élő mikrobákat a szárazföldi ökoszisztéma részének tekintjük, hisz kulcsszerepük van a tápanyag lebontásban és átalakításban, valamint a növényi közösségek életciklusában és diverzitásában is fontos szerepük van (Nannipieri Paolo, et al., 2020). Azonban az, hogy a szárazföldi életközösségek mikrobiális diverzitása rendkívül komplex nagymértékben megnehezíti az átfogó ismeretanyag megszerzését annak kölcsönhatásáról és a növényekkel való kapcsolatukról (Francioli, et al., 2018). A talajmikrobiom mellett kiemelt jelentőségű a növényeken élő mikrobiológiai életközösség tanulmányozása, főként az olyan álló kultúrák esetén, mint a szőlő vagy egyéb fás szárú évelő növények. A növényeken megtalálható mikrobák tanulmányozása lehetővé teszi azok növényre gyakorolt hatásának megismerését és bizonyos a növény életében jelentős változás indikátoraként is szolgálhatnak, mely növényvédelmi és növényegészségügyi jelentősége mellett a klímaváltozás növényekre gyakorolt hatásának részletei is feltárja a kutatók előtt (Francioli, et al., 2021).

A vizsgált talajt vagy növényi mintákat korábban mikrobiológiai fekete doboznak nevezték a rajtuk található mikrobiális populációk nagy abundanciája és a jellemzésükkel kapcsolatos komplex kihívások miatt (Cortois & De Deyn, 2012). A molekuláris biológiai eszközök fejlődésével, a módszertan laboratóriumból a mintavételi helyre való költöztetésével és a szükséges anyag és eszközök költségeinek csökkenésével (PCR, nagy áteresztőképességű szekvenálás, HTS) mára már az ökológiában rutinszerűvé vált a talaj és növényi minták mikrobiom elemzése. A talajban és növényeken élő mikrobák közül leginkább a prokariótákat (Archaea és Bacteria) és a gombákat vizsgálják standard megközelítéssel. A mintákban található életközösség jellemzése általában taxonómiai markerek, (ún. DNS-vonalkódok) PCR amplifikációjával történik, mely markerek kellően variábilisak ahhoz, hogy megfelelő taxonómiai felbontást adjon az életközösség összetételének megállapításához (Taberlet, et al., 2012). Ezek a markerek nem minden esetben elegendően hosszúak és variábilisak ahhoz, hogy lehetővé tegyék a faj szintű azonosítást ám technikai taxonómiai egységek bevezetésével az életközösség jól jellemezhetővé válik. A módszer nagy előnye az, hogy gyors, hatékony és könnyen megismételhető ezáltal a

kisléptékű, növényi részek jellemzésétől egészen a nagyskálás komplett ökoszisztémára kiterjedő jellemzés is lehetővé válik. Ezáltal bizonyos lokációk, növények, életterek vagy az ökoszisztémában megfigyelhető események esetében jól leírhatóvá válnak a domináns és funkcionális taxonok.

Az egyedi taxonok leírása mellett a vizsgált minta mikrobiális diverzitását is meghatározhatjuk ezzel a módszerrel, mely különböző kísérleti körülmények között teszi lehetővé a mikrobióta összehasonlítását. Bizonyos esetekben konkrét események bekövetkezése a mikrobiom egy adott, indikátor jellegű megváltozását eredményezi, mely lehetőséget ad a biomonitorozás költséghatékony megvalósítására (Szelecz, et al., 2018).

Ez a módszer laboratóriumi lépések és bioinformatikai számítások rutinszerű alkalmazását teszi szükségessé, mely megfelelő technikai tudás igényel, ugyanakkor fontos figyelembe venni a módszer korlátait is, többek között azt, hogy a kiválasztott taxonómiai markerek kópiáinak változó száma csökkenti a taxonómiai felbontóképességet, így bizonyos taxonok felül míg mások alulreprezentáltak lehetnek, habár funkciójukat tekintve jelentőségük ettől eltérő lehet. (Ruppert, et al., 2019). A bioinformatikai és statisztikai elemzéshez több felhasználóbarát szoftver áll rendelkezésre ám fontos megjegyezni, hogy ezek a szoftverek sok esetben a jelenlévő szisztematikus és statisztikus hibák ellenére nyújtanak számunkra könnyen elérhető eredményeket. Ezeket a hibákat fontos a megfelelő mértékben figyelembe venni és azok kumulatív hatását a teljes elemzés során szem előtt tartani. A hibák nem megfelelő kezelése és a módszerek hibás alkalmazása téves biológiai következtetéseket eredményezhetnek (van Ruijven, et al., 2020) és jelentős torzítások keletkezhetnek a teljes folyamat bármely lépése esetében vétett nem megfelelő hibakezelésből adódóan.

A lektorált szakirodalom (Crandall, et al., 2020) ma tele van izgalmas új eszközökkel és technikákkal, amelyeket a biológia és az orvostudomány minden területén alkalmaznak. A transzkriptomika, a proteomika és újabban a metabolomika három olyan technika, amely hatással van a gombák növénykórtani jellemzésére. Egyenként alkalmazva e technikák mindegyike olyan adathalmazt generálhat, amely akár évekig lefoglalhat egy kutatócsoportot, emellett kombináltan alkalmazva lehetőségük van egy rendszer transzkripciós és transzlációs szintű átfogó vizsgálatára. A transzkriptomika, vagyis a kvantitatív génexpressziós profilok készítése vitathatatlanul a legszélesebb körben használt technika a gombák növénypatológiai szempontból történő jellemzésére. Az elmúlt évtizedben az ún. mikroarray elemzés volt az elsődleges transzkriptomikai technika, de mára más új, nagy áteresztőképességű szekvenáláson alapuló módszerek is megjelentek. A proteomika a jelenleg még korlátozottan elérhető genomsekvencia információk miatt nem minden esetben ad megfelelő minőségű eredményeket, illetve bizonyos speciális esetek elemzésére nem alkalmas, így metaelemzés céljára jelenleg korlátozottan használható. A metabolomika a legfrissebb olyan technika, amely egy adott rendszerben lévő összes metabolit nem célzott profiljának meghatározásával foglalkozik. A növényi gomba kórokozók metabolomikai vizsgálatai még csak most kezdenek megjelenni, bár a kórokozó és a betegség számos aspektusának feltárásában rejlő lehetőségük miatt népszerűségük gyorsan nő.

A transzkriptomika a transzkriptom, azaz a sejtben lévő transzkriptumok teljes halmazának és gyakoriságának számszerűsítése egy adott fejlődési stádiumban vagy fiziológiai állapotban. Lehetővé teszi a génexpresszió mennyiségi és minőségi különbségeinek azonosítását több mRNS-populáció összehasonlításakor (Ozsolak & Milos 2011).

A transzkriptomika jelentős szerepet játszott a gombás növényi betegségek jobb megértésében. A génexpresszió elemzése a fertőzés során, valamint az expressziós profilok elemzése számos különböző *in vitro* növekedési körülmény esetében, beleértve az tápanyagdeficitet és más stresszhatásokat, nagyban hozzájárult a gombák fitopatogenitásának megértéséhez (Nilsson, et al., 2019). Számos transzkriptomikai vizsgálathoz az ún. mikroarray rendszert dolgoztak ki, bár a szekvencia-alapú megközelítések, mint például a génexpresszió sorozatos elemzése (SAGE, Velculescu, et al., 1995) és más kapcsolódó technikák az újgenerációs szekvenálási technológia fejlődésével egyre vonzóbbá válnak.

Az orvostudomány és a biológia területén kezdenek megjelenni az újgenerációs szekvenálási technológia transzkript-profilalkotásra történő alkalmazásáról szóló tanulmányok. Ezek a technológiák, nevezetesen a SOLiD (ABI CA, USA) és a Genome Analyzer (Illumina CA, USA), képesek nagyságrendekkel növelni a szekvenálás teljesítményét a költségek töredéke mellett (Ansorge, 2009). Ezek a technológiák nagymértékben megoldják a szekvenáláson alapuló transzkript-profilkészítéssel korábban kapcsolatos szekvenálási átviteli és költségproblémákat. Ezek az új generációs szekvencia-alapú megközelítések jelentős előnyökkel is rendelkeznek a microarray-ekkel szemben, beleértve a nagyobb érzékenységet és a sokkal nagyobb dinamikai tartományt. A szekvencia-alapú megközelítések a génexpresszió mérése tekintetében is jobbak, mivel egy mikroarray csak a tömbön reprezentált gének expressziós adatait szolgáltatja. A microarray-hez szintén kiterjedt szekvenciaadatokra, jellemzően genomszekvenciára van szükség a tömb létrehozásához. A szekvenálási megközelítés nem igényel ismert szekvenciaadatokat, bár ezek az erőforrások fontosak a hatékony adatelemzéshez. A nagy áteresztőképességű szekvencia-megközelítések azonban nagy erőforrásigényűek: hatalmas adathalmazok szűréséhez és elemzéséhez nagy számítási kapacitásra van szükség, amely jelentősen növeli a költségeket. Vitathatatlanul nehezebb a bioinformatikai feladat a SOLiD és a Genome Analyzer esetében, amelyek sokkal több, sokkal kisebb szekvenciát állítanak elő.

A *Botrytis* által kiváltott növénybetegségeket az elmúlt 50 évben több tanulmány és összefoglaló mű is részletesen ismertette (Elad, et al., 2004). A védekezéssel kapcsolatos szakirodalom egy igen jelentős része a biológiai védekezés, amely biológiai és ökológiai hatásának teljes megértése esetén hatékony védekezési stratégiákat dolgozhatunk ki a kórokozóval szemben. A *Botrytis* ellen való védekezésben a legnagyobb jelentőségű mikrobanemzetségek a *Trichoderma*, *Ulocladium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pichia* és *Candida* nemzetségek. A védekezés két fontos gyakorlati szituációban valósulhat meg, szüret utáni, üvegházi körülmények között és ültetvényben, mely utóbbi a környezeti hatásoknak való kitettség miatt nagyobb kihívást jelent. Ezt felismerve a jelenleg folyó kutatások célja az, hogy meghatározzák a biológiai védekezési stratégiák gazdasági és biológiai hatékonyságát, valamint azt, hogy más módszerekkel kiegészítve milyen integrált módszerrel lehet a legjobb eredményeket elérni (Fillinger & Elad, 2016).

A *Botrytis cinerea* a leggyakrabban szürkepenészként ismert nekrotróf gombakórokozó, mely több mint ezerkét száz gazdanövényt képes megfertőzni, legtöbbször elpusztítva azok sejtjeit, majd megtelepedve az elhalt szöveteken okoz hatalmas gazdasági károkat. A *Botrytis* ellen való védekezés máig legfontosabb eleme a kémiai fungicidek alkalmazása, ám a gombák rezisztenciájának gyors kialakulása miatt egyre nagyobb dózisú felhasználás és egyre változatosabb hatóanyag kijuttatás válik szükségessé, mely közegészségügyi és élelmiszerbiztonsági aggályokat is felvet (De Miccolis Angelini, et al., 2014). A *Botrytis cinerea* egy kifinomult penetrációs és

fertőzési stratégiát fejlesztett ki a növényi védekezési válaszok elnyomására, úgy mint enzimek, toxinok, reaktív oxigéngyökök, szekretált fehérjék és másodlagos metabolitok gazdag csoportja (Choquer, et al., 2007). Emellett az is igaz, hogy a növényi válaszok konstitutív vagy indukált (fizikai és kémiai módon) gáttal visszاسzoríthatják ezeket a fertőzési stratégiákat (Mengiste, et al., 2010), melyek közül elsődleges a növényi sejtfal, mint fizikai gát. A kémiai növényi védekezés elemét a fitoanticipinek és a fotoalexinek határozzák meg elsősorban (VanEtten, et al., 1994). A patogenezissel kapcsolatos biokémiai anyagok, fehérjék, enzimek és antimikrobiális vegyületek szintén felhalmozódhatnak a fertőzés helyén (van Loon, et al., 2006). Ezek mellett fitohormonok, úgy, mint szalicilsav, jázmonsav, etlén, abszcizinsav, brassinoszteroidok, auxin, citokininek, gibberellinek és strigolaktonok együttesen járulnak hozzá a növényi válaszok közvetítéséhez (Torres-Vera, et al., 2014).

A legújabb laboratóriumi technológiák alkalmazásával a kutatók számos olyan ún. „omikai” eszközt fejlesztettek ki a *B. cinerea* elleni növényi válaszok és a gomba virulenciájának molekuláris jellemzésére, amelyek a transzkriptomikai (kódoló és nem kódoló RNS-ek teljes halmaza), proteomikai (genomból származó fehérjék) és metabolomikai (sejtben, szövetben vagy szervben található összes metabolit) módszereken alapulnak és a nagy áteresztőképességű DNS és RNS szekvenálással valamint nagyfelbontású tömegspektrometriai és mágneses magrezonanciával (NMR) alkalmazva lehetővé teszi az ilyen adatok rendszerbiológiai szintre való fejlesztését (AbuQamar, et al., 2016).

A nagy áteresztőképességű szekvenáláson alapuló módszerek (HT-NGS) a metatranszkriptom szekvenálástól a teljes genom szekvenálásig, gyors és hatékony módszert adnak a *Botrytis cinerea* és a gazdanövény fertőzési és védekezési mechanizmusainak megértéséhez akár *in planta* minták esetében is (Smith, et al., 2014). A technológia alkalmazása lehetővé tette a gombagenom variabilitásának komplex megértését és a patogenezis diverzitásának és evolúciójának leírását, mely a szürkepenész betegségre adott növényvédelmi válasz hatékonyabb alkalmazását teszi lehetővé.

A DNS szekvenálási módszerek egyre költséghatékonyabbá válnak napjainkban akár a Sanger-féle dideoxi nukleotid szekvenálás akár a leggyakrabban az egynukleotid-polimorfizmus (SNP) elemzésére használt újgenerációs szekvenálási módszerek. Az újgenerációs szekvenálási technológiák (Illumina, IonTorrent, PacBio) forradalmasítják a genomikai kutatásokat és lehetővé tették a *B. cinerea* széleskörű vizsgálatát. A *B. cinerea* mára már modellkórokozóvá vált a rendkívül sok gazdanövénye valamint a komplex patogenitása miatt (Heather & Chain, 2016). A kutatások mélyebb megértése érdekében a Syngenta AG a gomba T4 és B05.10 törzsének genomszekvencia-projektjét kezdeményezte, amelyek során 37,9 Mbp és 38,8 Mbp méretű genomot kaptak Illumina HiSeq2000 technológia segítségével (Amselem, et al., 2011), melyet van Kan és mtsai. hézagmentes genomszekvenciává fejlesztettek (van Kan, et al., 2017). Ez a genom 18 kromoszómából és egy 4153 centimorgan méretű genetikai térképből, körülbelül 75 000 SNP markerből áll. A teljes genom elemzése nagyfokú szekvenciaazonosságot és génelrendeződési hasonlóságot mutatott a *B. cinerea* és a *Sclerotinia sclerotiorum* között.

A botritiszes szőlőből származó BcDW1 törzs genomját is szekvenálták (Blanco-Ulate, et al., 2015). A korábban szekvenált két törzsszel összehasonlítva azonosították a növényi szövetekbe való behatolásban és lebontásban részt vevő szekretált fehérjéket, glikozid-hidrolázokat, szénhidrát-észterázokat, lakkázokat és poliszacharid-liázokat (Magyar, 2011). Ezek az elemzések a környezeti alkalmazkodóképességének és gazdaspecifitásának genetikai vizsgálatát is lehetővé tették, mely során 13 különböző izolátum genomját szekvenálták újra a genetikai

diverzitás mérése érdekében (Atwell, et al., 2015). Az elmúlt évtizedekben számos gazdanövény genomszekvencia elemzését és genomvariabilitás vizsgálatát végezték el úgy, mint *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Fragaria vesca* és *Vitis vinifera* (Cao, et al., 2011), (Lin, et al., 2014), (Bolger, et al., 2014), (Shulaev, et al., 2011), (Jaillon, 2007). Az említett genomadattárak megjelenése lehetővé tette a gomba-növény kölcsönhatás molekuláris biológiai szintű mélyebb megértését.

Az összehasonlító génexpressziós elemzések transzkriptomikai módszerekkel adhatnak betekintést a növények biotikus és abiotikus stressz okozta válaszaiba, azok génexpressziós profilra adott válaszaiba. A transzkriptomikai módszerek alkalmasak különböző stresszfaktorok okozta génexpressziós változások azonosítására, melyek a transzkriptom nagy százalékát tehetik ki. *Arabidopsis* esetében a genom több mint 12%-a differenciálisan expresszálódhat *Botrytis* fertőzés esetén (Sham, et al., 2014). Számos, a különféle stresszre adott válaszok transzkripció szabályozására összpontosító tanulmány azonosította a *B. cinerea* fertőzésre és az egyidejű abiotikus stresszre, például a szárazságra, a hőre vagy a sótartalomra egyaránt reagáló, differenciálisan szabályozott géneket *Arabidopsis*-ban microarray-elemzések segítségével (Atkinson & Urwin, 2012). Paradicsomban egy RNAseq elemzés segítségével végzett transzkriptomikai vizsgálat megkülönböztette a vad *Solanum* fajok közötti természetes variációt (Smith, et al., 2014). A *B. cinerea* fertőzést követően a fotoszintetikus és metabolikus folyamatok leszabályozódtak, míg a védekezéssel kapcsolatos gének, például a PR protein 1 (PR1), β -1,3-glükánáz és szubtilizinszerű proteáz kódoló gének egyidejűleg felszabályozódtak a *B. cinerea*-nak erősen ellenálló fajban, a *S. lycopersicoides*-ben.

Kétségtelen, hogy az omika betekintést nyújt a növények kórokozókkal szembeni ellenálló képességének és a környezeti stresszel szembeni toleranciájának molekuláris mechanizmusaiba a jobb betegségkezelés érdekében. A tudósok nagy erőfeszítéseket tesznek a gének és a tulajdonságok összekapcsolására a fajta ellenálló képességének javítása és a betegségekkel szembeni ellenállás mechanizmusainak megértése érdekében. Az omika lehetővé teszi, hogy "lefordítsuk" a gének (genomika), az mRNS (transzkriptomika), a fehérjék (proteomika) és a metabolitok közötti összetett kölcsönhatásokat.

4.5 A *Botrytis cinerea* mellett előforduló többi mikroba

A *Botrytis cinerea* által megfertőzött szőlőbogyó felszínének mikrobiális populációját és annak dinamikáját számos korábbi tanulmány vizsgálta (Viannini & Chilosi, 2013), (Magyar, 2011). A fonalgombák és élesztők mellett az egyik leginkább említésre méltó eredmény a *Starmerella bacillaris* (korábban *Candida zemplinina*) azonosítása Tokaji mintákról származó aszúbogyókról gyűjtött izolátumok esetében, mely élesztőfajt azóta a borászati gyakorlatban is használják kofermentációs fajként (Englezos, et al., 2017). A *Metschnikowia pulcherrima* az aszú szőlő másik jellegzetes élesztőgombáját Tokajban találták közvetlenül a szőlőültetvényből vett minták esetében (Bene & Magyar, 2004). Egy eltérő izolálási stratégiával és molekuláris azonosítással nagyszámú véletlenszerű izolátumon, Csoma & Sipiczki (2008) hasonló eredményekről számolt be. Tokaji szőlőültetvényeken a *Hanseniaspora uvarum*, a *Metschnikowia pulcherrima* és közeli rokona, a *Metschnikowia fructicola* jelenléte dominált. A friss szőlőmust mikrobiális populációjának elemzése a *C. pulcherrima* és a *Penicillium expansum* abundáns jelenlétét mutatták ki a *Botrytis cinerea* mellett, melyek antagonista viselkedést mutatnak (Nguyen & Panon, 1998).

Közvetlen izolálással *Saccharomyces* fajokat nem tudtak kimutatni aszú bogyókon (Magyar & Soós, 2016), viszont a spontán erjesztés során nyilvánvalóan ezek

dominanciája mutatható ki magasabb alkoholtartalmú (> 5% vol.) közeg esetén (Albergaria & Arneborg, 2016).

A *Botrytis cinerea* mellett a nemesrothadás előrehaladtával általában szaprofita gombák jelenlétét azonosították. *Penicillium* és *Aspergillus* fajok általában nagy számban fordulnak elő (Magyar, 2011).

Az ecetsavbaktériumok populációja erősen megnő a szőlőn, amely jelentős borászati vonatkozású, hiszen az ecetsav mellett, hogy nagy mennyiségben borhibát, ecetesedést eredményez, kisebb mennyiségben érzékszervi tulajdonságokat javító és a sav-cukor egyensúlyt a savasság irányába kedvezően befolyásoló hatása is van (Sponholz, 1993). Az *Acetobacter* fajokkal ellentétben a *Gluconobacter oxydans* cukorban gazdag környezetet preferál, glükózból glükonsavat, 2-ketoglükonsavat, 5-ketoglükonsavat és 2,5-ketoglükonsavat állít elő. Ezek a ketonsavak részben felelősek a botritiszes must és borok magas kéndioxid megkötő képességéért. Csak mérsékelt mennyiségű ecetsav keletkezik az etanol oxidációja során, amely alacsony koncentrációban van jelen a nemes rothadó szőlőben. A botritiszes bogyókból kinyert lé ugyan jelentős mennyiségű ecetsavat tartalmaz, de a gyümölcsön lévő vad élesztőfajok szerepet játszhatnak a termelésében (Doneche, 1993).

4.6 A *Botrytis cinerea* hatása a borok aromaanyag-összetételére

A nemesrothadás során két fontos tényező határozza meg a szőlőbogyó kémiai összetételét. Az egyik a víz elpárolgásából eredő az oldott anyagok koncentrációjának növekedése, a másik a *Botrytis cinerea* másodlagos anyagcseretermékeinek a megjelenése és felhalmozódása. A két tényezőt egészítik ki a szőlőbogyón élő egyéb mikrobák anyagcseretermékei, amelyek szintén jelentősek, gondoljunk csak az *Acetobacter* fajok által termelt ecetsavra vagy a *Penicillium* fajok okozta keserű ízt eredményező borhibákra.

A nemesrothadás során bekövetkező főbb fizikai és kémiai változások már régóta ismertek (Doneche, 1993), (Magyar, 2011). A fiatal gomba micéliumban a glükóz az Embden-Meyerhof-útvonalon és a hexóz-monofoszfát útvonalon keresztül katabolizálódik. Aktív trikarbonsavciklussal is rendelkezik, és kimutatták egy glikoxilát-ciklus jelenlétét is. A glükóz közvetlen oxidációja a glükóz-oxidázon keresztül glükonsav felhalmozódásához vezet a stacionárius növekedési fázisban. A *Botrytis* a bogyóhéj alatt fejlődve oxigénszegény környezetben van, ami korlátozza a glükóz katabolizmust és a hifák növekedését. A glikolízis oxidatív lépése során képződő redukált NAD koenzimeket a glicerín-foszfát-dehidrogenáz részben regenerálja, részben anaerob körülmények között tartja, így a glikolízis során a glükóz teljes oxidációjával párhuzamosan glicerín is keletkezik (Magyar, 2011).

A glicerintermelés a nemesrothadás korai szakaszában a legmagasabb (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Ezt követően a későbbi fejlődési fázisban a gomba részben oxidálja azt. A IV. fázisban Sauternes-ben gyűjtött mintákban a végső glicerinkoncentráció 5-7 g/l körül van, de a bogyók további dehidratálása után meghaladhatja a 30 g/l-t, így például a tokaji aszú bogyókban is (Bene & Magyar, 2004). A cukoranyagcsere melléktermékei közé tartoznak továbbá a cukoralkoholok, mint az arabit, a mannit, az eritrit, ezenkívül a D-szorbit és az inozit felhalmozódik a fertőzött szőlőbogyóban (Sponholz, 1993).

A bogyóban a *Botrytis* metabolizmus okozta jelentős cukortartalom veszteség ellenére a dehidratáció a bogyó cukorkoncentrációjának jelentős emelkedését okozza (Magyar, 2011). A szőlőcukor-összetétel a *Botrytis* enzimatisz aktivitása által a szőlőben található poliszacharidok és pektinek lebontásával is módosul. Ez arabinóz, ramnóz, galaktóz, mannóz, xilóz és galakturonsav felhalmozódásához vezet.

A savtartalom változása a nemesrothadás során eltér a különböző szőlőfajták és borrhégek között. A *B. cinerea* könnyen hasznosítja a borkősavat, de az almasavat kisebb mértékben (Doneche, 1993). A szőlőben található savak drasztikus csökkenését a dehidratációból eredő koncentráció növekedés ellensúlyozza. A dehidratáció mértékétől függően a gyümölcslé savtartalma a csekély mértékű csökkenés és a jelentős növekedés között változhat. A glükonsav, galakturonsav és galaktársav mellett a *Botrytis* kis mennyiségben piruvinsavat és 2-ketoglutársavat is termel. Mindezek a savak az ecetsavbaktériumok által termeltekkel együtt hozzájárulnak a botritiszes szőlő magasabb savtartalmához és összetettebb savösszetételéhez. A jellemzően magas savtartalom érzékszervi szempontból előnyös, ellensúlyozza egyes aszúborok rendkívül magas cukortartalmát.

Az aszúsodás során a cukor és savtartalom jelzetős változása mellett a szőlőbogyóban található aromaanyagok módosulása járul hozzá a nemesrothadt szőlőből készült borok érzékszervileg is kimutatható egyediségéhez. A terpenolok, a szőlő elsődleges aromakomponensei, mennyiségük a nemes rothadás során csökkennek (Schreier, et al., 1976). Ezeket a vegyületeket glikozidjaikból gomba- és szőlő eredetű β -glikozidázok szabadítják fel. A terpenolokat ezt követően a gombák enzimei szagtalan vegyületekké oxidálják (Bock, et al., 1988). Ez a fajtaaroma csökkenéséhez vezet, miközben a *Botrytis* nagyszámú új aromás vegyületet termel. Általánosan elmondható, hogy a *Botrytis*-specifikus aromakomponensekkel foglalkozó tanulmányok jelentős része a borok aromaanyagait vizsgálta. Tekintve az erjedés során a *Saccharomyces cerevisiae* és más élesztőfajok által átalakított aromakomponensek jelentőségét érdemes a vizsgálatot kész borok esetében lefolytatni, ugyanakkor ezen aromakomponensek prekursorai a szőlőbogyóban találhatóak, így érdemesnek tartjuk annak aromaösszetételével is foglalkozni.

Számos g- és d-laktont azonosítottak a tokaji aszú szőlőben (Magyar, 2011). A g-laktonok illatjegyeit gyantás és karamellás, pörkölt vagy mézes illatjegyekkel írták le, míg a d-laktonok jellegzetes kókuszdió, csokoládé és őszibarack jegyeket mutattak. Ugyanezeket a laktonokat korábban már azonosították botritiszes borokból, de egészséges szőlőből készült borokból nem (Schreier, et al., 1976). A laktonok többnyire oxidatíván érlelt borokban találhatóak, de úgy tűnik, hogy a gyümölcsökben a *B. cinerea* oxidáló hatása és a vízvesztés miatt alakulnak ki.

Sarrazin és munkatársai (Sarrazin, et al., 2007) megállapították, hogy a *B. cinerea* fejlődése a homofuraneol, furaneol, norfuraneol és fenilacetaldehid koncentrációjának növekedéséhez vezetett a botritiszes szőlőből készült borokban. Más vizsgálatok a cisztein-S-konjugátumokra, mint fajtaaroma-prekursorokra összpontosítottak (Baumes, 2009). Kémiaiilag ezek a szagtalan vegyületek az L-cisztein S-szubsztituált származékai, amelyek a kénatomhoz kötődő kénatomban különböznek. Az erjedés során ezekből a prekursorokból rendkívül szagos illékony tiolok képződnek (Dubourdieu & Tominaga, 2009).

A *B. cinerea* a szőlő asszimilálható nitrogéntartalmának jelentős részét hasznosítja, beleértve az ammóniumot és az aminosavakat is. Egyes vizsgálatokban a *Botrytis* által fertőzött szőlőkben a teljes aminosavtartalom jelentős (30-80%-os) csökkenését írták le az egészséges szőlőhöz képest (Sponholz, 1993). Bár számos gombabetegség indukálja a patogenezishez kapcsolódó (PR) fehérjék szintézisét, különösen a zsendülés előtt, a PR fehérjék szintje jelentősen csökken a *B. cinerea* által fertőzött szőlőben vagy szőlőlében (Girbau, et al., 2004), valószínűleg a gomba proteolitikus enzimek szekréciója miatt. Ezzel szemben az extracelluláris gombaenzimek termelődése növeli a lé fehérjetartalmát, ami megnehezíti a bor tisztítását és stabilizálását (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1 A mintavételi hely bemutatása és a mintagyűjtés menete

A mintavételi hely kiválasztása esetében sok szempontot figyelembe kellett vennünk, melyek esetleg pozitív vagy negatív módon befolyásolhatják a kísérleteinket. Ilyen szempontok az ültetvény geológiai és geográfiai adottságai, a terület makro- és mezoklimatikus jellemzői, a mintagyűjtési helyül szolgáló ültetvény kora, kondíciója, a vizsgált szőlőültetvény fajta, fajtaklón és növénykondíció szerinti homogenitása, valamint az is, hogy az elmúlt év borászati tapasztalatai alapján milyen mennyiségű és minőségű aszúszemeket tudott szüretelni a szőlőterület tulajdonosa a dűlőből, abból milyen mennyiségű és minőségű bor készülhetett. Ezek a szempontok a vizsgálatok megismételhetősége és megfelelően reprezentatív eredményei szempontjából fontosak. A 2. ábrán a mintavételi terület látható térképen jelölve.



2. ábra: A mintavételi terület a Tokaj-hegyaljai borvidéken található Mád község határában. Az ábrán feltüntetésre kerültek a mintavételi hely hozzávetőleges középpontjának GPS koordinátái.

5.1.1 A szőlőterület elhelyezkedése

A mintavétel a Tokaj-Hegyalja borvidéken található Mád község határában fekvő Betsek dűlőben helyezkedik el. A dűlő a Mád határában található 42 első osztályú dűlő közül az egyik legkiválóbbként van számontartva. A dűlő a Mádi-medence keleti határában található vulkáni kúpok ölelésében fekszik. A terület kialakulását a miocén elejétől a pleisztocénig tehetjük, a sajátos domborzati viszonyok a jellemző hidrotermális aktivitásnak köszönhetően jöttek létre. A gejzírek és hidrotermális források vizei tavakban összegyűltek, majd a pilocénban limnokvarcit rakódott le a kovasav kicsapódásával. A felszint krioplanációs folyamatok alakították tovább (Pinczés, 2005). A terület földtani szempontból a Király- és Nyerges-hegy dűlők

horzsaköves törmeléktufájánk folytatása, a tufaterítések lepusztulása folytán andezit és törmelékes agyag került a felszínre (Remenyik, et al., 2023).

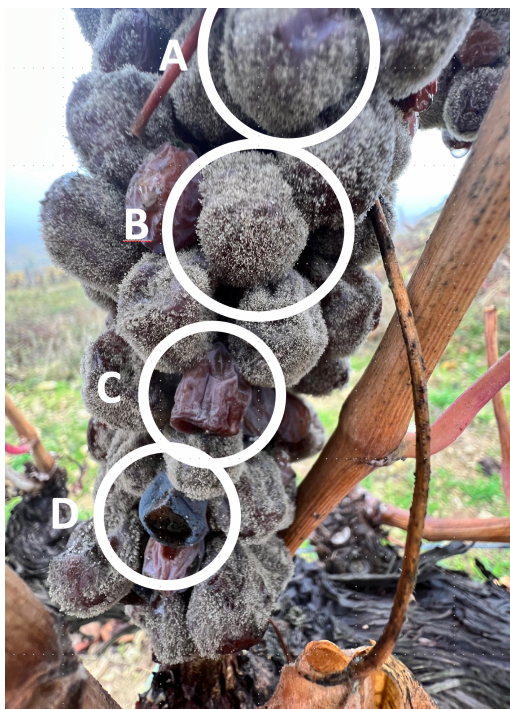
5.1.2 A mintavételi terület:

A mintavételi területek két szőlőtáblában helyezkedtek el, melyek közül az északabbra fekvő táblában furmint, még a délebbre fekvő táblában hárslevelű szőlőfajta található. Mindkét szőlőterület 3 m x 1 m térállásban lett telepítve Teleki-Kober 5BB rezisztens alanyfajta. A furmint fajta T85 klóntípusú a hárslevelű T311 típusú. Művelésmódját tekintve mindkét tábla közép magas kordonművelésű 4-5 termőalappal, melyek már több évre visszamenőleg alakítottak ki és 2 rügyes csapmetszéssel dolgoznak rajta. A területen már több mint 20 éve nem történt sem szerves sem műtrágya kijuttatása, növényvédelmét tekintve integrált módon kezelt terület, azaz kontakt és szisztémikus hatású növényvédőszerrel egyaránt kezelve van. Mindkét szőlőtábla a Mádi Szepsy család tulajdonában van, a területről szüretelt szőlőt a család tulajdonában lévő Szepsy Kft. dolgozza föl.

A mintavétel több időpontban és több vizsgálati célra történt, két évjárat folyamán gyűjtöttünk mintát 2016-ban és 2017-ben. Fontos azt kiemelni, hogy a mintagyűjtési időpont megválasztásakor még nem lehetünk biztosak abban, hogy az adott évjáratban egyáltalán lesz e megfelelő mennyiségű és minőségű aszúsodás, így a szükségesnél több mintagyűjtési időponttal számoltunk, amelyet az időjárás alakulásával minden esetben aktualizáltunk. A pontos mintagyűjtési időpontokat az 1. táblázat tartalmazza. Szerencsés esetnek tekinthető, hogy mind a 2016-os és mind a 2017-es évjárat kiemelkedő aszús évnek számít, így sikerült megfelelő mintagyűjtést végezni. Mindkét évjáratban 3-3 alkalommal gyűjtöttünk mintát, melyek időpontját úgy határoztuk meg, hogy nagyjából 1-1 hónap különbséggel szeptemberi, októberi és novemberi mintagyűjtésre legyen lehetőségünk. A mintagyűjtések között eltelt pontos időtartamot fontosnak tekintettük (később látni fogjuk, hogy ennek a paraméternek van az egyik legkisebb hatása a vizsgált génexpresszióra), ám a vizsgálataink szempontjából fontosabbak a gyűjtést megelőző időjárási viszonyok. Minden esetben olyan napokon végeztük a mintázást, amelyet megelőző két napon nem volt eső, hiszen az nagyban befolyásolja mind a szőlőbogyó fizikai és kémiai paramétereit, mind az azon megtalálható mikróbaközösséget. Minden esetben steril kesztyűben kézzel végeztük a bogyók gyűjtését, steril 50ml-es falkoncsőbe helyeztünk 5-10 bogyót több növényről (3-5 növényről). Minden alkalommal I, II, II és IV fázisú szőlőbogyót (Hegyi-Kaló, et al., 2020) (lásd 1. ábra) és szürkerothadt bogyót gyűjtöttünk. Minden mintából 5 biológiai ismétlést gyűjtöttünk. Azt tapasztaltuk, hogy mindkét évjáratban minden alkalommal megtalálható volt az 5 bogyótípus, ám számarányuk nagyban eltért az idő előrehaladtával. A lezárt falkoncsöveket egyből folyékony nitrogénbe dobtuk, majd miután kellően lehűlt szárazjégben tartottuk hidegen. A minták az Eszterházy Károly Katolikus Egyetem Kutatási és Fejlesztési Központjában kerültek eltárolásra -80 °C-os mélyfagyasztóban.

1. táblázat: a mintagyűjtések pontos dátuma, a gyűjtött minták típusai és azok felhasználása

Mintagyűjtés	Pontos dátum	Gyűjtött mintatípusok	Ismétlések száma
2016			
szeptember	szeptember 8.	I, II, III, IV, VI fázis	5-5 biológiai ismétlés RNS és DNS amplikon szekvenáláshoz, 100 ismétlés textúra elemzéshez
október	október 11.	I, II, III, IV, VI fázis	5-5 biológiai ismétlés RNS és DNS amplikon szekvenáláshoz, 100 ismétlés textúra elemzéshez
november	november 10.	I, II, III, IV, VI fázis	5-5 biológiai ismétlés RNS és DNS amplikon szekvenáláshoz, 100 ismétlés textúra elemzéshez
2017			
szeptember	szeptember 7.	I, II, III, IV, VI fázis	5-5 biológiai ismétlés RNS és DNS amplikon szekvenáláshoz, 100 ismétlés textúra elemzéshez
október	október 10.	I, II, III, IV, VI fázis	5-5 biológiai ismétlés RNS és DNS amplikon szekvenáláshoz, 100 ismétlés textúra elemzéshez
november	november 14.	I, II, III, IV, VI fázis	5-5 biológiai ismétlés RNS és DNS amplikon szekvenáláshoz, 100 ismétlés textúra elemzéshez

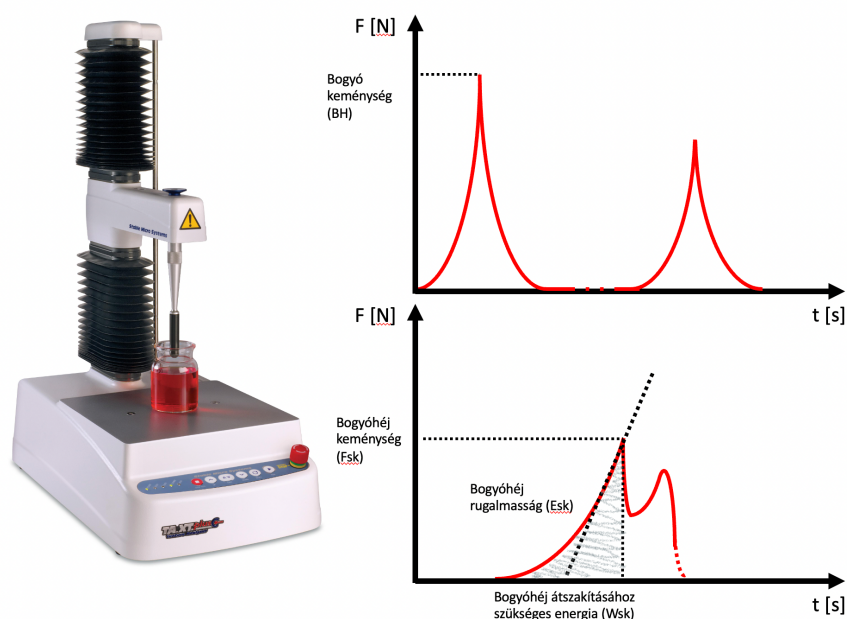


3. ábra: Az ábrán egy előrehaladott állapotú aszús fürt látható. Az „A”-val jelölt egy részben micéliumokkal fedett III-as fázisú, a „B”-vel jelölt egy teljesen micéliumokkal fedett IV-es fázisú, a „C”-vel jelölt egy IV-es fázisú szőlőbogyó, amelyen nem található micélium, a „D”-vel jelölt pedig egy szürkerothadt szőlőbogyó.

A molekuláris biológiai célokra gyűjtött minták mellett textúraelemzéshez és az alapanalitikai paraméterek meghatározásához is gyűjtöttünk mintát. Ehhez minden bogyótípusból minden mintagyűjtési időpontban 100-100 darab bogyót gyűjtöttünk úgy, hogy ollóval a bogyót tartó kis kocsánydarabot elvágtuk, ezáltal a bogyó egésze nem sérült. A textúraelemzéshez gyűjtött mintákat hűtőtáskában tároltuk, majd a mintagyűjtés napján elvégeztük rajtuk a méréseket. A textúramérések után a bogyók alkalmasak voltak arra, hogy levüket kiperéselve az alapanalitikai méréshez szükséges mintákat előállítsuk. Az alapanalitikai mérések eredményeit egy korábban közölt tanulmányban használtuk fel, nem képezi szorosan e munka tárgyát ám néhány esetben fokunk hivatkozni azokra (Hegyi-Kaló, et al., 2020).

