



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Kertészettudományi Doktori Iskola

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

Doktori (PhD) értekezés

DOI: 10.54598/000700

Dankó Tamás

Budapest

2021.

Doktori iskola megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola
tudományága: Kertészettudomány

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

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

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

.....
Iskolavezető jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása

.....
Társtémavezető jóváhagyása

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés	6
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1. Az aszúsodás folyamata	7
3.2. A <i>Botrytis cinerea</i>	9
3.2.1. A <i>B. cinerea</i> biológiájának hőmérséklet és páratartalom igénye.....	9
3.2.2. A <i>B. cinerea</i> fertőzés tünetei és molekuláris háttere.....	10
3.3. A <i>B. cinerea</i> virulencia faktorai	12
3.3.1. <i>B. cinerea</i> sejtfal-bontó enzimei	12
3.3.2. <i>B. cinerea</i> másodlagos anyagcseretermékei.....	13
3.3.3. A <i>B. cinerea</i> növényi sejthalált indukáló mechanizmusai	14
3.4. Növényi védekezés.....	15
3.4.1. Általános növényi védekezés	16
3.4.2. Növényi védekezésben szerepet játszó hormonok.....	17
3.4.3. A növényi hormonok kölcsönhatásai	18
3.4.4. A szőlő védekezése a <i>B. cinerea</i> ellen	19
3.4.5. Xiloglukán anyagcsere a növényekben.....	21
3.4.6. Glutation anyagcsere.....	21
3.4.7. Növényi védekezésben szerepet játszó transzkripció faktorok	22
3.4.8. PR fehérjék.....	25
3.5. Növényi illatanyagok	26
4. Célkitűzés	28
5. Anyag és módszer.....	29
5.1. Mintagyűjtés.....	29
5.2. Szőlőbogyók őrlése	30
5.3. Gomba biomassza meghatározás.....	30
5.4. Szárazanyag tartalom meghatározás	31
5.5. Szemi-automatizált élősövet meghatározás a szőlőbogyóban.....	31
5.6. Totál RNS kivonás szőlő bogyóból.....	34
5.7. Totál transzkriptum szekvenálás és adatelemzés	35
5.8. RNS szekvenálás validálás-Real Time qPCR	36
5.9. Főkomponens elemzés	37
5.10. GO kifejezés dúsulási teszt (overrepresentation test).....	37
5.11. Kis RNS dúsított RNS kivonás szőlőbogyóból	38
5.12. Kis RNS szekvenálás és adatelemzés	40

5.13.	Tenyészet fenntartás	40
5.14.	Fertőzés <i>B. cinerea</i> -val	40
5.15.	Aszúsodás és szürkerothadás modellezése	41
5.16.	Illatanyag gyűjtés az aszúsodott és szürkerothadt szőlőfürtökről	42
6.	Eredmények	43
6.1.	<i>B. cinerea</i> gomba biomasszájának mennyisége a szőlőmintákban	43
6.2.	Gombaképletek eloszlása a szőlőbogyóban	44
6.3.	Szőlőbogyó élőszövet vizsgálat	45
6.4.	RNS szekvenálás eredmények	46
6.5.	RNS szekvenálási eredmények validálása	47
6.5.1.	<i>V. vinifera</i> transzkriptom szekvenálás eredményei	48
6.5.2.	GO kifejezés dúsulási teszt eredményei a Furmint szőlőbogyókban	50
6.5.3.	Fehérje komplex oligomerizációs folyamat	51
6.5.4.	Glutation anyagcsere folyamata	51
6.5.5.	Egyéb antioxidáns rendszerek	52
6.5.6.	Xiloglukán anyagcsere folyamata	53
6.5.7.	L-fenilalanin lebontásából eredő másodlagos anyagcseretermékek szintézise ..	54
6.5.8.	PR fehérjék a Furmint aszúsodás folyamatában	56
6.5.9.	Transzkripciós faktorok expressziója a Furmint aszúsodása során	58
6.6.	Furmint és Semillon nemesrothadás expressziós profiljának összehasonlítása	62
6.7.	A nemesrothadás és a szürkerothadás összehasonlítása	67
6.8.	A <i>B. cinerea</i> gomba transzkripciós eredményei	71
6.8.1.	<i>B. cinerea</i> korai szénhidrát bontó génjeinek vizsgálata	73
6.8.2.	Növényi sejthalált indukáló gének vizsgálata	75
6.8.3.	ROS elimináló gének vizsgálata	75
6.8.4.	A <i>B. cinerea</i> másodlagos anyagcsere gének	76
6.9.	Kis RNS szekvenálás eredménye	77
6.10.	Illatanyag gyűjtés az aszúsodott és szürkerothadt szőlőfürtökről	81
7.	Eredmények megvitatása és következtetések	85
7.1.	<i>B. cinerea</i> biomassza eredmények megvitatása	85
7.2.	Szőlőbogyó élőszövet eredmények megvitatása	85
7.3.	Furmint totál transzkriptom szekvenálási eredmények megvitatása	85
7.3.1.	Hősokkfehérje gének expressziós eredményeinek megvitatása	86
7.3.2.	ROS elimináló gének expressziós eredményeinek megvitatása	86
7.3.3.	Furmint másodlagos anyagcseretermékek szintézis eredmények megvitatása ..	87
7.3.4.	Aszúsodott Furmint TF profilok megvitatása	89

7.3.5.	A Furmint aszúsodás transzkriptom profiljának összehasonlítása más nemes- és szürkerothadt minták génexpressziós mintázatával.....	91
7.4.	Kis RNS eredmények megvitatása	93
7.5.	A <i>B. cinerea</i> transzkriptom eredmények megvitatása.....	95
7.6.	Illatanyag eredmények megvitatása	95
7.7.	Új tudományos eredmények.....	98
8.	Összefoglalás	99
9.	Summary.....	102
10.	Irodalomjegyzék.....	105
11.	Mellékletek.....	123
12.	Köszönetnyilvánítás	135

1. Rövidítések jegyzéke

4CL	4-kumaril-Koa-ligáz
ABA	Abszcizinsav
bHLH	Bázikus hélix-hurok-hélix (<i>basic helix-loop-helix</i>) transzkripció faktor
AP2/ERF	APETALA2/ etilénre válaszoló transzkripció faktor
bZIP	Bázikus leucin cipzár (<i>basic leucine zipper</i>) típusú transzkripció faktor
DMAT	Dimetil-allil-triptofán
DMATS	Dimetil-allil-triptofán-szintáz
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
FDA	Fluoreszcein-diacetát
GSH	Glutation
GST	Glutation-S-transzferáz
H ₂ O ₂	Hidrogén-peroxid
HR	Hiperszenzitív reakció
HG	Homogalakturonán
JAZ	<i>Jasmonate ZIM-domain</i>
JA	Jázmonsav
CHI	Kalkon-izomeráz
COMT	Kávésav-3-O-metiltranszferáz
KoA	Koenzim-A
PAL	L-fenilalanin-ammónia-liáz
MYB	Mieloblasztózis-függő transzkripció faktor
miRNS	mikro RNS
PRR	Mintázat felismerő receptor (<i>Pattern Recognition Receptor</i>)
NAC	NAM, ATAF1/2 és CUC2 transzkripció faktorokból képzett mozaik szó
NPR1	<i>Non-expressor of pathogenesis-related genes 1</i>
NB-LRR	Nukleotid kötő leucinban gazdag régió
PTI	PAMP indukálta-immunitás (<i>PAMP-Triggered Immunity</i>)
PR	Patogenezishez köthető fehérje
PAMP	Patogénhez köthető molekulamintázat (<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PEL	Pektát-liáz
PL	Pektin-liáz
PME	Pektin-metilészteráz
PG	Poligalakturonáz
PVPP	Polivinilpolipirrolidon
PCD	Programozott sejthalál (<i>Programmed Cell Death</i>)
PYL	<i>Pyrabactin Resistance1-Like</i> receptor
RG	ramnogalakturonán-liáz
ROS	Reaktív oxigén származékok (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RIN	RNS integritási érték
SA	Szalicilsav
STS	Sztilbén-szintáz
SOD	Szuperoxid-dizmutáz
C4H	transz-fahéjsav-4-monooxigenáz
TF	Transzkripció faktor
TRIS	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán
UF3GT	UDP-glükóz:flavonol 3-O-D-glikoziltranszferáz

2. Bevezetés

A tokaji aszú a világ egyik legkülönlegesebb bora, melyet 2013-ban magyarországi hungarikumnak nyilvánítottak. Az első írásos emlékek az aszú készítésről Tokaj-hegyalján a 16. századig nyúlnak vissza, így a világon ezek az első feljegyzések a botritizált borok készítéséről. Ezek az írások évszázadokkal megelőzik a hasonló eljárással készült borok francia megjelenését (Johnson és Robinson, 2003). Az aszú borok készítéséhez szükséges aszúszemeket az érett szőlőbogyók és a *Botrytis cinerea* Pers. gomba különleges kölcsönhatásaként fellépő nemes rothadás folyamata eredményezi. A szőlő számára kedvezőtlen időjárási feltételek esetén ugyanakkor ez a növény-gomba kölcsönhatás egy súlyos termésveszteséggel járó fürtbetegség, a szürkerothadás formájában nyilvánulhat meg. Az agrárszektorban a *B. cinerea* becslések szerint évente 10-100 milliárd dolláros veszteséget okoz világszerte (Weiberg *et al.* 2013). Jelenleg közel 7 millió hektáron termesztnek szőlőt (OIV-International Organisation of Vine and Wine, Nemzetközi Bor és Szőlő szervezet) és az a tény, hogy akár teljes termésveszteséget is okozhat a gomba fertőzése, különösen fontossá teszi a szőlő - *B. cinerea* kapcsolat átfogó vizsgálatát. Külön hangsúlyt fektetek munkám során a kölcsönhatás két végkimenetelének a szőlőbogyó és a gombasejtek oldaláról történő molekuláris biológiai összehasonlítására, mely a magyar (Tokaj-hegyaljai) mintákon még nem történt meg.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az aszúsodás folyamata

A *Botrytis cinerea* fertőzés különleges körülmények között kiemelkedő minőségű termést, az aszú létrejöttét eredményezi szőlőbogyókon. Ebben a nemesrothadási folyamatban ugyanaz a szürkepenész játszik szerepet, mint a szürkerothadásban, csak a fertőzési folyamatot meghatározó külső és belső tényezőkben van különbség, ami alapvetően meghatározza a fertőzés intenzitását és kimenetelét.

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

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

E négy feltétel esetén a fertőzést követően a gomba lassan tud fejlődni, sőt akár le is állhat a növekedése.

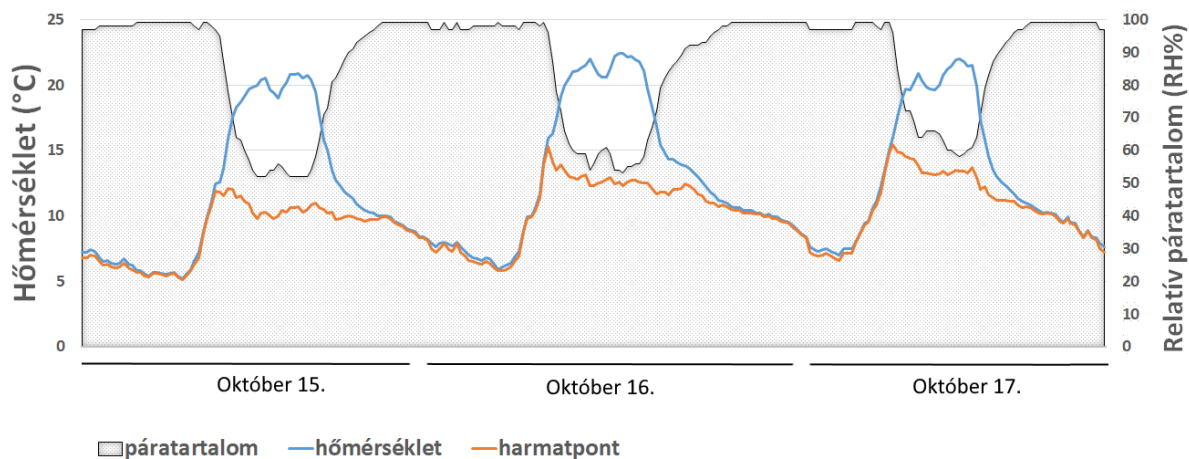
A nemesrothadás során képződő aszúbogyók kialakulásának lépései:

A Tokaj-hegyaljai klíma viszonyok ideálisak az aszúbogyók kialakulásához. A szőlőbogyó héja az érése során elvékonyodik. A csírázó konídiumok tömlői a látszólag ép bőrszöveten keresztül, az érés során a sztómák körül kialakuló mikrorepedéseken, vagy sebekben át jutnak a gazdanövény szervezetébe, ahol a gomba megtelepszik. A bogyókon permetlé perzselés vagy lisztharmat után kialakuló felületi parásodás is utat nyithat a *Botrytis* fertőzésének (Lehoczky *et al.* 1968). Az őszi eleji esőzések és a hajnali ködök hatására a szőlőszem megduzzad, mikrorepedések keletkeznek rajta, ami szintén beindíthatja a botritiszes nemesrothadást (Magyar és Bene 2006). A kórokozó extracelluláris sejtfal bontó enzimeket termel, amiktől a sejtfal annyira károsodik, hogy nem képes funkcionálni, amin keresztül a bogyó jelentős vizet veszít és a beltartalma betöményedik. A csúcsmínőségű aszúbogyók jellemzője, hogy barnás lilás színűek, erősen töppedtek. Felületükön alig vagy nem képződik micélium.

A borászok a 2017-es évet figyelemreméltó évjáratnak tekintik aszú szempontjából. Meleg évjárat volt, a korai botritiszesedés alapvetően a magas minőségben készült hagyományos

borfajtáknak kedvezett (szamorodni, aszú). Ebben az évben országosan – és így Tokaj-Hegyalján is – rendkívül korán szüreteltek.

A Tokaj-hegyaljai speciális mikroklímából adódóan az esős időszakot gyakran hosszú, meleg napos periódus követi. Ennek során ősszel, szüreti időszakban az éjszakai hőmérséklet alacsony (5-8 °C) és a relatív páratartalom 98-100%. Reggel 8 órától a levegő hőmérséklete a napsütésnek köszönhetően emelkedni kezd. Kilenc és 11 óra között a levegő hőmérséklete kezd magasabb lenni a harmatpontnál, ezáltal megkezdődhet az éjszaka lecsapódott pára felszáradása, továbbá a relatív páratartalom folyamatosan csökken. A harmatpont a levegőnek az a hőmérséklete, amelyen az adott nedvességtartalmú levegő a folyékony vízre nézve telítetté válik. A hőmérséklet délre elérheti akár a 20 °C-ot is és a relatív páratartalom 60%-ra csökken. A felmelegedés és alacsony páratartalom általában kitart 17 óráig. Ezt követően a napsütés gyengül, a hőmérséklet csökken, amitől a relatív páratartalom növekszik egészen a 98-100% értékig (1. ábra).



1. ábra A hőmérséklet, a relatív páratartalom és a harmatpont alakulása 2017 októberében Tokaj-Hegyalján (Tállya, www.amsz.hu).

3.2. A *Botrytis cinerea*

A *B. cinerea* az egész Földön elterjedt agresszív nekrotróf fonalas gomba, mely a szürkerothadás nevű megbetegedésért felelős. Komoly fenyegetést jelent a bogyós gyümölcsökre a növény fertőzésével, valamint tárolás során fellépő rothadás miatt. A *B. cinerea* génusz neve a görög „botrus” (βότρυς) szóból ered. A botrus szőlőt jelent, az „ytis” utótag a kórosságra utal, míg a „cinere” latinul hamu, amit valószínűleg a szürkés megjelenése miatt kapott. A *B. cinerea* fakultatív parazita gomba, a természetben nagyon ritkán előforduló aszkospórás *Botryotinia fuckeliana*-nak az ivartalan (anamorf) alakja (Jackson 2014). Tölcsér alakú apotéciumot képez, melyben parafízisek vannak. Az aszkuszban 8, egysejtű, ovális szintelen aszkospóra található.

A *B. cinerea* a Helotiales rend Sclerotiniaceae családjába tartozik (Staats *et al.* 2005). Ivartalan szaporodását a gomba módosult hifáiból képződő konídiumtartókon elhelyezkedő konídiumok biztosítják. A növényi sejteket megöli és a növekvő hifáival teljesen elpusztítja a szerkezetét, mielőtt a sejt alkotóelemeit táplálékként saját növekedésére fordítaná (van Kan 2006). Polifág gomba, rendkívül széles gazdanövénykörrel rendelkezik – több mint 1400 növényt képes fertőzni (Elad 2015). Több természetes variánsa létezik, melyek extrém módon alkalmazkodtak a különböző gazdanövényekhez (Choquer *et al.* 2007). A *B. cinerea*-val való laboratóriumi vizsgálatokat legtöbbször egy nagyon agresszív törzzsel, az úgynevezett b05.10-zel végzik, amit az 1990-es években izoláltak borszőlőről (*Vitis vinifera*) (Büttner *et al.* 1994). Népszerűsége abból adódik, hogy genetikailag stabil, és hajlamos a homológ rekombinációra, ami különböző genetikai konstrukciók elkészítését könnyíti meg.

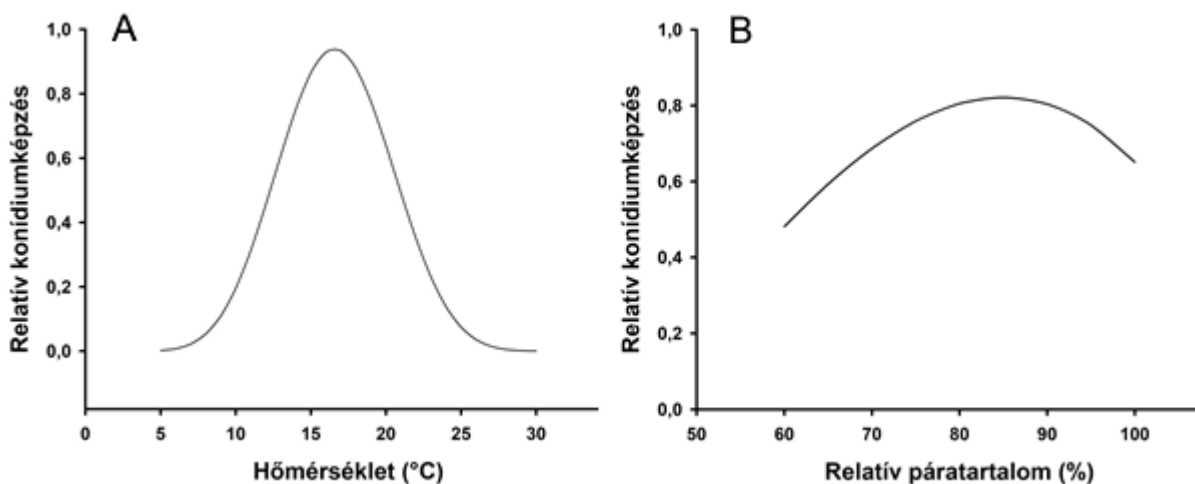
3.2.1. A *B. cinerea* biológiájának hőmérséklet és páratartalom igénye

A *B. cinerea* konídiumai széles hőmérsékleti tartományban képesek csírázni, majd növekedésnek indulni. Ciliberti és munkatársai (2015) tíz *B. cinerea* törzs csírázási dinamikáját vizsgálták különböző hőmérsékleteken. Burgonya-glükóz-agar táptalajra helyezést követő negyedik órában a vizsgált gombatörzsek konídiumainak több, mint 30%-a csíratömlőt fejlesztett 20 °C-on. Tizenkét óra múlva már az összes konídium csírázott. A legideálisabbnak a 20 °C bizonyult, de a törzsek között nem találtak szignifikáns eltérést az optimális hőmérséklet tekintetében. Judet-Correia *et al.* (2010) szőlőbogyókon vizsgálták a csíratömlő növekedését különböző hőmérsékleteken. Eredményeik alapján a gomba maximális növekedési potenciáljához tartozó hőmérséklet: 21,5 °C.

A *B. cinerea* konídiumai a szél, az eső és a rovarok segítségével is terjedhetnek a levegőben (Holz *et al.* 2007). A konídiumtermelés energiaigényes folyamat, ezért csak a gomba számára kedvező körülmények (megfelelő tápellátottság, hőmérséklet, páratartalom) között valósul

meg. A maximális konídiumtermeléshez tartozó hőmérséklet 15-20 °C közé esik (2. ábra „A”), ami kis mértékben függ a *B. cinerea* törzstől (Ciliberti *et al.* 2016).

A gomba konídiumképződése függ a relatív páratartalomtól is. A 65,5% és 100% páratartalom közötti tartományban állandó 20 °C-os hőmérsékleten végzett kísérletből kiderült, hogy a konídiumképzés maximum görbét mutat és 85% relatív páratartalom körül éri el az optimális nedvességtartalmat (2. ábra „B”). Ennél párásabb levegőben a gomba konídiumképzése enyhén csökken.



2. ábra *B. cinerea* relatív konídiumképzése a hőmérséklet és a pártartalom függvényében. A folytonos vonal a Ciliberti *et al.* (2016) által megmért konídiumképzési rátákra illesztett görbe („A”), a hőmérséklet („B”) relatív páratartalom függvényében (Ciliberti *et al.* 2016).

3.2.2. *A B. cinerea* fertőzés tünetei és molekuláris háttere

A gomba által okozott tünetek nagyban függenek a fertőzött növényi szervektől. A *B. cinerea* rothadást okoz, aminek során a növény szöveteinek szerkezete összeesik és víz jelenik meg a gyümölcsön vagy a leveleken. Az éretlen terméseken többnyire lassan terjedő barnás foltot okoz. A virágzatot is képes megtámadni, ami termés eldobást illetve sérült terméseket eredményez (González *et al.* 2016).

A *B. cinerea* konídium a gazdanövényen való megtapadása után 12-16 óra elteltével már elkezd kicsírázni és csíratömlőt növesztetni. Később ennek a tömlőnek a végén alakul ki az appresszórium, amivel együtt sejtfalbontó enzimek, fitotoxikus metabolitok és kis RNS-ek kiválasztása is megindul (González *et al.* 2016). A 2011-ben publikált *B. cinerea* genomja (Amselem *et al.* 2011) rávilágított arra, hogy a gomba extracelluláris sejtfalbontó enzimeit több redundáns génnel és izoenzimekkel rendelkezik, melyek komplex szabályozással nagyfokú

gazdanövény specifikusságot tesznek lehetővé. Ezt igazolja az a megfigyelés, hogy eltérő gazdanövény esetén a *B. cinerea* különböző extracelluláris fehérje mintázatot mutat (Shah *et al.* 2009). A sejtfallbontó enzimek között találhatóak poligalakturonázok (PG), pektin-liázok (PL), pektát-liázok (PEL), pektin-metilészterázok (PME), ramnogalakturonán-liázok (RG) és további nem pektinolitikus bontó enzimek mint pl. cellulázok, hemicellulázok, proteázok és lakkázok (van Kan 2006).

A *B. cinerea* az inváziója során két aspecifikus fitotoxint termel (Colmenares *et al.* 2002, Tani *et al.* 2005), melyek közül az egyik a botridial, ami egy szeszkviterpén metabolit (Pinedo *et al.* 2008). A botridial a gazdanövény sejtjeiben klorózist, majd sejt összeomlást idéz elő. Agresszív *B. cinerea* törzsek további poliketidin alapú fitotoxint is termelnek pl. botcinolidokat (Reino *et al.* 2004), melyek hasonló károkat okoznak mint a botridial, de antifungális hatásuk is ismert (Tani *et al.* 2005). Mindkét fitotoxin csoportnak az elsődleges prekursora az acetil–koenzim–A, így ha bármelyik fitotoxin bioszintézisében gátlás lép fel akkor a másik túltermelődésével kompenzálódik a virulencia csökkenés (Dalmais *et al.* 2011).

A fertőzés korai szakaszában a *B. cinerea* az oxálacetát-acetilhidroláz enzime segítségével extracelluláris oxálsavat termel. Az oxálsav a fertőzés több lépésénél játszik kulcsszerepet, úgy mint a környezet savanyítása, ahol az extracelluláris sejtfallbontó enzimeinek pH optimuma található (Cotton *et al.* 2003). Továbbá Ca^{2+} ionnal történő kelát képzés, mely csökkenti a növényi védekező mechanizmus során keletkezett reaktív oxigén származékok (ROS) mennyiségét (Williams *et al.* 2011). A *B. cinerea* a reaktív oxigén származékokat különösen jól tolerálja, sőt a fertőzés során maga is termel ROS-t. (Temme és Tudzynski 2009).

Az újabb kutatások szerint a *B. cinerea* kártételében nagy szerepet játszik a kiválasztott kis RNS-ek széles spektruma, amik géncsendesítésen keresztül a gazdanövény immunitásáért felelős gének transzkriptumait csökkentik le, ezzel megfosztva a növényt a hatékonyabb védekezés képességétől (Weiberg *et al.* 2013).

3.3. A *B. cinerea* virulencia faktorai

3.3.1. *B. cinerea* sejtfal-bontó enzimeik

A *B. cinerea* leírt 16.000 génjéből közel 1155-öt szénhidrát módosító enzimként azonosítottak, amiből 275 tartalmaz extracelluláris transzport szignál szekvenciát (Blanco-Ulate *et al.* 2014). Feltételezhetően ezeknek az enzimeknek szerepük van a fertőzésben, mert a növényi sejtfal jelentős része szénhidrátból áll. A kiválasztott szénhidrát módosító enzimek 49%-a glikozid-hidroláz (GH). A legnépesebb alcsaládja a GH28, amibe beletartozik a poligalakturonázok alcsaládja is. A poligalakturonázok a legnagyobb mennyiségben megjelenő extracelluláris enzimek és fő feladatuk a növényi sejtfalban található pektin lebontása. A második leggyakoribb extracelluláris fehérje típus a szénhidrát kötő fehérjék (23%). Őket követik a szénhidrát-észterázok (17%), glikozil-transzferázok (8%), és végül a poliszacharid-liázok (3%) (Blanco-Ulate *et al.* 2014).

A pektin bontásban közrejátszanak a poligalakturonázok, pektin-liázok, ramnogalakturonán-liázok és pektinmetilészterázok. A poligalakturonázok a pektin gerincét alkotó homogalakturonán (HG) láncot hasítják (Prestegard *et al.* 2017). Endo-poligalakturonidázok a láncon belül hasítanak és ezzel nagyobb lánc egységekre bontják a homogalakturonán láncot, az exo-poligalakturonidázok pedig a nem redukáló lánc végről egyszerre csak egy-egy D-galakturonsavat hasítanak le (Jayani *et al.* 2005). A jelenleg azonosított 11 extracellulárisan kiválasztott PG-ből öt exo és hat endo PG családba tartozik (Have *et al.* 1998, Kars *et al.* 2005).

Jelenleg négy PL-t és négy PEL-t azonosítottak a *B. cinerea* genomban (Blanco-Ulate *et al.* 2016). Funkciójukat tekintve szintén a pektin homogalakturonán gerincét hasítják, de a PG-k hidrolizáló mechanizmusától eltérően β -eliminációval szakítják meg a láncot. A PL enzimek többnyire a nagyfokú metilészterezett területeket kedveli, míg a PEL pont ellenkezőleg a ritkán metilészterezett területet (Jayani *et al.* 2005). A PL és PEL expressziója gyakorlatban nagyságrendekkel elmarad a PG gének expressziójától, amiből arra a következtetésre jutunk, hogy ezek az enzimek csak támogatják a PG destruktív működését (Blanco-Ulate *et al.* 2016).

A HG gerincen történt oldallánc módosítás (metiláció vagy acetiláció) negatívan módosíthatja a gomba endo-PG és PEL enzimeinek aktivitását (Kars *et al.* 2005). A PME enzimek demetilészterifikálják az oldallánc módosított homogalakturonán gerincét és a reakció során metanol szabadul fel. Jelenleg három PME gén azonosítása történt meg a *B. cinerea* genomban, melyek közül a PME1 és PME2 konstitutívan expresszálódik (Valette-Collet *et al.* 2003).

A *B. cinerea* genom hat ramnogalakturonáz (RG) enzimet kódol. Ez az enzim a ramnogalakturon poliszacharid gerincét alkotó galaktóz és ramnóz között képes hasítani. A

ramnogalakturon a homogalakturon gerincű pektinhez hasonlóan tartalmazhat metil vagy acetil oldallánc módosulatokat. Mindösszesen egy ramnogalakturon-acetiltranszferáz enzimet azonosítottak a gomba genomjában, de kulcsfontosságú szerepet tölt be az enzimátikus hasító helyek szabaddá tételében (Mølgaard *et al.* 2000).

A pektin oldalláncainak lebontását további enzimek végzik. Négy α -arabinofuranozidáz enzimet azonosítottak a gomba genomjában, ami terminális arabinózt hasít le. Továbbá három β -galaktozidáz enzimet, melyek terminális galaktózt hasítanak le és két α -L-1,5-arabinanáz enzimet, ami lineáris arabinán láncot képes hasítani (Nafisi *et al.* 2014).

Kísérleti úton azonosítottak egy 229 enzimből álló univerzális extracellulárisan kiválasztott szénhidrát módosító enzimekészletet, ami kimutatható volt paradicsom, saláta és szőlő *B. cinerea* fertőzése esetén is (Blanco-Ulate *et al.* 2014).

3.3.2. *B. cinerea* másodlagos anyagcsere-termékei

A *B. cinerea* hasonlóan más fonalas gombákhoz a másodlagos anyagcsere-termékek széles spektrumát (antibiotikumok, fitotoxinok, mikotoxinok stb.) termeli. Ezeket a termékeket öt csoportba sorolhatjuk szerkezetük és bioszintézisük szerint (Collado és Viaud 2015):

- terpének
- poliketidek
- nem riboszomális eredetű fehérjék
- prenilalizált triptofán származékok
- előző négy csoport keveréke

A terpének öt szénatomos izoprén egységekből álló vegyületek. A molekulák változatossága a gerincet alkotó izoprén egységek oldallánc módosulásaival vagy szénhidrátok kovalens kötésével jön létre. A szeszkviterpének három izoprén egységből álló terpének. A *B. cinerea*-ban azonosított első másodlagos anyagcsere-termék a botridial volt, ami szerkezetét tekintve szeszkviterpén, funkciójában pedig fitotoxin (Collado *et al.* 2007).

A poliketidek szintézise megfigyelhető baktériumokban, gombákban, növényekben és néhány tengeri állatban is. Szerkezetileg igen változatosak, továbbá biológiai és farmakológiai tulajdonságuk is eltérő lehet. Három csoportba soroljuk a poliketideket a szintézisükért felelős poliketid-szintáz gén típusától függően (Staunton és Weissman 2001, Yu *et al.* 2012.). A poliketid-I csoportba a makrolid, tehát 14-16 tagú laktongyűrűből álló deoxigenált cukor oldalláncokat tartalmazó antimikrobiális hatással rendelkező vegyületeket soroljuk. Jelentőségük főleg a gyógyászatban van. A poliketid-II csoportba többnyire poliaromás

antimikrobiális anyagok tartoznak. A poliketid-III csoportba főleg a gombák által termelt kis aromás vegyületek tartoznak (Collado *et al.* 2015). Ebbe a csoportba tartozik a *B. cinerea* másik jól ismert toxin csoportja a botcinolidok (botcinik sav, botcinin, botrilakton). Ezek erősen hidroxilált nonalakton poliketidek (Collado *et al.* 2000), amik nem csak fitotoxikus aktivitással, de antifungális hatással is rendelkeznek (Sakuno *et al.* 2007). A *B. cinerea* jellegzetes szürke színét adó melanin szintén poliketid-III vegyület (Scharf *et al.* 2014).

A nem riboszomális eredetű fehérjék bioszintézisében specifikus, adott fehérje konstrukció létrehozására szolgáló enzim komplex segédkezik. Számos különböző modul tartalmazhat a komplex, melyekkel sokféle kémiai módosítást végezhet el a készülő molekulán (Finking és Marahiel 2004). Ezek a peptidek gyakran gyűrűs szerkezetűek, komplex molekulák.

A prenilalizált triptofán származékok melyek kialakításában a dimetil-allil-triptofán-szintáz (DMATS) játszik közre. A triptofán prenilációja során izoprén csoport kötődik a triptofánhoz így kialakul a dimetil-allil-triptofán (DMAT). A DMAT további metileződéssel és oxidációjával változatos származékai képződhetnek (Collado *et al.* 2015)

A *B. cinerea* legtöbb másodlagos anyagcseretermékének funkciója jelenleg tisztázatlan, de erősen kutatott terület a különböző enzimek biotechnológiában történő alkalmazhatósága miatt (Wiemann és Keller 2014).

3.3.3. A *B. cinerea* növényi sejthalált indukáló mechanizmusai

A gazdaszervezet és a patogén interakciójában fontos szerepet tölt be a növényi sejthalál folyamata. Két eltérő formáját különböztetjük meg a sejthalálnak: a kontrolálatlan, ún. nekrotikus sejthalál és a programozott sejthalált. A *B. cinerea* célja a minél gyorsabb növényi sejthalál előidézése, amihez mindkét sejthalál típust képes előidézni, akár egyszerre is (Arenas *et al.* 2010, Frías *et al.* 2011).

A *B. cinerea* szekrétumában megjelennek a cerato-platanin család fehérjéi, melyek fitotoxikus aktivitással rendelkeznek. Nevüket a *Ceratocystis platani* gombáról kapták. A BcSpl1 az egyike a két cerato-platanin fehérjének, és a fertőzés korai szakaszában erős indukálódást mutat (Espino *et al.* 2010). A gomba sejtfalában lokalizálódik a fehérje (Boddi *et al.* 2004) és a növényi védekező rendszer felismeri (PAMP), aminek következtében a növényi sejtben beindul a programozott sejthalál (Frías *et al.* 2014). Tehát a cerato-platanin fehérjék egyben a gomba virulencia faktorai is és a növényi védekezést is indukálják, azonban nagy mennyiségben HR-t indukálnak (Frías *et al.* 2014).

A nekrozis és etilén indukáló faktor (NEP) családba két fehérje tartozik: a BcNEP1 és a BcNEP2. Ezek a fehérjék indukálják a növényi védekező mechanizmust, és a cerato-platanin fehérjékhez hasonlóan nagy mennyiségben programozott sejthalált indítanak be a gazdaszervezetben (Gijzen és Nürnberger 2006). Bár a gombasejteken mindkét fehérje expresszálódik, a fertőzés hatására a szekrétumban csak a BcNEP2-t tudták azonosítani (Arenas *et al.* 2010).

Itt érdemes megemlíteni, hogy a *B. cinerea*-nak erős PCD elleni védelemre van szüksége. A csírázást követően elicitorként funkcionáló toxinokat és hidrolizáló enzimeket választ ki, de ezek mennyisége a konídium méretéből adódóan limitáltak. Eközben a növény védekező mechanizmusa is életbe lép – oxidatív robbanás, kitinázok, fitoalexinek –, ami az újonnan létrejött gombahifák többségét elpusztítja. Amennyiben a gombának effektorokkal sikerül aktiválnia a növényi programozott sejthalált, akkor valójában a növényi védekezést megkerülve, a növény saját magát pusztítja el a biotróf gombák elleni védekező mechanizmusával (Boddi *et al.* 2004, Shlezinger *et al.* 2011).

3.4. Növényi védekezés

Mind a növényi, mind az állati immunrendszer elsődleges feladata megkülönböztetni egymástól a szervezet saját sejtjeit és az idegen sejteket, majd a felismerés után hatástalanítani az utóbbikat. Emlősökben, ízeltlábúakban, és növényekben is bizonyított az általános védekezés jelenléte (Medzhitov and Jenaway 1997, Khus and Lemaitre 2000, Cohn *et al.* 2001). Bár ezek az élőlénycsoportok a törzsfa távoli ágain helyezkednek el, a védekezés aspektusai megőrizték hasonlóságukat (Szatmári és Klement 2003). A támadó mikroorganizmusok jellemző molekuláris mintázatának (PAMP) felismerésében továbbá a felismerést követő, védekezéshez kapcsolható gének aktivációjában és antimikrobiális vegyületek képzésében található hasonlóság (Asai *et al.* 2002). A *Drosophila*-ban Toll receptornak (Imler és Hoffmann 2001), míg emlősöknél Toll-szerű receptoroknak hívjuk a felismerésért felelős receptor. Mindkét receptor típus rendelkezik leucinban gazdag molekulamintázatot tartalmazó doménnel (Aderem és Ulevitch 2000), amiről a nevüket kapták. A növényeknél szerkezetileg és funkcionalitásban nagyon hasonló PAMP felismerő rendszer működik (Gómez-Gómez és Boller 2000).

Jones and Dangl (2006) két alapvető formáját különbözteti meg a növényi immunválaszoknak: PTI és ETI. A PTI immunválasz (PAMP-triggered immunity) során a mikrobához/patogénhez/sérüléshez köthető molekuláris mintázatot (*microbial/pathogen/damage-associated molecular patterns, MAMPs/PAMPs/DAMPs*) a növény sejtmembránján elhelyezkedő mintázat felismerő receptorok (*Pattern Recognition Receptors, PRRs*) azonosítják és indítják el a védekezés jelátvitelt. PRR által felismert

mintázattal rendelkező molekulák lehetnek bakteriális flagellinek, gombák kitin sejtfa darabjai (kitozán) vagy sejtfa bontó enzimek termékeként odakerülő növényi sejtfa törmelék (Boller and Felix 2009, Galletti *et al.* 2011).