5.2 Szőlőbogyó textúra mérése

A szőlőbogyó textúrája jelen kutatás esetében két szempontból is jelentős információt ad. Egyrészt az aszúbogyó feldolgozása során egy extrakciós áztatást végzünk, amelyhez szükséges időt és mechnaikai beavatkozásokat (kevertetés) nagymértékben befolyásolja a bogyó textúrája. Emellett az aszúszem jó minőségének gyakorlati meghatározása annak szüretelése idején a bogyó „húsos, puha” tapintásával jellemezhető. Korábbi munkánk során bebizonyosodott, hogy ez a tulajdonság valóban a magas beltartalmi minőségű aszúszem indikátora (Hegyi-Kaló, et al., 2020). A szőlőbogyók textúra tulajdonságainak méréséhez a TAxT2i típusú (Stable Micro System, Surrey, Egyesült Királyság) textúraelemző készüléket használtunk HDP 90-es platformmal és 30 kg-os maximális terheléssel. Az alkalmazott berendezést és a mérés során kapott görbék illusztrációját a 4. ábra mutatja be. A bogyó keménységének (berry hardness, BH) meghatározásához egy lapos, 35 mm átmérőjű összenyomófejjel állandó keresztfej sebesség mellett (1 mm/s) történik az összenyomás egy előre beállított deformáció értékig, amely a kezdeti bogyó átmérő 25%-a. Az ehhez a deformációhoz szükséges erő a BH értéke, mely jellemzően néhány newton nagyságrendű.



4. ábra: Az ábra bal oldalán a textúraelemző készülék fotója látható, a jobb felső sematikus diagram a lapos összenyomófejjel történő kompressziós mérés grafikonját ábrázolja. A jobb alsó ábra a hegyes összenyomófejjel történő penetrációs mérés sematikus grafikonját ábrázolja.

A bogyóhéj textúrájának paramétereit egy hegyes összenyomófejjel történő, ún. penetrációs teszttel tudjuk megmérni. Az összenyomófej hegyének pontos átmérője 0,6 mm, a penetrációs teszt állandó keresztfejsebesség mellett történik szintén 1 mm/s sebesség mellett. A kapott erő-idő görbe maximuma a bogyóhéj keménysége (berry skin break force, Fsk), a görbe csúcs előtti szakaszának meredeksége a bogyóhéj rugalmassági együtthatója (berry skin elastic modulus, Esk), az első maximumig a görbe alatti terület pedig a bogyóhéj átszakításához szükséges munka (berry skin break energy, Wsk). Az Fsk jellemzően néhány mN nagyságrendű, az Esk néhány tized N/mm, a Wsk pedig néhány mJ nagyságrendű.

A bogyótextúra mérésekor a már említett pici kocsánnyal együtt begyűjtött bogyókat használtuk. A mérés eredményeül kapott görbe sematikus alakjából következtetni lehetett a mérés sikerességére. Nem megfelelő mérés következhet például abból, hogy a legnagyobb igyekezet ellenére is megsérült a bogyó héja az összenyomósos vizsgálat esetén vagy a vékony gyümölcshús és puha bogyó miatt a penetrációs tesztben az összenyomófej elérte a szőlőmagot. Ezeket a nem tipikus görbével rendelkező méréseket nem vettük figyelembe. A mérési sorozatot addig végeztük amíg minden bogyótípusból nem sikerült 30-30 megfelelő görbéjű mérést kivitelezni. Ez önkényes kiválasztásnak tűnhet, ám a bogyótextúra mérések során több tanulmányban is ezt a gyakorlatot alkalmazták (Rolle, et al., 2012), a területen elfogadott a görbealak szerinti válogatás. A megmaradt és lemért bogyókat mintatípusonként megőriztük, levüket kiperéseltük az alapanalitikai mérések céljából. A görbék kiértékelése az összenyomókészülék saját szoftverével történt.

5.3 Szőlőbogyó teljes DNS kivonás

A begyűjtött és mélyfagyasztva tárolt szőlőbogyókat sterilizált kerámia dörzsmozsárban folyékony nitrogén fürdőben porrá őröltük, majd a porokat mintánként 2 ml-es eppendorf csőben a felolvadás elkerülésével visszahelyeztük -80 °C-ra. A minták leórlését követően a teljes DNS-t egy növényi DNS kivonására fejlesztett kivonó készlettel, Qiagen DNEasy Plant mini kit-tel (Qiagen GmbH., Hilden, Németország) kivontuk. A kivont DNS koncentrációját és minőségét NanoDrop készülékkel (NanoDrop 2000, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ellenőriztük, mely során megfelelőnek minősítettük azt a mintát, amelyben a DNS koncentráció legalább 50 ng/μl. A kivont DNS-t 2 ml-es eppendorf csőben tároltuk tovább -80 °C hőmérsékleten az Eszterházy Károly Katolikus Egyetem Kutatási és Fejlesztési Központjának laboratóriumában.

5.4 Teljes RNS kivonás metatranszkriptomikai szekvenáláshoz

Az aszúsodott szőlőbogyóból történő RNS kivonása és a kivont RNS újgenerációs szekvenálással történő feldolgozása nem teljesen rutinszerűen történt kutatásunk során. A begyűjtött szőlőbogyók magas cukor- és polifenol tartalommal rendelkeznek, mely anyagok megnehezítik mind az RNS elválasztást és tisztítást, mind az amplifikációt (Magyar, 2011). A teljes RNS kivonáshoz így egy kevésbé korszerű ám nagyon hatékony módszert fejlesztettünk tovább, amellyel viszonylag hatékonyan és jó minőségben tudunk RNS-t kivonni mintáinkból. Az RNS kivonatolás főbb lépései a következők voltak:

- Cetromónium-bromidos (CTAB) extrakció Polivini-pirrolidon (PVP-40) és spermidin adalékkal
- Merkaptotetanolos denaturáció
- Kloroformos izoamilalkoholos extrakció

- Nátriumacetátos tisztítás
- TE-pufferes tisztítás
- Lítium-kloridos tisztítás
- DN-ázos emésztés

A kivonási protokoll részletes leírása az 2. számú mellékletben található.

A kivont RNS mintákat ezután -80 °C-os fagyasztoóban tároljuk a szekvenálás elvégzéséig. Az RNS minőségének ellenőrzését NanoDrop 2000 UV-látható spektrofotométerrel (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) és Agilent 2100 Bioanalyzer kapilláris gél-elektroforézis készülékkel végeztük Bioanalyzer RNA 6000 Nano assay chipet használva (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA). Azokat a mintákat értékeltük jó minőségűnek és mennyiségűnek, ahol az RNS koncentráció legalább 50 ng/μl volt és a számított RIN érték (RNA Integrity Number) legalább 4 volt. Ha egy adott minta esetében nem teljesült ez a feltétel, akkor megismételtük az RNS kivonást, mely általában célravezető volt, mivel a kivonatok egyik utolsó lépése az centrifugációs falán kitapadó RNS-t tartalmazó pellet pusztán mosással nem vált le onnan, így a pipetta hegyével volt szükséges onnan leválasztani. Ez bizonyos esetekben nem sikerült megfelelően, így annak egy része elveszhetett.

5.5 DNS amplikon szekvenálás

A kivont DNS-t újgenerációs amplikon szekvenálással egy megbízás alapján a gödöllői Eurofins BIOMI Kft. végezte az alábbi feltételekkel: „*ITS Amplikon szekvenálás NGS módszerrel Illumina Miseq platformon: a beérkező DNS minták minőségi ellenőrzése, amplikon specifikus PCR-ek (2 db) elvégzése az átadott mintákon, ITS2 régióra voantkozó fITS7 – ITS4 primerpár alkalmazása, amplikon PCR termékek tisztítása, illetve minőség és mennyiség ellenőrzése, az elkészült könyvtárak paired-end szekvenálása Illumina MiSeq platformon (2x250 readhossz, legalább átlagos 50 000 read/minta QC30>75 %), a nyers szekvencia adatok fastq file—ba mentése, mintánként mindkét szekvenálási irányra vonatkozóan (R1 , R2).*„ Az fITS7 és ITS4 primerek a rendre a következő tanulmányok alapján kerültek kiválasztásra: fITS7 esetén Ihrmark és munkatársai (2012), ITS4 esetén White és munkatársai (1990).

A visszaküldött szekvenciaadatok további feldolgozásra kerültek. A begyűjtött minták közül kizárólag a 2016-os évjáratban gyűjtött minták közül a furmint szőlőfajta I., IV. fázisai és szürkerothadt bogyótípusai 2 mintavételi időpontból (szeptember és október) kerültek szekvenálásra 5-5 ismétlésben. Sajnos a szürkerothadt bogyókból néhány esetben nem sikerült megfelelő minőségű DNS-t kivonni, így a szeptemberi minták közül 4 ismétlés, az októberi minták közül mindösszesen 2 ismétlésből dolgoztunk. Azért redukáltuk le a szekvenálandó minták számát a kiválasztott 3 bogyótípusra, mivel ez az eljárás igen költséges, ám azt feltételezzük, hogy az általunk megfogalmazott kérdésekre ezen adatok birtokában megfelelő választ kaphatunk.

5.6 RNS metatranszkriptomikai szekvenálás

A kivont RNS-t újgenerációs metatranszkriptomikai szekvenálással egy megbízás alapján a debreceni UD Genomed Kft végezte, Illumina NextSeq500 platformon, 14 Mread/minta biztosításával. Az RNS kivonatok esetén sem szekvenáltunk meg minden begyűjtött mintát, mely kivonatok esetében kizárólag furmint szőlőfajtából származó, szeptemberben, októberben és novemberben gyűjtött mintákból, 5 biológiai

ismétléssel dolgoztunk. Néhány minta esetében nem sikerült megfelelő minőségű RNS-t kivonni, így azok esetében kevesebb ismétlésszámmal dolgoztunk (szeptember IV fázis: 4 ismétlés, október III fázis: 4 ismétlés, október szürkerothadás: 3 ismétlés). A DNS mintákhoz hasonlóan úgy terveztük meg az RNS szekvenálásra kerülő mintákat, hogy azok megfelelő adatot szolgáltatassanak a felállított hipotézisek teszteléséhez.

5.7 DNS amplikon szekvencia adatok feldolgozása

A nyers DNS-szekvenciákat az R szoftverkörnyezetben (R Development Core Team 2023) implementált dada2 csomaggal (Callahan, et al., 2016) dolgoztuk fel, amelyet a DNS-szekvenciák finom variációjának felismerésére terveztek (a programmal minőségi szűrést, primer eltávolítást és amplikon szekvencia variáns csoportokba való rendezést végeztünk). Mivel a dada2 nem foglalja magában a szekvenciák operatív rendszertani egységekbe (Operational Taxonomic Unit, OTU) történő klaszterezését, ám a szekvenálás során keletkezett nem valós adatok eltávolítására elég robusztus, az egyedi amplikonszekvencia-variánsok (ASV), mint kimeneti adatok a mintákban található gombák intra- és interspecifikus genetikai variációját egyaránt tartalmazza. Ez lehetővé teszi a faj szintű különbségek feltárását az inter- és intraspecifikus kölcsönhatásokban. A nyers szekvenciákat 240 bázispárra vágtuk le a forward és 200 bázispárra a reverse szekvenciák esetében, majd zajsűrés és kiméra-sűrés után egyesítettük a szekvencia-változatokat és klaszterekbe soroltuk. Az egy read-ben megengedett maximális várható hibák száma 2 volt. A gombák taxonómiai hozzárendelését az úgynevezett „dynamic delimitation” módszeren alapuló (Köljalg, et al., 2013), az összes gombafaj-hipotézist reprezentáló referenciaszekvenciákat tartalmazó UNITE adatbázis (<https://unite.ut.ee>) alapján, a USEARCH v.11 (<https://www.drive5.com/usearch/manual/>) (Edgar, 2010) program segítségével végeztük el.

5.8 MetaRNS szekvencia adatok feldolgozása

Az RNS read-ek minőségét a FastQC v0.11.5 (Babraham Bioinformatics, Cambridge, Egyesült Királyság) segítségével értékeltük. A read-ek szűréséhez a Trimmomatic v0.36-ot használtuk a TruSeq2-PE adaptorok eltávolítására a következő beállításokkal: „single clip threshold” = 10, „indrom threshold” = 30, valamint „seed mismatch” = 2, Bolger és mtsai. módszere alapján (Bolger, et al., 2014). Ezután a szekvenálási read-eket a minőségük szerint szűrtük a FASTX-TOOLKIT segítségével, konkrétan a fastq_quality_filtert a következő küszöbértékre beállított paraméterekkel: -Q33 -q30 -p50. Ezután a szűrt szekvenciákat az említett tanulmányok (Pell, et al., 2012) alapján a Khmer v2.1.1 Python script-tel (Howe, et al., 2014) normalizáltuk a következő beállítási paraméterekkel: -k20 -C20 -N4 -X 50e9. Ezt követően a nagy lefedettségű read-ek alacsony abundanciájú fragmentumait a filter-abund py -V paranccsal távolítottuk el. Az így kapott jó minőségű read-eket a *B. cinerea*, *A. alternata*, *A. pulullans*, *E. nigrum* és *R. graminis* referencia genomhoz igazítottuk (van Kan, et al., 2017), majd egy Python szkript segítségével a Salmon 1.3.0 verzióját használva (Patro, et al., 2017) a megfelelő génekre szabdaltuk. Ezt követően a transzkript génekhez génneveket kapcsolunk az egyes genomok GIF annotációjának felhasználásával az R-ben található GenomicFeatures csomag segítségével (Lawrence, et al., 2013). A RNS-szekvenciákat az NCBI-ban a BioProject PRJNA736205 és a BioSAMPLE SAMN19612984 alatt tettük hozzáférhetővé.

5.9 Alapvető statisztikai módszerek

Mind az textúraadatok mind az újgenerációs szekvenálással előállított adatokat alapvető statisztikai elemzésnek vetettük alá. Megvizsgáltuk az adathalmaz általános tulajdonságait, eloszlását, az esetleges kiugró (outlier) adatokat és egyszerű szignifikáns eltéréseket kerestünk az általunk definiált mintacsoprotok között, úgy mint mintagyűjtési idő, aszúsodási fázis, szürke vagy nemesrothadás stb...

A szőlőbogyók textúraadatai minta-típusonként, azaz az aszúsodási típus, mintagyűjtési időpont és szőlőfajta szempontjából 30-30 ismétlésben állnak rendelkezésre, ám fontos azt megjegyezni, hogy a textúraméréshez felhasznált bogyók nem azonosak a DNS vagy RNS kivonáshoz használt bogyókkal, illetve a textúramérések esetében is különböző bogyókat mértünk le a kompressziós és penetrációs tesztekben. Annak érdekében, hogy az adatok megfelelően összevethetők és kombinálhatók legyenek a 30-30 mérés átlagát és szórását használtuk föl az egyes kategóriákban. A DNS és RNS kivonásokat 5-5 biológiai ismétlésben végeztük el, melyekhez a számított textúraparaméterek átlag és szórás adatainak segítségével Gauss-eloszlású véletlenszerű adatokat generáltunk. Ezáltal egy adott típusú mintához rendelkezésre állt minden meghatározott textúraadat és génexpressziós adat is.

Az alapvető statisztikai elemzéseket a R programkörnyezetben R Studio felhasználói felületen végeztük (R version 4.2.0, R Studio „Prairie Trillium” 2022.02.1). A tématerületen használatos programcsomagokat használtuk a különböző módszerekhez, az adatok normálásához és a varianciaanalízis elkészítéséhez és a Tukey HSD szignifikancia számításához (ggplot2 (Wichham, 2011), ggpubr (Kassambara, 2020), tidyverse (Wickham, et al., 2019), broom, AICcmoavg (Mazerolle & Maintainer, 2017), vegan (Oksanen, et al., 2007)). A minták közötti szignifikáns különbség $p=0,05$ szignifikancia szinten került meghatározásra minden esetben. Korábbi tanulmányban (Hegyi-Kaló, et al., 2020) elemeztük a textúra tulajdonságokat, azok aszúsodási típus és mintagyűjtési idő, valamint szőlőfajta szerinti szignifikáns különbségeit. Jelen munka során a DNS adatokból meghatározott ASV adatok abundancia és gyakoriság (richness) értékeit vetettük össze a különböző kategóriák között, valamint ugyanezt végeztük el a génexpressziós adatok abundancia és gyakoriság értékeivel is. Mindkét szekvenciaadatsor esetében Bray-Curtis távolságmetrikát alkalmazva mind PCA, mind NMDS ordinációt is számítottunk. Azért volt szükség a 2D ábrázolás alapján eldönteni melyik ordinációs metódus felel meg jobban a célkitűzéseinknek, mivel a PCA ugyan az adatok legnagyobb szórását emeli ki, ám a génexpressziós adathalmaz nagysága több mint 5000 dimenziós, melyet 2D-re redukálva az információ nagy része elveszhet. Erre némiképp megoldást jelent az NMDS amely a lehető legnagyobb mértékben megtartja az adatpontok távolságát, ám a leginkább szignifikánsan meghatározó változókra kevésbé érzékeny. Mind a transzkriptomikai, mind a gombaközösség adatok esetében az NMDS ordináció bizonyult megfelelőbbnek, így jelen munkánk során ezt használtuk. Az ordináció során vizualizált kategóriák közötti elkülönülés mértékét és az elkülönülés szignifikáns mivoltát permutációs variancia analízissel (PerMANOVA) ellenőriztük.

5.10 DNS adatok elemzése

Az amplikonszekvenálással nyert DNS adatokat előzetes feldolgozás után bioinformatikai módszerekkel értelmeztük. A gombaközösségi mátrixot, amely a mintákban azonosított ASV-k esetén az adott ASV-hez tartozó read-ek számát tartalmazza a legkisebb könyvtárméretre (413 538 read) történő véletlenszerű

almintavétellel normalizáltuk (ritkítottuk), mintánként a vegan R csomagban található `rrarefy` függvény segítségével (Oksanen, et al., 2007). A csak egy mintában előforduló ASV-ket kizártuk, így a végső elemzésekhez 1157 ASV-t kaptunk. A kategorikus változók (azaz a rothadás típusa és a mintavétel ideje) a minták közötti gombafajok gazdagságára (azaz az ASV-k számára) és gyakoriságára gyakorolt szignifikáns hatásának tesztelése érdekében az egyváltozós és kétváltozós varianciaanalízist végeztünk. A szignifikáns páronkénti különbségeket Tukey HSD különbségtesztjével azonosítottuk. A gombafajok körében az ASV-abundanciát és -gyakoriságot boxplotként grafikusán ábrázoltuk a `ggplot2` R csomag (Wickham, et al., 2019) segítségével. A minták közötti összetételbeli különbségeket nem metrikus többdimenziós skálázással szemléltettük a Bray-Curtis távolságmértékkel a gyakoriság-mátrixon, a metaMDS függvényt használva (vegan csomag) 999 permutációval. Permutációs többváltozós ANOVA-t (PERMANOVA) végeztünk a bogyótípus és a mintavételi időpont által magyarázott variáció mennyiségének becslésére az `adonis` függvénnyel (vegan csomag) 999 permutációval. A különböző bogyótípusok esetén meghatároztuk a legabundánsabb gombanemzetségeket, amelyeket az RNS adatok elemzésekor felhasználtunk. Erre azért volt szükség mivel metaRNS adatelemzés esetén a szekvenciákat egy referenciagenomhoz kell illeszteni, így szükség van taxonokat (nemzetség szinten) meghatározni, hogy mely referenciagenomok kerüljenek kiválasztásra az illesztéshez.

5.11 RNS adatok elemzése

Az RNS adatok elemzéséhez az R (R Core Team, 2023) statisztikai szoftvert használtuk. ANOVA és Tukey HSD-tesztet végeztünk az összes *B. cinerea* funkcionális gén abundanciájának és gyakoriságának elemzésére a négy aszúsodási fázis és a három mintavételi időpont szerint, valamint a szürke és nemesrothadási típusok esetében két mintavételi időpont szerint. Ezzel a vizsgált gének mennyiségi eloszlását elemezzük, amely egy összképet ad a további statisztikai vizsgálatok megtervezéséhez és megértéséhez. A funkcionális gének fázisok és időpontok közötti trendjeinek vizualizálására a korábban is használt NMDS ordinációt (Vegan R csomag segítségével) alkalmaztunk az összes *B. cinerea* gén esetében az arányok normalizált gyakorisági értékek mediánjára (Oksanen et al. 2007). Az adatokat futtatásonként 9999 iterációnak vetettük alá a Bray-Curtis-féle disszimilaritást és egy véletlenszerű kezdőszámot használva.

A funkcionális génösszetétel változásainak összehasonlítására az aszús fázisok között páros differenciális expressziós (DE) elemzést végeztünk az I.-II., a II.-III., illetve a III.-IV. fázisok között a DESeq2 R csomag segítségével (Love, et al., 2014). A szignifikánsan, differenciálisan expresszált gének küszöbértékeként 0,05 p-értéket és 1 $\log_2$ (fold change) értéket határoztunk meg.

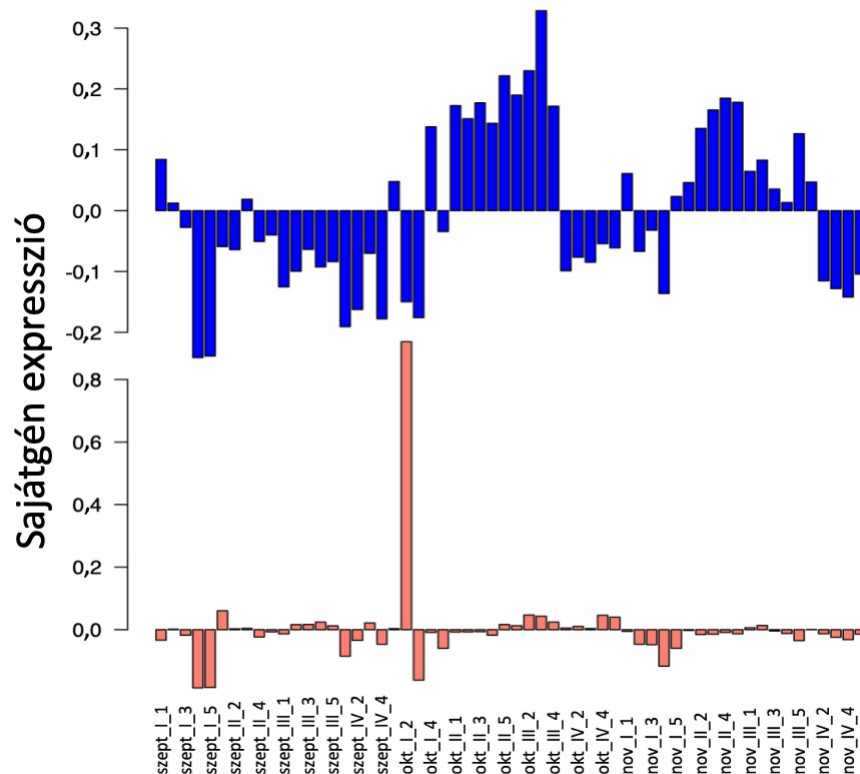
Az expresszált géneket tartalmazó adatsort hálózatelemzési módszerrel modulokba soroltuk. Ennek a módszernek a részletei a következő fejezetben kerül kifejtésre, ám itt fontos megemlíteni egy ott definiált elemet az NRCM (Noble Rot Connected Module) modulokat. Ezek olyan modulok (gének egy részhalmaza), amelyek sajátértékei az aszúsodási fázisokkal összefüggésbe hozható képet mutat, részletesen az eredmények fejezetben foglalkozunk velük.

A szomszédos fázisokhoz tartozó, differenciálisan expresszálódó, felül vagy alul szabályozott funkcionális géneket NRCM-tagság alapján rendeztük és csoportosítottuk. Például a kék modulban az I. és a II. fázis között szignifikánsan megnőtt a saját gén expressziója. Ezért a kék modulból az I. és II. fázis között felfelé szabályozott összes gént kiválasztottuk a további funkcionális elemzésekhez. Ugyanígy jártunk el az összes NRCM modul differenciálisa kifejeződő géneivel is. A

megfelelő modulokból kiválasztott differenciális gének génontológiai elemzését a topGO R csomag (Alexa & Rahnenführer, 2009), míg az útvonalak feldúsulásának elemzését a KOBAS v 2.0 szoftvereszköz (Xie, et al., 2011) segítségével végeztük el. Azokat a génkifejeződéseket és útvonalakat, amelyek korrigált p-értéke $<0,05$ volt, szignifikánsan feldúsultnak tekintettük. A szignifikánsan feldúsult anyagsereútvonalakhoz kapcsolódó géneket a Uniprot adatbázisban (UniProt, 2015) azonosítottuk és az onnan kinyert információkat használtuk fel azok funkciójának leírásához.

5.12 Hálózatelemzési módszer a metatranszkriptomikai adatok elemzéséhez

A *B. cinerea* és egyéb kiválasztott gombák összes funkcionális génjének elemzésére, valamint a funkcionális gének expressziós szintjének a bogyótextúra adatokkal történő összevetésére a WGCNA R csomag (Langfelder & Horvath, 2008) segítségével súlyozott gén-koexpressziós hálózatelemzéssel (Weighted Gene Coexpression Network Analyses, WGCNA) vizsgáltuk. Elemzéseinket 100 minimális klasztermérettel futtattuk, Pearson korrelációt alkalmazva. A felskálázás hatványkitevőjét 12 értékben határoztuk meg és a modulösszevonási küszöbértéket 0,25-ben. A klaszterezést hálózati klaszter dendrogramként vizualizáltuk. A mért texturális paraméterek esetében Pearson korrelációs statisztikát számoltunk a gének és a fizikai paraméterek közötti szignifikáns korrelációk becsléséhez. Az együtt expresszáladó gének alkotta modulokat a sajátértékproblémájuk megoldásaként adódó úgynevezett „sajátgén”-nel reprezentáltuk. Ez a sajátgén jól jellemzi a modulon belüli gének együttes viselkedését, meghatározható a sajátgén mintánkénti elméleti abundanciája. A textúra paraméterek és a koexpressziós modulok közötti korrelációt és szignifikanciaszintet szintén kiszámítottuk. Azok a meghatározott koexpresszáladó modulok amelyek az aszúsodás folyamatával valamilyen összefüggést mutattak, azaz a sajátgén mintánkénti abundanciája akár a mintavételi időpontok akár az aszúsodási fázisok között szignifikánsan különbözött NRCM modulnak neveztük el (lásd 5. ábra) (Noble Rot Connected Modules, NRCM). Az NRCM-ek sajátgén-expressziós értékeinek felhasználásával ANOVA-tesztet végeztünk, hogy az NRCM-eken belül a szomszédos fázisok és időpontok közötti szignifikáns változásokat megtaláljuk. Ezenkívül Tukey HSD-tesztet végeztünk a szignifikáns növekedés vagy csökkenés vizsgálatára. Az egyes NRCM-ek szignifikáns növekedést és csökkenést mutató gének részhalmazát választottuk ki a GO és Pathway Enrichment elemzések számára.



5. ábra: A felső, kékkel jelölt oszlopdiagram egy olyan modul sajátgén expresszió profilját mutatja, amely NRCM, az alsó lazacszínű viszont egy nem NRCM modulét. A vízszintes tengelyen a mintanevek láthatók, a függőleges tengelyen a normált elméleti abundancia értékek. A vízszintes tengely felirata a jobb olvashatóság érdekében csak minden második oszlophoz tartozó mintanevet jelenít meg a következő módon: [mintagyűjtési hónap]_[aszúsodási fázis]_[ismétlés száma], ahol szept szeptembert, okt októbert, nov novembert jelöli.

Az egyes vizsgált modulokon belül meghatároztuk az úgynevezett „module membership” (kME) értéket is, amely az adott gén abundanciaértékeinek és a sajátmodulnak a korrelációja. Ez természetesen nem csak arra a modulra értelmezhető, amelyikbe beletartozik egy adott gén, hanem bármely másakra is. A modulon belül kME érték alapján sorbarendeztük a géneket, melyek közül a legnagyobb értékkel rendelkezőket „hub-géneknek” nevezzük. A pontos definíció szerint a $kME > 0,8$ és a legmagasabb 10 %-ba tartozó kME értékű gének tekinthetők hub-génnek. Ez adott esetben igen sok gén lehet, ilyenkor a száz legmagasabb kME értékűt szokás választani (Panahi & Mohammad, 2021). Ezeket a kiválasztott hub-géneket funcionálisan is megvizsgáltuk, hiszen a transzkriptomikai koexpressziós hálózatban ezek fontos szerepet töltenek be. A gének funkciós azonosításához a Uniprot adatbázist használtuk (UniProt, 2015).

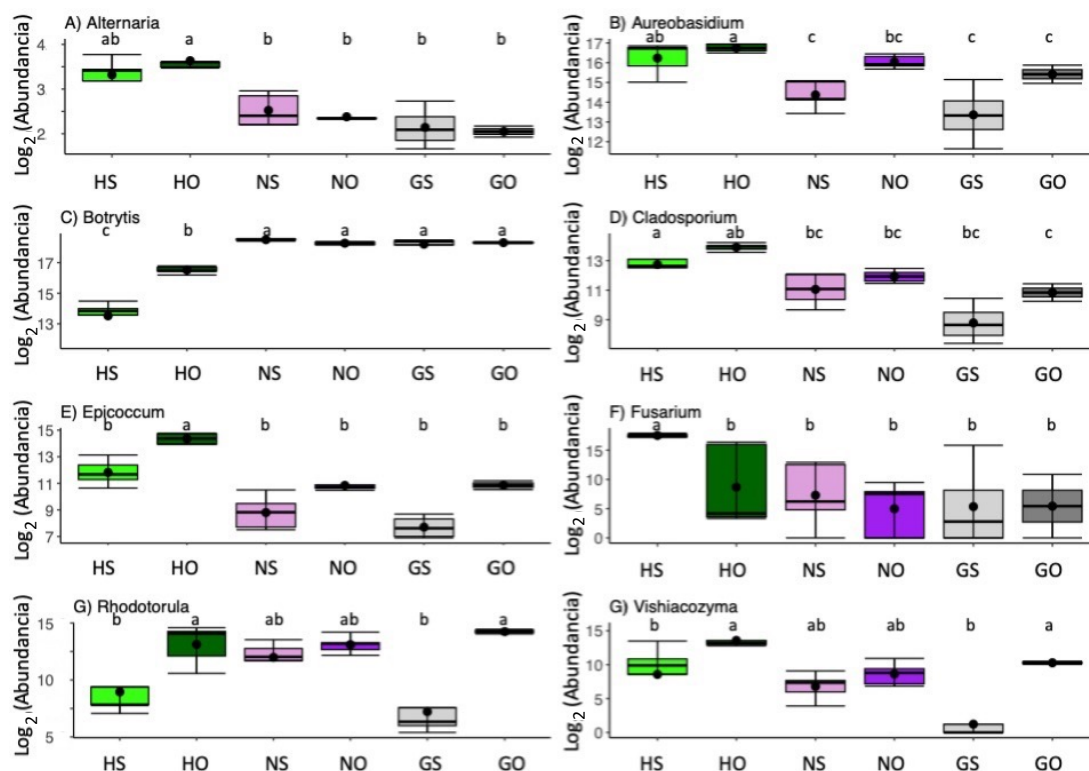
6. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE

6.1 A aszús és szürkerothadt bogyók gombaközösségének összetétele

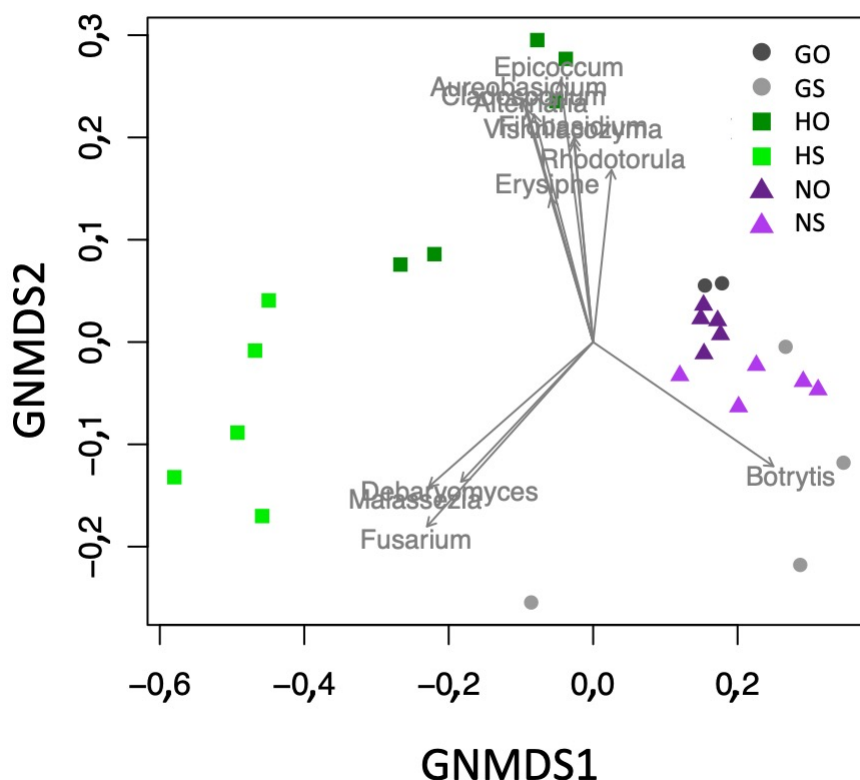
Ebben a fejezetben az aszús és szürkerothadt bogyók DNS amplikon szekvenálással meghatározott gombaközösségeket jellemezzük, mely eredményeket a továbbiakban arra használjuk, hogy kiválaszthassuk azokat a legabundánsabb fonalgombákat és élesztőgombákat amelyek esetében transzkriptomikai elemzést végzünk.

A fejezetben a begyűjtött I és IV fázisú szőlőbogyókon, valamint a szürkerothadt szőlőbogyókon található gombák közösségi összetételét mutatom be. Technikai okok miatt a szürkerothadt bogyókra a továbbiakban VI. fázisú bogyóként hivatkozunk (azért nem V. fázis mivel más tanulmányokban is felhasználtuk az említett mintákat, amelyek esetében az V. fázis a zöld bogyós állapotot jelölte).

A DNS amplikon szekvenciákat ASV-kre, azaz amplikon szekvencia variánsokra (amplikon sequence variant) osztottuk. Az egyedi ASV-ket meghatároztuk, mely nemzetséghez tartoznak, így kaptunk egy gombanemzetségekre osztott adathalmazt, melynek az egyes mintatípusokhoz (rothadási típus és mintagyűjtési hónap) tartozó abundanciájának kettes alapú logaritmusát doboz-diagramon ábrázoltuk (6. ábra). Az ábráról leolvasható, hogy általánosságban a három fázis elkülönül egymástól, az eloszlások átlaga vagy szórása különböző nagyságú, ám több esetben ez az elkülönülés a Tukey HSD teszt alapján nem szignifikáns.



6. ábra: A DNS amplikon szekvenálási adatok során vizsgált három fázis (egészséges – H, nemesrothadt – N és szürkerothadt – G) és két hónap (szeptember – S és október – O) bogyóiban meghatározott, a nyolc legmagasabb összabundanciával rendelkező nemzetségek abundancia eloszlása (kettes alapú logaritmusos skálán ábrázolva). A dobozok fölötti kisbetűk a Tukey HSD teszt során meghatározott szignifikancia csoportokat jelölik.



7. ábra: A legfontosabb, legmagasabb abundanciájú gombanemzetségek szerinti ASV összetétele a DNS amplikon szekvenálási adatok során vizsgált három fázis (egészséges – H, nemesrothadt – N és szürkerothadt – G) és két hónap (szeptember – S és október – O) esetében. A különböző mintatípusok jó elkülönülést mutatnak.

Annak érdekében, hogy lássuk, a vizsgált legfontosabb nemzetségekhez tartozó ASV-eket figyelembe véve megkülönböztethetőek-e a mintatípusaink NMDS ábrázolást készítettünk mely a 7. ábrán látható. Az elkülönülés mértékét a Permanova analízis jellemzi, mely szerint a fázis 20%-ban magyarázza azt 0,017-es p-értékkel, míg a mintagyűjtés ideje alacsony százalékban, nem szignifikáns módon jelenik meg az ábrázolásban.

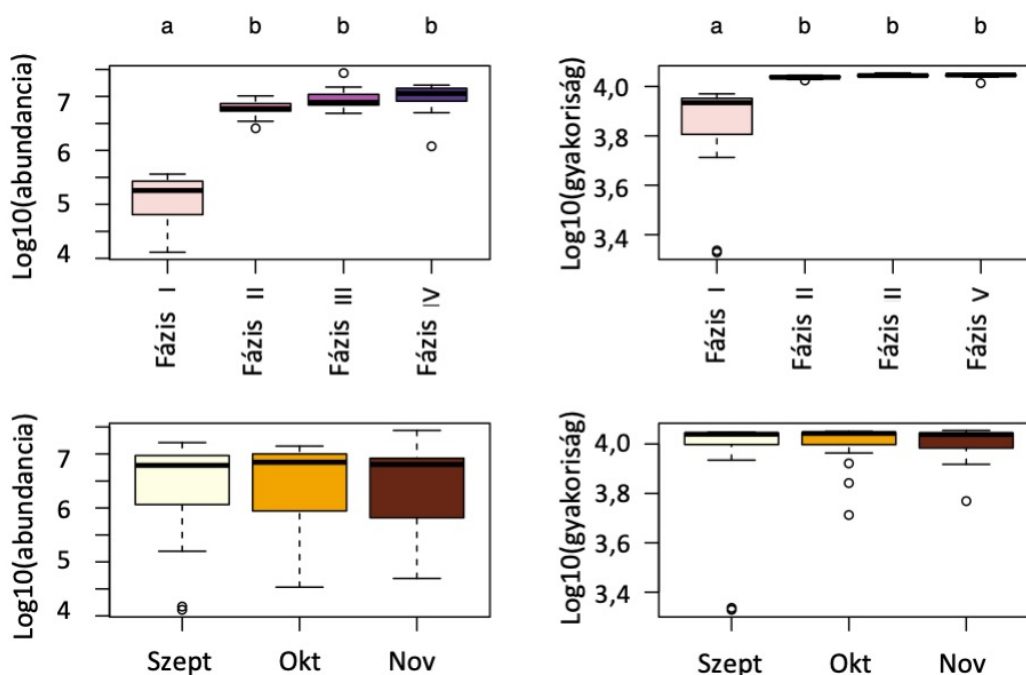
Ezek alapján önkényesen úgy döntöttünk, hogy a *Botrytis* mellett a későbbi transzkriptomikai adatok vizsgálatához kiválasztunk két fonalasgomba és két élesztő nemzetséget, amelyekből megfelelő referencia genom (GTF fájl) áll rendelkezésre nyilvános adatbázisokban (NCBI) és abundanciájuk a lehető legmagasabb. Így esett a választás az *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Epicoccum* és *Rhodotorula* nemzetségekre. Természetesen más nemzetségek vizsgálatára is van lehetőség, olyanokéra melyek például szőlészeti vagy borászati szempontból fontosak. Ilyen vizsgálatokat a későbbiekben el fogunk végezni, ám ez nem képezi e munka tárgykörét.