A PRR-ek ismétlődő leucin aminosavakból álló felismerő egysége a membránon kívül, míg a fehérjék foszforilálására képes kináz alegysége a citoplazmában helyezkedik el. Az utóbbi aktivációjával kezdetét veszi a MAPK-k (mitogén -aktivált protein kinázok) által közvetített foszforilációs kaszkád, ami etilén és jázmonsav vagy szalicilsav közvetítette jelátviteli útvonalon a védekezési gének kifejeződését indítja el (Dodds and Rathjen 2010).

A növényekben megfigyelt hiperszenzitív reakció és az állatokban leírt programozott sejtfa működése hasonló folyamat (Lam *et al.* 2001). A védekezés aktívan résztvevő komponenseiben azonban már jelentős különbségek adódnak a két szervezetben. Az emlősökben részben a keringési rendszer és specializált sejtek közvetítik a védelmet, addig a növényeknél a sejteknek egyedül kell elvégezni a felismerést és a hatékony védekezést is.

3.4.1. Általános növényi védekezés

Az általános rezisztencia a növények indukált, lokális, aktív védekezési mechanizmusa, mely a természetben a védekezés első vonalaként megállíthatja a nem-növénykórokozó és szaprotróf baktériumokat és gombákat (Klement *et al.* 2003; Galletti *et al.* 2011). Az általános rezisztencia tulajdonsága, hogy tünetmentes, még sejt szinten sem jár HR kialakulásával (Ott *et al.* 1997) és a növény számára kevésbé energiaigényes, mint a HR (Ott 2002). A védekezés korai lépéseiben lokálisan megemelkedik a sejtfa lignin tartalma (Underwood *et al.* 2012), papilla képződés indul be (Zeyen *et al.* 2002), amit a sejtmembránban elhelyezkedő kallóz-szintázok alakítanak ki (Voigt 2014). További korai aktív védekező mechanizmus a lokális oxidatív kitörés, mely során a növény reaktív oxigénformákat juttat a patogén behatolási pontjához közel, ezzel károsítva annak felületét, toxinjait, enzimeit (Ott *et al.* 1997, Bozsó *et al.* 2001, Andersen *et al.* 2018). A reaktív oxigénformák termelésében közrejátszanak a NADPH-oxidázok, amin- és poliamin-oxidázok, oxalát oxidázok (Kärkönen és Kuchitsu 2015) és peroxidázok (Kámán-Tóth 2019). A szabadgyökök további fontos szerepe, hogy az elsődleges sejtfa szerkezet fő alkotóelemében, a hidroxil prolinban gazdag glikoproteinek között keresztkötéseket hozzanak létre, ami tovább erősíti a sejtfa (Bradley *et al.* 1992).

A mikrobák enzimatis tevékenysége során keletkező sejtfa fragmentumok maguk is védekezési folyamatokat indíthatnak el, vagy erősíthetnek meg (De Lorenzo *et al.* 1994). A gomba által termelt sejtfa bontó enzimek hatására létrejövő galakturonsav oligomerjei a

poligalakturonáz enzimet gátló fehérjék (PGIPs) megjelenését vonja maga után (Bell *et al.* 1986).

Amennyiben a patogénnek sikerül áttörnie a PTI immunválaszt, akkor további effektorokat juttat a sejtbe, amivel elősegíti a kolonizációt. A növényi sejt ezeket az effektorokat felismerheti a nagy polimorfizmust mutató NB - LRR receptorfehérjék segítségével és HR-t indukálhat. Ezek a felismerő fehérjék a nevüket a funkciójuk után kapták: nukleotid kötő- (NB) és leucinban gazdag régiók (LRR). Ez a típusú védekezés csak a biotróf illetve hemibiotróf életvitelt folytató mikroorganizmusok esetében hatásos, a nekrotrof kórokozókkal szemben (pl.: *B. cinerea*) hatástalan, sőt akár elő is segítheti az ilyen életmódú gombák kolonizációját (Glazebrook 2005).

3.4.2. Növényi védekezésben szerepet játszó hormonok

A növényi védekezés kialakításában elengedhetetlen a hormonok nyújtotta precíz, de nagyfokú változást előidéző képes szabályozási rendszer. A legfontosabb növényi hormonok ezek közül a szalicilsav (SA), jázmonsav (JA), etilén (ET) és az abcizinsav (ABA).

A szalicilsav (SA), kémiai nevén o-hidroxibenzoesav egy természetesen előforduló fenolos vegyület, amely az egész növényvilágban elterjedt (Raskin 1992). A SA-nak kulcsszerepe van az általános rezisztencia, az ETI, továbbá a lokális és szisztémikus immunitás kialakításában (Durrán és Dong 2004, Vlot *et al.* 2009). A SA részt vesz a biotróf és hemibiotróf patogének elleni védekezés aktiválásában, de emellett fokozza a nekrotrof mikroorganizmusok iránti fogékonyságot a JA közvetítette védekezési gének gátlásával (Beckers és Spoel, 2006; Spoel és Dong 2008). A SA a növényi sejt citoplazmájában aktiválja az NPR1 (non-expressor of pathogenesis-related genes 1) fehérjét, ami ennek következtében bejut a sejtmagba és indukálja a *PR1*, *PR2* és *PR5* gének átíródását (Uknes *et al.* 1992, Nawrath és Métraux 1999).

Jázmonsav legismertebb funkciója a virág fejlődés és néhány érési folyamaton kívül (Peña-Cortés *et al.* 2004) a rovarok és nekrotrof kórokozók elleni növényi válasz szabályozása (Browse 2009). A jázmonsav a kloroplasztizok membránjában található α -linolénsav enzimatis úton történő átalakításával szintetizálódik (Wasternack és Kombrink 2010). A jelátviteli útvonal kezdő lépése az α -linolénsav oxigenálása a 13-lipoxigenáz enzim (13-lox) segítségével (Avanci *et al.* 2010). A legtöbb JA közvetítette válaszreakcióban kulcsszerepet játszik a COI1 (coronatine insensitive 1) fehérje, mely nagy affinitással köti a JA-t (Sheard *et al.* 2010). A JA széles transzkripciós változást kiváltó mechanizmusa során aktiválja *MYC2* típusú TF gének expresszióját, melyek további, a védekezésben aktívan résztvevő géneket indukálnak. A *MYC2* TF-ok aktivációjához szükséges a *MYC2* TF gének átíródását

megakadályozó JAZ (*Jasmonate ZIM-domain*) fehérjék lebontása. Jázmonsav jelenlétében (Fonseca *et al.* 2009) a COI1 fehérje stabil komplexet képez a JAZ fehérjével (Katsir *et al.* 2008), ami indukálja a JAZ fehérje ubikvitinálódását, ezzel a *MYC2* gének átíródása felszabadul a gátlás alól.

A gáz halmazállapotú etilén (ET) hormon részt vesz a levelek és a virágok öregedésében, gyümölcsök érésében, de emellett képes a növény fogékonyságát is befolyásolni patogén mikroorganizmusokkal szemben (Graham *et al.* 2012; Pech *et al.* 2012). *A. thaliana*-ban az ET-t az etilén receptorok érzékelik, amik negatívan szabályozzák az ET jelátviteli útvonalat. ET jelenléte nélkül a CTR1 (Constitutive Triple Response 1) szerin/treonin kináz aktív és az EIN2 (Ethylene Insensitive 2) fehérjét, annak foszforilálásával inaktíválja. Azonban etilén jelenlétében a CTR1 inaktíválódik, az EIN2 defoszforilálódik és a fehérje C terminálisa bejut a sejtmagba, ahol indukálja az EIN3 TF-t. Az EIN3 és EIL1 (Ethylene Insensitive-Like Protein 1) ezt követően különböző célgéneket és *ERF* TF géneket indukálnak (Müller és Munnei-Bosch 2015).

Az ABA hormon szabályozó szerepet tölt be a növény fejlődésében, csírázásában és fontos szerepet tölt be az abiotikus stresszel szembeni védekezésben (Fujita *et al.* 2006). Azonban az ABA képes befolyásolni a növény-patogén kölcsönhatás kimenetelét, negatív és pozitív irányban egyaránt a növény állapotától, a kórokozótól és a környezeti adottságoktól függően (Ton *et al.* 2009; Robert-Seilaniantz *et al.* 2011). Általánosságban az ABA csökkenti a SA vagy JA közvetítette immunválaszt (Anderson *et al.* 2004; Mohr és Cahill, 2007) így növeli a növény fogékonyságát (Spoel és Dong 2008, Coelho *et al.* 2019). Néhány kórokozó képes ABA termelésre – köztük a *B. cinerea* is – vagy a növényben kiváltani az ABA termelését, így csökkenteni a növényi immunválaszt (Siewers *et al.* 2004).

3.4.3. A növényi hormonok kölcsönhatásai

A SA és JA közvetítette védekezési útvonalak több ponton szabályozzák egymást negatív irányban (Bari és Jones 2009). A két útvonal kölcsönhatásában nem kizárólag, de az egyik legjelentősebb antagonistá szerepe az NPR1 fehérjének van. A SA hormon által aktivált NPR1 fehérje indukálja a SA függő PR géneket, miközben represszálja a JA függő PR géneket. *Npr1* mutáns növényekben kimutatták, hogy a SA hatására a SA függő gének indukciója mellett a JA függő gének expressziója is megemelkedik (Spoel *et al.* 2003). Lúdfüben a *WRKY70* TF (Transzkripcós faktor) konstitutív kifejeztetésével, a SA kapcsolt PR gének indukálódnak, miközben a JA-hoz köthető PR gének repressziója figyelhető meg (Li *et al.* 2004). A SA és JA antagonistá kapcsolata azonban alacsony hormonkoncentráció esetén nem érvényesül, ekkor szinergista hatást fejtenek ki egymásra és mindkét útvonal aktiválódik (Peterson *et al.* 2000).

A SA és JA erős antagonisták kapcsolatával ellentétben a JA és ET kapcsolata szinergista. A JA és az ET szintén képes stabilizálni az EIN3 fehérjét és fokozni a rezisztenciát nekrotrof kórokozókval szemben (Zhu *et al.* 2011). A JA és az ET szintén szükséges az ERF1 TF aktiválásához és így a JA függő PR gének aktiválásához (Lorenzo *et al.* 2003).

Az ABA-JA hormonok kölcsönhatásában fontos szerepet játszanak a JAZ-MYC2 fehérjék. Az aktivált ABA receptor PYL (Pyrabactin Resistance1-Like) JAZ fehérjével komplexet képez. Az így transzkripció gátlás alól felszabadult MYC2 TF indukálja a JA-hoz köthető védekező géneket (Per *et al.* 2018). Az ABA és JA is képes indukálni/represszálni ERF TF-okat (Moffat *et al.* 2012). *ERF5* és *ERF6* gének a levézet növekedését gátolják, és JA függő az expressziójuk. Ezzel ellentétben az ABA függő ERF11 TF antagonisták hatást vált ki az ERF6-ra (Sewelam *et al.* 2013). Az ERF1 TF hatására a növény szárazsággal szembeni ellenállósága növekszik. Az *ERF1* gén indukciója figyelhető meg JA vagy etilén hatására, azonban ABA-val történő kezelés hatására az *ERF1* gén expressziója drasztikusan csökken (Weiste *et al.* 2007). Néhány NAC TF indukálódást mutat ABA hormonra vagy dehidratációra (Fujita *et al.* 2011). A *NAC18* és *NAC55* gének mind a JA mind az ABA útvonalban fellelhetők (Jiang *et al.* 2009).

3.4.4. A szőlő védekezése a *B. cinerea* ellen

A szőlő, mint sok más haszonnövény, fogékony a *B. cinerea*-val szemben. Azonban különösen érdekes, hogy a *B. cinerea* elsősorban az érett szőlőbogyót képes fertőzni, az éretlent nem, vagy csak alig. A különbség hátterében azonban nem a gomba eltérő stratégiája áll, mert éretlen és érett szőlőbogyót fertőző gomba génextpressziós mintázatait összehasonlítva nem találtak markáns eltérést az aktiválódó gének között (Kelloniemi *et al.* 2015). A fertőzés eltérő kimenetelében a szőlő érettségi stádiumától függő – gomba által kiváltott – transzkriptum mintázat változás áll.

Az aktív védekezés lépései csak abban az esetben tudnak indukálódni, ha gazdanövény érzékeli a támadáshoz köthető jelző molekulákat, az elicitorokat (Delaunoy *et al.* 2014). A növény általános védekezése az érett és éretlen bogyónál egyaránt megfigyelhető. Ezek közé tartozik a fizikai akadály képzése, a fitoalexinek (sztilbének és származékai) és a patogénhez köthető fehérjék (pathogenesis - related proteins, PR proteins) termelése (Rivière *et al.* 2012).

Korai elicitoroként funkcionál több oligoszacharid, mint pl. a gomba sejtfalát alkotó kitin és a növényi sejtfalát alkotó pektin származékok. A β -glukán és kitin alegységek bizonyítottan indukálják a fitoalexin termelést (Sharp *et al.* 1984). Érdekes megfigyelés, hogy a gomba által termelt endogalaktruronáz, mely a sejtfalbontás fő enzime is, önmagában védekező válaszreakciót vált ki (Poinssot *et al.* 2003). A szőlő egyik fontos PR fehérje családja a kitinázok, melyek bontják a gomba fő sejtfalalkotó anyagát a kitint, így gátolja a hifák

növekedését (Collinge *et al.* 1993). A kitinázoknak több izoformájuk van, melyek eltérő időben expresszálódnak az elicitorral történő találkozást követő 48 órában (Aziz *et al.* 2004). A poligalakturonáz inhibitor fehérjék (PGIP) csökkentik a gomba eredetű endogalakturonáz aktivitását, úgy hogy közben a növény saját endogalakturonáz aktivitású enzimének aktivitását nem csökkentik (Rasul *et al.* 2012). A fertőzés korai szakaszában megemelkedik a növényben a *VvRbohD* (NADPH-oxidáz) és *VvGLP* (*Germine Like protein*) gének expressziója, ami oxidatív kitörést okoz (Kelloniemi *et al.* 2015). Továbbá a fenilpropanoid útvonal kulcsenzimeit is - a *VvPAL* és a *VvSTS* - aktiválódnak (Bais *et al.* 2000, Negri *et al.* 2017). Leggyorsabban és a legnagyobb mennyiségben a rezveratrol fenilpropanoid jelenik meg, de annak származékai is fontos szerepet kapnak a védekezésben. A rezveratrol metabolizációjából további sztilbén alakulnak ki, így a glükozilált piceid, dimerizált vitiferinek, amik erős antifungális hatással rendelkeznek, vagy a metilálódott pterosztilbén, ami a rezveratrolhoz hasonlóan a gomba csíratömlőjének növekedését gátolja. (Pezet *et al.* 2004; Delaunois *et al.* 2009). A rezveratrol mennyisége a fertőzés első 12 órájában már eléri a maximális koncentrációját, majd ahogy a lebontása elindul, csökkenni kezd a koncentrációja (Saigne-Soulard és Abdelli-Belhadj 2015). A szerin-proteáz inhibitorok hatékony védekezést biztosítanak a patogének ellen (Revina *et al.* 2008). Szőlőlevélben végzett kísérlet során 24 órával a *B. cinerea* fertőzés követően a szerin-proteáz inhibitor szintje megnőtt.

A SA-JA hormonok egyensúlya és az általuk aktivált védekezési útvonal a két érettségi fázisban lévő szőlőbogyóban jelentősen eltér. Míg az érett szőlőbogyóban *B. cinerea* fertőzés hatására a JA útvonalhoz kötött gének expressziója nő meg, addig az éretlenben a SA útvonal génei nem mutatnak indukciót (Agudelo-Romero *et al.* 2015, Kelloniemi *et al.* 2015). Beltartalmi mérések során azt tapasztalták, hogy míg a jázmonsav-izoleucin konjugátum szintje az érett bogyóban megnő, addig az éretlenben a szabad szalicilsav mennyisége fertőzésre ugyan nem változik, de alapszintje kb. tízszerese az érett bogyóban mérthez képest, a fertőzéstől függetlenül (Kelloniemi *et al.* 2015). Ezek az eredmények nincsenek összhangban azzal a régi dogmával, mely szerint a SA útvonal a biotróf, a JA/ET útvonal a nekrotróf mikrobák elleni védekezésben játszik kulcs szerepet (Glazebrook 2005). Az éretlen bogyó esetében tapasztaltak szerint a nekrotróf *B. cinerea*-val szembeni ellenállóságot a SA útvonal és az általa aktivált *VvPRI* fehérje biztosítja (Kelloniemi *et al.* 2015).

Az érett bogyónál a csökkent alap SA szint és a JA útvonal aktiválódása történik, azonban a szőlőbogyók ekkor a megtett védekező lépések ellenére mégis nagy fogékonyságot mutatnak (Kelloniemi *et al.* 2015). Wang és munkatársai (2015) azt tapasztalták, hogy alacsony metil-jázmonát koncentrációval történő kezelés esetén priming hatás, míg magas koncentrációnál

erősebb védekezés indukálható a szőlőbogyóban *B. cinerea* ellen, mint a kontroll növényeknél. Ezek a kezelések azonban csak csökkentették a fertőzés mértékét, megállítani nem tudták.

3.4.5. Xiloglukán anyagcsere a növényekben

A heteropolimerek közé tartozó xiloglukánok a növényi sejtek elsődleges sejtfalában találhatóak. A polimer gerincét (β 1 \rightarrow 4)-kapcsolt d-glukán biztosítja, melyhez 1-6 pozícióban α -d-xilóz kötődik, amivel kialakul az általános struktúrájuk (Hayashi és Kaida 2011). További módosítások lehetnek a láncon, pl.: β -1,2 kötött galaktóz vagy β -1,2/ β -1,3 fukóz, melyek módosítják a polimer oldékonyságát (Pauly és Keegstra 2016). A xiloglukánok fő feladata a cellulóz rostok között keresztkötések létrehozása, mellyel kialakítja az elsődleges növényi sejtfal merev, nagy teherbírású struktúráját (Cavalier *et al.* 2008). A xiloglukán-endotranszglylikozilázok olyan extracelluláris fehérjék, melyek a xiloglukán polimert láncon belül hasítják és kapcsolják össze egy másik xiloglukán lánccal. Ez a folyamatos átkötés és az újonnan kiválasztott xiloglukán lánc beépítése a mátrixba alakítja ki az összetett xiloglukán-cellulóz rostok hálózatát (Nishitani és Vissenberg 2007). A sejtfal dinamikus változása elengedhetetlen a növényi sejtek növekedésében, a gyümölcsök érésében (Albert *et al.* 2004). Továbbá már régóta ismert, hogy a xiloglukán-endotranszglylikozilázok részt vesznek a patogének elleni védekezésben is a sejtfal megvastagításával (Belchí-Navarro *et al.* 2018).

3.4.6. Glutation anyagcsere

A glutation (GSH) egy glicinből, ciszteinből és glutaminsavból álló tripeptid, ami a tiol csoportja miatt aktív redukálószerként viselkedik (Hasanuzzaman *et al.* 2017). A növényi sejtekben a glutation metabolizmusban két enzimes család játszik kulcsszerepet a glutation-peroxidázok és a glutation-S-transzferázok (Béla *et al.* 2017, Gullner *et al.* 2018).

Glutation-peroxidáz enzim a hidrogénperoxid redukálásához két GSH molekula között alakít ki diszulfid kötést, aminek köszönhetően a hidrogénperoxidot két vízmolekulává képes redukálni. A diszulfid kötéssel dimerizálódott GSH (GSSH) ezt követően glutation-reduktáz enzim segítségével redukálódik és ismét képes ellensúlyozni a reaktív vegyületeket.

A másik fontos enzim család a glutation metabolizmusban a glutations-S-transzferázok (GST). Néhány GST glutation-peroxidáz aktivitással bír és a reaktív zsírsav-peroxidokat szerves alkohollá redukálja. (Dixon *et al.* 2009). A GST-nek másik fontos feladata a sejt detoxifikálása, mely során a sejt számára káros anyagokhoz képes GSH-t konjugálni. Az így létrejövő molekulakomplex a vakuólumba kerül ABC-transzporterrel keresztül (Dixon és Edwards 2010).

Patogénnel való találkozás következtében a növényi sejtekben felhalmozódnak a reaktív vegyületek, ezzel eltolva a sejt redox állapotát. Ezt ellensúlyozva a sejt törekszik az

antioxidánsok és redukáló ágensek mennyiségének a növelésére (Barna *et al.* 2012). Nekrotróf patogénnel szemben a szőlőbogyóban, hasonlóan más növényekhez, megemelkedik a GST gének expressziója (Mulema *et al.* 2011, Agudelo-Romero *et al.* 2015)

Szőlőbogyó sejtekben azonosították elsőnek a GST enzimek Tau osztályát, mely fehérjék az antifungális hatással rendelkező rezveratrol extracelluláris térbe történő transzportálását végzik (Martínez *et al.* 2017).

3.4.7. Növényi védekezésben szerepet játszó transzkripciós faktorok

A transzkripciós faktor (TF) fehérjék a sejtmagban lokalizálódnak és a DNS-hez kötődve elősegítik vagy gátolják gének kifejeződését. A TF-ok komplex redundáns szabályozás alatt állnak, hogy a környezeti feltételnek megfelelő, a növény túlélését biztosító génműködési profil alakuljon ki. A szabályozás történhet MAPK kaszkád, növényi hormonok, vagy más szignált továbbító molekulák segítségével (Pedley és Martin 2005).

Biotikus és abiotikus stresszre a növények válaszreakcióját többlépcsős, de hasonló jelátviteli útvonalak szabályozzák (MAPK kaszkád, SA, JA, ET). A szabályozás hasonlósága magyarázatot ad arra, hogy a génexpressziós profiljuk nagy átfedést mutat (Glazebrook 2001). Például inkompatibilis növény - gomba kapcsolat során hasonló gének aktiválódnak, mint sebzés esetén (Durrant *et al.* 2004) vagy hideg és szárazság stressz esetén (Seki *et al.* 2001).

Jelenleg 58 TF családot különböztetünk meg a növényekben (Jin *et al.* 2017), melyek közül hat hozható kapcsolatba a kórokozók elleni védekezéssel (Ng *et al.* 2018). Ezek az AP2/ERF (APETALA2/ etilénre válaszoló faktor), bHLH (basic helix-loop-helix, alap hélix-hurok-hélix), bZIP (basic leucine zipper, bázikus leucin cipzár), MYB (mieloblasztózis-függő), NAC (NAM, ATAF1/2 és CUC2 transzkripciós faktorokból képzett mozaik szó), WRKY. A transzkripciós faktorokat a konzerválódott DNS kötő doménjük alapján rendezzük családokba.

A *V. vinifera*-ban mind az 58 TF család megtalálható, összesen 1276 TF gént azonosítottak benne (PlantTFDB v5.0). A hat- védekezéssel összefüggő TF családban található gének mennyiségét összehasonlítva lúdfűben, kukoricában, paradicsomban és szőlőben azt tapasztaljuk, hogy minden egyes csoportban a szőlőben van a legkevesebb azonosított gén (1. táblázat).

1. táblázat A lúdfű (*Arabidopsis thaliana*), kukorica (*Zea mays*), paradicsom (*Solanum lycopersicum*) és szőlő (*Vitis vinifera*) genomban azonosított védekezéssel összefüggő TF családba tartozó gének mennyiségi összehasonlítása (PlantTFDB v5.0).

Transzkripciós faktor család	Azonosított TF gének a növényi genomokban			
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Vitis vinifera</i>
AP2/ERF	169	254	164	100
bHLH	225	308	161	115
bZIP	127	216	70	47
NAC	138	189	101	71
MYB	168	203	140	138
WRKY	90	161	81	59

Az **AP2/ERF** TF család négy alcsaládból áll: APETALA2 (AP2), abszcizinsav inszenzitív 3 függő TF (Related to abscisic acid insensitive 3/viviparous 1, RAV), dehidratációs válasz kötő fehérje (Dehydration-response element binding protein, DREB) és etilén válasz faktor (Ethylene responsive factor, ERF). Az AP2/ERF transzkripciós faktor családnak fontos szerepe van a növekedés/fejlődés időzítésében, és a környezeti feltételek kedvezőtlené válása esetén annak leállításában (Licausi *et al.* 2010). Az ERF géneken belül 11 filogenetikai alapon összerendelt csoportot különböztetünk meg (Licausi *et al.* 2010). Nekrotróf gombák fertőzése gyakran okoz abiotikus stressz tüneteket a növényeknél, mint pl. dehidratálódás, ozmotikus stressz (Mizoi *et al.* 2012). A IX. csoportba tartozó gének számával kapcsolatba hozták a növények fitnessét (Nakano *et al.* 2006). Az alma, szilva és szőlőbogyó érésénél már korábban azonosították, hogy a IX. csoportba tartozó ERF gének expressziója megnő a héjban (Wang *et al.* 2007, El-Sharkawy *et al.* 2009, Licausi *et al.* 2010). Ez a feltehetőleg az érés során felhalmozott könnyen elérhető cukrokat célbavevő kórokozók elleni védekezéssel függ össze.

A **WRKY** TF-ok rendkívül fontos szerepet játszanak a növényi sejtek jelátviteli hálózatában. Ezt bizonyítja az is, hogy már a zöld-algáknál is megjelentek ezek a szabályozó fehérjék (Phukan, *et al.* 2016). A növényekben a WRKY TF-ok jelentős szerepet töltenek be az abiotikus stressz elleni tolerancia kialakításában és a környezeti adottságokhoz való alkalmazkodásban. Lúdfűben az *AtWRKY46* gén szabályozza a növény fejlődését, hormonális válasz reakcióját az oldal gyökérzet növekedésének serkentésével ozmotikus stressz esetén (Ding *et al.* 2015). Napraforgó *HaWRKY76* gén kifejeztetése lúdfűben növelte annak szárazság és elárasztással szembeni ellenállóságát (Raineri *et al.* 2015). A szőlő *VvWRKY11* génjének lúdfűben történő kifejeztetése növelte a lúdfű ozmotikus stressz elleni toleranciáját (Huaying *et al.* 2010). A szőlő WRKY gének kifejeződésében nagy számban történik változás az ozmotikus viszonyok megváltozása során (Chunlei *et al.* 2014). Az abiotikus stressz elleni védekezésen túl fontos a

biotikus stressz elleni védekezésben betöltött szerepe is. A lúdfüben leírt *AtWRKY18*, *AtWRKY40*, *AtWRKY60* gének részt vesznek a *Pseudomonas syringae* és *B. cinerea* elleni védekezésben (Xu *et al.* 2006). Az *AtWRKY33* TF létfontosságú a nekrotróf gombák elleni védekezésben (Liu *et al.* 2015). Továbbá a másodlagos anyagcsere termékek aktiválásával is növeli a biotikus stressz elleni védekezést, amikor a *VvWRKY2* gén a *VvC4H* gén promóterét aktiválja. Ez a gén a lignin bioszintézis egyik kulcsenzime, amivel a sejtfa szintézist serkenti (Guillaumie *et al.* 2010). A lúdfüben tapasztaltakhoz hasonlóan a szőlő WRKY gének expresszióját is növeli a metiljázmonát és az ET, míg az ABA és SA növényi hormonok csökkentik azokat (Zheng *et al.* 2006, Chunlei *et al.* 2014). Funkciójukat tekintve a növény veleszületett immunitásában (PTI, ETI) játszanak szabályozó szerepet. Több specifikus növényi védekezésben szerepet játszó MAP kináz célpontja is ez a transzkripciós faktor család (Ishihama *et al.* 2012). A *Nicotiana benthamiana*-ban a *WRKY7*, *WRKY8*, *WRKY9* fehérjék MAP kinázok foszforilálásával szabályozzák a NADPH-oxidáz expresszióját (Adachi *et al.* 2015). A biotikus stresszek elleni védekezésen túl szerepük van a csírázásban, a növényi fejlődésben és a levelek öregedésében (Rushton *et al.* 2010).

Jelenlegi ismereteink szerint *A. thaliana*-ban a **bHLH** típusú TF-ok MYC (mielocitomatózishoz kapcsolódó) családjába tartozó négy TF kulcsszerepet játszik a JA-közvetítette stresszválaszban és a polifenolos vegyületek anyagcseréjében (Hirai *et al.* 2007). A bHLH-IIIe család pozitívan szabályozza, míg a bHLH-IIId negatívan szabályozza a JA választ. Míg a bHLH-IIIf család a JA-mediálta antocianin szintézisben játszik kulcs szerepet, addig a bHLH-IIIf fagy toleranciában betöltött szerepe miatt fontos (Goossens *et al.* 2017). Szőlőben bizonyították, hogy a bHLH TF-ok szerepet játszanak a fény indukálta flavonoid anyagcsere aktiválásban (Sun *et al.* 2017).

A **bZIP** TF család szerepet játszik az abiotikus stresszben, a mag érésében, virág-fejlődésben és patogének elleni védekezésben, bár ez utóbbi az egyik legkevésbé feltárt terület (Jakoby *et al.* 2002). Biotróf patogén és *A. thaliana* kapcsolatában szabályozó funkciót tölt be a SA jelátviteli útvonalon. SA hatására a sejtmagba transzlokálódó NPR1-el összekapcsolódva aktiválják a SA-függő védekező géneket (Pieterse *et al.* 2012). Patogének támadása során bejuttatott elicitorok által aktivált kinázok képesek egyes bZIP fehérjéket foszforilálni. Az így aktivált TF már képes bejutni a sejtmagba majd diterpének és flavonoidok szintézisét serkenti (Dröge-Laser *et al.* 1997). Szőlőben korábban leírták, hogy a *VvbZIP23* gén (*VIT_03s0038g02420*) expressziója megnő szárazság-, só-, hidegstresszre (Tak és Mhatre 2013).

A **NAC** transzkripciós faktorok a növény fejlődésének széles spektrumát szabályozzák, így a mag-, virágzat és embrió képződést (Sablowski és Meyerowitz 1998, Takada *et al.* 2001), a levelek szenescenciáját, de a sejtosztódásban (Kim *et al.* 2016) és a védekezésben is szerepet játszanak (Nuruzzaman *et al.* 2013). Filogenetikai vizsgálatok alapján a NAC TF-ok 15 alcsaládba oszthatók, melyekkel jól korrelálnak az eltérő funkcióik is. Egyes NAC TF-ok, mind biotikus mind abiotikus stresszel szembeni ellenállóságra is hatással vannak (Puranik *et al.* 2012). Habár a NAC TF-ok a védekezésben játszanak szerepet, néhány gén esetében (ATAF1, ATAF2) a PR fehérje gének represszióját figyelték meg emelkedett NAC expresszió mellett. Ennek következtében fogényokabbakká váltak *Botrytis cinerea* és *Fusarium oxysporum* nekrotróf kórokozókkal szemben, de növekedett a szárazságtűrésük (Bu *et al.* 2008, Wang *et al.* 2009). A *VvNAC1* TF gén feltehetőleg fontos szerepet játszik a szőlő fejlődésében továbbá SA és JA közvetítette jelátviteli útvonalak segítségével növeli az ellenállóképességét nekrotróf és biotróf gombák ellen (Le Hénanff *et al.* 2013)

Az **MYB** TF család *V. vinifera*-ban a legtöbb génnel rendelkező család. Eukariótákban fontos szabályozó funkciót töltenek be. A MYB TF-ok szerkezetét tekintve négy csoportot különböztetünk meg az ismétlődő hélix-csavar-hélix motívumok alapján. Az R2R3 csoport növény-specifikus és a legnagyobb funkcionális csoportot alkotja a családon belül, ami a biotikus és abiotikus stresszválaszban részt vesz (Ambawat *et al.* 2013).

3.4.8. PR fehérjék

A PR fehérjék olyan fehérjék, melyek biotikus vagy abiotikus stressz hatására indukálódnak és szerepet játszanak a védekezésben és a tolerancia kialakításában. Funkció szerint jelenleg 17 csoportot (PR1-17, 2. táblázat) különböztetünk meg (van Loon *et al.* 2006). A PR fehérjék funkciója széles spektrumot ölel fel, mert vannak köztük enzimaktivitással rendelkezők és antimikrobiális fehérjék is. Ezekben a fehérjékben közös, hogy alacsony molekulásúlyúak (6-40 kDa), hőstabilak, proteázokkal szembeni ellenállóságuk nagy, továbbá alacsony pH-n van a működési optimumuk (van Loon *et al.* 1994).

A biotróf kórokozók többnyire SA-közvetítette jelátviteli úton, az NPR1 transzkripciós faktor segítségével aktiválják a PR-1,2,5 fehérjéket. Expressziójuk által nem csak az adott növényi sejtet védik, de lokális szerzett rezisztenciát és szisztemikus szerzett rezisztenciát is kialakítanak. Ezzel szemben nekrotróf kórokozók esetén a jázmonsav útvonal aktiválódik és MYC transzkripciós faktor segítségével a PR-3,4,12 fehérjék aktiválódnak. Ezek szisztemikus szerzett rezisztenciát nem, csak lokális szerzett rezisztenciát alakíthatnak ki (Ali *et al.* 2018).

2. táblázat Növényi PR fehérjék funkciói (Van Loon *et al.* 2006).

Család	Funkció
PR1	Gombaellenes
PR2	β -1,3-glukán hasítás
PR3	Endokitináz
PR4	Gombaellenes és kitináz
PR5	Gombaellenes
PR6	Proteináz inhibitor
PR7	Endopeptidáz
PR8	Kitináz III
PR9	Peroxidáz
PR10	Ribonukleáz-szerű
PR11	Kitináz
PR12	Defenzin
PR13	Tionin
PR14	Foszfolipid és zsírsav szállítás
PR15	Oxalát-oxidáz
PR16	Oxalát-szerű oxidáz
PR17	Ismeretlen

3.5. Növényi illatanyagok

A növények széles spektrumban szintetizálnak szerves illó komponenseket, amikkel interakcióba lépnek a környezettel. A virágok illatával vonzani tudják a beporzást végző rovarokat vagy az érett gyümölcsök illatával a magok terjesztését végző állatokat. Illatanyagokkal repellens hatást képesek előidézni patogénekkal, parazitákkal és növényevő állatokkal szemben (Maffei 2010).

A növényi illatanyagok többnyire besorolhatóak négy nagy csoportba:

- terpének (pl.: limonén, α -pinén)
- aromás vegyületek (pl.: benzaldehid, eugenol, fenetilbenzoát)
- zsírsav származékok (pl.: 1-hexanal, cis-3-hexanol, metil-jázmonát)
- aminosav származékok

A szőlő fő illatanyagai monoterpének, C₁₃ norizoprének, alkoholok, észterek, karbonsavak és aromás vegyületek (Dieguez *et al.* 2003, Ilc *et al.* 2016). A terpének változatos szerkezetükből adódóan sokféle aromát képesek kialakítani. Talán legismertebb monoterpén formájuk a limonén és geraniol, melyek citrus illetve rózsaszínű illatúak. Az aromás illatanyagok közül két nagy csoport jellemző a szőlőben: a fenilpropanoidok és a benzol funkciós csoporttal rendelkezők. Ezek a vegyületek az L-fenil-alanin aminosav metabolizmusából keletkeznek. Ebbe a csoportba

tartozó legismertebb illatanyagok a fahéjsav (fahéj illat), benzaldehid (keserűmandula illat) és acetofenon (széna illat).

A szőlőben megjelenő zsírsav származékok a C₁₃-lipoxigenáz és C₉-lipoxigenáz működése által, a linolénsav specifikus hasításával, majd a keletkezett termékek további átalakításával jönnek létre. Az átalakítás során kialakul a megfelelő funkciós csoport (alkohol, aldehid, karbonsav), de minden esetben alifás marad a szénlánc. A növények sérülése esetén jellegzetes „zöld illatot” érzünk (pl.: fűnyírás után jellemző), ami főleg C₁₈ zsírsavból keletkezett C₆ alkoholok, aldehidek és ketonok keveréke. Az átalakítást a sérült membránból kiszabaduló lipoxigenázok végzik (Dudareva *et al.* 2013).

Az aszúsodás során nem csak a szőlő érésekor keletkező illatanyagok kerülnek a levegőbe, hanem a *B. cinerea* illatanyagai is. Továbbá a fertőzés jellegéből adódóan nagy mennyiségben jelennek meg zsírsav származékok (pl: 3-metil-1-butanol, hexilacetát, 2-nonanol), melyek a sérült növényből szabadulnak fel. Megjelennek továbbá erjedéshez köthető alkoholok, ketonok, amelyek az intakt szőlő esetében nincsenek jelen (Rizvi és Raman 2016).

Tokaji aszúsodott szőlőbogyókból már történt illatanyag komponensek meghatározása. A vizsgálat során aszúbogyókból és aszús borból is sikeresen izolálták az aszú karakterét biztosító γ - és δ -laktonokat. Ezek a laktonok felelősek a citrusos, csokoládé és kókuszdió illatokért. A lakton vegyületek létrejöttében fontos szerepet játszik a *B. cinerea* oxidáló hatása és a Maillard reakció (Miklósy *et al.* 2004). A *B. cinerea* fertőzésére jellemző illatanyagokat szamócában már azonosították: 3-metilbutanal, cis-4-dekanal, 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 1-okten-3-on és 1-okten-3-ol. (Van Den Driessche *et al.* 2012).

Az illatanyagokat mesterségesen is alkalmazzák, főleg a leszüretelt gyümölcsök minőségének megóvása a céljából. Ennek érdekében 1-hexanolt, (E)-2-hexén-1-olt, (Z)-6-nonanolt, metil-szalicilátot, metil-benzoátot, benzil alkoholt és izotiocianátokat juttatnak a légterbe, melyek antifungális hatású anyagok (Tripathi és Dubey 2004).

4. Célkitűzés

Kutatásom során célul tűztem ki a Furmint szőlő fajta aszúsodásának kórélettani, genetikai és illatanyag profiljának feltérképezését.