6.2 A *Botrytis cinerea* génexpressziós profiljának tulajdonságai az aszúsodás során

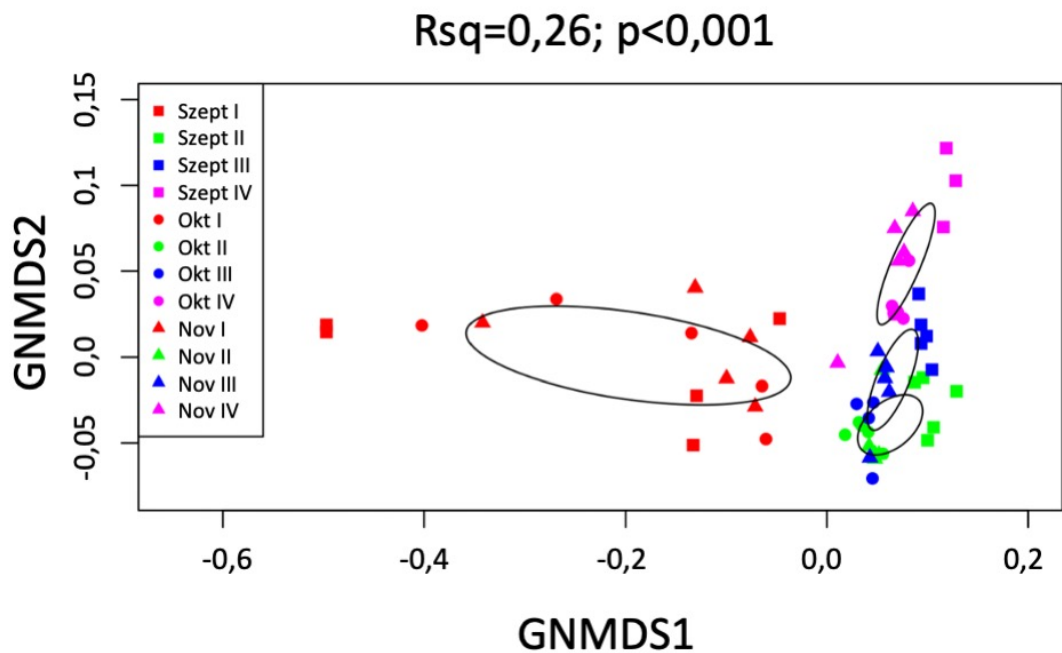
A következő fejezetekben rátérünk a kivont és szekvenált teljes RNS adatokból kapott eredmények tárgyalására. Első körben az aszúsodás folyamatát, tehát az I-IV fázisokat vizsgáljuk, azon belül is a *Botrytis cinerea* referenciagenomjához annotált géneket.

Az aszúsodás négy fázisában gyűjtött mintákból kinyert RNS szekvenciák tulajdonságait mutatom be. A transzkriptomikai adatokat először mennyiségi módon elemeztük, majd klasztereztük és funkcionális tulajdonságait vizsgáltuk.

A *B. cinerea* transzkriptek abundanciájának és gyakoriságának eloszlása szignifikáns növekedést mutatott az aszúsodás I. fázisa (egészséges) és az összes többi fázisa (II, III, IV) között, de későbbi fázisok között nem volt szignifikáns változás. Sem az abundancia, sem a gyakoriság tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes mintavételi hónapok között (8. ábra). Az NMDS módszerrel ábrázolt ordinációs diagrammok (9. ábra) erős elkülönülést mutattak az aszúsodási fázisok között, míg a mintavételi időnek kisebb hatása volt a minták közötti elkülönülésre. Ez utóbbit a PERMANOVA-teszt is bizonyította, amely azt mutatta, hogy a variancia 26%-át a fázisok ($F = 19,712$, $P < 0,01$, $r^2 = 0,26$), míg 6,6%-át a mintavételi időpont ($F = 4,01$, $P < 0,01$, $r^2 = 0,066$) határozta meg.



8. ábra: Az ábrán a *Botrytis cinerea* expresszált génjeinek abundancia-összegét láthatjuk a különböző aszúsodási fázisú és mintagyűjtési időpontú mintacsoportokban. Megfigyelhető, hogy az I. fázis és a többi fázis között van kizárólag szignifikáns eltérés, mind az abundanciát, mind a gyakoriságot figyelembe véve.



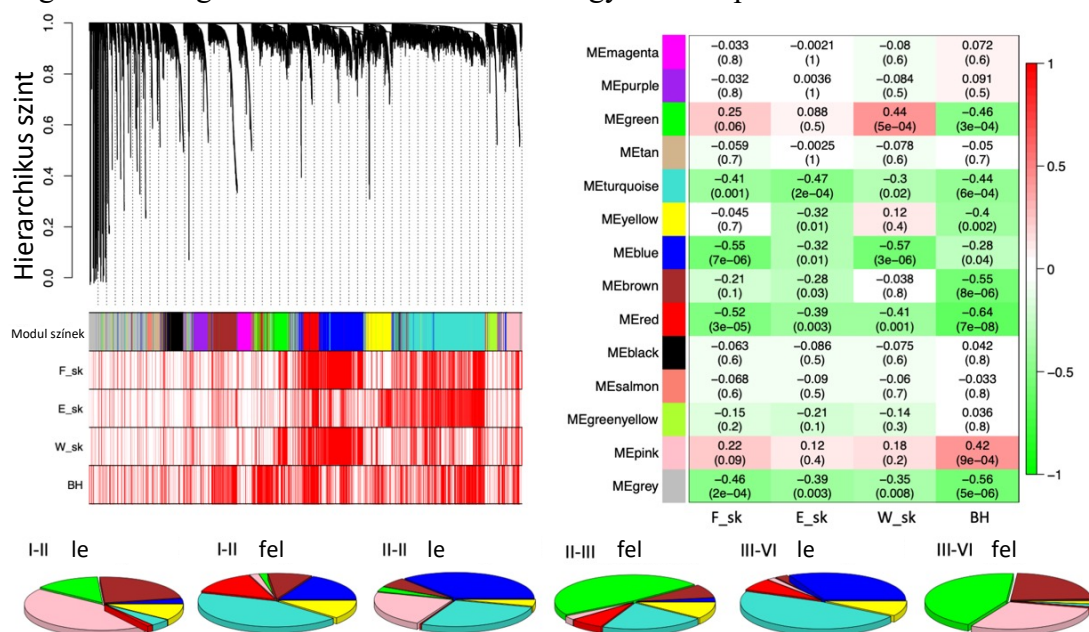
9. ábra: A szeptember-október-novemberi kombinált adatok NMDS-ordinációs ábrája *Botrytis cinerea* nemes rothadási fázisok (I-IV) funkcionális génjeinek különböző hónapokban gyűjtött (szeptember, október, november) minták között megfigyelt abundanciája alapján. Az egyes fázisok síkban vett középpontjától mért egységnyi eltérést ábrázoló ellipszisek (centroid) nem mutatnak átfedést, vagy csak kevés átfedést mutatnak, ami azt jelzi, hogy a kifejezett funkcionális gének összetételében erős különbség van az aszúsodás fázisai között, a mintavételi hónapok szerinti elkülönülés (adatpontok alakja alapján) viszont nem mutat ilyen mértékű elkülönülést.

6.2.1 Súlyozott gén-koexpressziós hálózat analízis (WGCNA)

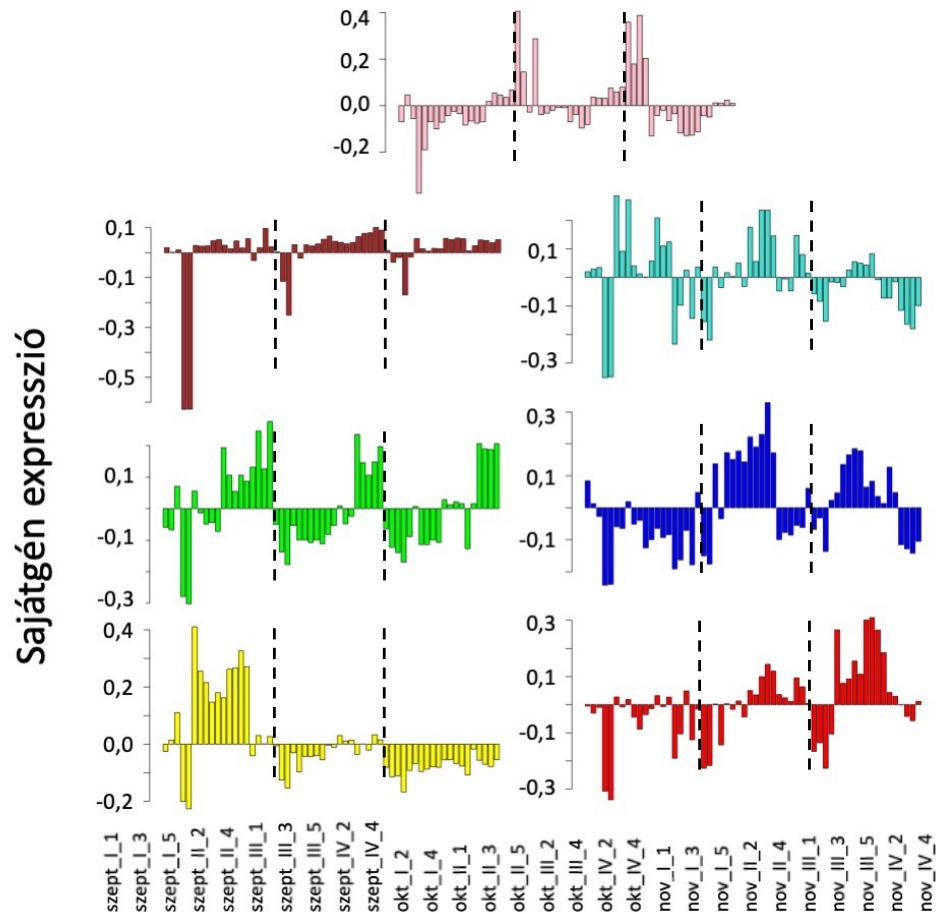
Az alfejezetben az aszúsodás során expresszált *Botrytis cinerea* gének alkotta koexpressziós hálózat tulajdonságait ismertetjük, valamint összevetjük azokat a bogyókon mért textúra paraméterekkel.

A *Botrytis cinerea* által expresszált gének alkotta hálózat belső szerkezetének megismeréséhez WGCNA klaszterezést végeztünk, hogy a funkcionális gének együtt történő kifejeződését modulokba soroljuk. Ezeket a színeket szokásos módon angol nyelven közöljük, hiszen a színnek magának jelentése nincs, kizárólag a vizualizációt segíti. A WGCNA-klaszterezési elemzésekből 13 különböző, több mint 100 tagot tartalmazó koexpressziós modult alkottunk (10. ábra). Megállapítottuk, hogy a bogyóhéj átszakításához szükséges erő (F_{sk}) negatív korrelációt mutat a *turquoise*, *blue* és *red* modulokkal. Hasonlóképpen, a bogyóhéj rugalmassági tényezője (E_{sk}) szignifikáns negatív korrelációt mutatnak a *turquoise*, *yellow*, *blue*, *brown* és *red* modulokkal. A bogyóhéj átszakításához szükséges munka (W_{sk}) szignifikánsan pozitív korrelációt mutatott a *green* modullal, de negatív korrelációt a *turquoise*, *blue* és *red* modulokkal. A bogyók keménysége (BH) szignifikánsan pozitív korrelációt mutatott a *pink* modullal, de negatív korrelációt a *green*, *turquoise*, *yellow*, *blue*, *brown* és *red* modulokkal. A modulok közül a *turquoise*, *blue*, *brown* és *red* modulok mutatták a legjelentősebb negatív korrelációt a textúra paraméterekkel, amint azt a 10. ábra ún. „hő térkép” része mutatja. A *blue*, *brown*, *green*, *pink*, *red*, *yellow* and *turquoise*

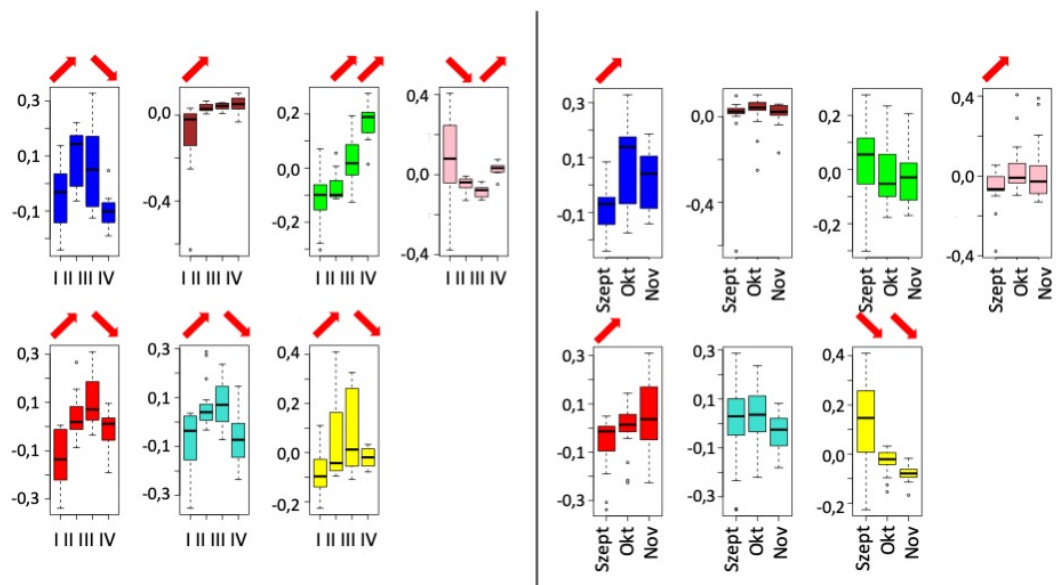
modulokat ún. NRCM moduloknak nevezzük, amelyek az aszúsodási fázisok vagy mintagyűjtési hónapok által meghatározott, azzal szemléletes módon összefüggést mutató sajátgén-kifejeződési profilt mutattak (11. ábra), míg a többi hat modul sajátgén-kifejeződési profilja elkülönült és nem volt összefüggésbe hozható. A *Botrytis cinerea* gének abundanciája Tukey HSD-teszt alapján szignifikáns különbséget mutatott az I. és a II. fázis között, de nem volt szignifikáns különbség a II. fázis, a III. fázis és a fázis között. A 11. ábrán látható NMDS-ordinációs ábrázolás azonban szemléletes elkülönülést mutatott a fázisok között. Az I. fázisból a II. fázisba való átmeneten belül a gének 84%-a olyan modulokba klasztereződött, amelyek szignifikáns negatív korrelációt mutattak a bogyótextúra paramétereivel.



10. ábra: A *Botrytis cinerea* gének négy nemes rothadási fázisában kifejezett koexpressziós hálózatának elemzése. A baloldali felső ábrán látható hierarchikus klaszterezési fa a gének korrelációja alapján lett konstruálva, amely alatt a funkcionális géneket 13 modulba rendezése található, 100 vagy annál magasabb számú modul nagysággal és 0,25 koexpressziós küszöbértékkel. A texturális paramétereknek megfelelő piros sávok szignifikáns ($p < 0,05$) korrelációt jeleznek a funkcionális génekkel. A jobb oldali hőtésképen a 13 modul sajátgénjének és a különböző textúra paraméterek (F_sk: bogyóhéj keménység, E_sk: bogyóhéj rugalmasság, W_sk: bogyóhéj átszakításához szükséges munka, BH: bogyókeményesség) korrelációja és zárójelben a hozzá tartozó p-értékek láthatók. A kördiagramok a differenciális génexpressziós eredményeket szemléltetik, azaz hogy a különböző szomszédos fázisok között fel- vagy leszabályozott funkcionális gének milyen arányban oszlanak meg az egyes NRCM modulok között. Az ábra a WGCNA programcsomag beépített ábrázoló szkriptjével lett készítve, melyben nem lehetséges az angolban használatos tizedespontot tizedesvesszőre lecserélni, így ezen az ábrán a decimálist tizedespont jelöli.



11. ábra: A *B. cinerea* génexpressziós hálózatban meghatározott NRCM modulok fentről lefelé, jobbról balra, rendre: *pink*, *brown*, *turquoise*, *green*, *blue*, *yellow* és *red*. A vízszintes tengely feliratait az 5. ábrához hasonlóan kerültek feltüntetésre. A szaggatott függőleges vonalak a mintavételi hónapokat választják el az ábrák jobb áttekinthetősége érdekében.



12. ábra: A modulokhoz tartozó sajátgének abundancia értékeinek eloszlása az aszúszódási-fázisok (balra) és a mintavételi időpontok (jobbra) között az NRCM modulok tekintetében egyirányú ANOVA-modellek alkalmazásával. Piros nyilak jelzik a szomszédos fázisok vagy hónapok közötti szignifikáns növekedést vagy csökkenést.

A meghatározott NRCM modulokhoz tartozó sajátgén expressziós szinteket ANOVA és Tukey HSD teszt segítségével elemeztük, hogy meghatározzuk mely fázisok vagy mintagyűjtési hónapok között nő vagy csökken szignifikánsan ez az érték. Az ilyen változások az adott modulba tartozó gének halmazát együtt jellemzik, így érdemes ezeket a mintatípus-párokat összehasonlítani differenciális génexpressziós vagy génontológiai módszerekkel. A 12. ábrán láthatjuk a meghatározott szignifikáns növekedést vagy csökkenést a sajátgénexpressziót illetően, melyet a dobozok fölötti piros nyilak jelölnek.

6.2.2 Differenciált génexpressziós elemzés

A fejezetben az I-IV. aszúsodási fázisú mintákból meghatározott Botrytis cinerea gének differenciális expressziós tulajdonságait elemezzük, majd a következő fejezetben meghatározzuk a differenciálisan expresszált gének funkcióit.

A nemesrothadási folyamat különböző fázisai esetén 8089 gént sikerült azonosítanunk, melyek valamely két fázis között szignifikánsan különböző abundanciával fejeződtek ki. Az I. és II. fázis között 1094 gén eltérő kifejeződését találtuk, melyek nem mutattak változást a II. és III. fázis között, de a II. és IV. fázis között lefelé szabályozódtak. Az I. és a II. fázis között összesen 440 gén volt differenciálisan expresszált, amelyek egyik további fázis között sem voltak szignifikánsan különböző abundanciájúak. A II. és III., valamint a III. és IV. fázis között 319, illetve 870 egyedi gént találtunk felfelé szabályozottnak. Olyan gén, amely kizárólag a III. és IV. fázis között volt lefelé szabályozott 2932 db-ot találtunk. A nemesrothadási folyamat korai szakaszában (a II. és III. fázis között) összesen 1126 gén esetében találtunk lefelé szabályozódást. Végül 344 génről derült ki, hogy az aszúsodás korai szakaszaiban lefelé szabályozott, de az utolsó szakaszban felfelé szabályozott. A 2. táblázat a differenciális expressziós elemzések összes és egyedi fel- és leszabályozott gének számosságát mutatja.

2. táblázat A differenciálisan kifejeződő funkcionális gének megoszlása az aszúsodási fázisok között. A felfelé mutató nyilak felszabályozást, a lefelé mutató nyilak leszabályozást jeleznek, a zérus jelzi, hogy a fázisátmenetek tekintetében nincs különbség az expressziós szintben.

I-II Fázis	II-III Fázis	III-IV Fázis	Differenciálisan expresszált gének száma
↑	↑	↑	3
		∅	25
		↓	19
	∅	↑	41
		∅	440
		↓	1094
	↓	↑	3
		∅	26
		↓	50
∅	↑	↑	167
		∅	319
		↓	94
	∅	↑	870
		∅	nem releváns
		↓	2932
	↓	↑	20
		∅	110
		↓	137
↓	↑	↑	33
		∅	35
		↓	5
	∅	↑	344
		∅	1126
		↓	161
	↓	↑	8
		∅	13
		↓	23

6.2.3 Gén-ontológia és a metabolikus útvonalak feldúsulása

Az összes NRCM valamennyi jelentős fázisátmenetében számos feldúsult gént és útvonalat azonosítottunk. Ezek közül a legtöbb a szénhidrát- és a fehérje-anyagcseréhez kapcsolódott, amelyek mindkettő fontos szerepet játszik az aszúsodás folyamata során (3. táblázat). A *brown* modul I-II. fázisában felfelé szabályozott gének közül a 17 feldúsult útvonal közül a "szénanyagcsere", a "fruktóz- és mannóanyagcsere", a "glikolízis" és a "butanoát-anyagcsere" géneket azonosítottuk. A *red* modulban az I-II. fázisból felszabályozott gének jelentősen feldúsultak a

"Keményítő- és szacharóz-anyagcsere" esetében. A *turquoise* modulban az I-II. fázistól felfelé szabályozott gének a "Galaktóz-anyagcsere", a "Glikolízis", az "Egyéb glikán anyagcsere" és a "Keményítő- és szacharóz-anyagcsere" tekintetében dúsultak fel. A szénhidrát-anyagcsere szintén feldúsult a III. és a IV. fázis között a botritizálódási folyamat végén, ahol a *green* modulban a felszabályozott gének a 'Szén-anyagcsere' és a 'Glikolízis', a *pink* modulban pedig a 'Szén-anyagcsere' és a 'Piruvát-anyagcsere' génjei dúsultak.

3. táblázat: Az NRCM-ek és a szignifikáns fázisátmeneteknek megfelelő, szignifikánsan feldúsult anyagcsere útvonalak listája.

Blue I-II felszabályozott	p-érték	Pink I-II leszabályozott	p-érték
peptidáz aktivitás	<0,001	szerves aromás kötés	<0,001
szerin-típusú peptidáz aktivitás	<0,001	heterociklikus kötés	<0,001
szerin hidroláz aktivitás	<0,001	RNS kötés	<0,001
katalitikus aktivitás fehérjén	<0,001	nukleinsav kötés	<0,001
hidroláz aktivitás	<0,001	kötés	0,007
karboxipeptidáz aktivitás	<0,001	DNS-irányított 5'-3' RNS polimeráz	0,014
szerin-típusú karboxipeptidáz aktivitás	<0,001	5'-3' RNS polimeráz	0,014
szerin-típusú exopeptidáz aktivitás	<0,001	RNS polimeráz	0,014
exopeptidáz aktivitás	0,002	aszparagin-típusú endopeptidáz aktivitás	0,035
katalitikus aktivitás	0,004	aszparagin-típusú peptidáz aktivitás	0,035
endopeptidáz aktivitás	0,007	purin ribonukleozid trifoszfát kötés	0,041
aszparagin-típusú endopeptidáz aktivitás	0,015	N-metiltranszferáz aktivitás	0,043
aszparagin-típusú peptidáz aktivitás	0,015	arginin N-metiltranszferáz aktivitás	0,043
ubikvitin-szerű fehérje-specifikus proteáz	0,026	protein-arginin N-metiltranszferáz	0,043
NEDD8-specifikus proteáz aktivitás	0,026		
Blue III-IV leszabályozott	p-érték	Red I-II felszabályozott	p-érték
szerin-típusú peptidáz aktivitás	<0,001	transzferáz aktivitás	0,018
szerin hidroláz aktivitás	<0,001	NAD ⁺ ADP-ribosziltranszferáz aktivitás	0,035
peptidáz aktivitás	<0,001	transzferáz aktivitás, pentóz	0,035
hidroláz aktivitás	<0,001		
katalitikus aktivitás	<0,001	Red III-IV leszabályozott	p-érték
karboxipeptidáz aktivitás	0,003	foszfataz aktivitás	0,001
szerin-típusú karboxipeptidáz aktivitás	0,003	foszforsavészter-hidroláz aktivitás	0,001
szerin-típusú exopeptidáz aktivitás	0,003	tirozin foszfataz aktivitás	0,007
hidroláz aktivitás, szén-nitrogén	0,006	hidroláz aktivitás, észter	0,013
exopeptidáz aktivitás	0,009	foszfoprotein foszfataz aktivitás	0,019
szerin-típusú endopeptidáz aktivitás	0,012		
katalitikus aktivitás, fehérjéhez kötött	0,013	Turquoise I-II felszabályozott	p-érték
DNS-kötés átírás faktor	0,020	kation kötés	<0,001
transzkripció szabályzás aktivitás	0,041	fém ion kötés	<0,001
Brown I-II felszabályozott	p-érték	foszfor csatorna kináz aktivitás	<0,001
antioxidáns aktivitás	<0,001	protein kináz aktivitás	<0,001
oxidoreduktáz aktivitás	<0,001	protein hisztidin kináz aktivitás	<0,001
peroxidáz aktivitás	<0,001	foszfotranszferáz activity, nitrogenous...	<0,001
„fatty-acyl-CoA” kötés	0,013	kis molekulaszensor aktivitás	<0,001
hidroximetilglutaril-CoA liáz aktivitás	0,013	kináz aktivitás	0,001
		foszfotranszferáz aktivitás, alkohol	0,003
		ion kötés	0,007

alanin-glioxilát transzamináz aktivitás	0,013
transzamináz aktivitás	0,013
transzferáz aktivitás, nitrogén	0,013
oxálsav -liáz aktivitás	0,013
peroxiredoxin aktivitás	0,013
acil-CoA kötés	0,013
zsírsav származék kötés	0,013
kén kötés	0,013
szén-szén liáz aktivitás	0,026
acetyl-CoA C-aciltranszferáz aktivitás	0,038
C-aciltranszferáz aktivitás	0,038
katalitikus aktivitás	0,047

Green II-III felszabályozott	p-érték
4 vas, 4 kén klaszter kötés	0,026
proteoszóma kötés	0,026

Green III-IV felszabályozott	p-érték
kétszálós RNS kötés	0,003
oxidoreduktáz aktivitás, kén	0,003
oxidoreduktáz aktivitás	0,013
peptidil-prolil cisz-transz izomeráz	0,046
cisz-transz isomeráz aktivitás	0,046

Pink III-IV felszabályozott	p-érték
RNS kötés	<0,001
nukleinsav kötés	<0,001
szerves ciklikus összetevő kötés	<0,001
heterociklikus összetevő kötés	<0,001
kötés	0,003
katalitikus aktivitás, RNS	0,004
DNS-vezérelt 5'-3' RNS polimeráz	0,017
endoribonukleáz aktivitás	0,017
ribonukleáz aktivitás	0,017
endoribonukleáz aktivitás	0,017
5'-3' RNS polimeráz aktivitás	0,017
3'-tRNS endoribonukleáz aktivitás	0,017
RNS polimeráz aktivitás	0,017
endonukleáz aktivitás, DNS, RNS	0,033
endonukleáz aktivitás	0,050
N-metiltranszferáz aktivitás	0,050
arginine N-metiltranszferáz aktivitás	0,050
protein-arginin N-metiltranszferáz	0,050

Yellow III-IV leszabályozott	p-érték
FMN kötés	0,006
hidroláz aktivitás, éter kötés	0,064

kötés	0,010
transzferáz aktivitás	0,011
katalitikus aktivitás	0,017
sejtváz fehérje kötés	0,029
ADP kötés	0,041
dsDNS kötés	0,047
dstDNS kötés	0,047
tiol-függő ubikvitin-specifikus kötés	0,047
mikrotubulus kötés	0,047
omega peptidáz aktivitás	0,047
tubulin kötés	0,047
tDNA kötés	0,047
ubikvitin hidroláz aktivitás	0,047

Turquoise III-IV leszabályozott	p-érték
kation kötés	<0,001
fém ion kötés	<0,001
kötés	<0,001
ion kötés	<0,001
foszfo-transzferáz aktivitás, alkohol	<0,001
kináz aktivitás	<0,001
„phosphorelay sensor” kináz aktivitás	<0,001
protein kináz aktivitás	<0,001
protein hisztidin kináz aktivitás	<0,001
foszfo-transzferáz aktivitás, nitrogén	<0,001
kis molekula érzékelés	<0,001
transzferáz aktivitás	<0,001
ADP kötés	0,003
GTPáz aktivátor aktivitás	0,004
enzim aktivátor aktivitás	0,004
GTPáz szabályzó aktivitás	0,006
nukleozid-trifoszfát szabályzó	0,006
molekula funkció szabályzó	0,006
enzim szabályzó aktivitás	0,008
foszfolipid kötés	0,010
foszfát-linozitol kötés	0,010
fehérje dimerizáció aktivitás	0,012
fehérje kötés	0,013
sejtváz fehérje kötés	0,019
adenil nukleotid kötés	0,039
adenil ribonukleotid kötés	0,039
cink ion kötés	0,044
átmeneti fém ion kötés	0,044

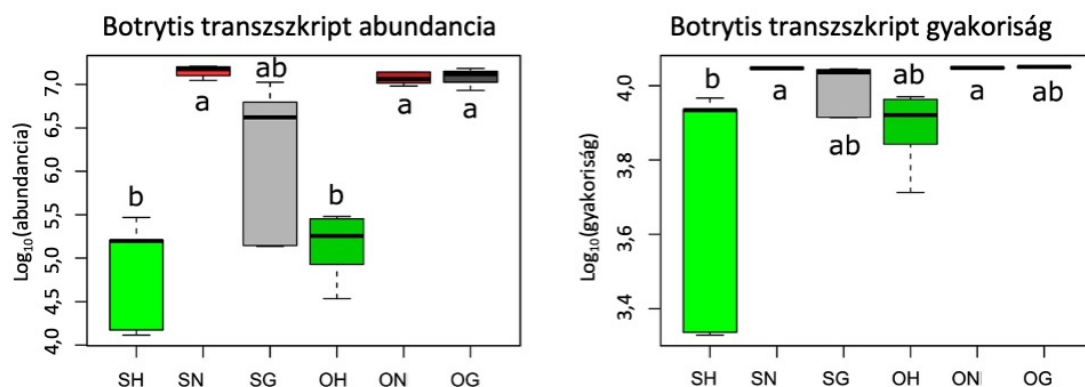
Yellow I-II felszabályozott	p-érték
aszparagin-típusú endopeptidáz aktivitás	0,009
aszparagin-típusú peptidáz aktivitás	0,009
transzferáz aktivitás	0,022
endopeptidáz aktivitás	0,027
peptidáz aktivitás	0,048

A *brown* modul I. fázisától a II. fázisig a fehérje-anyagcserével kapcsolatos, felfelé szabályozott génekben olyan feldúsult anyagcsereútvonalak találhatók, mint az "Alanin- és aszpartám-anyagcsere", a "Triptofán-anyagcsere", a "Valin-, leucin- és izoleucinanyagcsere", valamint az "Ubikvitin közvetítette proteolízis". Az aminosav-anyagcseréhez tartozó útvonalakon kívül a "ketontestek" útvonal is gazdagodott az I-II. fázisú *brown* modul felszabályozott génjei között. A *green* modul tekintetében a fehérje-anyagcseréhez tartozó olyan feldúsult útvonalakat azonosítottunk, mint az "Alanin és aszpartám anyagcsere", a "Béta-alanin", a "Cisztein és metionin anyagcsere" és a "Glicin, szerin és treonin", amelyek a nemesrothadási folyamatok későbbi, III. és IV. fázisa során feldúsultak. A szénhidrát- és fehérje-anyagcsere mellett a legtöbb modulban a másodlagos anyagcseretermékek képződéséért felelős útvonalakat is kimutattuk. Ezek a vegyületek szerepet játszanak az aszúbogyó borászati jelentőségű kifejlődésében, például az aromás vegyületek képződésében és az antibiotikus aktivitásban. Például a *pink* modulban mindkét jelentős fázisátmenet (az I. fázisból a II. fázisba, illetve a II. fázisból a III. fázisba felszabályozott gének) a "kén anyagcseréjéhez" kapcsolódó, jelentősen feldúsult útvonalakat tartalmazott. A *brown* modulban az "Alkaloid bioszintézis" útvonal az I. fázisból a II. fázisba történő felszabályozott gének között dúsult fel. Ugyanez az útvonal a *green* modulban a III. és IV. fázis között felfelé szabályozott gének között is gazdagodott. A feldúsult útvonalak teljes listája a 3. számú mellékletben található.

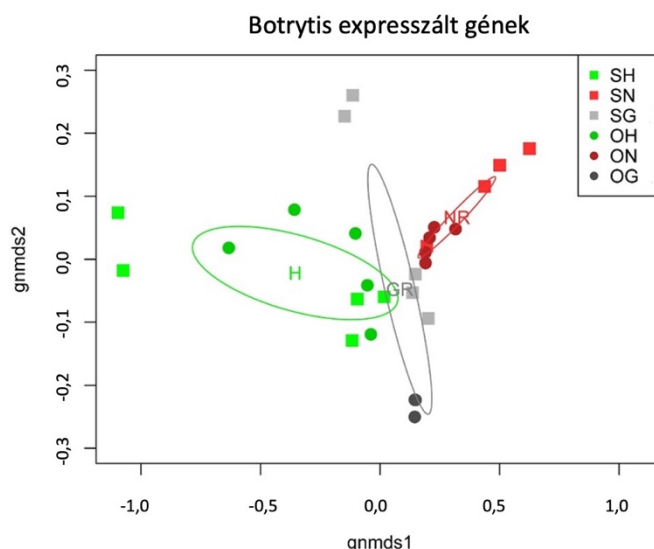
6.3 *Botrytis cinerea* génexpresszió különbségei nemes- és szürkerothadás esetében

A korábbiakkal szemben a 6.3 fejezetben az aszúsodás folyamatának vizsgálatáról rátérünk a nemes és szürkerothadás közötti különbségek vizsgálatára. Ebben a fejezetben is kizárólag a *Botrytis cinerea* géneket vizsgáljuk. Az előzőekhez hasonlóan először mennyiségi elemzéseket végzünk (ANOVA és NMDS) majd rátérünk a differenciális expressziós, gén-ontológiai és további funkcionális elemzésekre.

A *B. cinerea* funkcionális génjeinek abundanciája a nemesrothadás esetében magasabb volt, mint szürkerothadás esetében. Az egészséges szőlőbogyóból izolált RNS esetében a *Botrytis* gének abundanciája mindkét rothadási típushoz képest alacsonyabb volt. Ez a trend igaz a két vizsgált mintavételi időpontra, szeptemberre és októberre is (13. ábra). Ez azt mutatja, hogy csupán a gének abundanciájának vagy gazdagságának összegét vizsgálva a két rothadási típus között nem állapíthatunk meg különbséget és a mintavételi hónapok között sincs szignifikáns eltérés. Ezt a 14. ábráról leolvasható megállapítást a PERMANOVA teszt is megerősítette, ahol a *B. cinerea* funkcionális génjeinek abundanciája szignifikánsan elkülönülést mutatott mind a bogyórothadás típusok (beleértve az egészséges esetet is), ($F = 8,8097$, $p < 0,01$, $r^2 = 0,42629$), mind a mintavételi hónapok ($F = 2,0978$, $p < 0,01$, $r^2 = 0,06518$) esetében.



13. ábra: A *B. cinerea* funkcionális gének abundanciájának és gyakoriságának összehasonlítása a bogyórothadás típusok között egészséges bogyó (H), nemesrothadású bogyó (N) és szürkerothadású bogyó (G) esetében szeptember (S) és október (O) hónapokban ANOVA segítségével. A Tukey-féle HSD-tesztekkel számított szignifikáns különbségeket a különböző latin betűk jelzik.



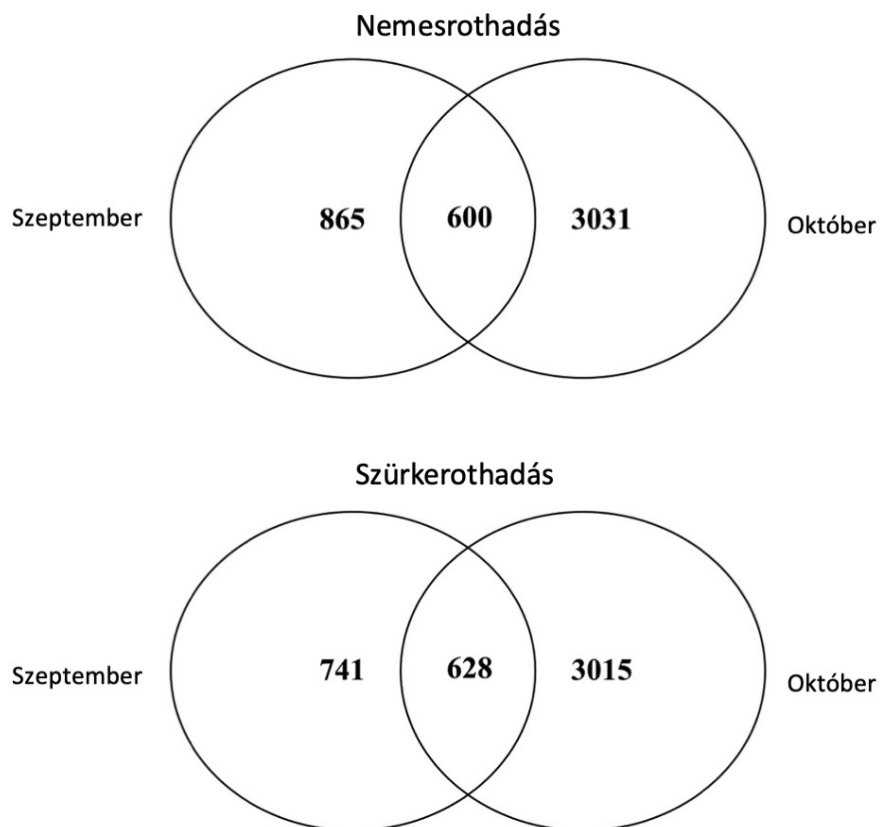
14. ábra. A *Botrytis cinerea* funkcionális génjeinek NMDS-elemzése egészséges (H), nemesrothadt (N) és szürkerothadt (G) bogyókban, szeptember (S) és október (O) hónapokban. Az egyes mintatípusok ordinációjának középpontjától mért standard eltérést ábrázoló ellipszisek nem fednek át, vagy csak kevés átfedést mutatnak, ami a kifejezett funkcionális gének összetételének erős különbségét jelzi a bogyótípusok és hónapok között.

6.3.1. Differenciális génexpresszió

A differenciális génexpressziós elemzés esetében a szeptemberben és októberben minden funkcionális gén esetében meghatározott expressziós szintet hasonlítottuk össze az adott hónapban gyűjtött egészséges szőlőbogyó esetében mért expressziós szinttel.

A szeptemberi nemes- és szürkerothadt összehasonlításban 1606 differenciálisan expresszáldó gént (DEG, differentially expressed gene) azonosítottunk, amelyek közül 741 nemes- és 865 volt szürkerothadás esetében felszabályozva. Az októberi

összehasonlításban 6046 DEG-et azonosítottunk, amelyek közül 3031 nemes- és 3015 szürkerothadás volt. A szeptemberi és októberi mintagyűjtési idők közötti összehasonlításból a 15. ábrán látható eredményeket kaptuk. Ebből megállapítható, hogy mindkét rothadási típus esetén nagyságrendileg hasonló számú gén expresszálódik differenciálisan mindkét hónapban, ám októberben több DEG-et találtunk, mint szeptemberben.



15. ábra. VENN-diagram, amely a felszabályozott *Botrytis cinerea* gének számát mutatja a nemesrothadásos és a szürkerothadásos bogyókban szeptember és október hónapokban a differenciális expressziós elemzések szerint.

6.3.2. Génontológia és útvonal feldúsulás elemzés

4. táblázat: A *Botrytis cinerea* szeptember és októberi szignifikánsan kifejeződő, a nemesrothadás során felszabályozott génkészletének gén-ontológiai feldúsulása

GO kifejezés	Funkció	Szignifikáns szülő- utód gének száma	Korrigált szignifikancia (p-érték)
GO:0022613	Ribonukleoprotein komplex biogenezis	7	< 0,01
GO:0042254	Riboszóma biogenezis	7	< 0,01
GO:0006364	rRNS folyamat	4	< 0,01
GO:0016072	rRNS metabolikus folyamat	4	< 0,01
GO:0044085	Sejtalkotó biogenezis	15	< 0,01
GO:0034470	ncRNS folyamat	5	< 0,01
GO:0034660	ncRNS metabolikus folyamat	5	< 0,01

GO:0051301	Sejtosztódás	2	< 0,01
GO:0071840	Sejtalkotó szerveződése	22	< 0,01
GO:0006412	Transzláció	3	0,01
GO:0043043	Peptid bioszintézis	3	0,01
GO:0043604	Amid bioszintézis	3	0,01
GO:0043170	Makromolekula metabolizmus	48	0,01
GO:0010467	Génexpresszió	37	0,02
GO:0044267	Sejtalkotó fehérje metabolizmus	12	0,03
GO:1901566	Szerves nitrogén vegyület bioszintézise	5	0,03
GO:0009987	Sejtszintű folyamat	159	0,03
GO:0019538	Fehérje metabolizmus	13	0,04
GO:0009059	Makromolekula bioszintézis	15	0,06
GO:0034645	Sejtszintű makromolekula bioszintézis	15	0,06

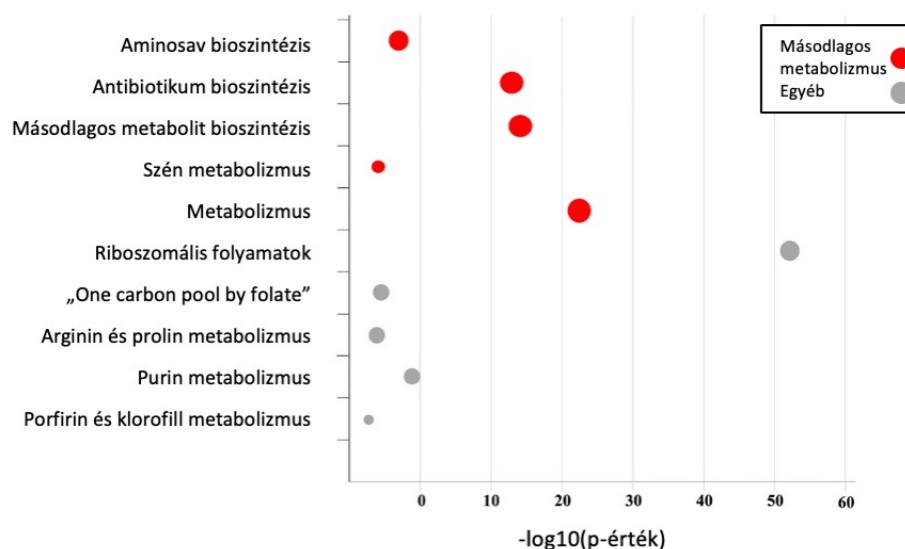
A szeptember és október hónapokban begyűjtött bogyóminták esetében gén-ontológiai és útvonal feldúsulási vizsgálatokat végeztünk, mely eredményeket a 4. és 5. táblázatok tartalmazzák. A szeptember és október között megosztott 600 felszabályozott nemesrothadás esetében azonosított gén alapkészletének 18 szignifikánsan feldúsult GO-ja közül egyharmad az anyagcseréhez kapcsolódott, amelyek közül néhány a nemesrothadás aktivitáshoz kapcsolódik, beleértve a "Celluláris fehérje anyagcsere-folyamat" és a "Fehérje anyagcsere-folyamat" (3. táblázat). A 628 génből álló, felszabályozott szeptember-októberi közös GR magprofilban csak három GO-t találtunk szignifikánsan feldúsulva, de ezek közül egyiket sem találtuk olyan anyagcsere- vagy fizikai változásokhoz kapcsolódónak, amelyek a nemesrothadáshoz kapcsolódnak. A felfelé szabályozott *Botrytis* gének készletében több feldúsult útvonal azonosítása megfelel több GO-kifejezés azonosításának. A *B. cinerea* nemesrothadás génprofiljában több feldúsult útvonalat azonosítottunk (3. számú melléklet). Ezek közül a három legjobban feldúsult útvonal a "Riboszómális folyamatok", a "Metabolikus útvonalak" és a "Másodlagos metabolitok bioszintézise" volt (16. ábra). A GO-gazdagodási elemzésekhez hasonlóan a felfelé szabályozott GR-gének alapkészletéhez nem azonosítottunk feldúsult útvonalakat.

5. táblázat: A nemesrothadás során felszabályozott *Botrytis cinerea* szeptember-októberi génkészletének funkcionális útvonalakkal való gazdagodása.

Funkció - útvonal	KEGG azonosító	Azonosított gének száma az útvonalon	korrigált p-érték
Riboszóma	bfu03010	103	< 0,01
Metabolizmus	bfu01100	737	< 0,01
Másodlagos metabolitok bioszintézise	bfuOI 110	243	< 0,01
Atibiotikum bioszintézis	bfu01130	193	< 0,01
Purin metabolizmus	bfu00230	42	< 0,01
Riboszomális bioszintézis	bfu03008	67	< 0,01
Aminosav bioszintézis	bfu01230	91	< 0,01
Folát származék, egyszeres szénkészlet	bfu00670	11	< 0,01
Arginin és prolin bioszintézis	bfu00330	18	< 0,01
Cisztein és metionin bioszintézis	bfu00270	37	< 0,01
Glikolízis	bfu00010	29	< 0,01
RNS polimeráz	bfu03020	26	< 0,01
RNS transzport	bfu03013	81	< 0,01
Szén metabolizmus	bfu01200	85	< 0,01
Pirimidine metabolizmus	bfu00240	22	< 0,01
Porfirin and klorofill metabolizmus	bfu00860	15	< 0,01
Endoplazmatikus retikulumban zajló fehérje kapcsolt folyamatok	bfu04141	70	0,02
Piruvát metabolizmus	bfu00620	25	0,03
Metán metabolizmus	bfu00680	17	0,04
Glicin metabolizmus	bfu00260	28	0,04

6. táblázat: A *Botrytis cinerea* virulencia génjei a nemesrothadás esetében felszabályozott gének között vannak jelen.

Rothadás típusa	Gén azonosító	Leírás	Funkció (UniProt)
Nemes-rothadás	BCIN_09g02390 (<i>Bmp3</i>)	Mitogén-aktivált protein kináz 7	MAP kináz aktivitás
	BCIN_03g03390 (<i>Bcsod1</i>)	Szuperoxid diszmutáz	Szuperoxid diszmutáz activity
	BCIN_12g02750 (<i>Bcelp4</i>)	Elongátor komplex	tRNS-ingadozás - uridin módosítása
	BCIN_08g04530 (<i>Bcatg3</i>)	Ubikvitinszerű fehérje aktiváló enzim	Autofágiához kötődő protein 3
	BCIN_05g03080 (<i>BcCyp2</i>)	Peptidil-prolil cis-transzomeráz	Peptidil-prolil cis-trans isomeráz aktivitás
	BCIN_16g03950 (<i>BcCBH-b</i>)	Glucanáz	Hydroláz aktivitás
Szürke-rothadás	BCIN_01g09910 (<i>Bcmfs1</i>)	Major facilitátor szupercsaládba tartozó multidrog transzporter	Transzmembrán transzporter aktivitás
	BCIN_02g07640 (<i>Bclcc7</i>)	Lakkáz	Oxidoreduktáz aktivitás
	BCIN_14g00850 (<i>Bcpgl</i>)	Poligalakturonáz	Poligalacturonáz aktivitás
	BCIN_15g03390 (<i>Bcvel1</i>)	Másodlagos anyagcsere szabályzó	Sporuláció
	BCIN_01g00060 (<i>Bcboa6</i>)	Poliketid szintáz	3-oxoacil szintáz aktivitás; metiltranszferáz aktivitás
	BCIN_05g03550 (<i>Bclcc4</i>)	Lakkáz	Oxidoreduktáz aktivitás
	BCIN_12g06380 (<i>Bcbot1</i>)	Citokróm P450 monooxygenáz	Oxidoreduktáz aktivitás; monooxygenáz aktivitás
	BCIN_01g07190 (<i>Bclcc5</i>)	Lakkáz	Oxidoreduktáz aktivitás
	BCIN_14g01870 (<i>Bchhk5</i>)	Senzoros hisztidin kináz	Foszforiláció, kináz aktivitás



16. ábra: A nemesrothadás során differenciálisan szabályozott *Botrytis cinerea* szeptember-októberi génkészletének funkcionális útvonal szintű feldúsulása. A különböző színek különböző funkcionális génklasztereket jelölnek, a körök mérete arányos az adott útvonal esetében azonosított gének számával.

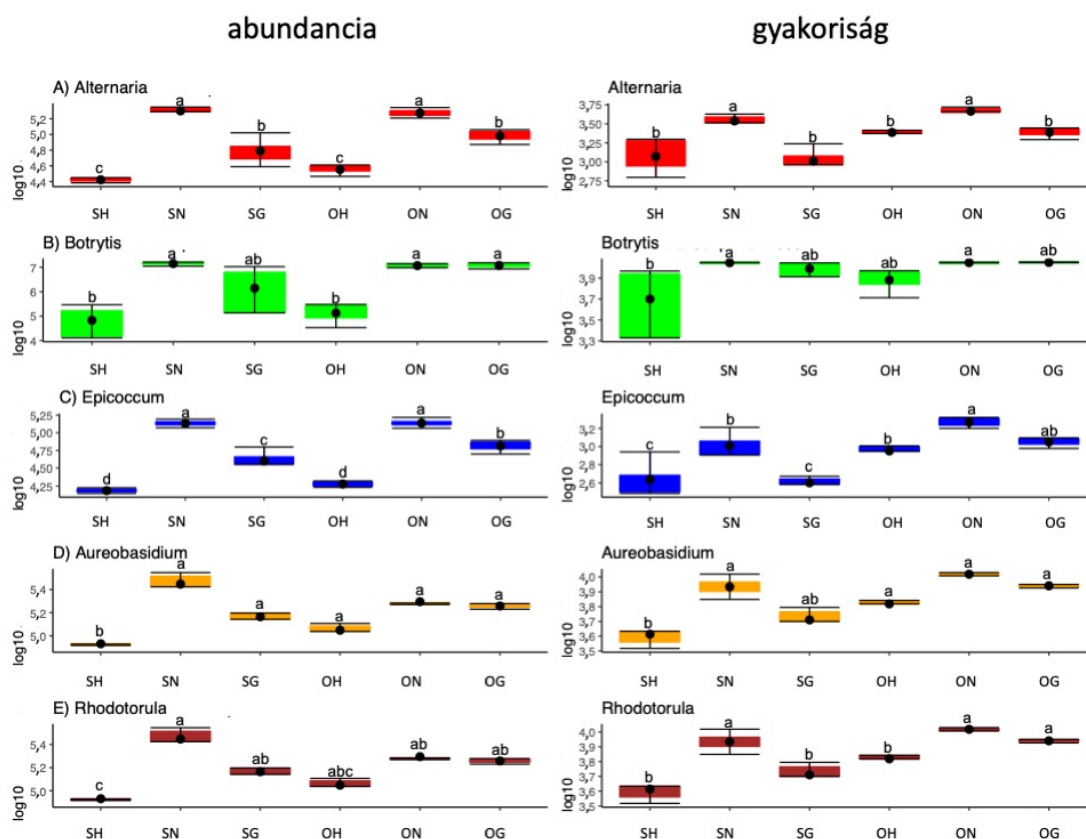
A virulencia BLAST elemzések (Cuzick, et. al., 2023) hat virulencia faktor jelenlétét mutatták ki a nemesrothadás során differenciálisan expresszált génprofilban, míg a szürkerothadás esetében kilencet találtak (6. táblázat) Az azonosított NR virulencia faktorok különböző mechanizmusokkal, többek között a növényi gazdaszervezet védelmi válaszáinak megkerülésével (BCIN_03g03390) járulnak hozzá a *B. cinerea* azon képességéhez, hogy kolonizálja a szőlőbogyó héját (Rolke, et al., 2004), (BCIN_09g02390) (Rui & Hahn, 2007), valamint, részt vesz a sejtfal lebontásában (BCIN_08g04530) (Ren, et al., 2018) (BCIN_16g03950) (Peterson & Nevalainen, 2012). A szürkerothadás virulenciaprofilja főként oxidoreduktázokból állt, amelyek védelmet nyújtanak a gazdaszervezet védelmi mechanizmusai ellen (BCIN_02g07640, BCIN_12g06380, BCIN_05g03550, BCIN_01g07190), (Yu, et al., 2020) emellett a membrántranszportban részt vevő gének (BCIN_01g09910) (Hayashi, et al., 2002), a sejtfal lebontásához hozzájáruló gének (BCIN_14g00850) (Micheli, 2001), valamint a növényi szöveteket támadó gének, nevezetesen a BCIN_15g03390 (Schumacher, 2012) és a fitotoxin-szintézis génjei BCIN_01g00060 (Colmenares, et al., 2002), (Tani, et al., 2005) és BCIN_12g06380 (Pinedo, et al., 2020) is szignifikánsan feldúsultak bizonyultak.

6.4 A szürke- és nemesrothadás során szerepet játszó egyéb gombák

A 6.4 fejezetben a korábban kiválasztott további fonalgombák és élesztőgombák szerepét vizsgáljuk. A fejezet első részében (6.4.1 és 6.4.2) a nemes és a szürkerothadásos minták közötti különbségeket elemezzük először mennyiségi szempontból (ANOVA, NMDS), majd funkcionális szempontból is (differenciális génexpresszió, útvonal feldúsulás, gomba-növény kapcsolatok).

A szürke- és nemesrothadás összehasonlítását a szekvenált transzkriptek abundancia és gyakoriság értékei alapján tehetjük meg. Az ampliton adatok alapján kiválasztott négy legabundánsabb gomba és a *Botrytis* szerepel ebben az elemzésben. Megfigyelhető, hogy mindegyik gomba mindkét vizsgált mintavételi hónapban a

nemesrothadás esetében mutat legmagasabb abundanciát és gyakoriságot, még hozzá úgy, hogy ezekben a bogyótípusokban viszonylag kicsi a transzkriptek eloszlásának szórása. *Alternaria* esetében az abundanciát vizsgálva mindhárom bogyótípus mindkét hónapban elkülönül egymástól, míg a gyakoriság eloszlását vizsgálva az egészséges bogyó és a szürkerothadás esetében nem szignifikáns ez a különbség. *Botrytis* esetében az egészséges bogyó transzkript eloszlása szignifikáns különbséget mutat mindkét rothadási típussal szemben. Az *Epicoccum* az *Alternaria*hoz hasonló képet mutat. *Aureobasidium* esetében az egészséges bogyókon meghatározott transzkriptek különülnek el jól a két rothadási típus esetétől, míg *Rhodotorula* esetében a *Botrytis*hez hasonló eloszlásokat kaptunk (17. ábra).

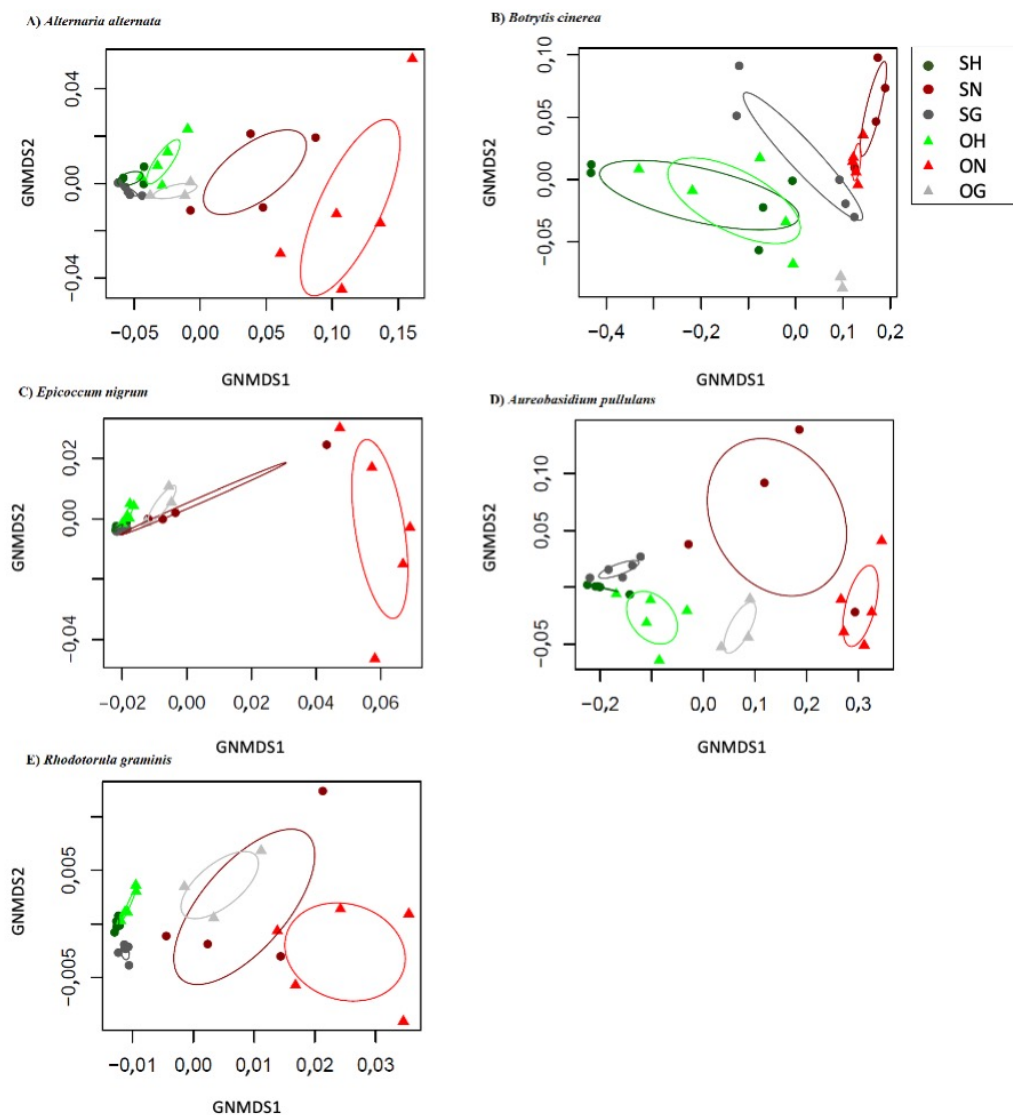


17. ábra. A fonalas gombák A) *Alternaria alternata*, B) *Botrytis cinerea*, C) *Epicoccum nigrum* és az élesztőgombák D) *Aureobasidium pullulans* és E) *Rhodotorula graminis* transzkript abundancia és gyakoriság értékek összehasonlítása az egészséges bogyó (H), a nemesrothadt bogyó (NR) és a szürkerothadt bogyó (GR) típusai között szeptember (S) és október (O) hónapokban ANOVA segítségével. A Tukey-féle HSD-tesztekkel számított páros különbségeket a különböző felső indexek, latin kisbetűk jelzik.

Az NMDS-elemzések az *A. pullulans* esetében a bogyórothadás típusaira, az *A. alternata*, *B. cinerea*, *E. nigrum* és *R. graminis* esetében pedig mind a bogyórothadás típusára, mind a mintavételi dátumra vonatkozóan a funkcionális génkészletek erős elkülönülését mutatták (18. ábra). Ez utóbbit a PERMANOVA statisztikai teszt is jelezte (7. táblázat).

7. táblázat: Az *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* és *Epicoccum nigrum* fonalas gombák, valamint az *Aureobasidium pullulans* és *Rhodotorula graminis* élesztőgombák referencia genomjához annotált egészséges, nemesrothadásos és szürkerothadásos funkcionális génkészleteinek permutációs többváltozós ANOVA-val számított F és p-értékei valamint r^2 értékei.

Gombafaj	Rothadás típusa szerint			Mintavétel időpontja szerint		
	F	p	r^2	F	p	r^2
<i>Alternaria alternata</i>	5,4045	< 0,01	0,15301	5,9162	0,012	0,1675
<i>Botrytis cinerea</i>	8,8097	< 0,01	0,42629	2,0978	< 0,01	0,06518
<i>Epicoccum nigrum</i>	5,2547	0,01	0,14848	6,1353	< 0,01	0,17336
<i>Aureobasidium pullulans</i>	5,001	< 0,01	0,16001	2,2527	0,104	0,07208
<i>Rhodotorula graminis</i>	5,536	0,012	0,14364	9,0039	< 0,01	0,23363



18. ábra. A fonalas gombák A) *Alternaria alternata*, B) *Botrytis cinerea* C) *Epicoccum nigrum* és az élesztőgombák D) *Aureobasidium pullulans* és E) *Rhodotorula graminis* genomjához annotált szeptemberi (S) és októberi (O) expressziós funkcionális génjeinek NMDS-analízise egészséges (H), nemesrothadó

(N) és szürkerothadó (G) bogyókban. Mindkét elemzésben az egyes mintatípusok középpontjától mért standard eltérést ábrázoló ellipszisek nem vagy csak kevés átfedést mutatnak, ami a kifejezett funkcionális gének összetételének erős különbségét jelzi a bogyótípusok és hónapok között.

6.4.1 Differenciális génexpresszió a rothadási típusok esetén

A szeptemberi és októberi elemzések során a nemes- és a szürkerothadás esetében egyedileg szabályozott géneket azonosítottunk az összes élesztő és fonalas gomba transzkriptom alapján. Ezen belül az *A. alternata*, a *B. cinerea*, az *E. nigrum*, az *A. pullulans* és a *R. graminis* esetében rendre 385, 600, 222, 261 és 31 mindkét hónapban egyaránt felszabályozott gént azonosítottunk. A szürkerothadás esetében ezek a számok rendre 2, 628, 3, 7, 3 voltak (8. táblázat).

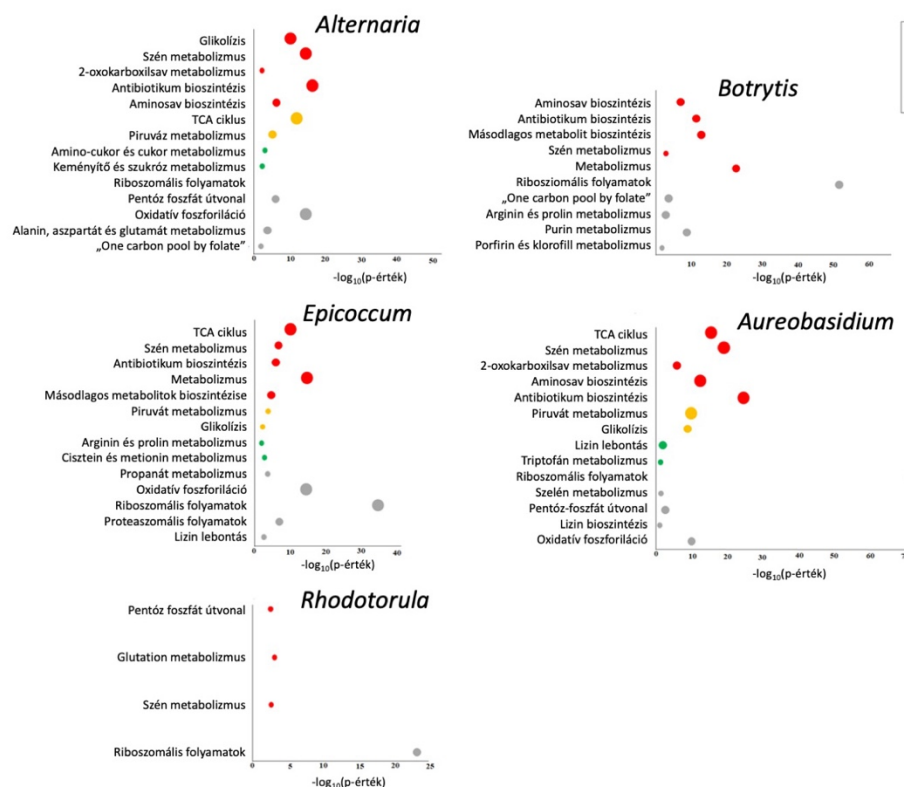
8. táblázat: Az *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* és *Epicoccum nigrum* fonalas gombák, valamint az *Aureobasidium pullulans* és *Rhodotorula graminis* élesztőgombák genomjához annotált differenciális expressziós elemzési eredmények a nemesrothadás és a szürkerothadás között szeptemberre, illetve októberre vonatkozóan, egyedi felfelé szabályozott géneket figyelembe véve.

Fajok	Szeptember nemesr.	Október nemesr.	Mindkét hónap nemesr.	Szeptember szürker.	Október szürker.	Mindkét hónap szürker.
<i>Alternaria alternata</i>	170	140	385	8	14	2
<i>Botrytis cinerea</i>	865	3031	600	741	3015	628
<i>Epicoccum nigrum</i>	24	110	222	29	19	3
<i>Aureobasidium pullulans</i>	408	212	261	8	64	7
<i>Rhodotorula graminis</i>	51	21	31	17	13	3

6.4.2 Génontológia, útvonalak gazdagodása és virulencia BLAST

Az *A. alternata*, a *B. cinerea*, az *E. nigrum* és az *A. pullulans* felfelé szabályozott mindkét vizsgált hónapban differenciálisan expresszáldó nemesrothadt bogyókban azonosított génkészletben az anyagcseréhez kapcsolódó feldúsult génontológiai kifejezéseket azonosítottunk, amelyek közül néhány a nemesrothadás kialakulásának folyamatával és a sejtosztódással kapcsolatos. Az *A. alternata* esetében ez hat, főként a nitrogén-anyagcseréhez kapcsolódó génre, mint például a "Peptid anyagcsere-folyamat", és olyan sejt-folyamatokra, mint például a "Transzláció". A *B. cinerea* génkészletében 18 génontológiai kifejezést azonosítottunk, amelyek egyharmada metabolikus tevékenységre vonatkozott, beleértve a "Celluláris fehérje-anyagcsere-folyamat" és a "Fehérje-anyagcsere-folyamat" kifejezéseket. Az *E. nigrum* esetében is három feldúsult kifejezést azonosítottunk, de ezek főként olyan celluláris folyamatokhoz kapcsolódtak, mint például a "Sejten belüli transzport". Az *A. pullulans* esetében a tizenkét feldúsult kifejezés főként a zsírsav-anyagcseréhez kapcsolódott,

mint például a "Zsír-sav-anyagcsere-folyamat", "Zsír-sav-bioszintézis-folyamat" és "Monokarbonsav-anyagcsere-folyamat". A korábban tárgyalt GO-terminusokat tükröző, feldúsult útvonalakat azonosítottuk az összes gomba- és élesztőfaj felfelé szabályozott nemesrothadt boggyóban azonosított génkészletében (19. ábra)



19. ábra. A KOBAS adatbázis alapján végzett funkcionális útvonalak feldúsulás-elemzése az A) *Alternaria alternata*, B) *Botrytis cinerea*, C) *Epicoccum nigrum* és az élesztőgombák D) *Aureobasidium pullulans* és E) *Rhodotorula graminis* nemesrothadáshoz kapcsolódó, felfelé szabályozott génjei. Minden buborék egy-egy feldúsult funkciót jelöl, a buborék mérete pedig a szignifikanciaszinttel arányos. A buborék színe különböző biokémiai útvonal koexpressziós klasztereket jelöl.

Az *A. alternata*, *B. cinerea*, *E. nigrum*, *A. pullulans* és *R. graminis* esetében összesen 27, 20, 28, 16 és 18 szignifikánsan feldúsult útvonalat azonosítottunk. A virulencia faktorokat azonosító BLAST-ot tekintve három gént azonosítottunk az *A. alternata* felszabályozott génkészletében, köztük egy 1,3,8-trihidroxi-naftalin reduktázt (CC77DRAFT_528893), egy 26S proteasóma-szerű fehérje szabályozó alegységet (CC77DRAFT_968321) és egy mitogén-aktivált fehérje kinázt (CC77DRAFT_1016542). Mind az 1.3.8-trihidroxinaftalin-reduktáz, mind a Mitogén-aktivált protein-kináz segíti a kolonizációt, mivel mindkettő az abiotikus stresszfaktorokhoz történő adaptációt segíti; az 1.3.8-trihidroxinaftalin-reduktáz az UV-toleranciát segíti elő (Thompson, et al., 2000), (Langfelder, et al., 2003), míg a MAP a vas anyagcserében játszik szerepet (Voss, et al., 2020). A *B. cinerea* felszabályozott génkészletében hat virulenciafaktorot azonosítottunk nemesrothadt boggyókból származó gének esetében, míg szürkerothadt boggyók esetében kilencet. A nemesrothadásos génkészlet kolonizációt lehetővé tevő génekből állt, köztük a sejtfal lebontását (BCIN_16g03950) (Peterson & Nevalainen, 2012), az autofágiát (BCIN_08g04530) (Ren, et al., 2018) a növényi gazdaszervezet védelmi válaszainak kijátszását (BCIN_03g03390) lehetővé tevő génből (Rolke, et al., 2004). A *B. cinerea*

szürkerothadással kapcsolatos génprofiljában szerepeltek sejtfallbontó enzimek (BCIN_14g00850) (Micheli, 2001), növényi szöveteket támadó enzimek BCIN_15g03390 (Schumacher, 2012), a növényi védelmi válaszok elleni védelmet biztosító gének (BCIN_02g07640, BCIN_12g06380, BCIN_05g03550, BCIN_01g07190) (Yu, et al., 2020) és a membrántranszportban részt vevő gének (BCIN_01g09910) (Hayashi, et al., 2002). Három gént azonosítottunk az *E. nigrum* felfelé szabályozott nemesrothadásos génkészletében, köztük egy azonosítatlan fehérjét (B5807_08936), egy PKS_ER domént tartalmazó fehérjét (B5807_02028), valamint egy 5-aminolevulinát-szintáz (5-aminolevulinát-szintáz). Az 5-aminolevulinát-szintáz szükséges a hem bioszintézis első lépéséhez (Hunter & Ferreira, 2009), ezért fontos a proliferáció és a környezeti stresszel való megbirkózás szempontjából. Az utóbbi komponensnek olyan elsődleges funkciókban tulajdonítanak jelentőséget, mint a génszabályozás, a differenciálódás és így a proliferáció (Elrod, et al., 2001), (Ferreira, et al., 1993), (Hamza, 2006), (PANEK & O'Brian, 2002). A PKS_ER a poliketid-szintáz enzimek enoilreduktáz doménje (Gu, et al., 2009). Ez utóbbi enzimek olyan másodlagos metabolitok szintéziséért felelősek, amelyek a szignáltovábbításban, a védekezésben és a toxinok termelésében játszanak szerepet (Künzler, 2018), (Losada, et al., 2009), (Macheleidt, et al., 2016), (Wakefield, et al., 2017). Végül egyetlen virulencia-gént, nevezetesen egy ATP-függő RNS-helikázt, az eIF4A-t (RHOBADRAFT_46472) azonosítottuk az *E. nigrum* felszabályozott szürkerothadásos génkészletében. Az RNS-helikázok az RNS-t érintő valamennyi folyamathoz kapcsolódnak a transzkripciótól a bomlásig (Adbelkri, et al., 2020), így ennek a génnek fontos szerepe lehet a stresszes környezethez való alkalmazkodás szabályozásában *R. graminis* esetében.

6.5 Egyéb gombák génexpressziója az aszúsodás során, hatásuk a boraromára

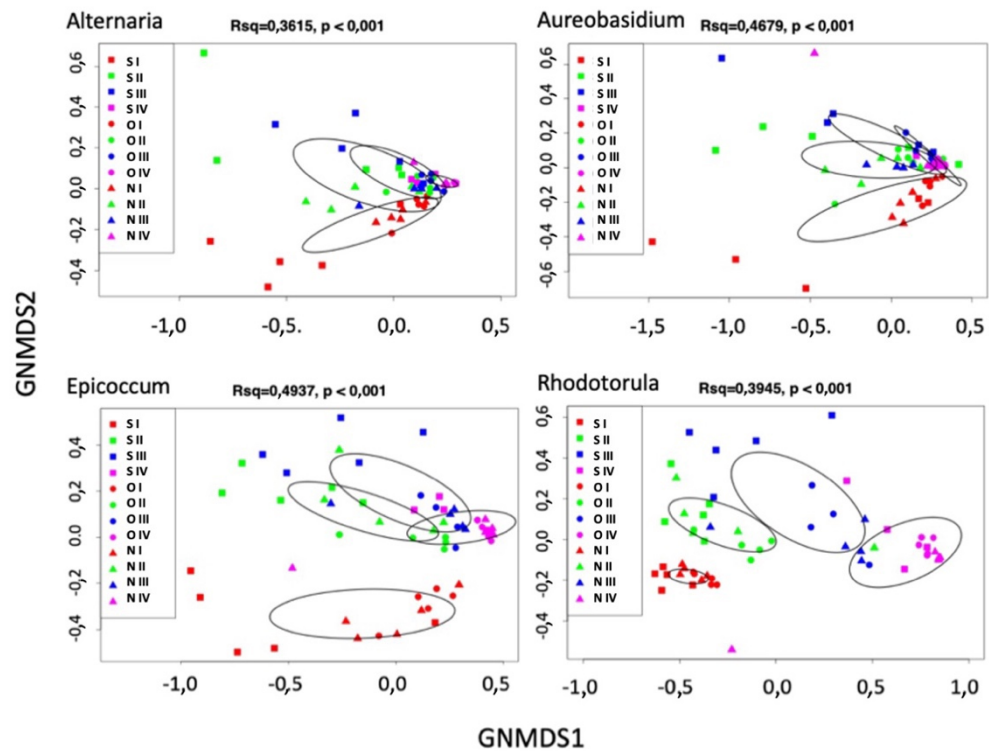
Ebben a fejezetben az aszúsodás folyamata során, azaz az I-IV fázisú mintákban azonosított géneket vizsgáltuk, méghozzá azokat, amelyeket a kiválasztott 4 gombanemzetség (*Alternaria*, *Aureobasidium*, *Epicoccum*, *Rhodotorula*) egy-egy fajának referenciagenomjához annotáltunk. A fejezet második szakaszában (6.5.2) a funkcionális elemzések esetén kiemeljük azokat a feldúsult útvonalakat amelyek hatással lehetnek az aaszúbogyókból készült borok aromaanyag összetételére.

Valamennyi fonalas gomba és élesztő esetében szignifikáns növekedést figyeltünk meg az első (I. fázis) és az utolsó (IV. fázis) fázis között, míg a mintagyűjtés időpontja egyik gomba esetében sem volt jelentős hatással a gén előfordulási gyakorisági értékekre. Különösen az I. és a II. fázis közötti növekedés volt szignifikáns a fonalas gombák esetében, de az élesztő esetében nem. A II. és III. fázis közötti növekedés csak az *E. nigrum* esetében volt szignifikáns, és végül a III. és IV. fázis közötti növekedés valamennyi fonalas gomba és élesztő esetében szignifikáns volt (9. táblázat).

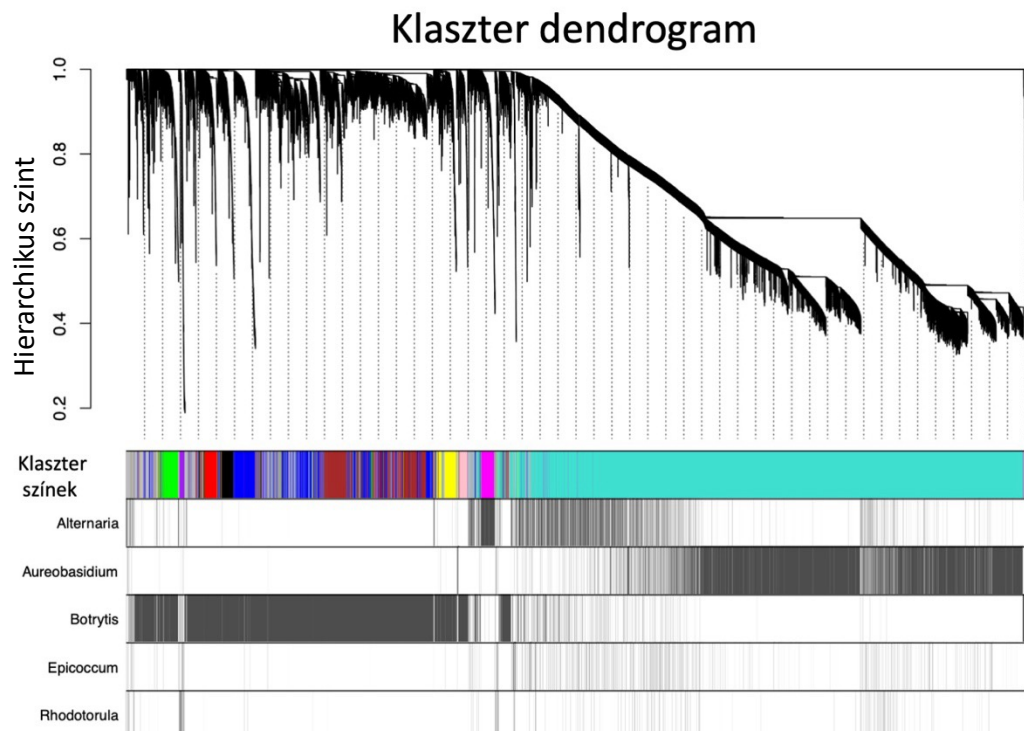
9. táblázat: A négy nemesrothadási fázis és a három mintavételi hónap esetében az annotált gének abundancia összegének logaritmusának átlagértékei és zárójelben az eloszlások szórásai. Az egyes oszlopok esetében a különböző kisbetűk $p=0,05$ szignifikanciával különbségeket jeleznek a fázisok vagy hónapok között.

Nemzetség:	<i>Alternaria</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Rhodotorula</i>
I fázis	4,219 (0,160) ^a	4,626 (0,236) ^a	6,322 (0,077) ^a	3,980 (0,153) ^a	3,931 (0,196) ^a
II fázis	4,691 (0,146) ^b	4,857 (0,219) ^{ab}	6,470 (0,014) ^b	4,420 (0,141) ^b	3,950 (0,215) ^{ab}
III fázis	4,855 (0,151) ^b	5,100 (0,260) ^b	6,460 (0,021) ^b	4,599 (0,154) ^c	4,147 (0,193) ^b
IV fázis	5,171 (0,270) ^c	5,894 (0,418) ^c	6,513 (0,074) ^b	4,943 (0,162) ^d	4,385 (0,217) ^c
Szept.	4,698 (0,443)	4,899 (0,495)	6,439 (0,129)	4,439 (0,429)	4,147 (0,323)
Okt.	4,753 (0,364)	5,233 (0,548)	6,423 (0,060)	4,488 (0,365)	4,083 (0,221)
Nov.	4,723 (0,386)	5,182 (0,590)	6,456 (0,067)	4,499 (0,364)	4,065 (0,269)

Az ANOVA-val összhangban az ordinációs diagramokból megfigyelhető, hogy a nemesrothadás fázisa minden faj génexpresszióját elkülöníti, de a szüret időpontjának kisebb hatása van a transzkriptomikai profilra. A vizsgált nemzetségek (*Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Epicoccum* és *Rhodotorula*) fázisának génexpressziós eloszlásában az ordinációs ábrázoláson megfigyelt nemzetségenkénti szignifikáns elkülönülés rendre 36%-a, 47%-a, 26%-a, 49%-a és 39%-a magyarázható a fázissal. A varianciaanalízishez hasonlóan az ordinációs ábrákon is megfigyelhető, hogy a betakarítás időpontja sokkal kisebb mértékben határozza meg a minták elkülönülését, mint a fázis (9. és 20. ábra).