Főbb célkitűzések:

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

5. Anyag és módszer

5.1. Mintagyűjtés

A Furmint szőlőbogyókat a tokaji borvidéken található Mádról, a Szepsy birtok Betsék dűlőjéből gyűjtöttem. A mintagyűjtés során alkalmazkodni kellett az évjáratonként különböző időjárási feltételekhez, amitől a szőlőbogyó érése és az aszúsodás akár heteket is tolódhatott. Négy aszúsodási fázist különítettem el morfológiai jellegek alapján (3. ábra).

A következők alapján gyűjtöttünk mintákat:

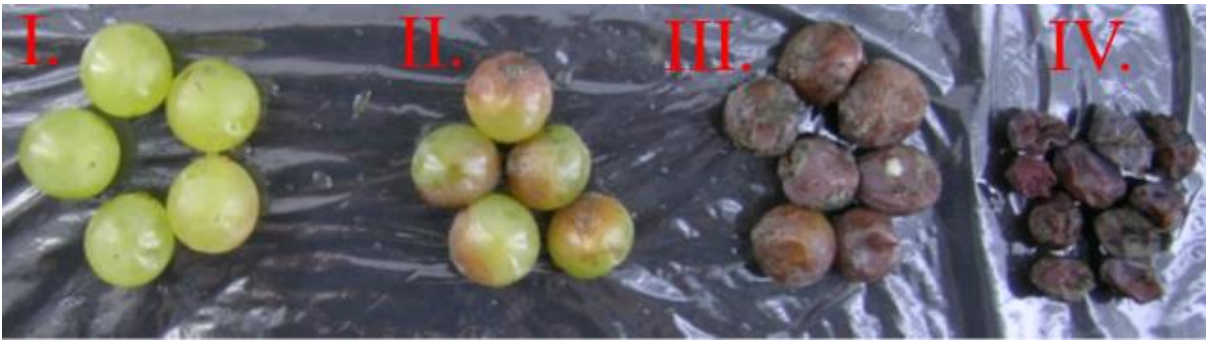
- I. fázis: Ép, feszes bőrszövet, melyen látható sérülés nincsen. A bogyó színe zöldes sárga.
- II. fázis: Már megjelentek a gomba tünetei. A bogyónak 25-90%-ban barnás lilás a héja. A bogyó elvesztette feszségét.
- III. fázis: A bogyó teljes egészében barnás lilás. Enyhén töppedt bogyók, akár jelentős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

A Furmint aszúsodása a fürtön mozaikos, ezért a dűlőben folyamatosan lehet találni a négy aszúsodási fázisnak megfelelő szőlőbogyókat. A különböző mintagyűjtési időpontokban (3. táblázat) minden aszúsodási fázishoz öt biológiai mintát vettem. A biológiai minták egyenként két 50 ml centrifugacső mennyiségű, a dűlő különböző fürtjeiről szedett bogyóból álltak.

3. táblázat Aszúbogyók mintagyűjtési időpontjai.

Időpont	Kísérlet
2016.10.25. (A időpont)	ELISA, RNS-, kis RNS szekvenálás
2016.11.03. (B időpont)	ELISA, RNS-, kis RNS szekvenálás
2017.09.27.	ELISA, Szőlő bogyó élő szövet vizsgálat
2018.10.10.	Aszúsodás modellezése, Illatanyag vizsgálat

Az RNS-, kis RNS szekvenálás és ELISA vizsgálatokhoz Mádon gyűjtött szőlőbogyó mintákat azonnal folyékony nitrogénnel hűtöttem le. A Budapestre történő szállítás során szárazjég pellettel töltött hungarocell dobozokba tartottam a mintákat. Ezt követően feldolgozásig ultramélyhűtőben -80 °C-on tároltam őket. A többi kísérlethez felhasznált mintákat a mintagyűjtést követően szobahőmérsékleten szállítottam Budapestre.



3. ábra Tokaj-hegyalján gyűjtött, különböző aszúsodási fázisban lévő Furmint szőlőbogyók. A római számok az aszúsodási fázist jelölik.

5.2. Szőlőbogyók őrlése

Az RNS kivonáshoz és ELISA vizsgálathoz szükség volt a minták feltárása. A bogyók őrlése Roche márkájú őrlőmalommal történt. Az őrlő kapszulákat és golyókat folyékony nitrogénben előhűtöttem. 25 mL-es acél kapszulákat töltöttem meg félig különböző fázisú aszúsodott bogyókkal és az őrlést végző acélgolyóval. Az őrlés 30 másodpercig tartott 25 1/s frekvencián. Az örleményt szárazjéggel előhűtött centrifugacsövekbe töltöttem és ultramélyhűtőben $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam őket felhasználásig. A minták között a kapszulákat és a golyót is átmostam melegvízes szappanos vízzel, majd desztillált vízzel és 70% etanollal szárítottam.

5.3. Gomba biomassza meghatározás

A különböző aszúsodási fázisú szőlőbogyó minták gomba tartalmát *B. cinerea* specifikus, módosított szendvics ELISA kittel (LOEWE) végeztem a gyártó utasításai szerint.

A tálcákat 3 órán át inkubáltam $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on *B. cinerea* specifikus antitestet tartalmazó pufferrel, majd a mosást követően egy lépésben felvittem a mintát és az alkalikus foszfatáz-antitest konjugátumot. A minták aszúsodott porított szőlőbogyók voltak 20X-os mintafellevő pufferben felhígítva. Az egy éjszakás $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os inkubálást követő enzimatiszus lépéshez Loewblue A és B szubsztrátot adtam a tálcához 1:1 arányban és 30 percig $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam. A színreakciót 600 nm-es hullámhosszon detektáltam Labsystems Multiscan MS v 4.0 spektrofotométeres tálcaleolvasóval.

A gomba biomassza mennyiségi meghatározásához szükség volt a kalibrációs görbe felvételére. Minimál tápoldaton (Gamborg B5 [Dushefa], 2% Glükóz [Reanal]) 48 óra alatt felnövesztettem a *B. cinerea* gombát, majd vákuum szűrtem, hogy minél sűrűbb gomba pelletet kapjak. A pelletet folyékony nitrogénnel lefagyasztottam és golyósmalommal őrltem. Az örleményből mintafellevő puffer segítségével öt pontos hígítási sort (koncentrációnként három

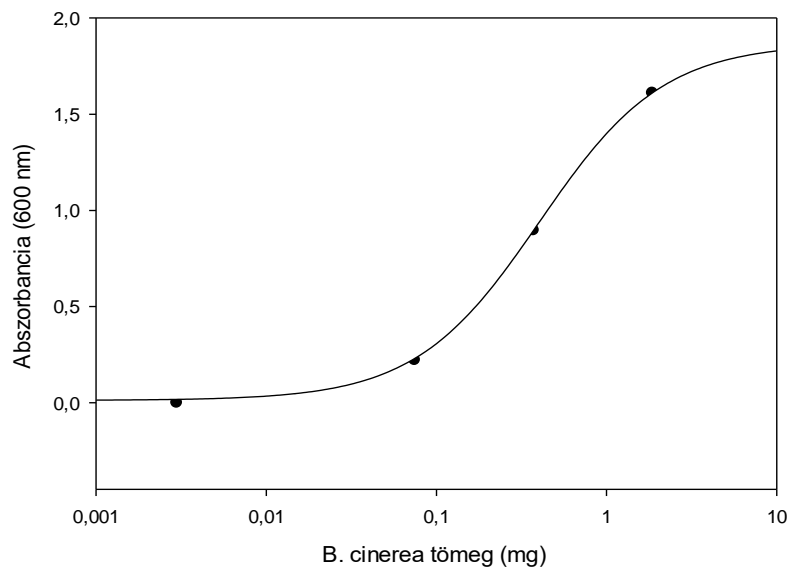
ismétlésben) készítettem. A kalibráló pontokra négy paraméteres logisztikus görbét illesztettem Sigmaplot v12.0 segítségével (4. ábra).

Négy paraméteres logisztikus görbe egyenlete:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + (x/c)^b}$$

Paraméterek:

a=1,94
b=-1,16
c=0,45
d=0,03



4. ábra A *B. cinerea* ELISA gomba biomassza kalibrációs görbe meghatározása négy paraméteres logisztikus függvény alapján ($R^2=0,999$).

5.4. Szárazanyag tartalom meghatározás

A szőlőbogyók szárazanyagtartalmának meghatározása során a korábban leörölt bogyókat használtam. Mintánként hozzávetőleg 1 g örleményt alumínium fóliából kialakított tartókba mértem analitikai mérleg segítségével, majd szárítószekrényben 105 °C-on 1 órán át hevítettem. Az alumíniumtartókban visszamaradt szárazanyagot ezt követően visszamértem. Meghatározásra került az éretlen, I., II., III. és IV. aszúsodott fázisú bogyók szárazanyagtartalma, fázisonként 3-3 párhuzamosban.

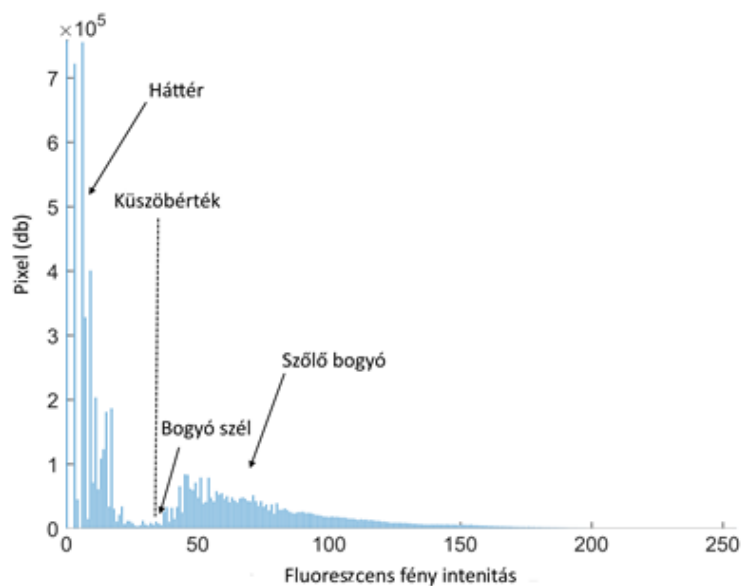
5.5. Szemi-automatizált élősövet meghatározás a szőlőbogyóban

A szőlőbogyó morfológiai paramétereinek és az élősövet meghatározásának alapjai Fuentes és munkatársai (2010) közleményén alapszanak.

A mintagyűjtés során a bogyók Brix értéke meghatározásra került. A szőlőbogyókat közvetlenül a festés előtt axiális irányban kettévágtam és a magokat eltávolítottam. Ezt követően az aszúsodási fázisnak megfelelő ozmotikus tulajdonságokkal rendelkező szacharózos oldatban (Brix értékből meghatározva) felvett Fluorescein diacetát (FDA) festéket csepegtettem a bogyó felnyitott felszínére, amíg elértem a maximum konvex

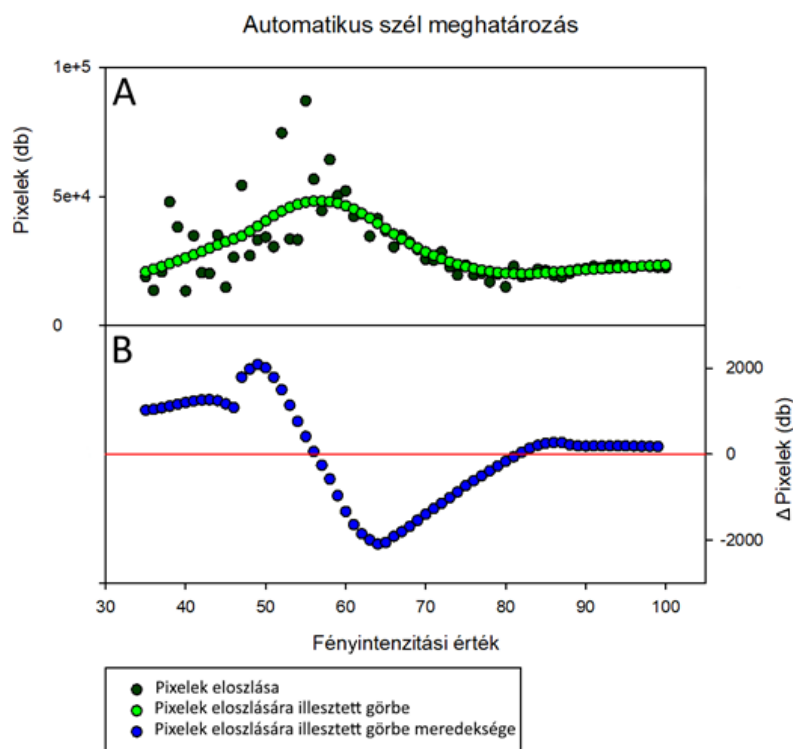
meniszkuszt. 15 percig sötétben inkubáltam, majd GFP szűrővel ellátott fluoreszcens mikroszkóp alatt full frame fényképezőgép segítségével rögzítettem a fluoreszcencia jelet. A III. és IV. aszúsodási fázis esetében szükség volt alsó megvilágítással extra képet készíteni, hogy a morfológiai méréseket el lehessen végezni.

A képfeldolgozáshoz a MATLAB szoftver képfeldolgozó egységét használtam. Első lépésben 8 bites képpé kellett konvertálnom a képet, majd intenzitás hisztogramon tudtam ábrázolni a pixelek fényesség eloszlását (5. ábra).



5. ábra A fluoreszcens kép pixeleihez tartozó intenzitás értékét tartalmazó hisztogram. Az ábra a MATLAB program segítségével készült.

A háttérrel és a szőlőbogyót reprezentáló pixel csoport között mindig tapasztalható egy árok, ami azt mutatja, hogy jól elkülönül a szőlő a háttértől. Ezt a jelszegény szakaszt felhasználva automatizálni tudtam a szőlő és a háttér közötti határ felismerését. Empirikusan meghatároztam, hogy szőlőtől származó pixelek intenzitásai 35 érték fölött helyezkednek el, ezért a 35 és 100 fényintenzitású pixelek eloszlását függvényként ábrázoltam. Az így kapott függvényt simítottam „lowess” algoritmus alapján és deriválással meghatároztam azt a fényintenzitást, ami az inflexió pont után következik, tehát a függvény derivátumának értéke negatív (6. ábra).



6. ábra A bogyó szélének szemi-automatikus meghatározása. „A” A fluoreszcens kép 35 és 100 fényintenzitás közötti pixelék eloszlása és az arra simított görbe. „B” Az A ábrán látható eloszlásgörbe meredekségének változása a fényintenzitás függvényében.

Az előszöveget mennyiségének meghatározásáa során egy empirikusan meghatározott küszöbértéknél fényesebb pixelék számát vettem figyelembe. Az empirikus küszöbérték meghatározása során a véletlenszerűen kiválasztott kísérleti képek intenzitás hisztogramját vizsgáltam meg. Ezt a küszöbértéket használtam az analízis során minden fázisra az előszöveget vizsgálat során. A pixelék számszerűsítéséhez szükség volt a kép binarizálására, ahol a küszöbérték feletti pixelék a mátrixban „1” míg az alattiak „0” értéket vettek fel.

A morfológiai paraméterek meghatározásához először ki kellett jelölnöm a szőlő peremkerületét, amelyhez az 'edge' függvény 'sobel' módszert használtam kiegészítve az empirikusan meghatározott küszöbértékkal. Ezt a küszöbértéket különböző aszúsodási fázisokban lévő bogyókról készült képek esetén módosítani kellett, hogy az él detektálás pontos legyen. A határ kijelölését követően a körülzárt területet kitöltöttem, amivel megkaptam a bogyó területét, maximális és minimális átmérőjét. A kerület pontos meghatározásához szükség volt a kijelölt bogyóterület szélének az élsimítására, amit a kép kismértékű homályosításával oldottam meg. Az itt használt szűrő paraméterei 'disc', '25' volt, amelyet a képre alkalmazva megfelelő élsimítást kaptam.

5.6. Totál RNS kivonás szőlő bogyóból

Az aszúbogyókból történő totál RNS kivonás technikájának alapja Reid *et al.* (2006) munkája volt. Fontos szerepet játszott az RNS kivonás sikerében a megfelelő kiindulási mennyiség optimalizálása, mert az aszúsodás során nem csak beltartalmi értékek változnak, hanem drasztikus vízvesztés is történik. Ezek függvényében a kiindulási anyag a különböző aszúsodási fázisú mintáknál eltérő volt az RNS kivonás során (4. táblázat).

4. táblázat Totál RNS kivonás során bemért kiindulási szőlőbogyó örlemény.

Aszúsodási fázis	Bemérési tömeg
I.	~ 800mg
II.	~ 800mg
III.	~ 500mg
IV.	~ 250mg

1. Az elporított mintát 50 ml-es centrifugacsőbe bemértem és 20 ml kivonó puffert adtam hozzá majd 10 percre 65 °C vízfürdőben inkubáltam és 2 percenként összeráztam.
2. Ezt követően azonos térfogatú kloroform-izoamil alkoholt (24:1) adtam hozzá, alaposan összeráztam és 10 percre 4 °C-on centrifugáltam 4800 x g-n.
3. A felülúszót új csőbe pipettáztam át és megismételtem a 2. pontot.
4. 10 ml felülúszót pipettáztam egy új 50 ml-es centrifugacsőbe és 0,1 térfogatnyi 3M nátrium-acetát puffert (pH 5,2) és 0,6 térfogatnyi jéghideg izopropanolt adtam hozzá. 30 percig -70 °C-on inkubáltam.
5. Ezt követően 4 °C-on 30 percig centrifugáltam 4800 x g-n.
6. A felülúszót leöntöttem és 5 ml 70% etanollal mostam, majd 4 °C-on 15 percig centrifugáltam 4800 x g-n.
7. Felülúszót maradéktalanul leöntöttem és a csapadékot liofilizálóval beszárítottam.
8. A csapadékot 1 ml TE (pH= 7) pufferben felvettem és egy új 2 ml-es centrifuga csőbe pipettáztam át.
9. 300 µl 8 M LiCl oldatot adtam hozzá, és éjszakára 4°C-on inkubáltam.
10. A mintát 21.000 x g-n 30 percig 4 °C-on centrifugáltam, majd 500 µl 70%-os jéghideg etanollal mostam.
11. A felülúszót maradéktalanul leöntöttem és beszárítottam a csapadékot liofilizálóval.
12. A pelletet 42 µl nukleázmentes vízben vettem fel.