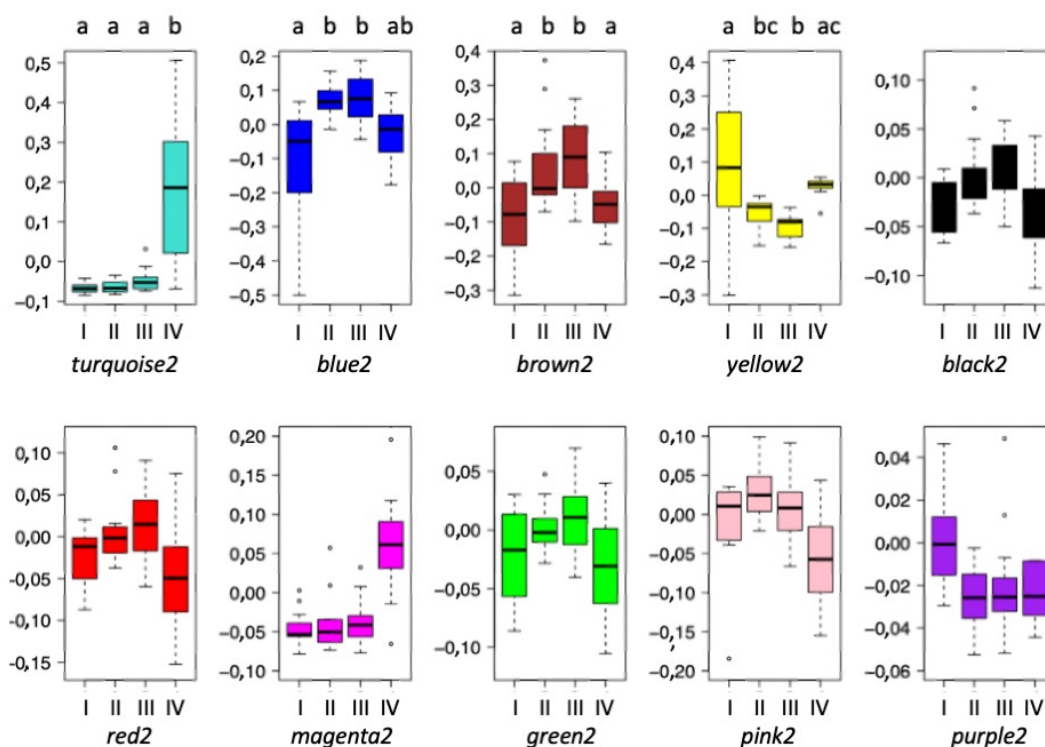
20. ábra: A vizsgált nem *Botrytis* nemzetségek NMDS ordinációs ábrája. A színek a nemesrothadási fázist (I, II, III, IV) az alakzatok a mintavételi hónapot (S – szeptember, O – október, N – november) jelölik.



21. ábra: A vizsgált fajok genomjához annotált gének WGCNA klaszter dendrogramja. A klaszterek színei a dendrogram alatt vannak feltüntetve, a szövegben erre a klaszterezésre a szín megnevezése után írt 2-es számmal hivatkozunk (például: *blue2*). Az egyes gének azonosított nemzetségét az ábra alján szürke vonalak jelzik.

6.5.1. WGCNA elemzés

A WGCNA klaszterelemzések tíz génmodul-klasztert azonosítottak (21. ábra). A megkülönböztethetőség miatt ebben az elemzésben a modulok neveit egy 2-es végződéssel látjuk el, mint például *blue2*, így a *Botrytis* esetében azonosított génklaszterek megkülönböztethetők a kombinált elemzés esetében azonosított génklaszterektől. A létrehozott koexpressziós modulok közül a *turquoise2*, *blue2*, *brown2* és *yellow2* NRCM-ek a nemesrothadási fázisok által meghatározott, annak minta eloszlásával párhuzamosságot mutató sajátgén expressziós profilt mutattak (Noble Rot Connected Modules, NRCM), míg a *black2*, *red2*, *magenta2*, *green2*, *pink2* és *purple2* modulok sajátgén expressziós profilja nem volt összefüggésbe hozható a nemesrothadással (22. ábra). Az összes fajhoz tartozó NRCM génkészletek közül a türkizkék és sárga modulban hasonló expressziós gyakorisági mintázatot jeleztek, ezért a jelenlegi vizsgálat középpontjában ezek az azonosított NRCM modulok álltak. A *turquoise2* modulban lévő sajátgének ANOVA-elemzései alapján a négy fázis között növekedés volt tapasztalható, de ez a növekedés csak a III. és IV. fázis között volt szignifikáns. A *yellow2* modulban szignifikáns csökkenés volt tapasztalható az I. fázistól a II. fázisig, majd további csökkenés a III. fázisig, végül növekedés a IV. fázisig (22. ábra).



22. ábra: A különböző génexpressziós modulok fáziseloszlása, a szignifikáns különbségeket kis betűkkel jelöljük, a modulok színei az egyes ábrák alatt szerepelnek.

6.5.2. Differenciális génexpressziós és útvonal feldúsulás elemzések

A négy aszúsodási fázisban rendre 1765, 348, 1599 és 293 gén differenciálisan fejeződött ki az *A. alternata*, az *E. nigrum*, fonalasszombák, illetve az *A. pullulans* és a *R. graminis* élesztőgombák esetében. Mivel a nemesrothadás bomlási folyamatát alapvetően a *Botrytis* határozza meg, ezért sokkal több gén differenciálisan kifejeződött, mennyiségileg 11246. Az aszúsodási folyamat egyes fázisai közötti DE-elemzések során olyan géneket azonosítottunk, amelyek egyértelműen szabályozottak és közösek voltak az egyes fázisok között. A negyedik fázisban felfelé vagy lefelé szabályozott egyedi gének többnyire a legnagyobb prevalenciával rendelkeztek az összes, egy fázisra jellemző gén közül. A *B. cinerea* esetében a negyedik fázisban felfelé szabályozott egyedi gének száma (874) 58%-át tette ki az összes felfelé szabályozott DE-génnek, míg a IV. fázisban lefelé szabályozott egyedi gének száma (800) 73%-át tette ki az összes lefelé szabályozott DE-génnek. Ez a tendencia az *A. alternata* [(54) 90%; (648) 78%], *E. nigrum* [(79) 96%; (97) 72%], *A. pullulans* [(384) 89%; (467) 92%] és *R. graminis* [(136) 97%; (10) 50%] esetében is megfigyelhető volt.

10. táblázat: Az egyes WGCNA-modulok kifejezett génjeinek megoszlása a megfigyelt nemzetségek között.

Modul	<i>Alternaria</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>red2</i>	1	0	520	0	1
<i>purple2</i>	22	7	42	25	57
<i>pink2</i>	0	0	452	0	0
<i>magenta2</i>	437	2	3	1	0
<i>black2</i>	1	0	484	0	0
<i>turquoise2</i>	3191	9914	1013	888	279
<i>green2</i>	14	1	592	1	0
<i>blue2</i>	4	0	2660	4	4
<i>brown2</i>	0	0	2148	1	2
<i>yellow2</i>	22	40	682	6	4

A hónapok közötti DE elemzéseket tekintve a novemberre jellemző fel- vagy leszabályozott géneknek volt a legmagasabb a prevalenciájuk az összes, egy egyedi hónapra jellemző gén közül. A *B. cinerea* esetében a novemberre egyedileg felfelé szabályozott gének száma (553) 86%-át tette ki az összes, egy hónapra egyedileg jellemző felfelé szabályozott DE-génnek, míg a novemberre egyedileg szabályozott lefelé szabályozott gének száma (867) 82%-át tette ki az összes, egy hónapra egyedileg jellemző lefelé szabályozott DE-génnek. Ez a tendencia az *A. alternata* [(553) 86%; (3) 33%], az *E. nigrum* [(36) 77%; (3) 43%], az *A. pullulans* [(195) 37%; (250) 60%]

esetében is megfigyelhető volt, és az *R. graminis* esetében egyetlen gén sem volt novemberre jellemzően fel- vagy leszabályozva.

A *turquoise2* modulban 47, 7, 50, 21 és 21 feldúsult útvonalat azonosítottunk az *A. alternata*, *B. cinerea*, *E. nigrum*, *A. pullulans* és *R. graminis* esetében. Ezen útvonalak közül több olyan útvonalat azonosítottak, amelyek olyan enzimeket tartalmaznak, amelyek hozzájárulnak a bor stabilitásához és minőségéhez, illetve amelyek a borból lévő aromás vegyületek képződésének prekursorai, különösen az aminosav-anyagcseréhez (Callejón et al., 2010), a szénhidrát-anyagcseréhez (Han et al., 2020), a lipid-anyagcseréhez, valamint a másodlagos metabolitok képződésében részt vevő enzimekhez kapcsolódóan. A *B. cinerea* kivételével, amely esetében csak egy "másodlagos metabolitok" útvonalat azonosítottunk, az aminosav-anyagcseréhez kapcsolódó útvonalak voltak a legelterjedtebbek: 11, 14, 6 és 4 útvonalat azonosítottunk az *A. alternata*, az *E. nigrum*, az *A. pullulans* és a *R. graminis* esetében. Ezt követte a szénhidrát-anyagcsere, ahol az utóbbi fajok esetében rendre 4, 9, 5 és 6 feldúsult útvonalat azonosítottunk. A "másodlagos metabolitok" útvonala volt a legkevésbé előforduló az *A. alternata* (4), az *E. nigrum* (3), az *A. pullulans* (2) és a *R. graminis* (1) esetében. A borok érzékszervi és minőségi paramétereire hozzájáruló géneket ezekből a feldúsított útvonalakból azonosítottuk, továbbá a WGCNA klaszterezett modulokból hasonló funkciójú hub géneket azonosítottunk, ezeket a 4. számú mellékletben mutatjuk be részletesen.

7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK

7.1 A *Botrytis cinerea* génexpressziója az aszúsodás során

Az aszús bogyók bizonyos vizuális és mérhető fizikai-kémiai tulajdonságaiban mutatkozó különbségek, amelyeket a folyamat különböző fázisainak meghatározására használtunk (Hegyi-Kaló, et al., 2020), (Carbajal-Ida, et al., 2016), implicit módon azt sugallták, hogy ezeket a változásokat legalább részben a *B. cinerea* számos, még ismeretlen, funkcionális génje okozza. Tudomásunk szerint kevés olyan tanulmány készült, amely megvilágítja a *B. cinerea* funkcionális génprofiljának minőségi és mennyiségi különbségeit a szabadföldi körülmények között természetesen előforduló aszúbogyó fejlődése során, és azt, hogy ezek a funkcionális gének valószínűleg hogyan járulnak hozzá a botritiszes szőlőbogyók fizikai-kémiai változásaihoz, ami fontos következményekkel jár a borászok számára. A borászati gyakorlatban a bogyó textúrája fontos tényező, mivel nagyban befolyásolja a macerációt, amely meghatározza a bogyóban lévő polifenolok felszabadulását. A borok polifenol tartalma nemcsak érzékszervi tulajdonságaikra, hanem eltarthatóságukra is nagy hatással van. Bár a *Botrytis* elvékonyítja a héjat, a növényi válaszreakciók a polifenol-koncentráció növekedését okozhatják, ami a nemesrothadás során sajátos polifenol-összetételt eredményez (Magyar, 2011), (Fournier, et al., 2013), (Magyar & Soós, 2016), (Rolle, et al., 2012).

7.1.1. A *Botrytis* funkcionális génjeinek expressziós dinamikája a nemesrothadás során

Az a tény, hogy a *B. cinerea* funkcionális génátíratának mennyisége és gazdagsága jelentősen megnő az első fázisból a második fázisba való átmenet során, de ezt követően nem változik szignifikánsan, a *B. cinerea* jelentős gombafiziológiai változására utal, amelyet a metabolikus aktivitás megugrása jellemez az aszúsodás kezdetén. A *B. cinerea* funkcionális génjeinek abundanciájában és előfordulási gyakoriságában bekövetkező jelentős növekedés az egészséges bogyóktól a nemesrothadt bogyókig összhangban van azzal a tanulmánnyal, amely a szüret utáni mesterségesen előidézett botritizálódást vizsgálja (Lovato, et al., 2019), míg a jelenlegi tanulmány, amelyben az aszúsodás minden fázisát vizsgáltuk, azt mutatja, hogy a kifejezett funkcionális gének számának növekedése már a folyamat kezdetén bekövetkezik. A *B. cinerea* funkcionális génjeinek a nemesrothadás folyamat korai szakaszában jelentett jelentős felszabályozottsága megerősíti, hogy a *B. cinerea* az egészséges, érett bogyókban is többnyire inaktív (Lovato, et al., 2019). Ahogy az aszúsodási folyamat elindul, feltehetően a környezeti jelzésekre adott válaszként, metabolikusan aktívabbá válik, és olyan géneket fejez ki, amelyek a proliferációban vesznek részt, valamint olyanokat, amelyek a szőlőnövény sejtszintű struktúráiban az aszúsodáshoz kapcsolódó változásokat indítanak el, mint például a bogyó héjának lebomlása (Hegyi-Kaló, et al., 2020), valamint a növényvédelmi válaszok és a fenolos érés aktiválása (Aguedo-Romero, et al., 2015). A *B. cinerea* nemesrothadásos génexpressziós profiljának általános hasonlósága a vizsgált hónapokban azt mutatja, hogy a *B. cinerea* nemesrothadásban kifejeződő génjeinek összetétele időben viszonylag stabil, ami egyfajta kiszámíthatóságot feltételez. Ez utóbbit az NMDS-elemzések is megerősítették, amelyek az összes hónapot összevonva a II., III. és IV. fázis egyértelmű elkülönülését mutatták, ami megerősíti várakozásainkat. Ez utóbbi döntő jelentőségű a borászok számára.

Megállapítjuk tehát, hogy az aszúsodás folyamata során expresszált *Botrytis cinerea* gének a mintavételi idővel nem változnak, és ugyan a II-IV fázisban magasabb totális abundanciát mutatnak az egészséges bogyón is magas gyakorisággal vannak jelen.

7.1.2 A bogyóhéj lebontásában részt vevő *Botrytis* funkcionális gének a nemesrothadás során

A *Vitis vinifera* szőlőbogyó héja főként szénhidrát-alapú vegyületekből, például cellulózból, arabinánból, mannánból, galaktánból, xilánból és xiloglükánból, lignin szerkezetű fehérjékből és proantocianidinekből áll (Apolinar-Valiente, et al., 2017). Az NRCM modulokon belül számos olyan differenciálisan expresszálandó gént azonosítottunk, amelyek szignifikánsan korreláltak a textúra paraméterekkel, ami a bogyóhéj lebontásában szerepet játszó funkcionális útvonalak feldúsulására utal a botritizálódási folyamat során. Az ANOVA és a Tukey-tesztek alapján a WGCNA modulok sajátgén expressziója alapján azt találtuk (8-10. ábrák, 3. táblázat), hogy az egészséges bogyókról a II. fázisú bogyókra való átmenet során differenciálisan kifejeződő gének voltak atipikus aszúfejlődésben szerepet játszó, más tanulmányokban is leírt gének (Magyar, 2011) (Hegyi-Kaló, et al., 2020) (Kallitsounakis & Catarino, 2020). Ennek oka az volt, hogy ebben a szakaszban a bogyóhéj rugalmassági modulusának jelentős változását (E-drop) figyelték meg, ami arra utal, hogy a sejtfal lebomlása elsősorban az aszúsodás e korai szakaszában történik. A szénhidrát-anyagcserében szerepet játszó enzimeknek a bogyóhéj fizikai paramétereinek változásával való megfigyelt korrelációja a jelenlegi vizsgálatban megerősíti, hogy azok aktív szerepet játszanak az aszúsodás során bekövetkező bogyótextúra változásokban. A szénhidrát-aktív (CA) enzimek, amelyek közvetlenül vagy közvetve részt vesznek a szénhidrátok szintézisében és/vagy lebontásában, különösen érdekesek a bogyók héjának módosulása szempontjából. Számos, az I. és II. fázisnak, azaz az aszúsodás kezdetének megfelelő, differenciálisan expresszálandó CA-enzimet azonosítottunk a *brown*, *red* és *turquoise* modulokban. Ez megerősíti feltételezésünket, miszerint a sejtfal katabolikus enzimek különösen fontosak a nemesrothadás folyamat korai fázisaiban. A *brown* modulban azonosított CA enzimek a bogyóhéj előzetes puhulásához kapcsolódhatnak, mivel ezek többnyire közvetve vesznek részt a szénhidrát lebontási folyamatokban. Ilyen enzim például a glükóz-6-foszfát izomeráz (BCIN_15g04970), amely a glikolízis alfolyamatában vesz részt (Mojzikova, et al., 2018). A *brown* modullal ellentétben a *red* és *turquoise* modul olyan enzimeket tartalmazott, amelyek közvetlenül részt vesznek a szénhidrátok lebontásában, a szénhidrát polimer szerkezeteken belüli kötéseket hasítják. Például az alfa-amiláz (BCIN_02g01420) a polimer szubsztátot rövidebb oligomerekre hasítja, katalizálva az alfa-1,4glükán kötések hidrolízisét (Dona, et al., 2010). A legtöbb ilyen enzimtípust a *turquoise* modulban találtuk, amely a legmagasabb negatív korrelációt mutatja a bogyóhéj rugalmasságával, ami az aszúsodás kezdetét jelzi (Hegyi-Kaló, et al., 2020).

7.1.3 A *Botrytis* génfunkciói a nemesrothadás egyéb biokémiai folyamataiban

A nemesrothadás során számos biokémiai változás megy végbe, amelyeket a szakirodalom alaposan leírt (Kallitsounakis & Catarino, 2020) (Magyar & Soós, 2016). A bogyóhéj szerkezeti változásai mellett a fentiekben leírt szénhidrátbontó enzimek a cukortartalom növekedéséhez is vezethetnek. A jelenlegi vizsgálat rávilágít arra, hogy a szénhidrátbontó enzimek leginkább a korai aszús fázisokban aktívak (3. táblázat). A szénhidrát-anyagcsere mellett a fehérje-anyagcsere érintő, feldúsult útvonalak is túlsúlyban voltak az adott modulokban. A szőlőbogyó héjának szerkezeti jellegű lebontása mellett a nitrogéntartalmú vegyületek metabolizmusa, mint az aminosavak, peptidek és nukleinsav-származékok fontos szerepet játszanak a *B. cinerea* anyagcsereje szempontjából (Lacroux, et al., 2008). Például a fertőzés során számos metabolikus útvonalhoz használ felvehető nitrogénforrásokat (Thakur, et al., 2018). Valószínűleg ez magyarázza az olyan nitrogén-felszabadító enzimek

azonosíthatóságát, mint az omega-amidáz (BCIN_14g01750), amely a *brown* modulban az I. és II. fázis között felfelé szabályozott, a feldúsult alanin-aszpartám útvonal (Slocum, 2005) részeként, valamint a green modulban a III. és IV. fázis között felfelé szabályozott, a feldúsult alanin-aszpartám útvonalhoz tartozó glutamát-dehidrogenáz (BCIN_03g07670). A "ketontestek" feldúsult útvonal azonosítása szintén a ketontesteket tartalmazó aminosavak lebontására utal. A jelenlegi tanulmány rámutat a fehérjék fontosságára az aszúsodott bogyókban végbemenő szerkezeti változásokban. Ezen túlmenően megmutatja a *B. cinerea* aktív szerepét a nitrogén felszabadításában az aszúsodás során, de azt is bizonyítja, hogy ez a folyamat már a nemesrothadás korai szakaszában is bekövetkezik.

Az aszúsodás során tehát a korai fázisokban azonosítottunk szignifikánsan feldúsult szénhidrát anyagcserét, különös tekintettel a sejtfalbontó folyamatokra. A folyamat későbbi szakaszában jelentős nitrogén anyagcsere útvonal feldúsulást kaptunk, amely esetében a könnyen felvehető nitrogén előállításával kapcsolatos géneket találtuk aktívnak.

7.1.4. Másodlagos anyagcseretermékekhez kapcsolódó funkcionális gének

Számos tanulmány megmutatta, hogy a *B. cinerea* a legnagyobb biomasszát képező gomba az aszúsodás során (Bene & Magyar, 2004) (Blanco-Ulate, et al., 2015), ami arra utal, hogy bizonyos versenyelőnye van más mikroorganizmusokkal szemben a szőlőbogyó mikro környezetében, amelyet a vízvesztéséből és a cukortartalom növekedéséből eredő növekvő ozmotikus stressz jellemez. Aszúsodó szőlőbogyó esetén az ozmotikus jellegű kémiai-fizikai stressz mellett a szőlészeti gyakorlatban jelentős kénvegyületek is fontos stresszfaktorok, mivel kéntartalmú vegyületekkel permetezzük a szőlőtőkét a növényi kórokozók előfordulásának csökkentése érdekében. E vegyületek azonban olyan mértékben felhalmozódhatnak a bogyókon, hogy az a *B. cinerea* és más gombák számára még az aszúsodási folyamat bekövetkezésekor is toxikus lehet. A kén anyagcsereje és az azt követő méregtelenítés ezért fontos a növény-gomba kölcsönhatási modellben a nemesrothadás folyamat során (Griffith, et al., 2015). A *pink* modulban a kén anyagcsere útvonala az I. és a II. fázis, illetve a III. és a IV. fázis között feldúsult (3. táblázat). A korai fázisokban (I-II) három, a feldúsult szulfát-útvonalhoz tartozó enzim, nevezetesen a szulfát-adenililtranszferáz (BCIN_01g04340) lefelé szabályozott, foszfoadenozin-foszfoszfoszulfát-reduktáz (BCIN_01g04230) és szulfit-reduktáz (BCIN_13g03450), amelyek a proszfoadenozin-foszfoszfoszulfátból (PAPS), a PAPS-ból szulfitba, illetve a szulfitból hidrogén-szulfidba történő redukciót katalizálják (Chartron, et al., 2007), míg a későbbi nemesrothadt fázisokban (III-IV.) a foszfoadenozin-foszfoszfoszulfát-reduktáz (BCIN_01g04230), szulfitreduktáz (NADPH) hemoprotein béta-komponens (BCIN_12g03740) és az O-acetil-homoszerin/O-acetilszerin-szulfhidriláz (BCIN_04g0077), amelyek a szulfátban gazdag útvonalhoz tartoznak és a PAPS-ot szulfitra, szulfitot szulfidra, szulfidot L-ciszteinné alakítják, illetve felszabályozódtak. Érdekes módon a *yellow* klaszterben a *B. cinerea* glutation-anyagcsere útvonala (bfu00480) a korai fázisokban (I. és II.) nagymértékben felfelé szabályozódott, de a későbbi stádiumokban (III. és IV.) az útvonal lefelé szabályozódott. Amint korábban említettük, a szulfit a kén metabolikus útvonalon keresztül L-ciszteinre bomolhat. Ez utóbbi vegyület a cisztein és metionin anyagcsere-útvonalon keresztül nagy sebességgel alakítható át glutationná (bfu00270). Ez utóbbi vegyületnek fontos szerepe van a sejtfunkciókban, a mitokondriumok szerkezetében, a sejtdifferenciálódásban, valamint a sejtfajlásban (Cantu, et al., 2008). Emellett fontos szerepet játszhat a biotikus és abiotikus oxidatív stresszre adott válaszokban,

mint például a hősokk és az ozmotikus stressz (Kumar, et al., 2016). A *Botrytis cinerea* képes a kénvegyületeket redukálni, ezáltal e vegyületek mennyiségét a túléléséhez megfelelő szintre csökkenti. Továbbá képes ezeket a vegyületeket más másodlagos metabolitokká alakítani, amelyek előnyösek a szaporodása szempontjából. Amellett, hogy a *B. cinerea* a szaporodását elősegítő metabolitokat termel és alakít át, olyan vegyületeket is azonosítottunk, amelyek antagonista hatással rendelkeznek más mikroorganizmusokkal szemben. A *brown* modulban a kataláz enzimet (BCIN_03g01920) azonosítottuk, amely az I. és II. fázis között felfelé szabályozott "másodlagos metabolitok" útvonalhoz tartozik. Ez az enzim több gazdagított útvonal, például a glioxilátokkal gazdagított útvonal részét képezi, de az alkaloidok szintézisében is kulcsfontosságú enzim. Ez utóbbi csoportba olyan antagonista hatású vegyületek tartoznak, mint például a sziderofór ferrirocín (Chowdhury, et al., 2020). A *green* modulban a 3-dehidrokináz (cDHQáz) (BCIN_09g00160) és az 5-aminolevulinát-szintáz (BCIN_10g03090) enzimeket a III. és IV. fázis között felszabályozott, feldúsult "másodlagos metabolitok" útvonalhoz tartozó enzimeként azonosítottuk. A cDHQ enzim felelős a 3,4-dihidroxibenzoát szintéziséért a shikimát-útvonalon keresztül, és a *B. cinerea* fertőzés egyik markere, amely más mikroorganizmusokkal szemben ismert antagonista tulajdonságokkal rendelkezik (Lattanzio, et al., 2006). Az 5-aminolevulinát-szintáz enzim (BCIN_10g03090) képes porfirin-tartalmú vegyületeket, például protoporfirin-IX-et képezni, amely várhatóan szintén antagonista hatású, mivel a porfirin-tartalmú vegyületek antibiotikum alternatívaként való felhasználását már bizonyították (Ptaszynska, et al., 2018). Ezek a vegyületek in vitro hatásosak a baktériumok, vírusok, gombák és protozoonok fotodinamikus inaktiválásában, amely a reaktív oxigén gyökök képződésén alapul (Trytek, et al., 2013). Fontos megjegyezni, hogy a *Botrytis* által termelt porfirin-tartalmú vegyületek magát a gombát is károsítják, ez az enzim azonban a környezeti tényezők változásaihoz, például a magas cukorszinthez való alkalmazkodásban is szerepet játszhat a hem-szintézis révén, ezért további, metabolomikai vizsgálatok szükségesek annak megválaszolásához mi ennek a vegyületcsoportnak a pontos szerepe és hatása a nemesrothadásban. A *B. cinerea* antagonista aktivitása a korai és a késői fázisokban hozzájárul ahhoz, hogy a folyamat során dominálni tudjon. A *B. cinerea* antagonista faktor termelését a későbbi aszúsodási fázisok során mindmáig kevéssé vizsgálták. A *B. cinerea* által termelt antimikrobiális anyagok megerősítik azt a feltételezésünket miszerint ez a faj olyan adaptív tulajdonságokkal rendelkezik, amelyek lehetővé teszik számára, hogy az aszúsodás során teljes mértékben domináljon.

7.2 A *Botrytis cinerea* és a legjelentősebb vizsgált gombanemzetségek génexpressziójában megfigyelt különbségek szürke- és nemesrothadás esetében

A 7.2 fejezetben az aszúsodás és a szürkerothadás közötti különbségek vizsgálata során kapott eredményeket értelmezzük. A 7.2.1 és 7.2.2 alfejezetekben a *Botrytis cinerea* által expresszált génekre fókuszálunk, míg a 7.2.3 alfejezetben rátérünk a kiválasztott további gombák által expresszált gének funkcionális elemzésére.

Vizsgálataink szignifikáns különbségeket mutattak ki a kifejeződő gének összetételében szürke- és nemesrothadt bogyók esetében, valamint a különböző szüreti időpontok között is. Az itt bemutatott adatok továbbá azt mutatják, hogy a differenciális expresszáldó gének közül több olyan folyamatnak felel meg, amelyek hozzájárulnak az aszúbogyókban végbemenő biokémiai folyamatokhoz és az ebből eredő érzékszervi és fizikai változásokhoz, ami döntő jelentőséggel bír a borászok számára.

7.2.1 *Botrytis cinerea* transzkript gyakoriság és abundancia

A *B. cinerea* funkcionális génátíratának gyakoriságában és abundanciájában megfigyelt változások a három összehasonlított bogyórothadás-típus és a két mintavételi időpont között koncepcionálisan összefüggésbe hozhatók a bogyók fizikai-kémiai jellemzőiben megfigyelt változásokkal (Kelleniemi, et al., 2015) (Hegyi-Kaló, et al., 2020). Azok a megfigyelések, amelyek szerint a *B. cinerea* transzkriptek teljes abundanciája és gazdagsága magasabb volt a rothadt bogyókban, mint az egészséges bogyókban, általában megerősítik feltételezéseinket, bár a különbségek nem minden esetben voltak statisztikailag szignifikánsak. Ez azt jelzi, hogy a *B. cinerea*, egy túlnyomórészt nekrotróf életmódú gomba, a tünetmentes, érett bogyókban még többnyire inaktív a szaporodás szempontjából, amit Lovato és munkatársai (Lovato, et al., 2019) a szüret utáni nemesrothadás esetében kimutattak. A bogyók fizikai-kémiai jellemzőinek dinamikus változásai az aszúsodás kezdete során, például a bogyóhéj lebomlásával (Hegyi-Kaló, et al., 2020), a növény védekezési válaszok beindulásával és az éréssel (Aguedo-Romero, et al., 2015) kapcsolatos változások megfelelnek a *B. cinerea* fokozott metabolikus aktivitásának a nemesrothadás során. Ez összhangban van azokkal a mikrobiológiai vizsgálatokkal, amelyek a *B. cinerea* dominanciáját mutatják az aszúbogyókban a minta grammonkénti kolóniaképző egységeinek száma alapján (Bene & Magyar, 2004) (Blanco-Ulate, et al., 2015). Érdekes módon a szürkerothadásos fertőzést a *B. cinerea* funkcionális gének abundanciájának növekedése jellemezte a nemesrothadáshoz képest, ami részben a *B. cinerea* nagyobb micélium biomasszájával magyarázható. (Dankó, 2021).

Mind az ANOVA-, mind az NMDS-elemzések betekintést nyújtottak a *B. cinerea* expresszált génprofiljának mennyiségi és minőségi különbségeibe a vizsgált különböző rothadási típusú szőlőbogyók között (13-14 ábra), valamint abba, hogy ezeket hogyan befolyásolja a mintavétel időpontja. Az éghajlat, a fajta, a termesztési gyakorlatok, az évjárat és a bogyómikrobiom kombinált hatását Ribéreau-Gayon és munkatársai (Ribéreau-Gayon, et al., 2006), valamint Blanco-Ulate és munkatársai (Blanco-Ulate, et al., 2015) bizonyították. A Tokaj-hegyalja borvidéken a megfelelő időjárási körülmények gyakrabban fordulnak elő az őszi második felében (Bene & Magyar, 2004). A *B. cinerea* kevésbé agresszív elszaporodása ezért valószínűleg sikeresebb nemesrothadási folyamattal jár együtt. Ez utóbbi esetleg lehetővé teheti, hogy az aszúsodás során szintén megjelenő egyéb gombák nagyobb ütemben szaporodjanak, és az együttes hatás esetleg kedvezőbb metabolikus kimenetelű eredményhez vezethet. Az egyéb mikrobák társult anyagcsere-hozzájárulása még nagyrészt ismeretlen terület és további kutatásokra van szükség azok részletes leírásához.

7.2.2. *Botrytis cinerea* nemesrothadás és szürkerothadás során expresszált génjeinek funkcionális elemzése

A *B. cinerea* kifejezett funkcionális génjeinek összetételében jelentős különbségeket találtunk a bogyórothadás típusai között, ami összhangban van a feltételezéseinkkel (4-5 táblázat). A mintavétel időpontja is erős korrelációt mutatott a kifejezett génösszetétellel minden bogyórothadás típusban, ami azt jelzi, hogy a szüret időpontja szignifikáns hatással van a bogyók fiziológiai és biokémiai folyamataira. Míg ezek az időbeli különbségek váratlanok, különösen a szürkerothadt bogyók esetében, addig a nemesrothadt bogyók esetében összhangban vannak a Hegyi-Kaló és munkatársai

(Hegyi-Kaló, et al., 2020) által a különböző szüreti időpontokra vonatkozóan jelentett kémiai különbségekkel (pl. cukortartalom, titrálható savasság), viszont ellentétesek a 7.1 fejezetben leírt különbségekkel. Ez az ellentét ugyanakkor érthető, hiszen ott nem vettük számításba a szürkerothadt bogyókat, viszont vizsgáltuk az aszúsodás II. és III. fázisát. Így kijelenthető, hogy amennyiben az aszúsodás és a szürkerothadás közötti különbségekre és hasonlóságokra koncentrálnunk, úgy a mintavételi időpont nagyobb jelentőséggel bír, mintha kizárólag az aszúsodás különböző fázisait vesszük figyelembe.

Összehasonlítva az egészséges bogyóval, a *B. cinerea* felfelé szabályozott génjeinek funkcionális eltérései a nemesrothadás esetében sokkal szignifikánsabbak voltak, mint a szürkerothadás esetében, különösen az anyagcsere tekintetében. A jelenlegi vizsgálatban számos, a sejtaktivitáshoz kapcsolódó GO-terminus azonosítása, mint például a "sejtalkotó biogenezis" és a "sejtosztódás", a *B. cinerea* során bekövetkező proliferációját mutatja. Ez Blanco-Ulate és munkatársai (Blanco-Ulate, et al., 2015) tanulmányában is nyilvánvaló volt, ahol számos, a sejtnövekedéshez és a gazdaszöveti szerveződéshez kapcsolódó feldúsult gént azonosítottak. Hasonlóképpen, a Lovato és munkatársai (Lovato, et al., 2019) is jelentősen feldúsult, a sejtburjánzással kapcsolatos GO-terminusokat, nevezetesen a "celluláris bioszintetikus folyamat" és a "transzláció" kifejezéseket azonosították a szüret utáni nemesrothadást mutató bogyókban.

Az aszúsodás folyamata során végbemenő biokémiai változásokat több tanulmány is áttekintette (Magyar & Soós, 2016), (Thakur, et al., 2018), (Kallitsounakis & Catarino, 2020). Az egyik jelentős változás a bogyó cukortartalmának növekedése, amelyet a tanulmányok szerint nem csak a vízvesztés okoz, hanem a *B. cinerea* szénhidrát lebontó aktivitása is, amely magyarázza a szén-, glikolízis és piruvát anyagcsereútvonalak megfigyelt feldúsulását is, amelyek számos szénhidrát lebontó enzimet tartalmaznak, köztük a fruktóz-biszfoszfát aldoláz (BCIN_07g03760) és az aldoláz 1-epimeráz (BCIN_02g07210). Érdekes megjegyezni, hogy Lovato és munkatársai (Lovato, et al., 2019) a szénhidrát-anyagcserében szerepet játszó géneket a szüret utáni nemesrothadás során lefelé szabályozottnak találták. Ennek oka lehet az aszúbogyók eltérő mintavételi időpontja és/vagy az, hogy a természetes, a szőlőtőkén végbemenő aszúsodás, mint ebben a vizsgálatban, és az indukált, betakarítás utáni nemesrothadás között fontos különbségek lehetnek az anyagcsere-folyamatokban. Amellett, hogy fontos szerepet játszanak az aszúbogyók biokémiai változásaiban, a poliszacharid-anyagcseréhez tartozó feldúsult útvonalak valószínűleg fizikai változásokat is okoznak a bogyóban a folyamat során. A bogyók sejtfalai az energiában gazdag cukrok fontos forrása, és olyan szénhidrátokból állnak, mint a glükóz, fruktóz, cellulóz, xilóz, xiloglükán, arabinan, I. és II. típusú (arabino)-galaktánok, xilán és mannán (Apolinar-Valiente, et al., 2017). A nemesrothadás során a szőlőbogyók a fertőzés végső stádiumában jobban kiszáradnak, amit a kutikularétegek repedései okoznak (Magyar és Bene, 2006). Hasonló eredményekre jutottak Blanco-Ulate és munkatársai (Blanco-Ulate, et al., 2015) is, akik az aszúsodó szőlőbogyók kezdeti fázisaiban a sejtfal lebontására szolgáló gének (pl. endo- β -1,4-glükánázok) feldúsulását azonosították. Ezen kívül a *B. cinerea* sejtfalbontó enzimeket (CWDE) kódoló génjeinek expressziós profilját vizsgáltuk, és nagy diverzitást találtunk CAZ-imeket, amelyek túlnyomórészt poliszacharid szerkezeteket támadnak, amelyek valószínűleg hozzájárulnak a bogyók keménységének és a héj rugalmasságának fent említett változásaihoz.

A glikolízis és a piruvát-érzékeny útvonalakon belül az aldehid-dehidrogenáz (NAD⁺) (BCIN_03g01130) és az alkohol-dehidrogenáz, propanol-preferáló (BCIN_01g02880)

enzimeket azonosítottuk, amelyek az acetátot és az etanolt acetaldehiddé alakítják (Jelski & Szmitkowski, 2008). Ez utóbbi vegyület az egyik legfontosabb karbonil vegyület, és a borban található összes aldehid több mint 90%-át teszi ki. Rendkívül reaktív, és képes egyes aminosavakhoz vagy fehérjékhez kötődni, így sokféle aroma- és szagvegyületet képezhet, elsősorban gyümölcsös, érett almára emlékeztető illatú. Ezen enzimek igazolják feltételezéseinket bár aromák képződéséhez vezetnek, ezek általában a borokhoz, és nem kifejezetten az aszúsodott bogyókhoz kapcsolódnak.

A nemesrothadás során a fehérjékből és más nitrogénvegyületekből, mint aminosavak, peptidek, ammóniumsók és nukleinsav-származékok, különböző nitrogénkomponensek szabadulnak fel. A *Botrytis cinerea* a felszabaduló nitrogént a fertőzés során különböző anyagcsere-folyamatokhoz használja fel (Thakur, et al., 2018). Emellett a *B. cinerea* számos aminosavat szintetizál a sejtműködéshez. A felszabályozott *Botrytis* gének GO-profilja a "fehérje-anyagcsere-folyamat" és a "sejtféhrje-anyagcsere-folyamat", és különösen az "arginin- és prolin-anyagcsere", a "cisztein- és metionin-anyagcsere", valamint a "glicin-, szerin- és treonin-anyagcsere" útvonalakra vonatkozóan gazdagodott. A génfunkciós profilban az aminosav-anyagcserében részt vevő, azonosított, feldúsított útvonalak közül néhány enzim az aminosavak lebontásáért felelős, mint például az argináz (BCIN_07g00340), amely az "arginin- és prolin-anyagcsere" feldúsított útvonalhoz tartozik, amely az arginint ornitinné és karbamiddá alakítja.

A fent említett feldúsított sejtfalbontó enzimek jelenlétén kívül a BLAST-elemzések alapján azonosított, felszabályozott génprofilban több más azonosított virulenciafaktor előfordulása is lehetővé teszi a *B. cinerea* kolonizációját és az azt követő aszúsodás kialakulását (6. táblázat). Például a BCIN_09g02390, egy mitogén-aktivált protein-kináz fehérje, fontos a gazdaszervezetbe való behatolás és az azt követő kolonizáció szempontjából (Rui & Hahn, 2007). Emellett a BCIN_08g04530 (ubikvitinszerű fehérje-aktiváló enzim), BCIN_05g03080 (peptidil-prolil cisz-transz izomeráz), BCIN_12g02750 (elongátor komplex fehérje), amelyek mind megtalálhatók a nemesrothadt bogyók génprofiljában, szerepet játszanak e kórokozó vegetatív fejlődésében a fertőzés során (Gioti, et al., 2006). A BCIN_03g3390 (szuperoxid-dizmutáz) előfordulása a reaktív oxigéngyökök metabolizmusáért és a gazdaszervezet védelmének kijátszásáért felelős, az aszúsodás korai szakaszában fejeződött ki (Blanco-Ulate, et al., 2015). Érdekes módon Lovato és munkatársai (2019) a fenti enzimről megállapították, hogy összefüggésbe hozható a szürkerothadásos tünetek megjelenésével, bár ők csak a szüret utáni nemesrothadást vizsgálták, és a szürkerothadásra vonatkozó következtetéseiket a korábban közzétett adatok metaanalízise alapján vonták le.

Az "antagonista metabolitok bioszintézise" feldúsult útvonal azonosítása a nemesrothadt bogyók felszabályozott géneiben arra utal, hogy a *B. cinerea* antagonista aktivitással rendelkezik más mikroorganizmusokkal szemben, ami lehetőséget ad a szaporodásra és a dominanciára. Ez genetikai magyarázatot ad korábbi megfigyeléseinkre, miszerint az aszúsodás során, más fonalas gombák visszaszorulásával a *B. cinerea* dominánssá válik az aszú bogyókban. Ez az antibiotikum útvonal nem dúsul a szürkerothadásban, így az antagonista aktivitást kifejező gének ebben a rothadástípusban nem szignifikánsan aktívak. Valószínűleg ez az oka annak, hogy a növénypatogén gombák a szürkerothadás alatt kezdenek dominálni és diverzifikálódni (Barata, et al., 2012). Ezért a *B. cinerea* azon túl, hogy biokémiai és fizikai szempontból hozzájárul a nemesrothadáshoz, úgy tűnik, hogy aktív szerepet játszik az aszúbogyók gombaközösségének szabályozásában. A más

gombákkal szemben antagonista aktivitással rendelkező enzimre jó példa a katabolikus 3-dehidrokináz (cDHQáz) (BCIN_09g06570), amely a 3,4-dihidroxibenzoát bioszintézisében vesz részt. Ez utóbbi termék antagonista aktivitással rendelkezik más gombákkal szemben, és a *B. cinerea* fertőzés markere (Lattanzio, et al., 2006). Az uroporfirinogén III dekarboxiláz enzimet (BCIN_06g06300) a feldúsított "másodlagos metabolitok" útvonalban azonosítottuk, az uroporfirinogén III átalakításáért felelős koproporfirinogén III-á, amely számos porfirin-tartalmú vegyület, például a protoporfirin-IX szintézisének prekursora.

A felszabályozott szürkerothadásos bogyók génprofiljában oxidoreduktázokat találtunk, nevezetesen BCIN_02g07640, BCIN_05g03550, BCIN_12g06380 és BCIN_01g07190 gének, amelyek jelentős szerepet játszanak a patogenitásban és a gazdaszervezet védekező mechanizmusai elleni védelemben (Yu, et al., 2020). Ez összhangban van Lovato és munkatársai (Lovato, et al., 2019) eredményeivel, akik két, a *B. cinerea* virulenciájához szükséges NADPH-oxidázokat kódoló gént, a BcnxA-t és a BcnxB-t találtak kulcsfontosságúnak. Emellett a jelenlegi vizsgálatban azonosítottuk a BCIN_15g03390 gént is, amely a növényi szövetek lebontásához kapcsolódik (Schumacher, 2012). A BCIN_01g00060 és BCIN_12g06380 fitotoxinokat termelő gének azonosítása a felszabályozott génprofilban, amelyek a botcinsav, illetve a botrydial fitotoxinok szintéziséért felelősek, megfelel a Lovato és mtsai. (2019) eredményeinek. Az utóbbi tanulmányban mindkét fitotoxin szintéziséért felelős gének lefelé szabályozódtak a nemesrothadás során, míg a botcinsav gének felfelé szabályozódtak, a botrydial gének pedig nem modulálódtak a szürkerothadás során.

Számos virulenciafaktort azonosítottunk mind a szürke-, mind a nemesrothadásos bogyókban felszabályozott génkészletekben. Bár mindkét adathalmazban azonosítottunk olyan virulenciafaktorokat, amelyeknek átfedő funkcionális szerepük van a virulenciában, a más mikrobákkal szemben antagonista aktivitással rendelkező virulenciafaktorokat kizárólag az aszúsodás során azonosítottuk, míg a fitotoxikus aktivitású gének csak a szürkerothadás során voltak jelen, ami megerősíti feltételezéseinket.

A fejezetben tehát jellemeztük a szürke és nemesrothadás során expresszált gének funkcióit. Ezek között a szénhidrátanyagcsere a fehérjeanyagcsere és az antimikrobiális anyagok bioszintézise esetében kaptunk számos aktív gént, melyek szerepét részletesen ismertettük.

7.2.3. Más vizsgált gombanemzetségek potenciális szerepe

Tudomásunk szerint a mi tanulmány az első, amely a *B. cinerea* mellett a fonalas gombák és élesztőgombák funkcionális génexpressziós profilját is elemzi szürke- és nemesrothadt bogyókban, és bemutatja, hogy ezek a gombák milyen mértékben járulhatnak hozzá a két rothadás során bekövetkező fizikai-kémiai változásokhoz. Újszerű betekintést nyújtunk továbbá a domináns gombák lehetséges kölcsönhatási dinamikájába és szukcessziójába az aszúsodás során, beleértve bizonyos antagonista mikroba-mikroba és mikroba-növény gének termelődését. Összességében az itt bemutatott adatok azt sugallják, hogy míg a *B. cinerea* dominál mind a nemes-, mind a szürkerothadás esetében, más gombák és élesztők előfordulása is egyedi módon járulhat hozzá a teljes transzkriptomhoz, ami fontos következményekkel járhat a borászok számára.

A vizsgált fonalas gombafajok és élesztőgombafajok transzkript abundanciája mind a nemesrothadt, mind a szürkerothadt bogyótípusok esetén gyakoribb volt összehasonlítva az egészséges bogyóval, mely megerősíti feltételezésünket, miszerint a különböző jelenlévő gombafajok egészséges bogyók esetében kisebb élettani aktivitást mutatnak (17-18. ábra). Ezt korábbi tanulmányok a *B. cinerea* esetében már igazolták szüret utáni kísérletekben (Lovato, et al., 2019), valamint jelent tanulmányban szabadföldön (Otto, et al., 2022). Ez utóbbi arra utal, hogy ezek a mikrobák az egészséges, tünetmentes szőlőbogyókon többnyire inaktívak a proliferáció és a metabolizmus szempontjából, majd a *B. cinerea* megjelenésével megnövekszik a funkcionális gének expressziója, amelyek fizikai-kémiai változásokat indítanak el. Például a szénhidrát-anyagcserében szerepet játszó útvonalak aktiválódása (Otto, et al., 2022), (Hegyi, et al., 2022) hozzájárul a bogyó héjának lebomlásához és számos biokémiai változáshoz (Hegyi-Kaló, et al., 2020), valamint beindítja a növényvédelmi válaszmechanizmusokat (Aguedo-Romero, et al., 2015). A fonalas gombák és élesztőgombák transzkript abundanciája kismértékben tér el a szürke- és nemesrothadást összehasonlítva, mégpedig ez előbbi esetében alacsonyabb értékű. A *Botrytis* esetében korábban megfigyelt gazdag micéliumnövekedés a szürkerothadás során (Barata, et al., 2012) nem feltétlenül általános jelenség más fonalgombák esetében is, vagy nem feltétlenül jelzi a funkcionális gének magas expressziós szintjét.

Az ANOVA- és NMDS-elemzések betekintést nyújtottak abba, hogy a gombafajok minőségi és mennyiségi génexpressziós profilja hogyan változott mind a mintavételi hónap, mind a szőlőbogyó rothadástípusa szerint. Korábban kimutatták (Ribéreau-Gayon, et al., 2006), (Blanco-Ulate, et al., 2015) az éghajlat, a fajta, a művelésmód és az évjárat kombinált hatását a szőlőbogyó mikrobiomjára. Emellett korábbi tanulmányok (Bene & Magyar, 2004) azt is igazolták, hogy a tokaji borvidéken az ős második felében gyakrabban fordulnak elő az aszús fejlődéséhez megfelelő időjárási körülmények. Az összes fonalas gomba és élesztőgomba funkcionális génexpressziós profiljában kifejezett összetételbeli különbségeket találtunk az egyes szőlőbogyó-rothadástípusok között, ami megfelel feltételezéseinknek. A mintavétel hónapja azonban erős korrelációt mutatott az expressziós génprofilal minden szőlőbogyó-rothadástípusban, ami rávilágít arra, hogy a szüret időpontja (kora vagy késő őszi) erős hatással lehet a nemesrothadás folyamatára és kisebb mértékben szürkerothadás során lejátszódó biokémiai és fizikai folyamatokra. Ez a megállapítás összhangban van a szőlőbogyók különböző szüreti időpontokban leírt kémiai különbségeivel (pl. cukortartalom, titrálható savtartalom) (Hegyi-Kaló, et al., 2020).

A vizsgált gombafajok közül a *B. cinerea* funkcionális génkészletében a legnagyobb számú a különböző rothadástípusokban, mindkét vizsgált mintavételi időpontban differenciálisan expresszált gén, amely bizonyítja a két szőlőbogyó-rothadástípusban való túlsúlyát. Ez nem meglepő, hiszen *B. cinerea* által fertőzött szőlőbogyókat gyűjtöttünk. A nemesrothadásban differenciálisan kifejeződő gének száma (>31) a többi fonalas gomba és élesztő esetében a szürkerothadással szemben (<5) arra utal, hogy ezeknek aktívabb szerepük lehet az aszús bogyó kialakulásában, mint a szürkerothadásban.

7.2.4. A vizsgált gombafajok génexpressziós profiljai és a nemesrothadás és szürkerothadás során

Jelentős különbséget találtunk a fonalas gombák és élesztőgombák minőségi és mennyiségi génexpressziós profiljában szürke- és nemesrothadás esetében (8. táblázat, 19. ábra). Az *A. alternata*, *B. cinerea*, *E. nigrum*, *A. pullulans* és *R. graminis* GO

elemzése és útvonal feldúsulás elemzése sokkal aktívabb génexpressziós profilt mutattak az aszúsodás esetében, mint a szürkerothadás esetén, különösen az anyagszere és a transzporttal és proliferációval kapcsolatos sejtaktivitás tekintetében. Az *A. alternata* és a *B. cinerea* felfelé szabályozott génprofiljában a sejtproliferációhoz kapcsolódó, feldúsult GO-terminusok azonosítása megfelel Blanco-Ulate és mtsai. megállapításainak (Blanco-Ulate, et al., 2015), akik szintén feldúsult, sejtfolyamatokhoz kapcsolódó útvonalakat találtak, mint például a "sejtnövekedés". Hasonlóképpen, a feldúsult GO-terminusokat, köztük a sejtszintű bioszintetikus folyamat és a 'Celluláris komponens biogenezis' kifejezéseket (Lovato, et al., 2019), illetve (Otto, et al., 2022) azonosították. A sejtburjánzásban részt vevő számos gén azonosítása valószínűleg összefüggésbe hozható a sejtbiomassza növekedésével az aszúsodott bogyók esetében minden itt elemzett gombafajnál.

Az aszúsodás során számos fizikai és biokémiai változás megy végbe a szőlőbogyókban, amelyeket részletesen áttekintettünk (Kallitsounakis & Catarino, 2020), (Magyar & Soós, 2016). Például a tokaji régióban a szőlőbogyók cukortartalma a botritizálódás során akár 350-700 g/l-re is emelkedhet. A nemesrothadás során a *B. cinerea* számos olyan gént expresszál, amelyek a szénhidrát-anyagcserében vesznek részt (Hegyi, et al., 2022). A *B. cinerea* szénhidrát-anyagcseréje is összefügg a szőlőbogyó sejtfalában a korai fázisok során végbemenő változásokkal, mivel az olyan szénhidrátokból áll, mint a glükóz, fruktóz, cellulóz, xilóz, xiloglükán, arabinan, I. és II. típusú (arabino)-galaktánok, xilán és mannán (Apolinar-Valiente, et al., 2017). Hasonlóképpen (Blanco-Ulate, et al., 2015) több CAZymet azonosítottak, miközben a sejtfalbontó enzimek (CWDE) jelenlétét vizsgálták, amelyek valószínűleg részt vesznek a bogyóhéj rugalmasságának és keménységének megváltoztatásában. A jelenlegi vizsgálatban szereplő fonalas gombák és élesztőfajok szintén hozzájárulhatnak a cukortartalom növekedéséhez és a bogyóhéj fizikai változásaihoz, mivel számos szénhidrát-anyagcseréhez kapcsolódó, dúsított útvonalat találtunk, amelyek számos olyan szénhidrát-aktív (CA) enzimet tartalmaztak, amelyek közvetlenül vagy közvetve szénhidrátokat bontanak le. Ami a közvetett lebontásban részt vevő enzimeket illeti, valamennyi fonalas gombában és élesztőtörzsben több enzimet azonosítottunk. Például glükóz-6-foszfát izomerázt, amely a glikolízis alútjában vesz részt (Mojzikova, et al., 2018) azonosítottuk a *B. cinerea* (BCIN_15g04970), az *A. alternata* (CC77DRAFT_636933), az *E. nigrum* (B5807_07479), az *A. pullulans* (M438DRAFT_297371) és a *R. graminis* (RHOBADRAFT_32461) esetében. Az *A. alternata* esetében (CC77DRAFT_1006243) csak egy olyan enzimet azonosítottunk, amely közvetlenül részt vesz a szénhidrátpolimerek lebontásában (Li, et al., 2021), nevezetesen egy glükán endo-1,3-béta-D-glükozidázt.

Az alkoholanyagcseréhez kapcsolódó szénhidrát-enzimek tekintetében egy aldehid-dehidrogenázt kódoló gént azonosítottunk az *A. alternata* (CC77DRAFT_mRNA1019268), a *B. cinerea* (BCIN_03g01130), az *E. nigrum* (B5807_03687) és az *A. pullulans* (M438DRAFT_291551) glikolízis és piruvát útvonalakkal dúsított glikolízisében. Ezen kívül egy alkohol-dehidrogenázt kódoló gént találtunk az *A. alternata* (CC77DRAFT_1049514), a *B. cinerea* (BCIN_01g02880), az *E. nigrum* (B5807_08512) és az *A. pullulans* (M438DRAFT_342985) dúsított glikolízis útjában. Az aldehid-dehidrogenáz és az alkohol-dehidrogenáz felelős az acetát, illetve az etanol felcserélhető átalakításáért acetaldehiddé (Jelski & Szmitkowski, 2008). E gének jelenléte tehát hozzájárulhat a fokozott érzékszervi szájmelegítő hatással járó alkoholképződéshez, valamint a nemesrothadt szőlőből készült borok esetén nagy jelentőségű aldehidtartalomhoz is. Az acetaldehid másrészt erősen reaktív, és nitrogéntartalmú vegyületekkel, például fehérjékkel és aminosavakkal reagálva különféle aromás vegyületeket képezhet.

Az *A. alternata*, az *E. nigrum* és az *A. pullulans* esetében a TCA-ciklus és az oxokarboxil-útvonal, valamint az *A. alternata* és az *E. nigrum* esetében a glikoxilát- és dikarboxilát-anyagcsere felerősödése valószínűleg a szerves savak szintéziséhez kapcsolódik. A szerves savak a borok stabilitásának fontos összetevői, ezért a borokban történő elemzésükre a minőségellenőrzéshez szükség van (Robles, et al., 2019). A szerves savakról feltételezik, hogy antioxidáns tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek egészségügyi előnyökkel járnak, és az élelmiszerekben lévő kórokozók jelenlétének korlátozására is használják őket. A TCA-ciklus közvetlenül részt vesz a legtöbb köztes karbonsav, például a malát, a citrát és a borostyánkősav szintézisében (Stubbs, et al., 2020). A jelenlegi vizsgálatban számos más TCA enzim mellett egy fumarát-hidrátáz, egy malát-dehidrogenázt kódoló gént azonosítottunk, amelyek az (S)-malát, illetve az oxalacetát szintézisében vesznek részt, az *A. alternata* (CC77DRAFT_946367; CC77DRAFT_1005031), *E. nigrum* (B5807_04743; B5807_10373) és *A. pullulans* (M438DRAFT_mRNA334283; M438DRAFT_mRNA347257) esetében. Ezenkívül több, ehhez az útvonalhoz tartozó, a szerves savak közötti átalakulásért felelős enzimet is azonosítottunk, amelyek közül az *A. alternata* (CC77DRAFT_1066078), az *E. nigrum* (B5807_05176) és az *A. pullulans* (M438DRAFT_341850) esetében azonosítottunk egy aszpartát-aminotranszferázt kódoló gént, amely kifejezetten az oxalacetát és az aszpartát közötti reverzibilis interkonverzióért felelős (Sookoian & Pirola, 2012). A glioxilát útvonal szorosan kapcsolódik a TCA-ciklushoz, és leginkább akkor aktív, amikor az acetát oxidálódik. A glioxilát-útvonal fontos a TCA-ciklus által felhasznált szén folyamatos áramlása szempontjából, mivel pótolja a TCA-ciklus anaerob reakciókhoz használt köztitermékeit (Wendisch, et al., 2006). Az *A. alternata* dúsított glikoxilát útvonalában azonosítottunk egy citrát-szintázt kódoló gént (CC77DRAFT_1005031), amely az acetátból képződő acetyl-CoA-t citráttá alakítja/metabolizálja. A citrátos erjedés diacetyl termelődéséhez vezet, amely a bor vajas aromájáért felelős (Belda, et al., 2017).

Az aszúsodás során a szőlőbogyók felvehető nitrogéntartalma megnő, mivel a nitrogén nitrogéntartalmú vegyületekből, például peptidekből és aminosavakból nitrogén szabadul fel. A felszabaduló nitrogént később a *B. cinerea* hasznosítja a fertőzési folyamat során (Thakur, et al., 2018), és valószínűleg más gombák is felhasználják azt. Valószínűleg ezt tükrözi, hogy a fonalas gombák és élesztőfajok esetében számos feldúsult GO-terminust és útvonalat azonosítottunk, amelyek az anabolikus és katabolikus nitrogénanyagcseréhez kapcsolódnak. A nitrogén katabolizmus tekintetében a *B. cinerea* esetében egy arginázt (BCIN_07g00340) azonosítottunk, amely a feldúsított "Arginin és prolin metabolizmus" útvonalhoz tartozik. Ez utóbbi enzim az arginin ornitinné és karbamiddá történő átalakításával a könnyen felvehető nitrogéntartalom növekedését eredményezi. Az *A. alternata* 'Cisztein és metionin metabolizmus' útvonalon belül két enzimet, nevezetesen egy aszpartát-aminotranszferázt (CC77DRAFT_1066078) és egy malát-dehidrogenázt (CC77DRAFT_9369630) találtunk, amelyek képesek az L-ciszteint piruváttá lebontani, amit követően ammónia szabadul fel (Hildebrandt, et al., 2015). Az utóbbi két enzimnek szintén a "Cisztein és metionin metabolizmussal" dúsított útvonalhoz tartozó ortológjait találtuk meg az *E. nigrum* (B5807_05176; B5807_01092) és az *A. pullulans* (M438DRAFT_271592; M438DRAFT_315011) esetében is.

A szőlőbogyók kiszáradásával és a cukorkoncentráció növekedésével a gombáknak egyre nagyobb környezeti stresszel kell megbirkóznuk. Ez valószínűleg összefügg a stressztűréssel kapcsolatos gének jelenlétével, amelyeket a virulencia BLAST-analízisek alapján azonosítottunk az adott gombafajok felszabályozott génkészletében, mint például az 1.3.8-trihidroxinaftalin-reduktáz (CC77DRAFT_528893) az *A. alternata* esetében, amely UV-rezisztenciát kölcsönöz (Langfelder, et al., 2003), a

BCIN_08g04530 a *B. cinerea* esetében, amely lehetővé teszi az autofágiát (Ren, et al., 2018), és az 5-aminolevulinát-szintáz (B5807_11545) az *E. nigrum* esetében, amely a hem bioszintézis első lépéséhez szükséges (Hunter & Ferreira, 2009).

A borban a legfontosabb illattal kapcsolatos termékek a magasabb rendű alkoholok és a zsírsavak (Styger, et al., 2011). Az *E. nigrum* génkészletében azonosítottuk a feldúsult "propanoát" útvonalat. Többek között a dihidrolipoamid-dehidrogenáz enzimet (B5807_05535) azonosítottuk, amely ehhez az útvonalhoz tartozik, és amely a dihidrolipoamid E-t lipoamid E-vé alakítja. Ez utóbbi vegyületet ezt követően egy reakciósorozat során propanoil-CoA-vá alakul át, amely az észter-propanoát képződésének prekursora (Wongkittichote, et al., 2017). Az észterek a borban található fontos illékony vegyületek, amelyek kellemes gyümölcsös aromákkal társítunk. Az *A. alternata* esetében az alkohol-dehidrogenáz enzimet (B5807_00377) a feldúsított "Zsírsav-metabolizmus" enzimben azonosítottuk, ami hozzájárulhat az alkohol és más aromás vegyületek koncentrációjának növekedéséhez, ahogyan azt korábban tárgyaltuk. Az *A. alternata* (CC77DRAFT_928877) és az *E. nigrum* (B5807_00377) esetében egy zsírsavszintáz enzimet találtunk. Ez az enzim számos zsírsav szintézisében vesz részt (Jensen-Urstad & Semenkovich, 2012), mint például a propánsav, amely megtalálható az aszú borokban, és gyümölcsös, tejes ízzel társul (Barata, et al., 2012). A fentiekből tehát egyértelmű, hogy minden fonalas gomba és élesztő valószínűleg hozzájárul az aszúsodás során végbemenő fizikai és biokémiai változásokhoz, bár egyesek jobban, mint mások, ami megerősíti a feltételezéseinket.

A fejezetben tehát meghatároztuk azokat a szignifikánsan feldúsult anyagcsere útvonalakat, amelyek a *B. cinerea* mellett vizsgált további kiválasztott gombák aktivitását jellemzi. Azt találtuk, hogy ezek a gombák az aszúbogyókon aktívabbak és változatosabb anyagcsereműködés jellemzi azokat, mint a szürkerothadt bogyókon, mely folyamatokat az előzőekben részletesen leírtunk.

7.2.5. A génexpressziós profilok és a mikroba-mikroba vagy mikroba-növény kölcsönhatások közötti kapcsolatok a nemesrothadás és a szürkerothadás során

Az antagonista metabolit bioszintézis feldúsult útvonalainak azonosítása, valamint a virulencia BLAST segítségével meghatározott faktorokhoz kapcsolódó gének azonosítása a vizsgált gombafajok felszabályozott, nemesrothadással összefüggő génjeinek vonatkozásában több esetben is mikrobiális kölcsönhatásokra utal (8. táblázat). A fajok együttes konkurens jelenléte valószínűsíti az antagonista kölcsönhatásokat, mivel a gombák egymással és a prokariótákkal is versengenek az élettérért és a táplálkozási erőforrásokért. Az aszúsodott bogyók esetén az „antagonista metabolitok bioszintézise” útvonalat egyik fonalas gomba- vagy élesztőfaj sem expresszálta szignifikánsan feldúsult módon ellentétben a szürkerothadás esetében tapasztaltakkal, ami részben magyarázatot adhat a fonalas gombák bőséges micéliumos növekedésére a szürkerothadás során, ahogyan azt már mások is (Barata, et al., 2012) megfigyelték. Ezért emellett, hogy a többi gomba- és élesztőfaj valószínűleg hozzájárul a nemesrothadás során végbemenő fizikai-kémiai változásokhoz, aktív szerepet játszhatnak a mikrobiális közösség szerkezetének alakításában is.

Például a katabolikus 3-dehidrokináz (cDHQáz) (BCIN_09g06570) és az uroporyphyrinogen III dekarboxiláz (BCIN_06g06300), amelyek mindketten gombaellenes aktivitással rendelkeznek (Lattanzio, et al., 2006), a *B. cinerea* aszús felfelé szabályozott génkészletében azonosítottuk a feldúsított "antagonista kölcsönhatás génjeinek bioszintézise" útvonalban. A katabolikus 3-dehidrokináz (BCIN_09g06570) a 3,4-dihidroxibenzoát bioszintézisében vesz részt (Lattanzio és

mtsai. 2006), míg a 3-dehidrokináz (BCIN_09g06570) az uroporfirinogén III-at alakítja át koproporfirinogén III-á, amely a porfirintartalmú vegyületek szintézisének prekursora. Az *A. alternata* esetében egy C-4 metilszterol-oxidázt (CC77DRAFT_1078410) azonosítottunk, amely akadályozza a gombamembrán szintézisét a feldúsított "Bioszintézis antagonistá interakciós gének" útvonalában. Hasonlóképpen, az *E. nigrum*-ban azonosítottunk egy zsírsav-hidroxiláz domént tartalmazó fehérjét (B5807_00281), amely részt vesz a C-4 metil-szterol-oxidáz aktiválásában (Jordá & Puig, 2020). Az *A. pullulans* esetében egy alkohol-dehidrogenázt (M438DRAFT_326255) azonosítottunk a feldúsított "antagonista kölcsönhatás géneinek bioszintézise" útvonalban, amely az alkoholtermelésben játszik fontos szerepet, felváltva alakítja át az acetátot és az etanolt acetaldehiddé (Jelski & Szmítowski, 2008). Amellett, hogy a korábban tárgyaltak szerint hozzájárul a bor érzékszervi tulajdonságaihoz, az alkoholt fontos tényezőnek tartják, amellyel az élesztők az aszúsodás során a fonalas gombákat kontrollálják (Freimoser, et al., 2019), és ez lehet az oka annak, hogy a későbbi fázisokban az élesztők dominálnak (Blanco-Ulate, et al., 2015), (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Mind az *Aureobasidium*, mind a *Rhodotorula* valóban nagyobb transzkriptgazdagságot mutat, mint az *Alternaria* és az *Epicoccum* a mi vizsgálatunkban.

Az antagonistá metabolitok szintéziséhez kapcsolódó enzimeket is azonosítottunk, amelyek az *A. alternata* és az *E. nigrum* esetében a feldúsult "antagonista kölcsönhatás géneinek bioszintézise" útvonalban olyan vegyületek szintéziséért felelősek, amelyeknek kellemetlen érzékszervi tulajdonságot kölcsönözhet a bornak, beleértve a szulfidot és a ként (Goode et al. 2008). Az *A. alternatában* találtunk szulfát-adenililtranszferázt (CC77DRAFT_951586), amely a szulfátból történő szulfitszintéziséért felelős, egy olyan vegyületért, amelyet általában élelmiszer tartósítószerként használnak, valamint számos nem *Saccharomyces* élesztő, tejsavbaktérium (LAB) és ecetsavbaktérium (AAB) szaporodásának visszaszorítására a bortermelés során (Patro, et al., 2017). Hasonlóképpen, az *E. nigrum* esetében azonosítottak egy ATP adenzin-5'-foszfoszfoszulfát 3'-foszotranszferázt (B5807_08270), amely a kénképződésért felelős, amely jól ismert a fungicid tulajdonságairól (Huang, et al., 2020).

Más fonalas gombákkal és élesztőkkel ellentétben, amelyek antagonistá kölcsönhatás géneit csak az aszúsodott bogyók esetében fejezték ki, a *B. cinerea* transzkriptjában antagonistá kölcsönhatási faktorokat azonosítottunk mindkét rothadási típus esetében (a feldúsított "Az antagonistá kölcsönhatás géneinek bioszintézise" és virulencia gének). Az a tény, hogy a feldúsult "Antagonista metabolitok bioszintézise" útvonal jelen volt az összes fonalasgomba és az *A. pullulans* nemesrothadt bogyókból származó génkészletében, kiemeli, hogy feltehetően ebben a fázisban zajló komplex kölcsönhatási dinamika jellemzi a mikrobiótát. Ez ellentétben áll a szürkerothadásos esettel, ahol a *B. cinerea* elleni antagonizmus hiánya más mikrobák részéről, valamint a kedvezőbb ozmotikus körülmények valószínűleg lehetővé teszik a *B. cinerea* nagyobb dominanciáját, ami nemkívánatos fiziológiai változásokhoz vezet, ami a termés kiesést okozza.

A *B. cinerea* által felszabályozott szürkerothadásos génprofilban csak a gazdaszervezet-kórokozó interakciós gének voltak azonosíthatók, amelyek többsége gazdaszervezet-interakciós gén, arra utalhat, hogy a *B. cinerea* a GR okozója. A gazdaszervezet-interakciós gének közé olyan gének tartoztak, amelyeknek jelentős szerepük van a gazdaszervezet védelmi válaszában a károsításában és a patogenitásban, mint például a BCIN_02g07640, BCIN_05g03550, BCIN_12g06380 és BCIN_01g07190, (Yu, et al., 2020), valamint a növényi szövetek elpusztításával és lebontásával kapcsolatos gének, mint a BCIN_15g03390 (Schumacher, 2012), valamint a BCIN_01g00060 és BCIN_12g06380, amelyek a botcinsav és a botrydial fitotoxinok

szintéziséért felelősek. Ez utóbbi eredmények megfelelnek (Otto, et al., 2022) megállapításainak, amelyek szerint ezek a gének jelen vannak a *B. cinerea* felfelé szabályozott szürkerothadásos génkészletében, valamint (Lovato, et al., 2019), feltételezésünkkel, miszerint mindkét gén szintézise lefelé szabályozott az aszúsodás során.

A fejezetben tehát ismertettük a nemesrothadt és szürkerothadt bogyókon azonosított mikrobiális kölcsönhatásokkal kapcsolatos géneket. Azt találtuk, hogy míg a *B. cinerea* gének mind a két típus esetében mutat antagonista viselkedést, addig ezek a folyamatok a többi gomba esetében csak az aszúbogyókon volt szignifikánsan feldúsulva.

7.3 Az egyéb vizsgált gombafajok potenciális hatása az aszúborok aromájára

A jelen tanulmány - tudomásunk szerint - az első, amely a *B. cinerea* mellett azonosított fonalgombák és élesztőgombák aktív metabolikus szerepét vizsgálja az aszúsodás során, valamint arról, hogy ezek hogyan járulnak hozzá az aszúsodás folyamatához, különösen a szőlő és boraromák, az aromával kapcsolatos vegyületek és azok prekursorainak kialakulásához, amelyek befolyásolhatják az érzékszervi tulajdonságokat és a bor általános minőségét. Betekintést nyújtunk abba, hogy a nemesrothadáshoz kapcsolódó fonalas és élesztőgombák funkcionális génexpressziós profiljai hogyan változnak a folyamat során, ahogyan azt a nemesrothadási fázis és a mintagyűjtési hónapok befolyásolják, ami döntő jelentőséggel bírhat a borászok számára.

Mind a fonalgombák, mind az élesztőgombák transzkript abundancia növekedése az aszúsodás során vizsgálataink eredménye alapján ellentétben áll az irodalomból ismertekkel, nevezetesen, hogy a fonalas gombák a folyamat elején jelennek meg, szemben az élesztőgombákkal, amelyek a későbbi szakaszokban dominálnak (Li, et al., 2021) (9. táblázat, 20. ábra). Ez az ellentétes trend valószínűleg az aszúsodás négy szakasza során növekvő funkcionális szerepét tükrözi, különösen a jelenlegi vizsgálatban az aromával kapcsolatos prekursorok esetében. A WGCNA klaszterezett *turquoise* modulhoz tartozó sajátgén jelentős növekedése a II-III. fázisától a IV. fázisáig, valamint a legnagyobb számú egyedileg felszabályozott gén előfordulása az összes fonalas és élesztőgomba esetében a negyedik fázisban kvantitatív módon azt jelzi, hogy ebben a fázisban a mikrobióta más, a bor ízét és aromáját érintő együttes mikrobiális hatás az aszúsodás későbbi fázisaiban történik. Az aroma kialakulásához kapcsolódó számos feldúsult útvonal és gén, pl. az aminosav- és lipidanyagcserében részt vevő útvonalak előfordulása jelezte az aroma kialakulásában betöltött közvetlen és közvetett szerepüket. A *B. cinerea*-tól eltérő, aszúsodáshoz kapcsolódó fonalgombákból és élesztőgombákból származó számos enzim azonosítása a *B. cinerea* fontos ám nem egyedüli szerepére utal az utóbbi vonatkozásban (10. táblázat és M4 melléklet). Bár a *B. cinerea* a domináns gomba az aszúsodás mind a négy szakaszában, úgy tűnik, hogy fő funkcionális szerepe a folyamat korai szakaszában (I. és II. fázis) a bogyóhéj szerkezeti változásaiban van, amint azt korábbi tanulmányunkban (Hegyi, et al., 2022) kimutattuk. A mintavételi hónap fonalgombák és élesztőgombák expressziós profiljára gyakorolt hatásának hiánya (nem szignifikáns hatása), ahogyan azt az NMDS-elemzések mutatták, megfelel korábbi eredményeinknek, ahol hasonló eredményeket találtunk a *B. cinerea* funkcionális génexpressziós profiljának három hónap alatt történő elemzésekor. Ez azt mutatja, hogy az elsősorban a *B. cinerea*-hoz társuló fonalas és élesztőgombák funkcionális génprofilja viszonylag állandó.

Az aromával kapcsolatos aminosav-anyagcsere enzimek tekintetében az azonosított enzimek többsége aminosavak szintézisére vonatkozott, amelyek közül néhány aromás, valamint aminosavból származó konjugátumok. Ezen aminosavak későbbi lebontása vagy további metabolikus módosítása az aromavegyületek kialakulásához kapcsolódik (Ardö, 2006). Az *E. nigrum* esetében például azonosítottunk egy penta-funkcionális aroma-polipeptidet (B5807_03777), amely részt vesz az aromás aminosavak szintézisében. Ezenkívül aromás aminosav-transzferázt azonosítottunk *A. pullulans* esetében (M438DRAFT_343791), amely katalizálja az aromás aminosavak transzaminációját a megfelelő alfa-ketosavakká. Konkrétan egy tirozin: fenilpiruvát aminotranszferázt azonosítottunk az *A. alternata* (CC77DRAFT_1066078) és egy aszpartát aminotranszferázt az *A. pullulans* (M438DRAFT_279163) esetében, amelyek az aromás aminosavak fenilalanin (Qian, et al., 2019) és tirozin bioszintézisében vesznek részt. A fenilalanin számos kellemes tónusú aromavegyület szintézisének előanyaga, mint például a virágos tónusú 2-fenilacetát. Továbbá a fenilalanin a fenilpropanoidok prekursora, és az *A. alternata* expresszált génkészletében található cinnamilalkohol-dehidrogenáz (CC77DRAFT_404246) a fahéjalkoholt cinnamilaldehiddé alakítja, amely édes cseresznye jellegű aromával rendelkezik (Budrock, 2016). A tirozin lebontása kellemes aromák, például virágos aromák, valamint kellemetlen aromák, köztük kémiai anyagokhoz társított, úgynevezett vegyszeres aromák kialakulásához vezethet (Ardö, 2006). A fenilalanin és aromás származékainak szintézise mellett az enzim felelős az oxalacetát és az aszpartát közötti reverzibilis interkonverzióért is. Továbbá egy 3-izopropilmalát-dehidrogenázt (M438DRAFT_313770) és egy szacharopin-dehidrogenázt (M438_DRAFT_353262) találtunk az *A. pullulans* esetében, amelyek a leucin-, illetve a lizin bioszintézisben vesznek részt. A leucin közismerten gyümölcsös jelleget kölcsönöz a bornak és más alkoholos italoknak. A szacharopin-dehidrogenáz kifejezetten a 2-oxoglutarát képződéséért felelős, amely a bor fő karbonilvegyülete (Herzan, et al., 2020).

Az aminosavval kapcsolatos származékok tekintetében egy glutation-hidroláz (M438DRAFT_280042) és egy laktoilglutacion-liáz (B5807_09934) volt jelen az *A. pullulans* és az *E. nigrum* génexpressziós profiljában. A glutation-hidroláz a 3-merkaptóhexán-1-ol előanyaga, amely a bor trópusi vagy citrusos gyümölcsös aromájához társul. A laktolilglutacion-liáz egy aldoketo reduktázzal konjugálva detoxifikálja a metilglioxált. Ez utóbbi vegyület részt vesz a metilbutanal szintézisében, amely a mérsékelten amilás aromáért felelős. Végül az *A. pullulans* esetében azonosítottunk egy antranilát-metabolizmusban részt vevő antranilát-szintázt (M438DRAFT_335458), amely a narancsvirág aromájú metil-antranilát molekulát szintetizálja (Li, et al., 2021).

A lipidanyagcserehez kapcsolódó enzimek többsége, akárcsak a nitrogénanyagcserehez kapcsolódó enzimek, az aromavegyületek prekursorainak, nevezetesen a zsírsavaknak, származékaiknak (észtereknek) és szteroloknak a szintéziséhez kapcsolódik. A zsírsavak és a hozzájuk kapcsolódó származékok szintézisével kapcsolatban az *A. alternata* esetében egy hosszú szénláncú zsírsav-CoA ligázt (CC77DRAFT_1033357) és egy zsírsavszintáz béta alegységet (CC77DRAFT_928877) találtunk, míg az *E. nigrum* génkészletében egy zsírsavszintáz alfa alegységet azonosítottunk (B5807_00377) (Baekdal, et al., 2012). A zsírsavanyagcsere szereplői mellett egy tiolészter-dehidráz-izomerázt (M438DRAFT_310991), egy az észterek szintéziséért felelős pantotenát-kinázt (M438DRAFT_366935) (Cordente, et al., 2007), egy az észterek lebontásáért felelős

karboxil-észter-hidrolázt (M438DRAFT_363842) azonosítottunk, valamint egy feruloilészterázt (M438DRAFT_347279), amely részt vesz a hidroxifahéjsavak felszabadításában észterezett formájukból, majd ezt követően illékony fenolokká alakul, és így hozzájárul az aromaprofilhoz (Pérez-Jimenez, et al., 2019). Az *A. alternata* esetében (CC77DRAFT_1019990) és az *A. pullulans* esetében (M438DRAFT_265955) megtalálható mevalonát-kináz a szterolok, valamint a terpének, például a geranil-difoszfát, a farnezil-difoszfát és a diterpének geranilgeranil-difoszfát szintéziséhez kapcsolódik (Wedler, et al., 2015). Hasonlóképpen, az *A. pullulans* génkészletében található geranil-difoszfát-szintáz (M438DRAFT_273287), maleilacetát-reduktáz (M438DRAFT_268034) és monoterpenil-glikozilteranszferáz (M438DRAFT_316845) is részt vesz a terpének szintézisében (Li, et al., 2017). A terpének az illékony vegyületek egyik legfontosabb csoportja, amelyek hozzájárulnak a borszőlő jellemző aromaprofiljához. Az összes lipidanyagcseréhez kapcsolódó enzim közül csak egy enzim, nevezetesen az *A. pullulans*-ból származó ERG20 farnezil-difoszfát-szintáz (M438DRAFT_269366) járul hozzá közvetlenül az aromához a rotundon, egy borsszerű aromával társított vegyület képződésével (Siebert, et al., 2008).

Az aminosav- és lipidanyagcserével kapcsolatos enzimekhez hasonlóan a szénhidrát-anyagcserével kapcsolatos enzimeket is azonosítottunk, amelyek hatással vannak az aroma prekursor vegyületek képződésére, nevezetesen egy glikozid-hidrolázt (M438DRAFT_317847), piruvátdekarboxiláz (M438DRAFT_346971) és piruvát-dehidrogenáz (M438DRAFT_348965), valamint prefenát-dehidratáz (M438DRAFT_326681) az *A. pullulans* esetében, valamint egy foszfoglükomutáz (B5807_00578) az *E. nigrum* esetében. A glikozidhidroláz glikozidokat képez, amelyek az aroma ilyen jellegű kémiai tartalékait képezik. A piruvát-dehidrogenáz acetátot képez, amelyet a piruvátdekarboxiláz acetaldehiddé alakít át (Neuser, et al., 2000), amely vegyület a bor teljes aldehidtartalmának 90%-át teszi ki, és gyümölcsös aromával társul. A prefenát-dehidratáz a prefenátot fenilpiruváttá alakítja át, amely ezt követően 2-feniletanollá alakul, amely az erjesztett élelmiszerek virágos és mézes aromájáért felelős. Kimutatták, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* génexpressziós profilja alkoholos erjedés közben a foszfoglükomutáz katalizálja a hexóz anyagcsere egyik kulcsfontosságú lépését, amely fontos illóanyagok prekursorai lehetnek, amelyek az alkoholos erjedés során fontos hozzájárulást jelenthetnek a bor aromájához. Az illósavak azonban túlzott mennyiségben kellemetlen, ecetszerű illatot okoznak (Reiter, et al., 2021).