Kivonó puffer összetétele:

- 300 mM Tris HCl (pH:8,0),
- 25 mM EDTA,
- 2 M NaCl,
- 2% CTAB,
- 2% PVPP,
- 0.05% spermidin trihidroklorid,
- közvetlenül használat előtt 2% β -merkaptoetanol hozzáadása

Az RNS minőségét az RNS kivonási technika optimalizálása során NanoDrop 1000 spektrofotométeren ellenőriztem és agaróz gélelektroforézissel vizsgáltam, de a rutin kivonások során csak NanoDrop 1000 készülékkel ellenőriztem. A megfelelőnek ($>100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNS tartalom, A260/230 arány $>1,8$ és A260/280 arány $> 2,0$) talált RNS mintákat ezt követően DNA-free kit (Ambion, Thermofischer) segítségével a gyártó utasítása szerint DNáz emésztést végeztem rajtuk. RNS szekvenálás előtt a minták RIN (RNA Integrity number, RNS integritás szám) értékét Agilent Bioanalyzerrel mértük.

5.7. Totál transzkriptum szekvenálás és adatelemzés

Az RNS szekvenálás mintái két mintagyűjtésből származtak, fázisonként 5-5 mintával, tehát összesen 40 db RNS szekvenálási eredményt dolgoztam fel a disszertációmban.

A totál transzkriptum szekvenálását és a nyersadatokat feldolgozását az UDGenoMed Kft. végezte.

A totál RNS minőségi ellenőrzése Agilent BioAnalyzer Eukarióta Totál RNA Nano és Pico kit segítségével történt a gyártó utasításai szerint. Az RNS szekvenálási könyvtárhoz használt minták 7-nél magasabb RIN értékkel rendelkeztek. Az RNS szekvenálási könyvtár a TruSeq RNA Sample preparation kittel (Illumina) lett elkészítve a gyártó utasításai szerint. A szekvenálást NextSeq500 készüléken (Illumina) végezték, egyszálú, egyirányú, 75 nukleotid hosszú leolvasási módban. Átlagosan 18-20 millió szekvenált leolvasás történt mintánként.

A szekvenálás minőségellenőrzése FastQC v 0.11.7 szoftver segítségével történt. Ezt követően a STAR v2.5.4b szoftver segítségével illesztettük a leolvasott szekvenciákat külön a szőlő (*Vitis vinifera* IGGP 12x) (Jaillon *et al.* 2007) és a *Botrytis cinerea* (ASM83294v1) (Van Kan *et al.* 2017) referencia cDNS adatbázisra. Az elkészült BAM fájlokat a StrandNGS szoftver (Agilent Technologies) segítségével elemeztük tovább. Nyers expressziós adatokat kinyertük a BAM fájlokból és DESeq algoritmus alapján normalizáltuk őket. Ezt követően a kondíciók között

eltérően expresszázó gének listáját azonosítottuk Tukey post hoc és Benjamin-Hochberg hamis találati arány korrekcióval (FDR) kiegészített ANOVA teszttel.

5.8. RNS szekvenálás validálás-Real Time qPCR

A transzkriptom szekvenálás validálása során a szekvenáláshoz használt RNS mintákban megmértem Real Time qPCR technikával 5-5 *V. vinifera* és *B. cinerea* gén relatív expresszióját. A RNS-eket Thermo Scientific First Strand cDNA Synthesis Kit-tel cDNS-sé írtam át a gyártó által biztosított protokoll szerint, majd az átírt cDNS-eket 5-szörösre hígítottam nukleáz mentes vízzel. Az RT-qPCR-t C-1000 Thermal Cycler CFX96™ Real-Time PCR System (Bio-Rad) készülékben végeztem. A reakcióhoz SensiFAST SYBR® No-ROX Kit-et (Bioline) használtam a gyártó utasításai szerint. Az alkalmazott primereket és RT-qPCR paramétereiket az M. 1. táblázat tartalmazza. Minden vizsgált gén esetében mind a négy aszúsodott fázisból négy véletlenszerűen kiválasztott mintában határoztam meg a relatív génextpressziót két technikai ismétlésben.

A validálás során mind a három aszúsodási fázisban mért génextpressziót az egyes fázisokhoz viszonyítottam – ugyanúgy, ahogy a totál RNS szekvenálás és kisRNS szekvenálás adatelemzése során is történt. A gének kiválasztása során törekedtem rá, hogy kis és nagy expressziós változású és az aszúsodási fázisok között változó vagy konstans expressziójú is legyen a vizsgált gének csoportjában.

A szőlő háztartási génei közül a *VIT_08s0007g06520* aktin gén és a *VIT_06s0004g03220* azonosítóval rendelkező elongációs-faktor-1 expresszióját határoztam meg, melyek közül az aktin bizonyult stabilabbnak (Reid *et al.* 2006). Az elongációs-faktor-1 expressziója két mintánál nem volt kimutatható. A *B. cinerea* esetében az egyik β -tubulin *Bcin01p08040* gént választottam háztartási génnek (Ren *et al.* 2017). Az expresszió meghatározásához a ddCt módszert alkalmaztam. A ddCt módszert során meghatároztam két eltérő fázisból származó cél gén és háztartási gén ciklus értékének a különbségét és ezeket arányosítottam egymáshoz.

$$\Delta\Delta Ct = 2^{[(Ct_{v,c} - Ct_{v,h}) - (Ct_{k,c} - Ct_{k,h})]}$$

ahol:

- $Ct_{v,c}$, vizsgált minta vizsgált gén Ct értéke
- $Ct_{v,h}$ vizsgált minta háztartási gén Ct értéke
- $Ct_{k,c}$ kontroll minta vizsgált gén Ct értéke
- $Ct_{k,h}$ kontroll minta háztartási gén Ct értéke

5.9. Főkomponens elemzés

A főkomponens-analízis egy többváltozós statisztikai eljárás, mely az adatredukciós módszerek közé sorolható. Az eljárás során a nagy variabilitással rendelkező adatsort transzformáljuk kisebb, kettő vagy három ortogonális főkomponensre. A technika nagy előnye, hogy előzetes becslést nyújt az adathalmazok hasonlóságára, illetve segítségével könnyen azonosíthatóak a kiugró minták. A vizsgálat során két komponensre bontottam az adatokat. Az első főkomponens tengelyén a legnagyobb variabilitást mutatja a minta, a második főkomponens tengelyén a második legjelentősebb változás irányát mutatja. A vizsgálathoz az IBM SPSS Statistics 23 programot használtam.

5.10. GO kifejezés dúsulási teszt (overrepresentation test)

A GO kifejezések olyan génekhez rendelt azonosítók, melyek az adott gén termékét biológiai-, molekuláris folyamatokban vagy lokalizációjáról adnak információt. A GO ontológia gráf szerkezetű, ahol a GO kifejezések a csomópontok, az élek pedig a GO azonosítók közötti kapcsolatot reprezentálják.

A GO kifejezések feldúsulásának vizsgálatát a Cytoscape Bingo v3.0.3. szoftver segítségével végeztem. Az annotálási fájl (GO.obo) a Gén Ontológiai Konzorcium (Gene Ontology Consortium) hivatalos honlapjáról (<http://geneontology.org/>) származott. A gének GO annotálási könyvtárát az Ensembl-Biomart és KEGG szerver segítségével készítettem el a *V. vinifera* és *B. cinerea* összes cDNS-re. A Furmint minták dúsulási tesztje során háttérnek a szekvenálási eredményben változott génekből készült gén halmazt használtam. A teszt során hipergeometrikus statisztikát alkalmaztam és Benjamini & Hochberg hamis találati aránnyal ($p < 0,01$, False Discovery Rate, FDR) korrigáltam az eredményt. Az eredmények fejezetben azokat a GO folyamatokat mutatom be, melyek a hipergeometrikus tesztnek és a FDR-nek is megfelelnek és az adott folyamatot az elérhető adatokkal nem lehet tovább pontosítani.

A hipergeometrikus teszt során a program összeveti, az eltérően expresszáldó gének listáját az adatbázisban lévő, nem eltérően expresszáldó gének listájával, hogy az adott GO kifejezésnél milyen eloszlásban van egy adott gén. A vizsgálat során Fisher-féle egzakt próbával vizsgáljuk minden szóba jövő GO kifejezésre a szignifikancia mértékét.

A Fisher-próba működési elve:

A Fisher-féle egzakt-teszt egy nem paraméteres próba, amit a kontingenciatáblázat elemzésére használunk (Agresti 1992). Közvetlenül számolja a mért gyakoriságok alapján az aránytalanság mértékét, a tapasztaltnál extrémebb értékek bekövetkezésének valószínűségét H_0 igaz volta esetén (H_0 : A sorok és oszlopok függetlenek). A számítás során, rögzített marginálisok, és

függetlenséget feltételező H_0 esetén, a tapasztaltnál szélsőségesebb elemek elméleti valószínűségeit összeadjuk, a hipergeometrikus eloszlás minden további tagjára.

Esetünkben a következő kontingenciatáblázat alapján történik a vizsgálat:

5. táblázat Dúsulási teszt során alkalmazott Fisher-féle egzakt-teszt általános kontingencia táblázata.

	∈ GO kategóriának	∉ GO kategóriának	Összesen
Eltérően expresszáldó gének	A	B	A+B
Azonosan expresszáldó gének	C	D	C+D
Összesen	A+C	B+D	A+B+C+D

Amennyiben szignifikánsan több az eltérően expresszáldó gén az adott GO kategóriában, akkor dúsulásról vagy hiányról beszélünk, attól függően, hogy indukált vagy represszált gének listáját használjuk fel az analízishez.

5.11. Kis RNS dúsított RNS kivonás szőlőbogyóból

A szőlőbogyóból történő megfelelően tiszta kis RNS izolálásához nem volt megfelelő a totál RNS kivonáshoz használt módszer, ezért egy másik módszert adaptáltam, ahol a kis molekulású RNS frakciót is megfelelő tisztasággal tudtam kivonni (Carra *et al.* 2007).

A totál RNS kivonáshoz hasonlóan, ebben az esetben is aszúsodási fázistól függően eltérő mennyiségű mintából volt szükséges kiindulnom (6. táblázat).

6. táblázat Kis RNS kivonás során bemért kiindulási szőlőbogyó örlemény.

Aszúsodási fázis	Bemérési tömeg
I.	~ 2000 mg
II.	~ 1800 mg
III.	~ 1000 mg
IV.	~ 800 mg

1. Az elporított mintát 50 ml-es centrifugacsőbe bemértem és 12,5 ml kivonó puffert (totál RNS kivonáshoz is használt kivonó puffer) adtam hozzá majd 10 percre 65 °C vízfürdőben inkubáltam és 2 percenként összeráztam.
2. Ezt követően azonos térfogatú kloroform: izoamil-alkoholt (24:1) adtam hozzá, alaposan összeráztam és 10 percig 4 °C-on centrifugáltam 4800 x g-n.
3. A felüliszót új csőbe pipettáztam át és megismételtem a 2. pontot.
4. 10 ml felüliszót átpipettáztam egy új 50 ml-es centrifugacsőbe és 10 ml jéghideg izopropanolt adtam hozzá. 15 percig - 20 °C-on majd 45 percig 4 °C-on inkubáltam.
5. Ezt követően 4 °C-on centrifugáltam 4800 x g-n 30 percig.

6. A felúszót leöntöttem és 2 ml 80% etanollal mostam. 4 °C-on 15 percig centrifugáltam 4800 x g-n.
7. Felülúszót maradéktalanul leöntöttem és a csapadékot liofilizálóval beszárítottam.
8. 700 µL milliQ vízben felvettem és egy új 2 ml-es centrifuga csőbe pipettáztam át.
9. Egyenlő mennyiségű fenol-kloroformot (5:1, pH = 5,2) adtam hozzá majd vortexeltem. 15 percig centrifugáltam 20.000 x g-n. Centrifugálást követően azonnal átpipettáztam a tiszta felülúszót, ügyelve, hogy a fehér szuszpenziós fázis érintetlen maradjon.
10. A 9. lépést megismételtem.
11. A 10. lépésből átszívott felülúszót 500 µl-re kiegészítettem milliQ vízzel és hozzáadtam 50 µl 5M NaCl oldatot majd 550 µl kloroform:izoamil-alkoholt (24:1). 4 °C-on 10 percig centrifugáltam 20.000 x g-n.
12. A felülúszót új csőbe átpipettáztam és 65 °C-os vízfürdőben 5 percig inkubáltam. Hozzáadtam egyenlő mennyiségű 15 %-os PEG oldatot, 15 percig -20 °C-on, majd 4 °C-on 45 percig inkubáltam. Eztután 4 °C-on 15 percig centrifugáltam 16.000 x g-n.
13. A felülúszót új 2 ml-es centrifugacsőbe szívtam át és egyenlő mennyiségű izopropanolt adtam hozzá. Egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltam.
14. Másnap 4 °C-os centrifugában 30 percen át 21.000 x g-n centrifugáltam, majd óvatosan leszívtam a felülúszót. 5 ml 80% jéghideg etanollal mostam és újra 30 percig centrifugáltam 21.000 x g-n.
15. A felülúszót maradéktalanul eltávolítottam és liofilizálóval beszárítottam.
16. 23 µl milliQ vízben visszaoldottam az RNS-t és -80 °C-on tároltam.

Az RNS minőségét 7 M ureát tartalmazó 19:1 poliakrilamid gélen és Agilent Bioanalyzerrel ellenőriztem. A poliakrilamid gélen futtattam a kis (LMWR) és a nagy (HMWR) molekulású RNS frakciót, továbbá Zymo Small RNA ladder létrát használtam markerként. Az RNS mintákat gélbe töltés előtt 2X RNA loading dye-al (Thermo Fisher Scientific) kezeltem a gyártó utasításai szerint, hogy az RNS másodlagos szerkezetét felbontsam. A minták felvitele előtt 20 percig üresen futtattam a gél 0,5 TBE pufferben 6 V/cm térerősséggel. Ezt követően a HMWR-ből 2 µg, LMWR-ből 1 µg RNS-t vittem a zsebekbe és ugyanúgy 6 V/cm térerősséggel végeztem az elektroforézist, amíg a brómfenolkék festék el nem érte a gél alját. Ezt követően 20 percig enyhe rázatás közben áztattam 0,5 µg/ml etídium-bromid oldatban, majd 300 nm hullámhosszú fényel megvilágítva lefényképeztem a gél.

5.12. Kis RNS szekvenálás és adatelemzés

A totál transzkriptum szekvenálását és a nyersadatok feldolgozását az UDGenoMed Kft. végezte.

Kis RNS szekvenálási könyvtár a NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England BioLabs) segítségével készült a gyártói utasítások szerint. Minden könyvtár 1 µg kis RNS dúsított mintából készült. 3' és 5' adaptor ligálását követően egy szálú cDNS készült belőle majd indexált adapterek segítségével PCR-el felszaporították. Tisztítás céljából 6% Novex TBE PAGE gélen megfuttatták a PCR terméket. A kis RNS régió kivágása és tisztítása után a nukleinsav molekulaméret eloszlását Agilent BioAnalyzer DNA1000 chip (Agilent Technologies) segítségével ellenőrizték. A szekvenálás Illumina NextSeq500 készüléken történt a teljes transzkriptóma szekvenálásához hasonlóan.

A szekvenálás során képződött leolvasott szekvenciák minőségi ellenőrzés és adapter régiók levágása után a *V. vinifera* referencia genomra (GCF_00003745.3 12x) lettek illesztve. A *V. vinifera* miRNS lókusza elérhetőek a miRBase adatbázisban. Minden minta esetében meghatároztuk az ezekre a lókuszosokra illeszkedő leolvasott szekvenciák mennyiségét. A lókuszfedettségi adatokat GeneSpring programba importálva normalizáltuk az expressziós értékeket. Ezt követően a kezelésekek között eltérően expresszálódó miRNS-ek listáját azonosítottuk Tukey post hoc és Benjamin-Hochberg hamis találati arány korrekcióval (FDR) kiegészített ANOVA teszttel.

A növényi miRNS-ek célpontját a PSRNATarget online szerver segítségével prediktáltam (Dai *et al.* 2018).

5.13. Tenyészet fenntartás

A *B. cinerea* b05.10 törzset laboratóriumban mesterséges táptalajon tartottam fenn és indukáltunk spóráképzést. ½ maltóz agaron (1,5 m/m% maláta kivonat, 1,5 m/m% agar) tenyésztettem szobahőmérsékleten 5 napig sötétben, majd 5 napig UV fénycső alatt 21°C-on.

5.14. Fertőzés *B. cinerea*-val

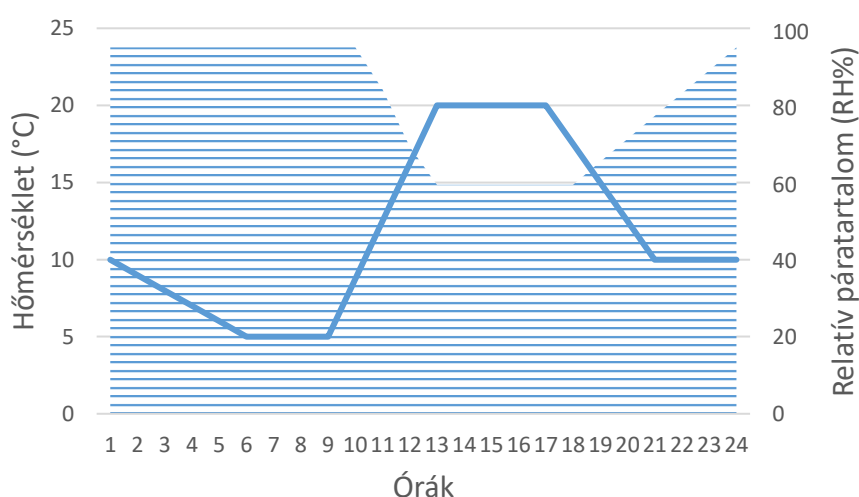
A konídumokat a táptalajról „fertőző médiummal” lemostam (Gamborg B5 médium [Dushefa], 2% glükóz [Reanal]), gézlapon átszűrtem és bürker kamrával meghatároztam a spóraszámot. Ezt követően fertőző médiummal beállítottam a 10⁵ konídium/ml koncentrációt és szórófejes flaska segítségével egyenletesen lepermeteztem a fűtöket minden oldalról. A fertőzés minden esetben délután történt, hogy igazodjunk a *B. cinerea* cirkadián ciklusa által biztosított fokozottabb virulencia időpontjához (Hevia *et al.* 2015).

5.15. Aszúsodás és szürkerothadás modellezése

Az ép furmint szőlőfürtöket a Szepsy birtok Betsek dűlőjében gyűjtöttem 2018.10.10-én. A 2018-as ősszel jelentős aszály súlytotta Magyarországot, ami kedvezőtlenül befolyásolta az aszúsodás folyamatát. Az aszúsodás és szürkerothadás modellezéséhez ezért szükséges volt a szőlőfürtök *B. cinerea* konídiummal való kezelése az aszúsodás modellezése előtt. A kezelés során a fürtöket 10^5 *B. cinerea* konídium/ml koncentrációjú szuszpenzióval permeteztem le, majd 24 órán keresztül benedvesített zárt dobozban tároltam őket 21 °C-on.