A szénhidrát-anyagcseréhez kapcsolódó, aromával kapcsolatos enzimek közül a jelenlegi vizsgálatban több olyan enzimet azonosítottunk, amelyek részt vesznek a citrát-anyagcserében és a kapcsolódó malolaktikus erjedésben, nevezetesen egy citrát-szintázt az *A. alternata* (CC77DRAFT_250650), az *A. pullulans* (M438DRAFT_294441), az *E. nigrum* (B5807_06716), emellett egy l-laktát-dehidrogenáz az *A. alternata* (CC77DRAFT_285449) és az *A. pullulans* (M438DRAFT_292234), és egy malát-dehidrogenáz (B5807_02946), malánenzim (B5807_05369) acetolaktát-szintáz az *A. alternata* (CC77DRAFT_285449) és az *A. pullulans* (M438DRAFT_292234), valamint egy malát-dehidrogenáz (B5807_02946), malánenzim (B5807_05369) acetolaktát-szintáz az *A. pullulans* (M438DRAFT_264767) és *E. nigrum* (B5807_00488), illetve egy aldehid-dehidrogenáz az *A. pullulans* (M438DRAFT_282832) és *E. nigrum* (B5807_0481) esetében. A citrát és a malolaktikus erjedéshez kapcsolódó enzimek diacetilhez és diacetilszármazékokhoz kapcsolódnak, amelyek fontos aromavegyületek, és hozzájárulnak a bor "vajás" aromájához (Bartowsky & Henschke, 2004). Amellett,

hogy hozzájárulnak a borok általános aroma- és ízprofiljához, a szerves savak és karbonsavszármazékaik anyagcseréje hatással van a bor eredő összes sav-bázis kémijára és pH-jának változására (Vicente, et al., 2022), alkoholtartalmára, színére és stabilitására, ami befolyásolja a bor érzékszervi tulajdonságait és általános minőségét. Továbbá a szerves, illetve a karbonsavak antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkeznek, amelyek jótékony hatással vannak az emberi egészségre, és segítenek megvédeni a bor aromás vegyületeit az oxidációtól és az azt követő íz- és aromavesztéstől (Papadopoulou & Roussis, 2008). A korábban említett, a szerves savak metabolizmusában részt vevő enzimek mellett egy izocitrát-dehidrogenázt (CC77DRAFT_1056855) és egy izocitrát-liáz (H) (M438DRAFT_343020) enzimet azonosítottunk az *A. alternata* (CC77DRAFT_1056855) és az *A. pullulans* (M438DRAFT_343020) esetében, mindkettő antioxidáns hatású (Benhar et al., 2012), amely védi a bor aromás vegyületeit az oxidációtól.

Az antioxidáns tulajdonságok tekintetében az *A. pullulans* esetében glutamát-ciszteinliázt (M438DRAFT_342907) és hidroxil-acilglutathion-hidroláz/glioxiláz II-t (M438DRAFT_273852), gamma-glutamil-ciklotranszferázt (M438DRAFT_323211) azonosítottunk, amelyek a glutathion-anyagcseréhez tartoznak. A glutamát-ciszteinliáz a glutathion-bioszintézis sebességkorlátozó enzime, a hidroxil-acilglutathion-hidroláz/glioxiláz II katalizálja az S-D-laktóilglutathion hidrolízisét glutathionból és D-tejsavból (Junior, et al., 2021), a gamma-glutamil-ciklotranszferázok pedig számos, glutathionhoz konjugált vegyület katabolizmusában vesznek részt. Erős antioxidáns képességeit kiegészítve a glutathionról kimutatták, hogy gátolja számos illóanyag, például az izoamil-acetát, etil-hexanoát, etil-oktanoát, etil-dekanoát és a linalool csökkenését a Debina borban a tárolás során (Papadopoulou & Roussis, 2008). Továbbá a sauvignon blanc borokban jelen lévő számos jellegzetes íz- és illatanyag a C5/C6- glutathion-konjugátumokból vagy azok katabolizált származékaiból ered.

A borok alkoholkoncentrációja döntő jelentőségű. Jelen tanulmányban egy galaktóz-oxidázt (M438DRAFT_276942) azonosítottunk az *A. pullulans* génkészletében, amely katalizálja a primer alkoholok oxidációját több vegyületté, köztük aldehidekké. Ez utóbbi folyamat mellett, hogy fontos hatással van az alkoholkoncentrációra, a bor aromájának és ízének kialakulásában is fontos szerepet játszik. Hasonlóképpen, egy glicerol kinázt és egy 6-foszfoglükonolaktónt (B5807_08165) találtunk az *A. alternata* (CC77DRAFT_76448) és az *E. nigrum* (B5807_01031) fajok esetében, amelyek a glicerol metabolizmusáért/lebontásáért felelősek (Wang, et al., 2020).

Számos olyan enzim mellett, amelyeknek az aromához és az antioxidáns aktivitáshoz való hozzájáruláson kívül más funkcionális szerepük is van, azonosítottunk néhány olyan enzimet, amelyek a borban lévő potenciálisan mérgező vegyületek méregtelenítésében és az ízek megőrzésében játszanak szerepet. Az *A. alternata* (CC77DRAFT_1003962) és az *E. nigrum* (B5807_08147) génkészletében található S-formilglutathion-hidroláz hozzájárul a formiát-származék vegyületek képződéséhez, amelyeknek oxidált almás jellegű aromája van (Kelebek & Selli, 2011), de a bor méregtelenítésében is szerepet játszanak, a formaldehidet formiáttá alakítva. Továbbá az *A. pullulans*-ból származó kynureináz (M438DRAFT_265743) felelős a kynurenin antranilsavvá történő lebontásáért, és a bornak tipikusan hibás "öregedő" ízt kölcsönöz (Hoenicke, et al., 2002).

A fejezetben tehát részletesen elemeztük azokat a feldúsult anyagcsereútvonalakat, amelyek hatással vannak a boraromát meghatározó bogyóösszetevő komponensekre. Számos ilyen folyamatot azonosítottunk amelyekről az M4 melléklet tartalmaz egy részletes táblázatos összesítést.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Tudomásom szerint, a jelen doktori értekezésem és a hozzá kapcsolódó publikációk azok az első tanulmányok, amely részletesen leírják a *B. cinerea* és az aszúbogyón megtalálható más gombák hatását a szőlőbogyó fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságaira a gombák által expresszált funkcionális géneken keresztül, szabadföldi körülmények között. Kutatásom részletesen vizsgálta azt, hogy a *Botrytis cinerea* szürkerothadás és nemesrothadás esetén milyen lebontó folyamatok által képes megváltoztatni a szőlőbogyó textúráját és hogyan járul hozzá a szőlőbogyók kémiai összetételéhez. Vizsgáltam a *Botrytis* okozta nemesrothadás folyamat különböző fázisaiban megjelenő legfontosabb funkcionális gének szerepét és dinamikáját. A *Botrytis cinerea* mellett megjelenő legfontosabb fonalasgomba és élesztőfajok szerepét is elemeztem szürkerothadásos és nemesrothadásos bogyók esetén. Emellett vizsgáltam azt, hogy ezek a gombák miként járulnak hozzá a szőlőbogyó boraromát meghatározó összetevőinek változásához. Munkám során a következő új tudományos eredményeket foglalmaztam meg:

1. tézis

A nemesrothadás és szürkerothadás során a *B. cinerea* a bogyófertőzés első lépéseként a szőlőbogyó héjának lebontásáért felelős géneket fejezi ki, majd a kórokozó dominanciáját és a bogyó felületének és belső szöveteinek kolonizációját elősegítő géneket expresszálja. Ezek a gének nemesrothadás esetében aktívabbnak, szignifikánsan nagyobb abundanciájúnak határoztam meg, mint szürkerothadás esetében.

2. tézis

A *Botrytis cinerea* expresszált funkcionális génjei, nemesrothadás során szignifikánsan feldúsult útvonalakat mutattak olyan, az aszúsodás szempontjából előnyös biokémiai változások esetében, mint a cukor- és fehérjetartalom növekedése, valamint az ún. botritiszes boraromát meghatározó prekursor molekulák bioszintézise, míg szürkerothadás esetében, és a növényi védekezési válaszok kijátszására és fitotoxikus vegyületek előállítására szolgáló géneket fejez ki.

3. tézis

A *Botrytis cinerea* által expresszált gének az aszúsodás kezdeti szakaszában a szénhidrát lebontáshoz kapcsolódó útvonalak lebontó lépései szignifikánsan feldúsulnak, amelyek a bogyóhéj szerkezetének változásához járulnak hozzá, míg az aszúsodás későbbi szakaszában feldúsult anyagcsere útvonalak lehetővé teszik, hogy a *Botrytis cinerea* kolonizálja a szőlőbogyót („szulfát anyagcsere”, lebontás) és domináljon annak mikrobiótájában („antimikrobiális anyagok bioszintézise”).

4. tézis

Munkám során az aszúbogyón a *B. cinerea* mellett legnagyobb gyakorisággal előforduló gombák metabolikus aktivitását vizsgáltam, úgy, mint az *A. alternata*, *E. nigrum* fonalasgombák, valamint az *A. pullulans* és *R. graminis* élesztők. Megmutattam, hogy a nemesrothadás során ezeknek a mikrobáknak jelentős szerepük van az aszúsodás folyamatában mivel nagyszámú gént felszabályozottan expresszálnak (899 gén), míg szürkerothadás során jóval kevesebbet (15 gén).

5. tézis

Tanulmányom során leírtam az *A. alternata*, *A. pulullans*, *E. nigrum* és *R. graminis* által expresszált legfontosabb aminovas-, lipid- és szénhidrátanyagcseréhez tartozó feldúsult útvonalakat, melyek olyan prekuzormolekulák szintézisét aktiválják, amelyek hozzájárulnak az aszúborok érzékszervi tulajdonságaihoz, valamint azok élelmiszeripari minőségéhez és biokémiai stabilitásához.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A célkitűzések két alfejezetet tartalmaz. Az első alfejezet a *Botrytis cinerea* aszúsodásban és szürkerothadásban betöltött szerepét taglalja, míg a második alfejezet a *Botrytis* mellett megtalálható egyéb gombák jelenlétét és hatásukat vizsgálja. Az első alfejezet nyolc, míg a második hét hipotézist tartalmaz.

Az irodalmi áttekintésben bemutatásra került a *B. cinerea* biológiája, taxonómiai besorolása, életciklusa, fertőzési útvonala. A fejezetben a kórokozó patogenezise általános módon került bemutatásra. A fejezet foglalkozik a *Botrytis cinerea* fenotípusos változatosságával is. Bemutatásra kerül az aszúsodás négy fázis modellje, a világ nemesrothadással érintett borvidékei, kiemelten a Tokaj-hegyalja borvidék és az ott termelt aszúborok. A biológiai módszertani fejezetben a különböző a kutatás során alkalmazott molekuláris biológiai módszerek általános bemutatásával és azok a jelenkori gyakorlatban történő alkalmazásával foglalkozunk.

Az irodalmi áttekintésben kitérünk a *Botrytis* mellett megtalálható egyéb mikroorganizmusokra, azok bogyómikrobiótában betöltött lehetséges szerepére, valamint azokra az eredményekre, amelyet a *Botrytis cinerea* patogenezis proteomikai és transzkriptomikai markereiről közöltek, valamint olyan transzkriptomikai tanulmányok közölt eredményeire is, amelyek a különböző törzsek tulajdonságait vizsgálják.

Az „Anyag és módszer” című fejezetben bemutatam a mintavételi helyet és a mintagyűjtés módját, az alkalmazott laboratóriumi módszereket, a DNS és RNS kivonatolásának módszertanát. A következő szakaszban a bioinformatikai módszertant részletezzük, majd a fejezet utolsó részben a hálózatelemzési módszer részletei kerülnek kifejtésre és bevezetésre kerül egy új fogalom az NRCM modul kifejezése.

Az eredményeket bemutató fejezetben részletesen kifejtésre kerül a szürkerothadás és nemesrothadás közötti, a bogyó mikrobiótájában megmutatkozó különbség. Ez alapján választottuk ki azokat a *Botrytis*-től különböző nemzetségeket, amelyeket a későbbi fejezetben vizsgálunk a tekintetben, hogy hogyan járulnak hozzá az *Botrytis cinerea* patogeneziséhez és a szőlőbogyó kémiai összetételéhez. A gének mennyiségi leírásán túl azok biokémiai szerepükre is kitérünk, még hozzá a szénhidrát-, lipid- és fehérje anyagcserét illetően, valamint a másodlagos metabolitok bioszintézisének vonatkozásában. A következő alfejezet a nemesrothadás négyfázis modelljén alapuló leírását transzkriptomikai szemszögből vizsgálja. Az aszúsodás folyamatának szakaszaiban expresszált gének funkciói, és azok kapcsolata a szőlőbogyók fizikai és kémiai tulajdonságaival kerülnek tárgyalásra. Bevezetésre és meghatározásra kerülnek az NRCM modulok és kimutatjuk azok kapcsolatát az aszúsodás folyamatával. A következő alfejezetben a széles körben elterjedt és használatos bioinformatikai módszerek segítségével elemezzük az aszúsodás folyamatát és meghatározzuk a szignifikánsan feldúsult biokémiai útvonalakat. A következő alfejezet a szürke és nemesrothadás típusok közötti funkcionális génprofilban található különbségeket részletezi, mégpedig leírja a felül és alulszabályozott útvonalakat a két rothadástípus és a vizsgált két mintagyűjtési hónap (szeptember és október) között, valamint meghatározza az ezekben szignifikánsan jelenlévő GO terminusokat is.

Az eredményeket leíró fejezet következő szakaszában rátérünk a *Botrytis cinerea* mellett előforduló legjelentősebb gombák szerepére, amelyek transzkriptomikai profilját először mennyiségi statisztikai szempontok szerint elemezzük. Annotálásra kerülnek a kiválasztott gombanemzetségeket belül elérhető egy-egy jó minőségű referenciagenommal rendelkező faj esetében, és az így meghatározott géntáblázat alapján vizsgáljuk, hogy a nemes- és a szürkerothadás között milyen különbségeket

találunk. A következő alfejezet a szürke- és a nemesrothadás közötti funkcionális különbségekkel foglalkozik e négy egyéb faj esetében, valamint virulencia blast, génontológia és útvonal feldúsulás elemzés segítségével írjuk le ezeknek a gombáknak a funkcióbeli különbségeit a különböző rothadás típusok és vizsgált mintavételi hónapok között.

A következő szakaszban az aszúsodás négy fázisa során meghatározott, a kiválasztott egyéb gombák által expresszált gének mennyiségi statisztikai elemzését közöljük, melyben során egyértelmű és fontos eredmény az, hogy ezek a mikrobák az aszúsodás késői szakaszában játszanak fontos szerepet. A többi referenciagenomhoz annotált gének bevonásával is elvégezzük a koexpressziós hálózatelemzést, ám ebben az esetben ez a módszer nem segít a funkcionális gének kisebb klaszterekbe való rendezésében, ugyanis az egyéb gombák által expresszált gének jóformán egy nagy klasztert alkotnak. Ezután az általánosan használt differenciális génexpressziós elemzés, génontológiai elemzés és útvonal feldúsulási elemzés eredményeit közöljük. Az értekezés egy nagyon fontos eleme a vizsgált gombák boraromára gyakorolt hatásának vizsgálata, melyet transzkriptomikai módszerekkel ugyan csak feltételesen tehetünk meg, ám ezek az eredmények számos további proteomikai vagy metabolomikai kutatás kiindulópontjául szolgálhatnak. Az értekezésben közöljük azokat a szignifikánsan feldúsult útvonalakat és hub-géneket, amelyek feltételezhetően hatással vannak az aszúbogyó kémiai összetételére és ezáltal a belőle készült bor aromájára is. Az eredmények közlésekor kitérünk a feltételezhető biokémiai folyamatra és arra, hogy az miként érinti az aszúborok aromáját.

A következőtetések című fejezetben az első szakaszban a *Botrytis cinerea* génexpresszió bogyófizikai és kémiai paraméterekre gyakorol lehetséges hatását vizsgáltuk. Olyan a bogyóhéj lebontásában szerepet játszó enzimeket találtunk, amelyek az aszúsodás és a szürkerothadás során különböző módon fejeződnek ki, így különböző fizikai változások mennek végbe a két rothadási típusú bogyókon. A következő szakaszban a poliferciával foglalkoztunk, majd azoknak a géneknek a szerepét írtuk le, amelyek a szénhidrátanyagcserében és a fehérjeanyagcserében játszanak szerepet. Részletesen foglalkoztunk a másodlagos metabolitokkal, amelyek a szulfát anyagcsere köztes termékei és az oxidatív stresszre adott mikrobiális választ kódoló gének funkcionális leírását tartalmazza. Borászati szempontból kiemelt fontosságú a glutation termelés, amely nem csak a sejtosztódás esetén jelentős, hanem szabad formában való jelenléte hozzájárul a borok érzékszervi tulajdonságaihoz. Fontos, a bogyómikrobiótát erősen befolyásoló tényező a pofirinvegyületek és az antimikrobiális vegyületek bioszintézise, amelyet ebben a fejezetben tárgyaltunk.

A következő alfejezet a *Botrytis cinerea* génexpressziós eredményeinek értelmezését tárgyalja különböző rothadási típusok esetében. Várakozásaink szerint azt találtuk, hogy a szürkerothadásos bogyók valamivel magasabb abundanciát mutattak, mint a nemesrothadásos bogyók, ám ez valószínűleg a nagyobb biomassza tömegnek köszönhető. Amennyiben a teljesen aszúsodott bogyóállapotot, azaz a IV. fázist hasonlítjuk össze különböző hónapok esetében azonosított szignifikánsan feldúsult útvonalakat azt kapjuk, hogy a vizsgált hónapok különbséget mutatnak, méghozzá október esetében több olyan útvonalat azonosítottunk, amely az antagonista virulenciafaktorokhoz, a borászatiilag fontos poliszaharidok lebontásához, a fehérje anyagcseréhez és a másodlagos anyagcseretermékek bioszintéziséhez köthető. Ebben a fejezetben foglalkozunk a poliszaharid anyagcsere esetében azonosított feldúsult útvonalakkal, az acetát és etanol biokémiai szerepével a virulenciafaktorok részletes leírásával és az antimikrobiális hatású metabolitok esetleges szerepével. Ez utóbbi a nemesrothadás esetében van jelen, ami arra enged következtetni, hogy ebben a rothadási típusban az egyszerű termésvesztést okozó teljes növényiszövet lebontástól és felhasználástól eltérő, komplexebb viselkedést mutat a *Botrytis cinerea*.

A következő alfejezetben a *Botrytis cinerea* mellett, a DNS vonalkódelemzés alapján azonosított legfontosabb gombanemzetségek génexpresszióját vizsgáltuk, egy-egy jól dokumentált referencia fajon keresztül. Ezek a fajok az *Alternaria alternata*, az *Aureobasidium pulullans*, az *Epicoccum nigrum* és a *Rhodotorula graminis* voltak. Az alapvető statisztikai eredményekből levonható legfontosabb következtetés az, hogy ezek a gombák leginkább a IV. fázisban vannak jelen, itt aktívak, így az aszúsodás korábbi fázisaiban szerepük elhanyagolhatónak tekinthető. Funkcióikat tekintve alapvető jelentőségű a polifерációjuk, a szénhidrátanyagcserével kapcsolatos aktivitásuk, amelyek közül legjelentősebbek az acetát, a glioxilát és az oxalacetát anyagcsereútvonalak funkcionális génjei. A hozzájuk kapcsolódó fehérjeanyagcsere esetében a piruváthoz és argininhez köthető útvonalak mutattak szignifikáns feldúsulást.

Ennek a fejezetnek az egyik legjelentősebb témaköre a szőlőben található aromaanyagokkal kapcsolatos funkcionális gének jellemzése. Számos olyan ezekhez a gombákhoz tartozó feldúsult útvonalat azonosítottunk, amely hozzájárulhat az aszúsodott borok aromájához, ám transzkriptomikai elemzésről lévén szó ezek tényleges mennyisége a módszerünk alapján nem meghatározható. A legjelentősebb feldúsult útvonalak az észter-propanoát prekursorok bioszintézisét eredményező, a zsírsav szintézis és az antagonista interakciós gének klasztere voltak. Ellentétben más gombafajokkal *Botrytis cinerea* esetében kizárólag gazdanövény-gomba interakciós útvonalakat azonosítottunk szignifikánsan feldúsultnak, míg a többi vizsgált gomba esetében a mikroba-mikroba kölcsönhatást kódoló gének is szignifikánsan feldúsultak voltak.

A fejezet további részében konkrétan kitérünk a vizsgált gombák boraromára hatást gyakorló funkcionális génjeinek tárgyalására, melyek közül elsőként az aminosav anyagcsereben szerepet játszó legfontosabb útvonalakat részletezzük. Kitérünk az aromás aminosavak szintézisére, az aminosav transzferázok szerepére. Jelentős lehet a fenilalanin anyagcsere esetében azonosított cinnamilalkohol bioszintézis útvonal, valamint a tirozin és leucin anyagcsere, amely különböző virágos és gyümölcsös aromák megjelenésében játszanak szerepet a borászatban. Az aminosav anyagcsere egyik eleme az antranilát metabolizmus, amely narancsvirág illattal azonosítható a borokban.

A lipidanyagcsere köztitermékei is fontos aromaképző vegyület prekursorai, melyek a különböző észterek és szterolok. Ezekkel a lehetséges aromaprekursorokkal kapcsolatos feldúsult útvonalakat írtunk le ebben a fejezetben. A lipidanyagcsere esetében fontos megemlíteni a rotundont tartalmazó anyagcsereútvonalat, amely borsszerű aromát ad a borokhoz.

A következő szakaszban a gombafajok szénhidrátanyagcserével kapcsolatos funkcióival foglalkoztunk, amelyek közül a malolaktikus fermentációval kapcsolatos gének jelentősek, melyek aktivitása megnövelheti a diacetil jelenlétét a borokban, mely vajás ízt eredményez. A pozitív érzékszervi tulajdonságot adó összetevők bioszintézisét eredményező feldúsult útvonalak mellett borhibákat eredményező útvonalakat is találtunk, mint például a formiát szintézis, amely oxidált ízt eredményezhet.

A következő fejezetben az értekezés új tudományos eredményei kerültek bemutatásra, amelyeket öt tézis formájában közlünk. Az értekezés további részét képezik az összefoglalás magyar és angol nyelven, a hivatkozások listája, az egyéb mellékletek és végül a köszönetnyilvánítás.

10. SUMMARY

The objectives are presented in two sub-chapters. The first sub-chapter discusses the role of *Botrytis cinerea* in grey rot and noble rot, while the second sub-chapter examines the presence and impact of other fungi besides *Botrytis*. The first subchapter contains eight hypotheses, while the second subchapter contains seven hypotheses.

In the literature review, the biology, taxonomic classification, life cycle and infection pathways of *B. cinerea* are presented. The pathogenesis is presented in general terms in this chapter. The chapter also deals with the phenotypic diversity of *Botrytis cinerea*. The four-phase model of noble rot is presented, the wine regions of the world affected by noble rot, with special emphasis on the Tokaj-Hegyalja wine region and the aszú wines produced there. In the chapter on biological methodology, a general introduction to the various molecular biological methods used in research and their application in current practice is given.

In the literature review, other microorganisms besides *Botrytis*, their possible role in the berry microbiota, the results published on proteomic and transcriptomic markers of *Botrytis cinerea* pathogenesis, and the published results of transcriptomic studies on the properties of different strains are discussed.

In the chapter "Materials and methods", I describe the sampling site and method of sample collection, the laboratory methods used, the methodology for DNA and RNA extraction. In the next section, the bioinformatics methodology is detailed, and in the last section of the chapter, the details of the network analysis method are explained and a new concept of the NRCM module is introduced.

In the next section of the chapter describing the results, we turn to the role of the most important fungi besides *Botrytis cinerea*, whose transcriptomic profiles are first analyzed from a quantitative statistical point of view. Annotations are made for the selected genomes available within each of the selected genomes for a species with a good quality reference genome, and the resulting gene table is used to investigate the differences between the noble and the grey rot. The next subsection will address the functional differences between grey and noble rot in these four other species, and use virulence blast, gene ontology and pathway enrichment analysis to describe the functional differences of these fungi between the different rot types and sampling months studied.

In the next section, we report quantitative statistical analysis of the genes expressed by selected other fungi during the four stages of the rot, with the clear and important result that these microbes play an important role in the late stages of the rot. Co-expression network analysis is also performed by including genes annotated to other reference genomes, but in this case this method does not help to sort functional genes into smaller clusters, since genes expressed by other fungi form a large cluster. We then report the results of the commonly used differential gene expression analysis, gene ontology analysis and pathway enrichment analysis.

A very important element of the thesis is the investigation of the effect of the fungi studied on wine aroma, which can only be done conditionally by transcriptomic methods, but these results could serve as a starting point for many further proteomic or metabolomic studies. In this thesis, we will identify significantly enriched pathways and hub genes that are thought to affect the chemical composition of aszú berries and thus the aroma of the resulting wine. The results will be reported in the context of the putative biochemical process and how it affects the aroma of aszú wines.

In the conclusions section, the possible impact of *Botrytis cinerea* gene expression on berry physical and chemical parameters was firstly discussed. Enzymes involved in the degradation of the berry skin were found to be expressed differently during noble

and gray rot, resulting in different physical changes in the two types of berries. In the next section, we dealt with proliferation and then described the role of genes involved in carbohydrate metabolism and protein metabolism. Secondary metabolites, which are intermediates of sulphate metabolism and genes encoding the microbial response to oxidative stress, were discussed in detail. Of particular importance from an oenological point of view is the production of glutathione, which is not only important for cell division, but its presence in free form contributes to the organoleptic properties of wines. An important factor strongly influencing the berry microbiota is the biosynthesis of porphyrin compounds and antimicrobial compounds, which is discussed in this chapter.

The next subchapter discusses the interpretation of *Botrytis cinerea* gene expression results for different rot types. As expected, we found that the grey rot berries showed slightly higher abundance than the noble rot berries, but this is probably due to the higher biomass mass. If we compare the significantly enriched pathways identified for the fully matured berry stage, i.e. phase IV, for different months, we find that the months studied show differences, with more pathways identified for October, which are related to antagonistic virulence factors, degradation of oenologically important polysaccharides, protein metabolism and biosynthesis of secondary metabolites. In this chapter, we address the enrichment pathways identified for polysaccharide metabolism, the biochemical role of acetate and ethanol in virulence factors with a detailed description of the potential role of antimicrobial metabolites. The latter is present in the case of noble rot suggesting that in this type of rot *Botrytis cinerea* exhibits a more complex behavior than the simple breakdown and utilization of whole plant tissue causing yield loss.

In the following subsection, the gene expression of the most important genomic associations identified by DNA barcoding analysis, in addition to *Botrytis cinerea*, was investigated using a well-documented reference species. These species were *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum nigrum* and *Rhodotorula graminis*. The main conclusion to be drawn from the basic statistical results is that these fungi are mostly present and active in stage IV, so that their role in the earlier stages of enrichment can be considered negligible. In terms of their functions, their proliferation and carbohydrate metabolism activities are of fundamental importance, the most significant being the functional genes for the acetate, glyoxylate and oxaloacetate metabolic pathways. For their associated protein metabolism, the pyruvate and arginine pathways showed significant enrichment.

One of the most important topics of this chapter is the characterization of functional genes related to aromatic compounds in grapes. We have identified several enriched pathways associated with these fungi that may contribute to the aroma of the aszú wines, but as a transcriptomic analysis, the actual amount of these pathways cannot be determined by our method. The most significantly enriched pathways were those leading to biosynthesis of ester-propanoate precursors, fatty acid synthesis and a cluster of antagonist interaction genes. Unlike other fungal species, only host-fungus interaction pathways were identified as significantly enriched in *Botrytis cinerea*, while genes encoding the microbe-microbe interaction were also significantly enriched in the other fungi studied.

In the remainder of this chapter, we will discuss specifically the functional genes of the fungi studied that affect wine aroma, firstly the most important pathways involved in amino acid metabolism. The synthesis of aromatic amino acids and the role of amino acid transferases will be discussed. The cinnamyl alcohol biosynthesis pathway identified for phenylalanine metabolism, as well as tyrosine and leucine metabolism, which play a role in the appearance of various floral and fruity aromas in wine, may

be of importance. One element of amino acid metabolism is anthranilate metabolism, which is identified in wines with orange blossom aroma.

Intermediates of lipid metabolism are also important flavor precursors, which are various esters and sterols. Enriched pathways related to these potential aroma precursors have been described in this chapter. In the case of lipid metabolism, it is important to mention the metabolism pathway involving rotundone, which adds a peppery aroma to wines.

In the next section, the functions of fungal species related to carbohydrate metabolism were discussed, of which the genes related to malolactic fermentation are significant, whose activity can increase the presence of diacetyl in wines, resulting in a buttery taste. In addition to the enriched pathways leading to biosynthesis of compounds with positive organoleptic properties, we also identified pathways leading to wine defects such as formate synthesis, which may result in oxidized flavors.

In the next chapter, the new scientific results of the thesis are presented in the form of five theses. The rest of the thesis includes a summary in English and Hungarian, a list of references, other appendices and finally the acknowledgements.

11. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- ABUQAMAR, S., MOUSTAFA, K., & TRAN, L. (2016). 'Omics' and plant responses to *Botrytis cinerea*. In: *Frontiers in plant science*, 7, 1658.
- ADBELKRI, Y., BANROQUES, J., & KYLE TANNER, N. (2020). Known inhibitors of RNA helicases and their therapeutic potential. In: *RNA Remodelling Proteins: Methods and protocols*, 35-52.
- AGUEDO-ROMERO, P., ERBAN, A., REGO, C., CARBONELL-BEJERANO, P., NASCIMENTO, T., SOUSA, L., & FORTES, A. (2015). Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*. In: *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1769-1785.
- ALBERGARIA, H., & ARNEBORG, N. (2016). Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. In: *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 2035-2046.
- ALBERTINI, C., THEBAUD, G., FOURNIER, E., & LEROUX, P. (2002). Eburicol 14 α -demethylase gene (CYP51) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. In: *Mycological research*, 106(10), 1171-1178.
- ALEXA, A., & RAHNENFÜHRER, J. (2009). Gene set enrichment analysis with topGO. In: *Bioconductor Improv*, 27, 1-26.
- AMSELEM, J., CUOMO, C., VAN KAN, J., VIAUD, M., BENITO, E., COULOUX, A., . . . HAHN, M. (2011). Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. In: *PLOS Genetics*, 7, e1002230.
- ANSORGE, W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. In: *New biotechnology*, 25(4), 195-203.
- APOLINAR-VALIENTE, R., GÓMEZ-PLAZA, E., TERRIER, N., DOCO, T., & ROS-GARCÍA, J. (2017). The composition of cell walls from grape skin in *Vitis vinifera* intraspecific hybrids. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 4029-4035.
- ARDÖ, Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. In: *Biotechnology advances*, 24(2), 238-242.
- ATKINSON, N., & URWIN, P. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. In: *Journal of experimental botany*, 63(10), 3523-3543.
- ATWELL, S., CORWIN, J., SOLTIS, N., SUBEDY, A., DENBY, K., & KLIEBENSTEN, D. (2015). Whole genome resequencing of *Botrytis cinerea* isolates identifies high levels of standing diversity. In: *Frontiers in Microbiology*, 6, 996.
- AZIZ, A., POINSSOT, B., DAIRE X., ADRIAN M., BÉZIER, A., PUGIN, A., & LAMBERT, B. (2003). aminorin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. In: *Molecular plant-microbe interactions*, 16(12), 1118-1128.

- BAEKDAL, T., SCGJERLING, C., HANSEN, J., & KNUDSEN, J. (2012). Analysis of long-chain acyl-coenzyme A esters. In: *Advances in Lipid Methodology*, 109-131.
- BARATA, A., MALFEITO-FERREIRA, M., & LOUREIRO, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. In: *International journal of food microbiology*, 153(3), 243-259.
- BARTOWSKY, E., & HENSCHKE, P. (2004). The ‘buttery’ attribute of wine—diacetyl—desirability, spoilage and beyond. In: *International journal of food microbiology*, 96(3), 235-252.
- BAUMES, R. (2009). Wine aroma precursors. In: *Wine chemistry and biochemistry* (old.: 251-274). New York: Springer New York.
- BELDA, I., ZARRAONAINDIA, I., PERISIN, M., PALACIOS, A., & ACEDO, A. (2017). From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the “terroir” concept. In: *Frontiers in Microbiology*, 8, 821.
- BENHAR, M., FORRESTER, M. T., & STAMLER, J. S. (2009). Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. In: *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(10), 721-732.
- BENE, ZS., & MAGYAR, I. (2004). Characterization of yeast and mould biota of botrytized grapes in Tokaj wine region in the years 2000 and 2001. In: *Acta Alimentaria*, 33(3), 259-267.
- BENSON, R. W. (1977). Learning from French Wine Labels. In: *ABAJ*, 63, 1650.
- BI, K., LIANG, Y., MENGISTE, T., & SHARON, A. (2022). Killing softly: a roadmap of Botrytis cinerea pathogenicity. In: *Trends in Plant Science*, 28, 211-222.
- BLANCO-ULATE, B., AMRINE, K., COLINS, T., RIVERO, R., VINCENTE, A., MORALES-CRUZ, A., . . . CANTU, D. (2015). Developmental and Metabolic Plasticity of White-Skinned Grape Berries in Response to Botrytis cinerea during Noble Rot. In: *Plant Physiology*, 169(4), 2422-2443.
- BOCK, G., BENDA, I., & SCHREIER, P. (1988). Microbial transformation of geraniol and nerol by Botrytis cinerea. In: *Applied microbiology and biotechnology*, 27, 351-357.
- BOLGER, A., LOHSE, M., & USADEL, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. In: *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- BRITO, N., ESPINO, J., & GONZÁLEZ, C. (2006). The endo- β -1, 4-xylanase Xyn11A is required for virulence in Botrytis cinerea. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(1), 25-32.
- BUDROCK, G. (2016). Fenaroli's handbook of flavor ingredients. Boca Raton, Florida, US: CRC Press.
- CALLAHAN, B., MCMURDIE, P., ROSEN, M., HAN, A., JOHNSON, A., & HOLMES, S. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. In: *Nature methods*, 13(7), 581-583.

- CALLEJÓN, R. M., TRONCOSO, A. M., & MORALES, M. L. (2010). Determination of amino acids in grape-derived products: a review. In: *Talanta*, 81(4-5), 1143-1152.
- CANTU, D., VINCENTE, A., GREVE, L., DEWEY, F., BENNETT, A., LABAVICH, J., & POWELL, A. (2008). The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(3), 859-864.
- CAO, J., SCHNEEBERGER, K., OSSOWSKI, S., GUNTHER, T., BENDER, S., FITZ, J., & WIEGEL, D. (2011). Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations. In: *Nature genetics*, 43(10), 956-963.
- CARBAJAL-IDA, D., MAURY, C., SALAS, E., SIRET, R., & MEHINAGIC, E. (2016). Physico-chemical properties of botrytised Chenin blanc grapes to assess the extent of noble rot. In: *European Food Research and Technology*, 242, 117-126.
- CARBONNEAU, A., & CASTERAN, P. (1986). Experiment on training systems for the production of noble rot grapes in the Bordeaux area, *Botrytis cinerea*; production of sweet white wines. In: *Connaissance de la Vigne et du Vin*.
- CHARTRON, J., SHIAU, C., & CAROLL, K. (2007). 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate Reductase in Complex with Thioredoxin: A Structural Snapshot in the Catalytic Cycle. In: *Biochemistry*, 46(13), 3942-3951.
- CHOQUER, M., FOURNIER, E., KUNZ, C., LEVIS, C., PARDIER, J., SIMON, A., & VIAUD, M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. In: *FEMS microbiology letters*, 277.1, 1-10.
- CHOWDHURY, F., ZAMAN, N., ISLAM, M., & KHAN, H. (2020). Anti-fungal secondary metabolites and hydrolytic enzymes from rhizospheric bacteria in crop protection: a review. In: *Journal of the Bangladesh Academy of Sciences*, 44(2).
- CHRISTOVA, P., & SLAVOV S. B. (2021). *Epicoccum nigrum* – isolation, characterization and potential for biological control of *Botrytis cinerea*. In: *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 27, 693-698.
- COLLADO, I., SANCHEZ, A., & HANSON, J. (2007). Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. In: *Natural product reports*, 24(4), 674-686.
- COLMENARES, A., ALEU, J., DURA-PATRON, R., COLLADO, I., & HERNANDEZ-GALAN, R. (2002). The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. In: *Journal of chemical ecology*, 28, 997-1005.
- CORDENTE, A., SWIEGERS, J., HEGARDT, F., & PRETORIUS, I. (2007). Modulating aroma compounds during wine fermentation by manipulating carnitine acetyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEMS microbiology letters*, 267(2), 159-166.
- CORTOIS, R., & DE DEYN, G. (2012). The curse of the black box. In: *Plant and Soil*, 350, 27-33.

- COTORAS, M., & SILVA, E. (2005). Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. In: *Mycologia*, 97(2), 485-492.
- CRANDALL, S. G., GOLD, K. M., JIMÉNEZ-GASCO, M. D. M., FILGUEIRAS, C. C., & WILLETT, D. S. (2020). A multi-omics approach to solving problems in plant disease ecology. In: *PLoS One*, 15(9), e0237975.
- CSOMA, H., & SIPICZKI, M. (2008). Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. In: *FEMS Yeast research*, 8(2), 328-336.
- CUZICK, A., SEAGER, J., WOOD, V., URBAN, M., RUTHERFORD, K., & HAMMOND-KOSACK, K. E. (2023). A framework for community curation of interspecies interactions literature. In: *Elife*, 12, e84658.
- DANKÓ, T. (2021). A szőlőbogyó-Botrytis kölcsönhatás transzkriptom szintű sajátosságai Furmint szőlőfajta aszúsodási folyamata során. Gödöllő: Diss. Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem.
- DE MICCOLIS ANGELINI, R., ROTOLO, C., MASIELLO, M., GERIN, D., PLLASTRO, S., & FARETRA, F. (2014). Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. In: *Pest management science*, 70(12), 1785-1796.
- DEIGHTON, N., MUCKNSCHNABEL, I., COLMENARES, A., COLLADO, I., & WILLIAMSON, B. (2001). Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. In: *Phytochemistry*, 57(5), 689-692.
- DIAZ, J., HAVE, T., & VAN KAN, J. (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. In: *Plant physiology*, 129(3), 1341-1351.
- DOEHLMANN, G., BERNDT, P., & HAHN, M. (2006). *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. In: *Molecular microbiology*, 59(3), 821-835.
- DOEHLMANN, G., MOLITOR, F., & HAHN, M. (2005). Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. In: *Fungal genetics and biology*, 42(7), 601-610.
- DONA, A., PAGES, G., GILBERT, R., & KUCHEL, P. (2010). Digestion of starch: In vivo and in vitro kinetic models used to characterise oligosaccharide or glucose release. In: *Carbohydrate polymers*, 80(3), 599-617.
- DONECHE, B. (1993). Botrytized wines. In: *Wine microbiology and biotechnology*, 11, 327-351.
- DOSS, R. (1999). Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. In: *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 404-408.
- DUBOURDIEU, D., & TOMINAGA, T. (2009). Polyfunctional thiol compounds. In *Wine chemistry and biochemistry* (old.: 275-293). New York: Springer New York.