Az optimális aszúsodási hőmérséklet és páratartalom profil meghatározását meteorológiai adatbázis segítségével határoztam meg (www.amsz.hu). Az adatbázisból kigyűjtöttem az aszúsodás szempontjából kiváló évjáratnak minősülő 2017-es év szeptember, október és november hónapok hőmérséklet és páratartalom adatait Tállya településről (Mádról nincs elérhető meteorológiai adatbázis erről az időszakról). Az összegyűjtött adatokból készítettem el a modellezés során alkalmazott hőmérséklet és páratartalom programot.

Az előkezelést követően Conviron klímakamrában inkubáltam a levágott fürtöket nyitott műanyag ládában a következő paraméterek szerint: 8-tól 12 óráig a hőmérséklet 5 °C -ról 20 °C-ra emelkedett és a relatív páratartalom (RH%) 96-ról 60-ra csökkent. Öt órán keresztül stabilan maradtak a környezeti paraméterek, majd 17-től 20 óráig 20 °C-ról 10 °C-ra csökkent a hőmérséklet, a relatív páratartalom pedig éjfélig 60%-ról 96%-ra nőtt a kamrában. Hajnali 5 órára a hőmérsékletet 5 °C-ra csökkent, 96% relatív páratartalom mellett (7. ábra). A szürke rothadt minták ugyanebben a kamrában voltak elhelyezve, de zárt műanyag dobozban, amiben közelítőleg 100% RH tudtam biztosítani. Az aszúsodott és szürkerothadt szőlőfürtökből egy hét elteltével vettem illatanyag mintákat.



7. ábra A klímakamrában beállított hőmérséklet és relatív páratartalom (RH%) paraméterek változásának programja.

5.16. Illatanyag gyűjtés az aszúsodott és szürkerothadt szőlőfürtökről

Az illatanyag gyűjtés során 1-2 szőlőfürtöt helyeztem inert sűrűzacskóba 4 órás dinamikus illatanyag gyűjtésre. A dinamikus illatanyaggyűjtés során a környezetből beszívott, aktívszénrel szűrt levegőt áramoltatunk keresztül a vizsgálandó minta körül, ami magával viszi az illó komponenseket az áramlás irányába. Nagy adszorpciós képességgel rendelkező anyaggal megköthetőek az illóanyagok, miközben a levegő kiáramlik a rendszerből (Vuts *et al.* 2018).

Az illatanyagokat 5 mg aktív szén (Brechtbühler AG, Schlieren, Svájc) segítségével csapdáztam. Az adszorbált illatanyagokat 150 µl diklórmétánnal mostam le, majd 300 ng (Z)-13-oktadekanal-t adtam minden mintához belső standardként.

Az illatanyagokat GC-MS (HP Agilent 5890 GC and 5975 MS, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) technikával Vf-WAXms szilika kapillárison (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm J&W Scientific, Folsom, CA, USA) analizáltam. Splitless üzemmódban minden mintából 3 µl-t injektáltam. A kolonna hőmérsékletét kezdetben 2 percig 50 °C-on tartottam, majd 8 °C min⁻¹ hőmérséklet emelkedéssel 240 °C-ra hevítettem, ahol további 10 percig tartottam a hőmérsékletet. Az ionizáló feszültség 70eV, a szkennelési tartomány m/z 29-300 volt, vivőgáz (hélium) áramlási sebessége 1.0 ml/perc volt. A komponensek azonosítása MassHunterrel (B.8.00) történt NIST 17 és Wiley MS könyvtárak alapján. A komponensek igazolása Kováts index (KI) segítségével vagy szintetikus standarddal történt.

Minden mintában normalizáltam az azonosított csúcsok csúcsalatti területét a belső standard területének ismeretében. A kapott eredmények logaritmusát vettem és csúcsenként minden mintára Kolmogorov-Smirnov tesztet végeztem ($P > 0,05$). Ezt követően homogenitás tesztet (Levene teszt, $p > 0,05$) és egy szempontos ANOVA tesztet hajtottam végre.

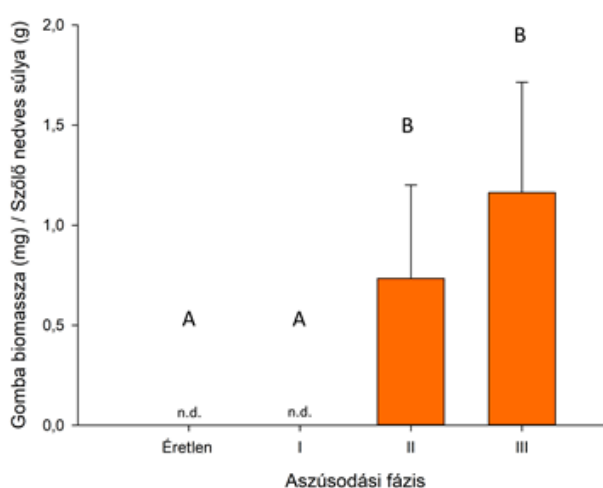
6. Eredmények

6.1. *B. cinerea* gomba biomassájának mennyisége a szőlőmintákban

A 2016-ban gyűjtött, majd leőrölt aszúsodott szőlőbogyó mintákban meghatároztam a *B. cinerea* gomba biomassza mennyiségét specifikus ELISA teszttel. Két mintagyűjtési időpontban hasonlítottam össze a négy aszúsodási fázisban gyűjtött mintákat. Mindkét időpontból aszúsodási fázisonként négy biológiai mintából készítettem két-két technikai ismétlésben a kimutatást. Minden biológiai minta 5-8 aszúbogyóból állt.

A különböző mintagyűjtésből származó azonos fázisba tartozó minták között nem tapasztaltam szignifikáns eltérés, ezért az azonos fázisba tartozó mintákat együtt kezeltem. A IV. fázisú minták – feltételezhetően nem várt keresztreakció miatt – a kojugátum hozzáadását követően azonnal sötétkékre változtak, ezért ezeket a mintákat a továbbiakban nem értékeltem .

Éretlen mintát csak az első mintagyűjtésből tudtunk gyűjteni. A mérés eredménye szerint az éretlen bogyókban és az I. fázisban nem detektálható *B. cinerea* gomba a fűrtökben. A II. és III. fázisban mért gombabiomassza eredmények szerint a gomba mennyisége nem növekszik szignifikánsan tovább az aszúsodás későbbi szakaszában (8. ábra). Az ábrázolás során nedves súlyra vonatkoztatott értékeket adtam meg, mert a szárazanyag meghatározás során az éretlen továbbá az I., II. és III fázisba tartozó bogyók szárazanyag tartalma nem különbözik sziginifikánsan (M. 2. táblázat).

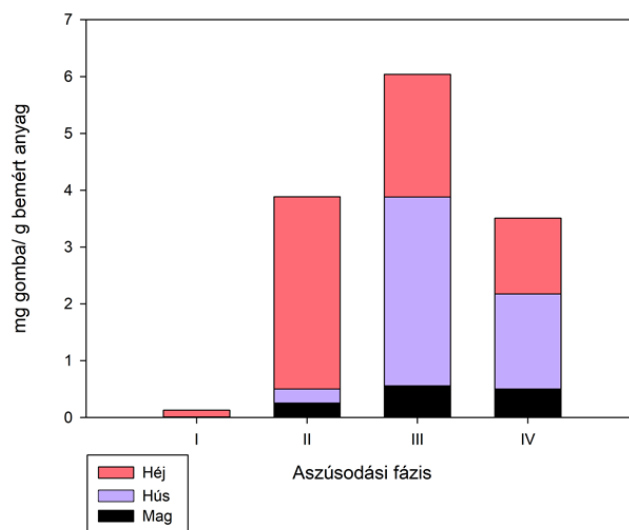


8. ábra ELISA technikával meghatározott *B. cinerea* gombabiomassza mennyiségek a 2016-ban gyűjtött aszúsodott szőlőbogyókban. n.d.: nem detektálható.

Az eredményeket Kruskal-Wallis nem parametrikus teszttel hasonlítottam össze 0,05 szignifikancia szint mellett.

6.2. Gombaképletek eloszlása a szőlőbogyóban

A 2017-es mintagyűjtés alkalmával a szőlőbogyó szöveteiben külön-külön vizsgáltam a *B. cinerea* eloszlását az aszúsodás során. A szövetenkénti vizsgálat érzékenyítette ezt a *B. cinerea* meghatározási technikát, mert szövetenként fajlagosan nagyobb mennyiségű mintából tudtam kiindulni. Aszúsodási fázisonként három biológiai mintából készítettem két-két technikai ismétlésben a kimutatást. Minden biológiai minta 10 db aszúbogyó különböző szöveteiből állt. Az I. fázisban kizárólag a bogyó héján és csak egyetlen esetben volt kimutatható a *B. cinerea* jelenléte. A második fázisban a héjon nagy mennyiségben jelent meg, néhány esetben a húspan is. A harmadik fázisban a gomba a bogyó belsejébe hatolt, ezért a héj mellett a húspan is kimutatható volt nagy mennyiségben (9. ábra). Néhány esetben a magból készült őrleményben is találtam gomba biomasszát. A negyedik fázisban az összes biomassza mennyiség csökken a harmadik fázishoz képest, de a csökkenés mértéke csak a héj mintákban volt szignifikáns (7. táblázat)



9. ábra ELISA technikával meghatározott *B. cinerea* biomassza mennyiségek a 2017-ben gyűjtött minták esetében.

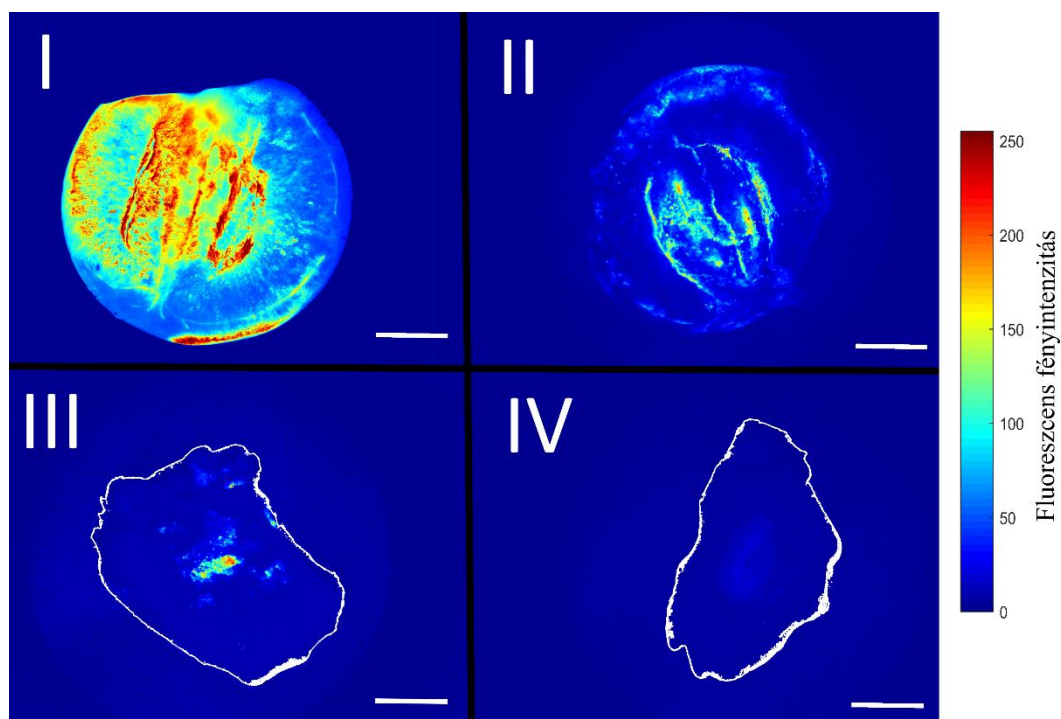
A szőlőbogyó különböző szöveteiben mért *B. cinerea* gomba biomassza eredményeket – az aszúsodási fázisok tekintetében – külön hasonlítottam össze. A szignifikanciateszthez Kruskal-Wallis nem parametrikus próbát használtam 0,05 szignifikancia szint mellett (7. táblázat).

7. táblázat A *B. cinerea* biomassza eloszlásnak statisztikai elemzése a bogyó szöveteiben ($P < 0,05$).

Aszúsodott fázis	Szignifikancia csoportok		
	Héj	Hús	Mag
I.	A	a	α
II.	B	a	α
III.	B	b	α
IV.	A	b	α

6.3. Szőlőbogyó élőszövet vizsgálat

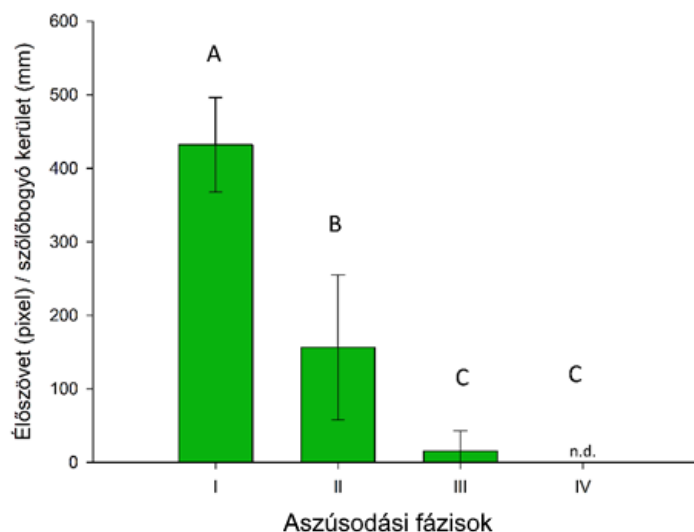
A 2017-es mintákból meghatároztam, hogy az aszúsodás során mekkora a bogyók élőszövet aránya az egyes aszúsodási fázisokban. A vizsgálat során az FDA festék bekerül a sejtekbe, ahol észterázok hatására fluorofor vegyületté alakul át. A fluoreszcenciát fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltam és Matlab program segítségével analizáltam a képeket.



10. ábra Négy aszúsodási fázisban lévő félbevágott, FDA-val festett szőlőbogyó fluoreszcencia intenzitás ábrája. Mércse = 5 mm.

Az intenzitás ábrákon jól elkülöníthető a háttér és az élőszövetet festő FDA festék fluoreszcens jele (10. ábra). Az első fázisban szinte még az egész bogyó világít, de a kettes illetve a hármas aszúsodási fázisban drasztikus csökkenés tapasztalható. A négyes fázisban egy esetben sem tapasztaltam fluoreszcenciát.

Az eltérő bogyó méretek miatt szükség volt az adatok normalizálására. Az aszúsodás során a bogyó erősen töpped a vízvesztés és a lágyulás miatt, így a félbevágott bogyó felülete egyre kisebb. A kisebb felülethez viszont konstans kerület tartozik, mert a bogyó héj mérete nem változik. Az adatfeldolgozás során ezért meghatároztam minden bogyó héjának a kerületét és ezzel a paraméterrel normalizáltam az adott bogyóhoz tartozó össz fluoreszcens jelet (11. ábra).



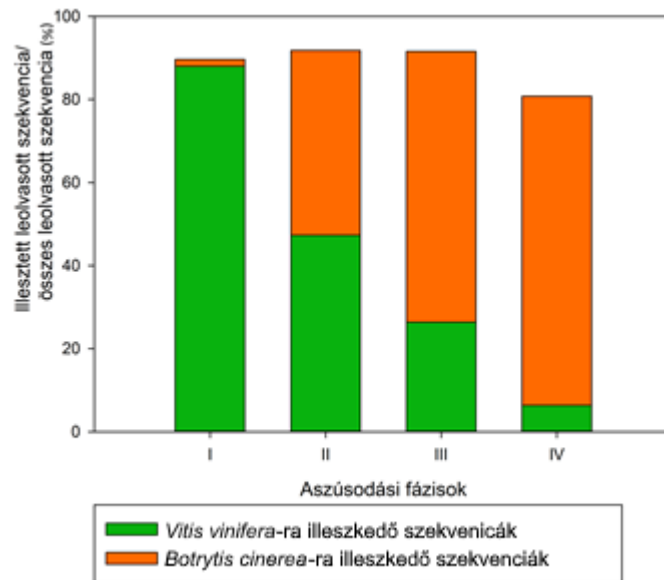
11. ábra A szőlőbogyók élőszövet tartalma a különböző aszúsodási fázisokban ($p < 0,05$).
n.d.: nem detektálható.

A második fázisban mért normalizált élőszövet mennyisége 36%-a az elsőben mértnek, a harmadikban pedig mindössze 4%-a. A négyes fázisban, ami már kész aszúbogyót jelent, fluoreszcens jel nem volt detektálható.

6.4. RNS szekvenálás eredmények

A totál RNS szekvenálása során a leolvasott szekvenciákat minőségi ellenőrzést követően az *V. vinifera* és *B. cinerea* referencia cDNS adatbázisra illesztettük. Az illesztés paramétereiből adódóan a leolvasott szekvenciák szinte kizárólag csak a neki megfelelő genomra illeszkednek (12. ábra).

Az RNS szekvenálás során képződött szekvenciák a különböző aszúsodási fázisokban eltérő arányban illeszkedtek a referencia cDNS adatbázisra. Az I. fázisból nyert szekvenciák 90%-ban illeszkedtek a szőlő referencia cDNS adatbázisra, míg a gomba transzkriptumokra a szekvenciák csak alig több mint egy százaléka. A kettes fázisban a szekvenciák fele-fele arányban illeszkedtek a gomba és a szőlő referencia cDNS adatbázisra, ami arra utal, hogy a szőlő sejtjei nagy mennyiségben pusztultak el, mert a gomba biomassza a kettes fázisban a szőlő kiindulási tömegéhez képest nagyságrenddel kisebb. A hármas fázisban tovább nő a gomba referencia cDNS adatbázisra illeszkedett szekvenciák aránya. A négyes fázisban a szőlő referencia cDNS adatbázisra illeszkedett szekvenciák aránya mindössze öt százaléka az összes szekvenciának.

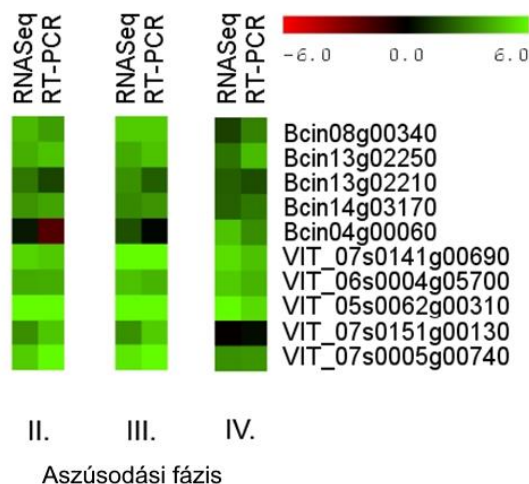


12. ábra A totál RNS szekvenálás során leolvasott szekvenciák illesztése a *V. vinifera* vagy a *B. cinerea* referencia cDNS adatbázisra az összes leolvasott szekvencia tükrében.