- EDGAR, R. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. In: *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
- ELAD, Y., WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, P., & DELEN, N. (2004). *Botrytis: biology, pathology and control*. Heidelberg, Németország: Springer Science and Business Media.
- ELROD, S., CHERRY, J., & JONES, A. (2001). U. S. Szabadalom száma: U.S. Patent No. 6,261,827.
- ENGLEZOS, V., GIASCOSA, S., RANTSIOU, K., ROLLE, L., & COCOLIN, L. (2017). *Starmarella bacillaris* in winemaking: Opportunities and risks. In: *Current opinion in food science*, 17, 30-35.
- ESCOBAR-NIÑO, A., LIÑEIRO, E., AMIL, F., CARRASCO, R., CHIVA, C., FUENTES, C., ... & FERNÁNDEZ-ACERO, F. J. (2019). Proteomic study of the membrane components of signalling cascades of *Botrytis cinerea* controlled by phosphorylation. In: *Scientific reports*, 9(1), 9860.
- FERREIRA, G., NEAME, P., & DAILEY, H. (1993). Heme biosynthesis in mammalian systems: evidence of a Schiff base linkage between the pyridoxal 5'-phosphate cofactor and a lysine residue in 5-aminolevulinate synthase. In: *Protein Science*, 2(11), 1959-1965.
- FILLINGER, S., & ELAD, Y. (Eds.). (2016). *Botrytis-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 189-216). Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- FOURNIER, E., GIRAUD, T., ALBERTINI, C., & BRYGOO, Y. (2005). Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. In: *Mycologia*, 97.6, 1251-1267.
- FOURNIER, E., GLADIEUX, P., & GIRAUD, T. (2013). The 'D r J ekyll and M r H yde fungus': noble rot versus gray mold symptoms of *Botrytis cinerea* on grapes. In: *Evolutionary applications*, 6(6), 960-969.
- FOURNIER, E., LEVIS, C., FORTINI, D., LEROUX, P., GIRAUD, T., & BYGOO, Y. (2003). Characterization of Bc-hch, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* het-c vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. In: *Mycologia*, 95.2, 251-261.
- FOX, D., & HEITMAN, J. (2002). Good fungi gone bad: the corruption of calcineurin. In: *Bioessays*, 24(10), 894-903.
- FRANCIOLI, D., LENTENDU, G., LEWIN, S., & KOLB, S. (2021). DNA metabarcoding for the characterization of terrestrial microbiota—pitfalls and solutions. In: *Microorganisms*, 9(2), 361.
- FRANCIOLI, D., SCHULZ, E., BUSCOT, F., & REITZ, T. (2018). Dynamics of soil bacterial communities over a vegetation season relate to both soil nutrient status and plant growth phenology. In: *Microbial Ecology*, 75, 216-227.

- FREIMOSER, F., RUEDA-MEJIA, M., TILOCCA, B., & MICHELI, Q. (2019). Biocontrol yeasts: Mechanisms and applications. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 1-19.
- GIOTI, A., LE PECHEUR, P., SIMON, A., GIRAUD, C., PRADIER, J., VIAUD, M., & LEVIS, C. (2006). Expression profiling of *Botrytis cinerea* genes identifies three patterns of up-regulation in planta and an FKBP12 protein affecting pathogenicity. In: *Journal of molecular biology*, 358(2), 372-386.
- GIRBAU, T., STUMMER, B., POCOCCO, K., BADLOCK, G., SCOTT, E., & WATERS, E. (2004). The effect of *Uncinula necator* (powdery mildew) and *Botrytis cinerea* infection of grapes on the levels of haze-forming pathogenesis-related proteins in grape juice and wine. In: *Australian journal of grape and wine research*, 10(2), 125-133.
- GOODE, J., & HARROP, S. (2008). Wine faults and their prevalence: Data from the world's largest blind tasting. In: *Proceedings of the 20th Entretiens Scientifiques Lallemend*, Horsens, Denmark, 15.
- GOURGUES, M., BRUNET-SIMON, A., LEBRUN, M., & LEVIS, C. (2004). The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. In: *Molecular microbiology*, 51(3), 619-629.
- GOVRIN, E., & LEVINE, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. In: *Current biology*, 10(13), 751-757.
- GREENBERG, J., & YAO, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. In: *Cellular microbiology*, 6(3), 201-211.
- GRIFFITH, C., WOODROW, J., & SIEBER, J. (2015). Environmental behavior and analysis of agricultural sulfur. In: *Pest management science*, 71(11), 1486-1496.
- GU, L., WANG, B., KILKARNI, A., GEDERS, T., GRINBERG, R., GERWICK, L., & SCHERMAN, D. (2009). Metamorphic enzyme assembly in polyketide diversification. In: *Nature*, 459(7247), 731-735.
- HAMZA, I. (2006). Intracellular trafficking of porphyrins. In: *ACS chemical biology*, 1(10), 627-629.
- HAN, X., PENG, Q., YANG, H., HU, B., SHEN, C., & TIAN, R. (2020). Influence of different carbohydrate sources on physicochemical properties and metabolites of fermented greengage (*Prunus mume*) wines. In: *Lwt*, 121, 108929.
- HAVE, A., MULDER, W., VISSER, J., & VAN KAN, J. (1998). The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. In: *Molecular plant-microbe interactions*, 11(10), 1009-1016.
- HAVE, T., & PAULINE, J. (2001). Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. In: *Chemical reviews*, 101(11), 3397-3414.
- HAYASHI, K., SCHOONBEEK, H.-J., & MAARTEN, A. (2002). Bcmfs1, a novel major facilitator superfamily transporter from *Botrytis cinerea*, provides tolerance

- towards the natural toxic compounds camptothecin and cercosporin and towards fungicides. In: *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 4996-5004.
- HEATHER, J., & CHAIN, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. In: *Genomics*, 107(1), 1-8.
- HEGYI-KALÓ, J., HEGYI, Á., GEML, J., ZSÓFI, Z., PÁLFI, X., & VÁCZY, K. (2020). Physico-Chemical Characteristics and Culturable Microbial Communities of Grape Berries Change Strongly during Noble Rot Development. In: *Plants*, 9(12), 1809.
- HEGYI-KALÓ, J., LENGYEL, S., SZALÓKI, N., SZÉN, O., JUHÁSZ, Á., & VÁCZY, K. (2017). Microbial ecology on grape berries of different botrytisation phases. In: *Növényvédelem*, 53(11), 507-512.
- HEGYI, Á. I., OTTO, M., GEML, J., HEGYI-KALÓ, J., GEIGER, A., GOLEN, R., GOMBA-TÓTH, A., & VÁCZY, K. Z. (2023). The origin of the particular aroma of noble rot wines: various fungi contribute to the development of the aroma profile of botrytised grape berries. *OENO One*, 57(3), 165-176.
- HEGYI, Á., OTTO, M., GEML, J., KUN, J., GYENESEI, A., HEGYI-KALÓ, J., . . . VÁCZY, K. (2022). Metatranscriptomic Analyses Reveal the Functional Role of Botrytis cinerea in Biochemical and Textural Changes during Noble Rot of Grapevines. In: *Journal of Fungi*, 8(4), 378.
- HERZAN, J., PROKES, K., BARON, M., KUMSTA, M., PAVLOUSEK, P., & SOCHOR, J. (2020). Study of carbonyl compounds in white wine production. In: *Food Science and Nutrition*, 8(11), 5850-5859.
- HILDEBRANDT, T., NESI, A., ARAÚJO, W., & BRAUN, H. (2015). Amino acid metabolism in plants. In: *Molecular plant*, 8(11), 1563-1579.
- HOENICKE, K., BORCHERT, O., GRÜNING, K., & SIMAT, T. (2002). “Untypical aging off-flavor” in wine: Synthesis of potential degradation compounds of indole-3-acetic acid and kynurenine and their evaluation as precursors of 2-aminoacetophenone. In: *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(15), 4303-4309.
- HOWE, A., JANSSON, J., Malfatti, S., TRINGE, S., TIEDJE, J., & BROWN, C. (2014). Tackling soil diversity with the assembly of large, complex metagenomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(13), 4904-4909.
- HUANG, D., WANG, S., SONG, D., CAO, X., HUANG, W., & KE, S. (2020). Discovery of γ -Lactam alkaloid derivatives as potential fungicidal agents targeting steroid biosynthesis. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(49), 14438-14451.
- HUNTER, G., & FERREIRA, C. (2009). 5-Aminolevulinate synthase: catalysis of the first step of heme biosynthesis. In: *Cellular and molecular biology*, 55(1), 102.
- IHRMARK, K., BÖDEKER, I. T., CRUZ-MARTINEZ, K., FRIBERG, H., KUBARTOVA, A., SCHENCK, J., ... & LINDAHL, B. D. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. In: *FEMS microbiology ecology*, 82(3), 666-677.

- JAILLON, O. A.-M. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. In: *Nature*, 449.7161, 463-467.
- JELSKI, W., & SZMITKOWSKI, M. (2008). Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. In: *Clinica Chimica acta*, 395(1-2), 1-5.
- JENSEN-URSTAD, A., & SEMENKOVICH, C. (2012). Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(5), 747-753.
- JONES, D., & MCMANUS, P. (2017). Susceptibility of Cold-Climate Wine Grape Cultivars to Downy Mildew, Powdery Mildew, and Black Rot. In: *Plant disease*, 101(7), 1077-1085.
- JORDÁ, T., & PUIG, S. (2020). Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genes*, 11(7), 795.
- JUNIOR, W., TREU, L., NADAI, C., DA SILVA DUARTE, V., CAMPANARO, S., FABREGA-PRATS, M., & CORCIH, V. (2021). Genomic insights into the glutathione metabolism of the nonconventional wine yeast *Starmerella bacillaris*. In: *OenoOne*, 55(1).
- KALLITSOUNAKIS, G., & CATARINO, S. (2020). An overview on botrytized wines. In: *Ciência e técnica vitivinícola*.
- KARS, I., & VAN KAN, J. (2007). Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of Botrytis." Botrytis: Biology, pathology and control. (99-118. kiad.). Dordrecht: Springer Netherlands.
- KASSAMBARA, A. (2020). "ggpubr: "ggplot2" based publication ready plots. R package version 0.4.0
- KELEBEK, H., & SELLI, S. (2011). Characterization of phenolic compounds in strawberry fruits by RP-HPLC-DAD and investigation of their antioxidant capacity. In: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34(20), 2495-2504.
- KELLENIEMI, J., TROUVELOT, S., HÉLIOR, M., SIMON, A., DALMAIS, B., FRETTEINGER, P., & VIAUD, M. (2015). Analysis of the molecular dialogue between gray mold (*Botrytis cinerea*) and grapevine (*Vitis vinifera*) reveals a clear shift in defense mechanisms during berry ripening. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(11), 1167-1180.
- KÖLJALG, U., NILSSON, R., ABERENKOV, K., TEDERSOO, L., TAYLOR, A., & LARSSON, K. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. Hoboken: Wiley Online Library.
- KUMAR, D., HAZRA, S., DATTA, R., & CHATTOPADHYAY, S. (2016). Transcriptome analysis of Arabidopsis mutants suggests a crosstalk between ABA, ethylene and GSH against combined cold and osmotic stress. In: *Scientific Reports* 6(1) 36867.
- KUNZ, C., VANDELLE, E., ROLLAND, S., POINSSOT, B., BRUEL, C., CIMERMAN, A., & BOCCARA, M. (2006). Characterization of a new,

- nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. In: *New phytologist*, 170(3), 537-550.
- KÜNZLER, M. (2018). How fungi defend themselves against microbial competitors and animal predators. In: *PLoS Pathogens*, 14(9), e1007184.
- LACROUX, F., TRÉGOAT, O., VAN LEEUWEN, C., PONS, A., TOMINAGA, T., LAVIGNE-CRUEGE, V., & DUBOURDIEU, D. (2008). Effect of foliar nitrogen and sulphur application on aromatic expression of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. In: *OenoOne*, 42(3), 125-132.
- LANGFELDER, K., STRIEBEL, M., JAHN, B., HAASE, G., & BRAKHAGE, A. (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. In: *Fungal genetics and biology*, 38(2), 143-158.
- LANGFELDER, P., & HORVATH, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. In: *BMC bioinformatics*, 9(1), 1-13.
- LATORRE, B., VIERTEL, S., & SPADARO, I. (2002). Severe Outbreaks of Bunch Rots Caused by *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* on Table Grapes in Chile. In: *Plant disease*, 86(7), 815-815.
- LATTANZIO, V., LATTANZIO, V., & CADINALI, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: *Phytochemistry: Advances in research*, 661(2), 23-67.
- LAWRENCE, M., HUBER, W., PAGÉS, H., ABOYOUN, P., CARLSON, M., GENTLEMAN, R., & CAREY, V. (2013). Software for computing and annotating genomic ranges. In: *PLoS computational biology*, 9(8), e1003118.
- LI, H., JAMES, A., SHEN, X., & WANG, Y. (2021). Roles of microbiota in the formation of botrytized grapes and wines. In: *CYTA Journal of Food*, 19, 656-667.
- LI, X., WEN, Y., MENG, N., QIAN, X., & PAN, Q. (2017). Monoterpenyl glycosyltransferases differentially contribute to production of monoterpenyl glycosides in two aromatic *Vitis vinifera* varieties. In: *Frontiers in Plant Science*, 8.
- LIN, T., ZHOU G., THANG, J., XU, X., YU, Q., ZHENG, Z., & HUANG, S. (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. In: *Nature genetics*, 46(11), 1220-1226.
- LORENZINI, M., MAINENTE, F., ZAPPAROLI, G., CECCONI, D., & SIMONATO, B. (2016). Post-harvest proteomics of grapes infected by *Penicillium* during withering to produce Amarone wine. In: *Food Chemistry*, 199, 639-647.
- LORENZINI, M., SIMONATO, B., FAVATI, F., BERNARDI, P., SBARBATI, A., & ZAPPAROLI, G. (2018). Filamentous fungi associated with natural infection of noble rot on withered grapes. In: *International Journal of Food Microbiology*, 272, 83-86.
- LOSADA, L., AJAYI, O., FRISVAD, J., YU, J., & NIERMAN, W. (2009). Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in *Aspergillus* species. In: *Medical mycology* 47. Supplement_1, S88-S96.

- LOVATO, A., ZENONI, S., TORNIELLI, G., COLOMBO, T., VANDELLE, E., & POLVERARI, A. (2019). Specific molecular interactions between *Vitis vinifera* and *Botrytis cinerea* are required for noble rot development in grape berries. In: *Postharvest biology and technology*, 156, 110924.
- LOVE, M., SIMON, A., & WOLFGANG, H. (2014). Differential analysis of count data—the DESeq2 package. In: *Genome Biol*, 15(550), 10-1186.
- MACHELEIDT, J., MATTERN, D., FISCHER, J., NETZKER, T., WEBER, J., SCHROECKH, V., & BRAKHAGE, A. (2016). Regulation and role of fungal secondary metabolites. In: *Annual review of genetics*, 50, 371-392.
- MAGYAR, I. (2011). Botrytized wines. In: *Advances in food and nutrition research*, 63, 147-206.
- MAGYAR, I., & SOÓS, J. (2016). Botrytized wines—current perspectives. In: *International Journal of Wine Research*, 29-39.
- MAZEROLLE, M., & MAINTAINER, M. (2017). Package AICcmodavg. R package, 218.
- MENGISTE, T., LALUK, K., & ABUQAMAR, S. (2010). Mechanisms of induced resistance against *B. cinerea*. In: *Postharvest pathology*, 13-30.
- MICHELI, F. (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. In: *Trends in plant science*, 6.9, 414-419.
- MOJZIKOVA, R., KORALKOVA, P., HOLUB, D., SAXOVA, Z., POSPISILOVA, D., PROCHAZKOVA, D., & DIVOKY, V. (2018). Two novel mutations (p.(Ser160Pro) and p.(Arg472Cys)) causing glucose-6-phosphate isomerase deficiency are associated with erythroid dysplasia and inappropriately suppressed hepcidin. In: *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 69, 23-29.
- NAKAJIMA, M., & AKUTSU, K. (2014). Virulence factors of *Botrytis cinerea*. In: *Journal of General Plant Pathology*, 80, 15-23.
- NANNIPIERI PAOLO, ASCHER-JENULL, J., CECCHERINI, M., PIETRAMELLARA G., RENELLA, G., & SCHLOTTER, M. (2020). Beyond microbial diversity for predicting soil functions: A mini review. In: *Pedosphere*, 30(1), 5-17.
- NEUSER, F., ZORN, H., & BERGER, R. (2000). Generation of odorous acylolins by yeast pyruvate decarboxylases and their occurrence in sherry and soy sauce. In: *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(12), 6191-6195.
- NGUYEN, H., & PANON, G. (1998). The yeast *Metschnikowia pulcherrima* has an inhibitory effect against various yeast species. In: *Sciences des aliments*, 18, 515-526.
- NILSSON, R. H., ANSLAN, S., BAHRAM, M., WURZBACHER, C., BALDRIAN, P., & TEDERSOO, L. (2019). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. In: *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 95-109.

- OKSANSSEN, J., KINDT, R., LEGENDRE, P., O'HARA, B., STEVENS, M., OKSANSSEN, M., & SUGGESTS, M. (2007). The vegan package. *Community ecology package*, 719(10), 631-637.
- OTTO, M., GEML, J., HEGYI, Á. I., HEGYI-KALÓ, J., KUN, J., GYENESEI, A., & VÁCZY, K. Z. (2023). Metatranscriptomic analyses of grapes reveal differences in expressed functional genes of filamentous and yeast fungi during noble rot and grey rot. *Fungal Ecology*, 65, 101277.
- OTTO, M., GEML, J., HEGYI, Á., HEGYI-KALÓ, J., POGÁNY, M., PIERNEEF, R., & VÁCZY, K. (2022). Botrytis cinerea expression profile and metabolism differs between noble and grey rot of grapes. In: *Food Microbiology*, 106(104037).
- OZSOLAK, F., & MILOS, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. In: *Nature reviews genetics*, 12(2), 87-98.
- PANAHI, B., & MOHAMMAD, A. (2021). Weighted gene co-expression network analysis of the salt-responsive transcriptomes reveals novel hub genes in green halophytic microalgae *Dunaliella salina*. In: *Scientific Reports*, 11(1), 1607.
- PANEK, H., & O'BRIAN, M. (2002). A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. In: *Microbiology*, 148(8), 2273-2282.
- PAPADOPOULOU, D., & ROUSSIS, I. (2008). Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetylcysteine. In: *International journal of food science & technology*, 43(6), 1053-1057.
- PATRO, R., DUGGAL, G., LOVE, M., IRIZZARY, R., & KINGSFORD, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. In: *Nature methods*, 14(4), 417-419.
- PELL, J., HINTZE, A., CANINO-KONING, R., HOWE, A., TIEDJE, J., & BROWN, C. (2012). Scaling metagenome sequence assembly with probabilistic de Bruijn graphs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), 13272-13277.
- PÉREZ-JIMENEZ, M., ROCHA-ALCUBILLA, N., & POZO-BAYON, M. (2019). Effect of saliva esterase activity on ester solutions and possible consequences for the in-mouth ester release during wine intake. In: *Journal of texture studies*, 50(1), 62-70.
- PERTOT, I., GIOVANNINI, O., BANNACHI, M., CAFFI, T., VITTORIO, R., & MUGNAI, L. (2017). Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control Botrytis cinerea on grapevine. In: *Crop Protection*, 97, 85-93.
- PETERSON, R., & NEVALAINEN, H. (2012). Trichoderma reesei RUT-C30—thirty years of strain improvement. In: *Microbiology*, 158.1, 58-68.
- PINAR, A., RAUHUT, D., RUEHL, E., & BUETTNER, A. (2017). Effects of Bunch Rot (Botrytis cinerea) and Powdery Mildew (Erysiphe necator) Fungal Diseases on Wine Aroma. In: *Frontiers in Chemistry*, 5, 20.
- PINCZÉS, Z. (2005). A Tokaji-hegység kistájai. In: *Földrajzi Értesítő*, LIV(3-4), 209-241.

- PINEDO, C., MORAGA, J., COLLADO, I., & ALEU, J. (2020). Botrytis species as biopocatalysts. In: *Phytochemistry Reviews*, 19, 529-558.
- PITHAN, P., DUCATI, J., GARRIDO, L., ARRUDA, D., THUM, A., & HOFF, R. (2021). Spectral characterization of fungal diseases downy mildew, powdery mildew, black-foot and Petri disease on *Vitis vinifera* leaves. In: *International Journal of Remote Sensing*, 42, 5680-5697.
- PTASZYNSKA, A., TRYTEK, M., BORSUK, G., BUCZEK, K., RYBICKA-JASINSKA, K., & GRYKO, D. (2018). Porphyrins inactivate *Nosema* spp. microsporidia. In: *Scientific Reports*, 8(1), 5523.
- PUCHEU-PLANTÉ, B., & SEGUIN, G. (1978). Pourriture vulgaire et pourriture noble en Bordelais. In: *Connaiss Vigne Vin*, 12, 21-34.
- QIAN, Y., LYNCH, J., GUO, L., RHODES, D., MORGAN, J., & DUDAREVA, N. (2019). Completion of the cytosolic post-chorismate phenylalanine biosynthetic pathway in plants. In: *Nature communications*, 10(1), 15.
- REITER, T., MONTPETIT, R., BYER, S., FRIAS, I., LEON, E., VIANO, R., & MONTPETIT, B. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* gene expression during fermentation of Pinot Noir wines at an industrially relevant scale. In: *Applied and environmental microbiology*, 87(11), e00036-21.
- REMENYIK, J., CSIGE, L., DÁVID, P., & FAUSZT, P. (2023). A microbiome survey of Tokaj highlights viticultural terroirs in Mád and suggests soil microbial contribution to must polyphenol contents. www.researchsquare.com.
- REN, W., LIU, N., SANG, C., SHI, D., ZHOU, M., CHEN, C., & CHEN, W. (2018). The autophagy gene BcATG8 regulates the vegetative differentiation and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. In: *Applied and environmental microbiology*, 84(11), e02455-17.
- RIBÉREAU-GAYON, P., DUBOURDIEU, D., DONÉCHE, B., & LONVAUD, A. (2006). Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications (Vol 1. kiad.). Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons.
- RIENO, J., HERNANDEZ-GALÁN, R., DURÁN-PATRÓN, R., & COLLADO, I. (2004). Virulence–toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. In: *Journal of Phytopathology*, 152(10), 536-566.
- ROBINSON, J., & HARDING, J. (2015). The Oxford companion to wine. American Chemical Society.
- ROBLES, A., FABJANOWICZ, M., CHMIEL, T., & PLOTKA-WASYLKA, J. (2019). Determination and identification of organic acids in wine samples. Problems and challenges. In: *Trends in Analytical Chemistry*, 120, 115630.
- ROLKE, Y., LIU, S., QUIDDE, T., WILLIAMSON, B., SCHOUTEN, A., WELTRING, K., & TUDZYNSKI, P. (2004). Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. In: *Molecular Plant Pathology*, 5(1), 17-27.

- ROLLE, L., GIORDAN, M., GIACOSA, S., VINCENZI, S., SEGADE, S., TORCHINO, F., & GERBI, V. (2012). CIEL* a* b* parameters of white dehydrated grapes as quality markers according to chemical composition, volatile profile and mechanical properties. In: *Analytica Chimica Acta*, 732, 105-113.
- RUI, O., & HAHN, M. (2007). The Slr2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and host tissue colonization. In: *Molecular plant pathology*, 8, 173-184.
- RUPPERT, K., KLINE, R., & RAHMAN, M. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. In: *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547.
- SARRAZIN, E., DUBOURDIEU, D., & DARRIET, P. (2007). Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. In: *Food chemistry*, 103(2), 536-545.
- SCHOUTEN, A., TENBERGE, K., VERMEER, J., STEWART, J., WAGEMAKERS, L., WILLIAMSON, B., & VAN KAN, J. (2002). Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. In: *Molecular plant pathology*, 3(4), 227-238.
- SCHREIER, P., DRAWERT, F., & JUNKER, A. (1976). Identification of volatile constituents from grapes. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(2), 331-336.
- SCHUMACHER, J. (2012). Tools for *Botrytis cinerea*: new expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. In: *Fungal genetics and biology*, 49.6, 483-497.
- SHAM, A., AL-AZZAWI, A., AL-AMERI, S., AL-MAHMOUD, B., AWWAD, F., AL-RAWASHDEH, & ABUQAMAR, S. (2014). Transcriptome analysis reveals genes commonly induced by *Botrytis cinerea* infection, cold, drought and oxidative stresses in *Arabidopsis*. In: *PlosOne*, 9(11), e113718.
- SHULAEV, V., SARGENT, D., CROWHURST, R., MOCKLER, T., FOLKERTS, O., DELCHER, A., & FOLTA, K. (2011). The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). In: *Nature genetics*, 43(2), 109-116.
- SIEBERT, T., WOOD, C., ELSEY, G., & POLLNITZ, A. (2008). Determination of rotundone, the pepper aroma impact compound, in grapes and wine. In: *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(10), 3745-3748.
- SIEWERS, V., SMEDSGRAAD, J., & TUDZYNSKI, P. (2004). The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea*. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 3868-3876.
- SIEWERS, V., VIAUD, M., JIMENEZ-TEJA, D., COLLADO, I., GRONOVER, C., PRADIER, J., & TUDZYNSKI, P. (2005). Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. In: *Molecular plant-microbe interactions*, 18(6), 602-612.

- SLOCUM, R. (2005). Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. In: *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(8), 729-745.
- SMITH, J., MEGNESHA, B., TANG, H., MENGISTE, T., & BLUHM, B. (2014). Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* involves widespread transcriptional reprogramming. In: *BMC genomics*, 15(1), 1-18.
- SOOKOIAN, S., & PIROLA, C. (2012). Alanine and aspartate aminotransferase and glutamine-cycling pathway: their roles in pathogenesis of metabolic syndrome. In: *World journal of gastroenterology*, 18(29), 3775.
- SPONHOLZ, W. (1993). Wine spoilage by microorganisms. In: *Wine microbiology and biotechnology*, 395-420.
- STAATS, M., VAN BAARLEN, P., & VAN KAN, J. (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. In: *Molecular biology and Evolution*, 22, 333-346.
- STUBBS, R., YADAV, M., KRISHNAMURTHY R., & SPRINGSTEEN, G. (2020). A plausible metal-free ancestral analogue of the Krebs cycle composed entirely of α -ketoacids. In: *Nature chemistry*, 12(11), 1016-1022.
- STYGER, G., PRIOR, B., & BAUER, F. (2011). Wine flavour and aroma. In: *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 38(9), 1145.
- SZABÓ, J., & TÖRÖK, I. (1867). Tokaj-hegyaljai album. Tokaj.
- SZELECZ, I., LOSCH, S., SEPPEY, C., LARA, E., SINGER, D., SORGE, F., & MITCHELL, E. (2018). Comparative analysis of bones, mites, soil chemistry, nematodes and soil micro-eukaryotes from a suspected homicide to estimate the post-mortem interval. In: *Scientific Reports*, 8(1), 25.
- TABERLET, P., COISSAC, E., POMPANON, F., BROCHMANN, C., & WILLERSLEV, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. In: *Molecular ecology*, 21(8), 2045-2050.
- TANI, H., KOSHINO, H., SAKUNO, E., CUTLER, H., & NAKIJAMA, H. (2006). Botcinins E and F and Botcinolide from *Botrytis cinerea* and Structural Revision of Botcinolides. In: *Journal of natural products*, 69(4), 722-725.
- TANI, H., KOSHINO, H., SAKUNO, E., & NAKAJIMA, H. (2005). Metabolites Produced by *Botrytis cinerea*, and Their Antifungal Activity against *Magnaporthe grisea*, a Pathogen of Rice Blast Disease. In: *Journal of natural products*, 68(12), 1768-1772.
- THAKUR, N., THAKUR A., JOSHI, V., & SHARMA, S. (2018). Botrytized wines: A review. In: *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 8(1), 1-13.
- THOMPSON, J., FAHNESTOCK, S., FARRALL, L., LIAO, D., VALENT, B., & JORDAN, D. (2000). The second Naphthol reductase of fungal melanin biosynthesis in *Magnaporthe grisea*: Tetrahydroxynaphthalene reductase. In: *Journal of biological chemistry*, 275(45), 34867-34872.

- TORRES-VERA, R., GARCÍA, J., POZO, M., & LÓPEZ-RÁEZ, J. (2014). Do strigolactones contribute to plant defence? In: *Molecular Plant Pathology*, 15(2), 211-216.
- TRYTEK, M., LIPKE, A., MAJDAN, M., PISAREK, S., & GRYKO, D. (2013). Homo-and Heterogeneous α -Pinene Photooxidation Using a Protoporphyrin-Derived Amide. In: *European Journal of Organic Chemistry*, 9, 1653-1658.
- UNGER, C., KLETA, S., JANDL, G., & TIESEMANN, A. (2005). Suppression of the defence-related oxidative burst in bean leaf tissue and bean suspension cells by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. In: *Journal of phytopathology*, 153(1), 15-26.
- UNIPROT, C. (2015). UniProt: a hub for protein information. In: *Nucleic acid research*, 43, 204-212.
- VAN KAN, J. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. In: *Trends in plant science*, 11(5), 247-253.
- VAN KAN, J., STASSEN, J., MOSBACH, A., VAN DER LEE, T., FAINO, L., FARMER, A., & SCAILLET, G. (2017). A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. In: *Molecular plant pathology*, 18(1), 75-89.
- VAN LOON, L., REP, M., & PIETERSE, C. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. In: *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 135-162.
- VAN RUIJVEN, J., AMPT, E., FRANCIOLI, D., & MOMMER, L. (2020). Do soil-borne fungal pathogens mediate plant diversity–productivity relationships? Evidence and future opportunities. In: *Journal of Ecology*, 108(5), 1810-1821.
- VANETTEN, H., MANSFIELD, J., BAILEY, J., & FARMER, E. (1994). Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus" phytoanticipins. In: *The plant cell*, 6(9), 1191.
- VEFHOEFF, K., & WARREN, J. (1972). In vitro and in vivo production of cell wall degrading enzymes by *Botrytis cinerea* from tomato. In: *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 78, 179-185.
- VELCULESCU, V. E., ZHANG, L., VOGELSTEIN, B., & KINZLER, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. In: *Science*, 270(5235), 484-487.
- VIANNINI, A., & CHILOSI, G. (2013). *Botrytis Infection: Grey Mould and Noble Rot*. In Sweet, Reinforced and Fortified Wines: Grape Biochemistry, Technology and Vinification (old.: 159-169). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd.
- VIAUD, M., BRUNET-SIMON, A., BYGOO, Y., PRADIER, J., & LEVIS, C. (2003). Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. In: *Molecular Microbiology*, 50(5), 1451-1465.
- VICENTE, J., BARAN, Y., NAVASCULÉS, E., SANTOS, A., CALDERÓN, F., MARQUINA, D., & BENITO, S. (2022). Biological management of acidity in wine industry: A review. In: *International Journal of Food Microbiology*, 375, 109726.

- VIRET, O., KELLER, M., JAUDZEMS, V., & COLE, F. (2004). Botrytis cinerea infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. In: *Phytopathology*, 94(8), 850-857.
- VOSS, B., KIRSCHOFER, F., BRENNER-WEISS, G., & FISCHER, R. (2020). *Alternaria alternata* uses two siderophore systems for iron acquisition. In: *Scientific reports*, 10(1), 3587.
- WAKEFIELD, J., HASSAN, H., JASPARS, M., EBEL, R., & RATEB, M. (2017). Dual induction of new microbial secondary metabolites by fungal bacterial co-cultivation. In: *Frontiers in Microbiology*, 8, 1284.
- WANG, S., CHEN, H., TANG, X., ZHANG, H., HAO, G., CHEN, W., & CHEN, Y. (2020). The role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in NADPH supply in the oleaginous filamentous fungus *Mortierella alpina*. In: *Frontiers in microbiology*, 11(818).
- WEDLER, H., PEMBERTON, R., & TANTILLO, D. (2015). Carbocations and the complex flavor and bouquet of wine: mechanistic aspects of terpene biosynthesis in wine grapes. In: *Molecules*, 20(6), 10781-10792.
- WENDISCH, V., BOTT, M., & EIKMANN, B. (2006). Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. In: *Current opinion in microbiology*, 9(3), 268-274.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. J. W. T., & TAYLOR, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1), 315-322.
- WICKHAM, H. (2011). ggplot2. Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics, 3(2), 180-185.
- WICKHAM, H., AVERICK, M., BRYAN, J., CHANG, W., MCGROWAN, L., FRANCOIS, A., & YUTANI, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. In: *Journal of open source software*, 4(43), 1686.
- WONGKITTICHOTE, P., MEW, N., & CHAPMAN, K. (2017). Propionyl-CoA carboxylase - a review. In: *Molecular genetics and metabolism*, 122(4), 145-152.
- XIE, C., MAO, X., HUANG, J., DING, Y., WU, J., DONG, S., & WEI, L. (2011). KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. In: *Nucleic acids research*, 39, 316-322.
- YU, Q.-K., HAN, L., WU, Y., & LIU, T. (2020). The Role of Oxidoreductase-Like Protein Opl1 in Sexual Reproduction and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. In: *Microorganisms*, 8(11), 1730.

M2. Az RNS kivonatolási protokoll részletes leírása

- A szőlőbogyó-mintát kerámia mozsárral porítsuk be folyékony nitrogén fűrdőben, fázisonként az alábbiak szerint:

1.fázis: 0,8g
2.fázis: 0,6g
3.fázis: 0,4g
4. fázis és szűrkerethadt minta: 0,2g

- Egy 50 ml-es centrifugacsőben adjuk a mintához az előmelegített (65 °C) 2%-os CTAB extrakciós puffert: 20 ml

2%-os CTAB extrakciós puffer összetétele (500 ml oldathoz):

- CTAB (cetiltrimetil-ammónium-bromid) : 10 g
- 2M NaCl : 58,45 g
- 100 mM Tris-HCl : 7,875 g
- 20 mM EDTA (etiléndiamintetraecetsav) : 3.75 g
- 2,5 % PVP-40 (polivinil-pirrolidon) : 12,5 g
- Állítsuk be a pH-t 8-ra 1 M NaOH-val
- Spermidin : 0,25 g

- Adjunk hozzá 10 % (2 ml) merkaptotetanolt.
- Inkubáljuk 65 °C-on 10 percig - percenként röviden vortexeljük.
- Adjunk hozzá azonos térfogatú (20 ml) kloroformot:izoamilalkoholt (24:1), és többször rövid ideig vortexeljük.

Kloroform / izoamilalkohol (24:1 v/v) összetétele (500 ml oldathoz):

- 480 ml kloroform
- 20 ml izoamilalkohol

- Centrifugáljuk 4 °C-on 21 000 g-n 30 percig.
- A felülúszóból 10 mL-t tegyünk át egy új 50 ml steril centrifugacsőbe, és adjunk hozzá ugyanannyi (10 mL) kloroform:izoamilalkohol (24:1) keveréket, majd többször rövid ideig vortexeljük.
- Centrifugáljuk 4 °C-on 21 000 g-n 30 percig.
- A felülúszóból 5 ml-t tegyünk át egy új centrifugacsőbe. Adjunk hozzá 500 µl (1:10 nátrium-acetát 3M NaOAc) oldatot. Adjunk hozzá 3 mL -20 °C-os 60%-os izopropanol oldatot. Röviden vortexeljük, és 30 percig tároljuk -80 °C-on.
- Centrifugáljuk a nukleinsav (RNS) pelletek összegyűjtéséhez 4 °C-on 21 000 g-n 30 percig.
- Távolítsuk el a felülúszót (pipetta segítségével) teljesen, és mossuk ki a megmaradt nukleinsav pelleteket 5 mL (80 %-os) etanollal.

- Centrifugáljuk 4 °C-on 21 000 g-n 15 percig.
- Távolítsuk el (pipettával) a felülúszót teljesen.
- A csapadékot steril fülke alatt szárítsuk meg.
- Oldjuk fel a szárított csapadékot 800 µl TE-pufferben. Az RNS a centrifugacső falához tapadhat. Kaparjuk a pipetta hegyével a centrifugacső falához, hogy leváljon. Pipetázzunk többször, hogy homogenizálja az elegyet. Töltsük át egy új 2 ml-es eppendorf-csőbe.
- Adjunk hozzá azonos térfogatú, 800 µl 8M LiCl-t (16,96 g porított LiCl 50 ml-re feloldva vízzel), és tároljuk egy éjszakán át - 20 °C-on.
- Centrifugáljuk 4 °C-on 21 000 g-n 45 percig.
- Dobjuk el (pipetta segítségével) a felülúszót.
- Mossunk 500 µl 80 %-os -20 °C-os etanollal, és centrifugáljuk 4 °C-on 21 000 g-n 5 percig.
- Távolítsuk el a maradék alkoholt, centrifugáljunk még egyszer, és távolítsuk el a maradék alkoholt (pipetta segítségével).
- Szárítsuk meg a csapadékot steril fülke alatt.
- Szuszpendáljuk a pelletet 175 µl RNázmentes vízben, és melegítsük két percig 50 °C-on.
- Adjunk hozzá 20 µl DNáz puffert (RDD) és 5 µl DNaseI-t, vortexeljük és forgassuk meg.
- Inkubáljuk 37°C-on 20 percig.
- Adjunk hozzá 200 µl izopropanolt, majd vortexeljünk és forgassuk össze.
- Tároljuk 60 percig -20°C-on
- Centrifugáljuk 4°C-on 21 000 g-n 50 percig, és dobjuk el a felülúszót (pipetta segítségével).
- Mossunk 500 µl 80%-os -20 °C-os etanollal és centrifugáljunk 21000 g-n 5 percig.
- Távolítsuk el az alkoholt, és ismételjük meg a 28. lépést.
- Szárítsuk meg a csapadékot steril fülke alatt.

Szuszpendáljuk a pelletet 27 µl RNázmentes vízben.

M3. Az aszúsodás négy fázisa során azonosított feldúsult *Botrytis cinerea* anyagcsere útvonalak teljes listája

A melléklet az alábbi helyről tölthető le:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1gwJ3lBq0X6p7nu7EM5HVge2Fmol0c8gx/edit?usp=share_link&ouid=105143242300507799512&rtpof=true&sd=true

M4. A borok érzékszervi és minőségi paramétereikhez hozzájáruló gének részletes listája, amely vagy szignifikánsan feldúsult útvonalból, vagy a koexpressziós elemzés esetén azonosított hub-génből származik

A melléklet az alábbi helyről tölthető le:

https://docs.google.com/document/d/1oTbNvlzqwo7eL3D5tJV8yMyuNGB2WKsh/edit?usp=share_link&ouid=105143242300507799512&rtpof=true&sd=true

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik segítettek kutatói tevékenységemet:

Dr. Váczy Kálmán Zoltánnak, témavezetőmnek, aki támogatta, irányította, segítette kutatómunkámat és az értekezés felépítését.

Dr. Cserhádi Mátyásnak, témavezetőmnek, aki segítette munkámat és az értekezés megírása során támogatott.

További kiemelt köszönetemet fejezem ki az átfogó szakmai segítségükért:

Dr. Geml Józsefnek

Dr. Margo Otto-nak

Köszönettel tartozom egykori és jelenlegi kollégáimnak a laboratóriumi munkáim során nyújtott segítségükért:

Dr. Pogány Miklósnak, Geiger Adrienn-nek, Golen Richárdnak, Thomas Cels-nek, Dr. Gomba-Tóth Adrienn-nek, Szabadi Kriszta Lillának, Dr. Zsófi Zsoltnak, Lovas Miklósnak, Dr. Kun Józsefnek, Dr. Gyenesei Attilának, Rian Pierneefnek, Markovics Györgyné Gabriellának.

Köszönettel tartozom a vizsgálatokhoz kijelölt mintagyűjtési területek biztosításáért és a gyakorlati hasznosság megállapításához adott segítségért a **Szepsy Pincészetnek**.

Hálával és köszönettel tartozom **feleségemnek, gyermekeimnek és édesanyámnak** az elfogadó türelmükért és támogatásukért.