6.5. RNS szekvenálási eredmények validálása

A totál transzkriptóma szekvenálás nyersadataiból többlépcsős szekvencia illesztés, normalizálás és statisztikai próbák után nyerjük az expressziós adatokat. Ezeknek a származtatott eredményeknek a valóságát úgy igazoltam, hogy a szekvenáláskor használt RNS mintákban megmértem Real Time q-PCR technikával 5-5 *V. vinifera* és *B. cinerea* gén relatív expresszióját. Az expressziós értéket minden esetben az I. aszúsodási fázisban mért expressziós értékekhez hasonlítottam. A kapott eredményeket pedig összehasonlítottam az RNS szekvenálás eredményeivel. A két technikával kapott génexpressziós változás irányának meg kell egyeznie és hasonló nagyságrendbe kell esnie ahhoz, hogy elfogadjuk a szekvenálás eredményeit.

Az összehasonlítást a 13. ábrán mutatom be, ahol a kiválasztott gének relatív expresszióját (RT-qPCR) és RNASeq expressziós adatait ábrázoltam a különböző aszúsodási fázisokban. Legjobban a kettes fázisban korrelálnak az eredmények (korrelációs együttható: 0,93), de a hármas (0,90) és négyes (0,83) fázisban is erős egyezés tapasztalható a két technikával mért eredmények között (M. 3. táblázat). Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a transzkriptom vizsgálat eredményei megbízhatóak.

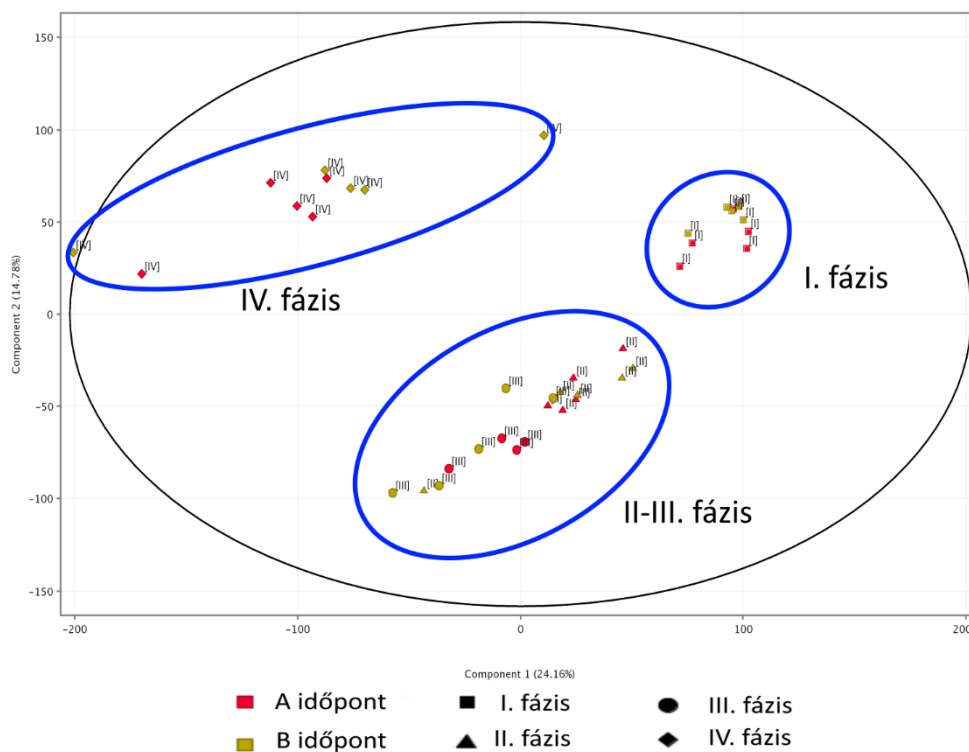


13. ábra Az RNS szekvenálással és RT-qPCR technikával kapott *V. vinifera* és *B. cinerea* relatív génexpressziós eredmények összehasonlítása. A II., III. és IV. aszúsodási fázisban kapott expressziós értékek az I. fázishoz voltak viszonyítva.

6.5.1. *V. vinifera* transzkriptom szekvenálás eredményei

A szőlő és gomba transzkripciósi adatait egymástól különválasztva funkcionális elemzés alá vettem. Az aszúsodott szőlőbogyók RNS szekvenálási eredményein először főkomponens analízist végeztem (14. ábra). A főkomponens analízis eredménye szerint az azonos aszúsodási fázisban lévő szőlő minták hasonló transzkripciósi mintázatot mutatnak, mert együtt klasztereződnek. A különböző mintaszedésből származó, azonos fázisba tartozó minták szorosan klasztereződnek, ami azt mutatja, hogy sikeres volt a párhuzamos mintavételezés.

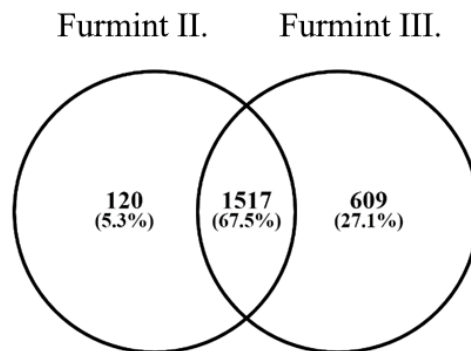
A fázisok tekintetében jól elkülönülnek az I. és IV. fázis mintái, azonban a II. és III. fázis mintái együtt klasztereződnek. A szőlőbogyó élősövet vizsgálata során világossá vált, hogy a IV. fázisú szőlőbogyó hús és héj szövetei nem tartalmaznak élő sejteket, ezért ebből a fázisból nyert szőlő szekvenálási eredmények a magban található sejteket reprezentálják. Vizsgálataim a szőlőbogyó és a gomba kölcsönhatására terjednek ki, ami a bogyó hús és héj szövetekben valósul meg. A magban történt változások nem kapcsolódnak szorosan a témához, ezért a IV. fázisból nyert eredményeket a későbbiekben szőlő adatok vonatkozásában nem használtam fel.



14. ábra A *V. vinifera* transzkriptom szekvenálás eredményeinek főkomponens analízise.

Az aszúsodás során történt génexpressziós változásokat a kontroll, vagyis érett, egészséges szőlőbogyók génexpressziós profiljához hasonlítottam. Felül- és alulszabályzott gének esetében azokat vettem számításba, melyek expressziója legalább kétszerese vagy fele volt a kontrollhoz képest, kivéve ahol jelzem az eltérést.

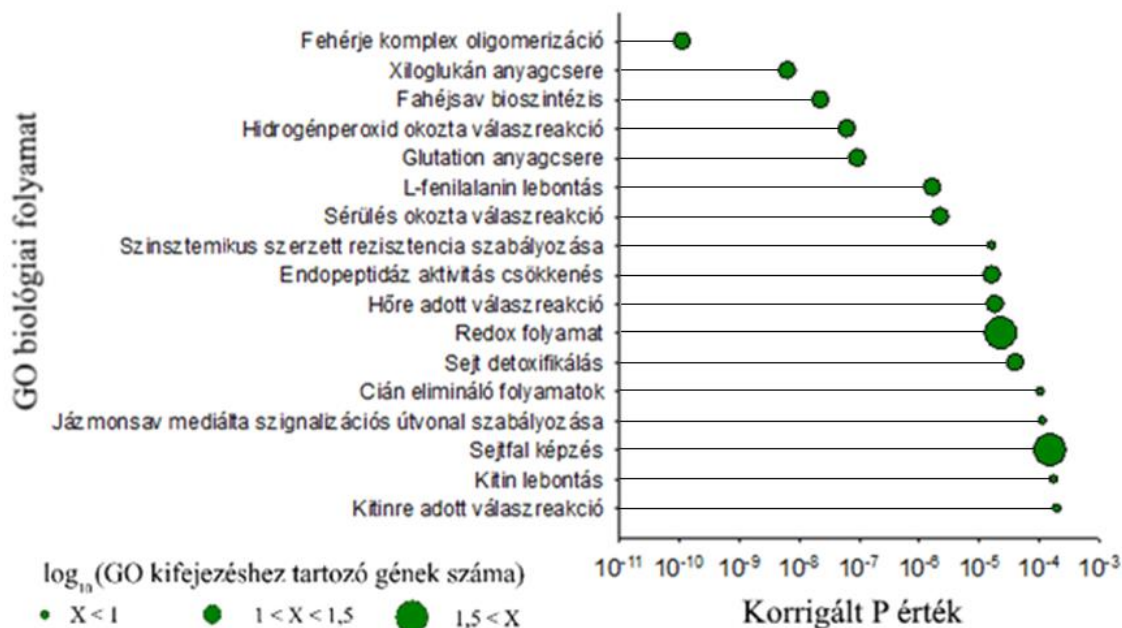
A II. aszú fázisban 1637, a III. fázisban 2126 felülszabályzott gén expressziója érte el a kétszeres küszöbértéket (15. ábra). 1517 azonos gén mindkét fázisban indukálódik, ami a II. és III. fázisban aktiválódó géneknek a 68%-a. A nagy azonosság az aktiválódó génekben azt mutatja, hogy hasonló folyamatok játszódnak le bennük. A III. fázisban még további 609 gén aktiválódik, ami arra utal, hogy további anyagcsere változások történnek a bogyókban.



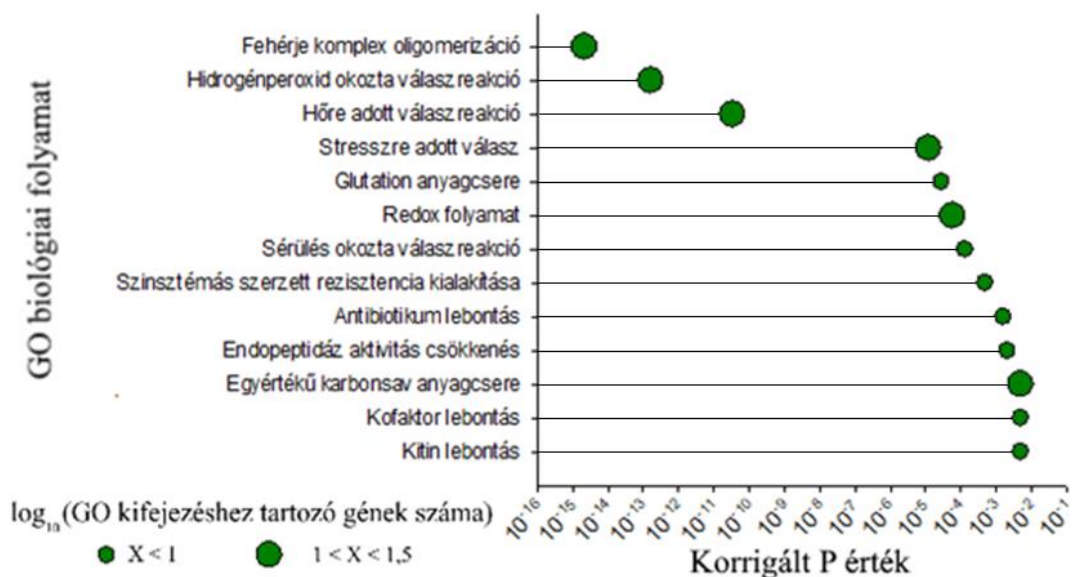
15. ábra Furmint minták II. és III. aszúsodási fázisában aktiválódó szőlő gének Venn diagramja.

6.5.2. GO kifejezés dúsulási teszt eredményei a Furmint szőlőbogyókban

A főkomponens elemzésből és az aktiválódó gének nagyfokú azonosság listájából várható volt, hogy a II. és III. aszúsodási fázisban a feldúsuló GO kifejezésekben nagy lesz az átfedés. Dúsulási teszt alapján a Furmint minták második és harmadik aszúsodási fázisában jellemzően a biotikus stresszre és a sérülésre adott válaszok dominálnak (16.-17. ábra). A második fázisban 17 folyamat, míg a harmadik fázisban 13 folyamat aktiválódott.



16. ábra A Furmint II. aszúsodási fázis GO kifejezés dúsulási teszt eredménye. X tengelyen az FDR valószínűségi (P) értékeket, az Y tengelyen a feldúsult biológiai folyamatokat tüntettem fel.



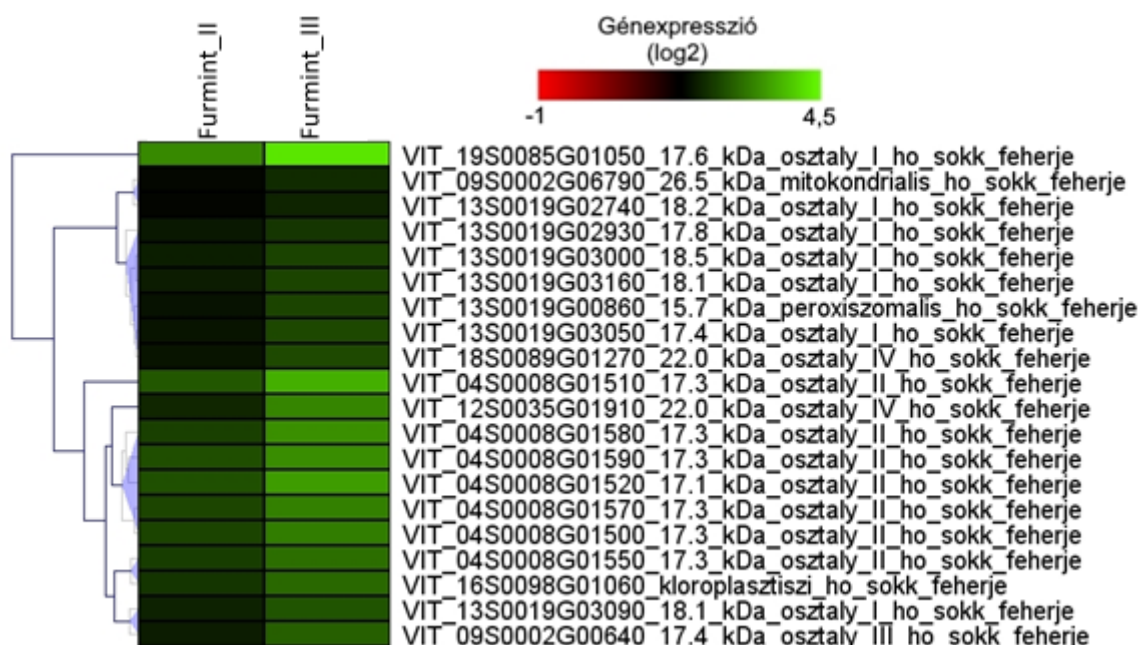
17. ábra A Furmint III. aszúsodási fázis GO kifejezés dúsulási teszt eredménye. X tengelyen az FDR valószínűségi (P) értékeket, az Y tengelyen a feldúsult biológiai folyamatokat tüntettem fel.

A GO kifejezés dúsulási teszt eredményeit a továbbiakban részletesen kifejtem: az egyes folyamathoz köthető géneknek az expressziós profilját megvizsgálva.

6.5.3. Fehérje komplex oligomerizációs folyamat

A fehérje oligomerizációs kategóriába többnyire hőszokkfehérjék tartoznak, amik a Furmint minták esetében mindkét vizsgált aszúsodási fázisban emelkedett expressziót mutattak.

Általánosságban megfigyelhető, hogy a vizsgált gének expressziója a harmadik fázisban nagyobb, vagy azonos a kettes fázisban lévőhöz viszonyítva, de represszió nem figyelhető meg az aszúsodás előrehaladtával egyik gén esetében sem. Az I. osztályba tartozó kis hőszokkfehérjék expressziója elmarad a II. és IV. csoportba tartozókéétól, kivéve a *VIT_19s0085g01050*, mely a legnagyobb aktiválódást mutatja mind a kettes mind a hármas fázisban (18. ábra).

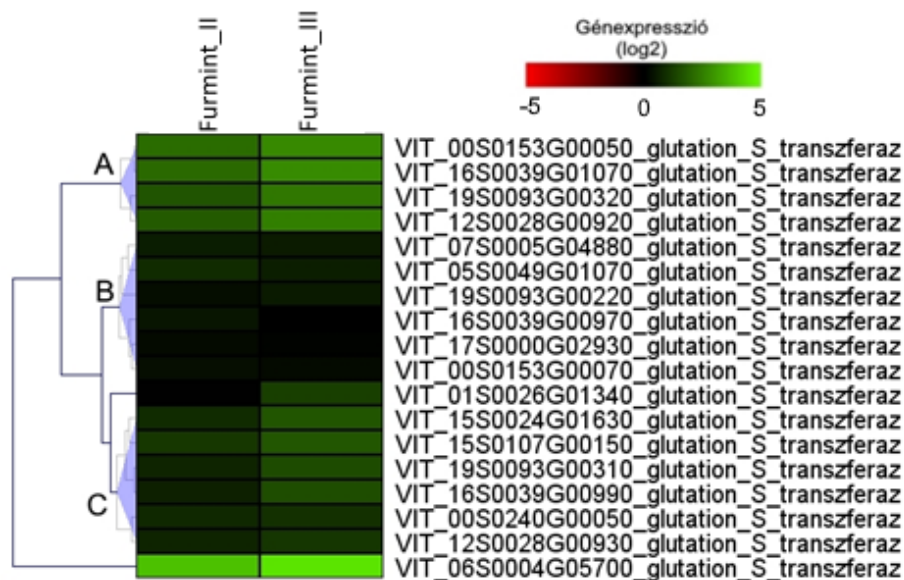


18. ábra A GO kifejezés dúsulási tesztben kapott fehérje oligomerizációs folyamatért felelős Furmint kis hőszokkfehérjék expressziója hierarchikus klaszterezéssel ábrázolva a különböző aszúsodási fázisokban. Az expressziós változás log₂ értékben van megadva a kontrollhoz képest.

6.5.4. Glutacion anyagcsere folyamata

A Furmint aszúsodása során a megemelkedett abiotikus és biotikus stresszel szemben a bogyó glutacion anyagcsereje fokozódott. A 19. ábrán mutatom be a glutacion anyagcsere folyamatban szerepet játszó gének hierarchikus klaszterezett expressziós értékeit. A „B” klaszter elemei a harmadik fázisra enyhe repressziót mutatnak. Az „A” és „C” klaszter eltérő mértékben, de mindkét esetben nagyobb aktivitást mutat a III. fázisban, mint a másodikban, ami arra utal, hogy tovább fokozza a növényi sejt a redukáló képességét. A *VIT_06s0004g05700* gén

expressziója a legmagasabb a második fázisban, sőt tovább emelkedve a harmadik fázisban is. A *V. vinifera*-ban azonosított 17 glutation peroxidáz génből csak a *VIT_06s0080g00260* és a *VIT_00s0207g00220* gén mutatott alig kétszeres expresszió növekedést az aszúsodás során (M. 4. táblázat).



19. ábra A GO kifejezés dúsulási tesztben kapott glutation anyagcsere folyamatért felelős Furmint *glutation-S-transzferázok* expressziója hierarchikus klaszterezéssel ábrázolva a különböző aszúsodási fázisokban. Az expressziós változás log₂ értékben van megadva a kontrollhoz képest. Nagybetűvel („A”, „B”, „C”) a klaszterek vannak jelölve.

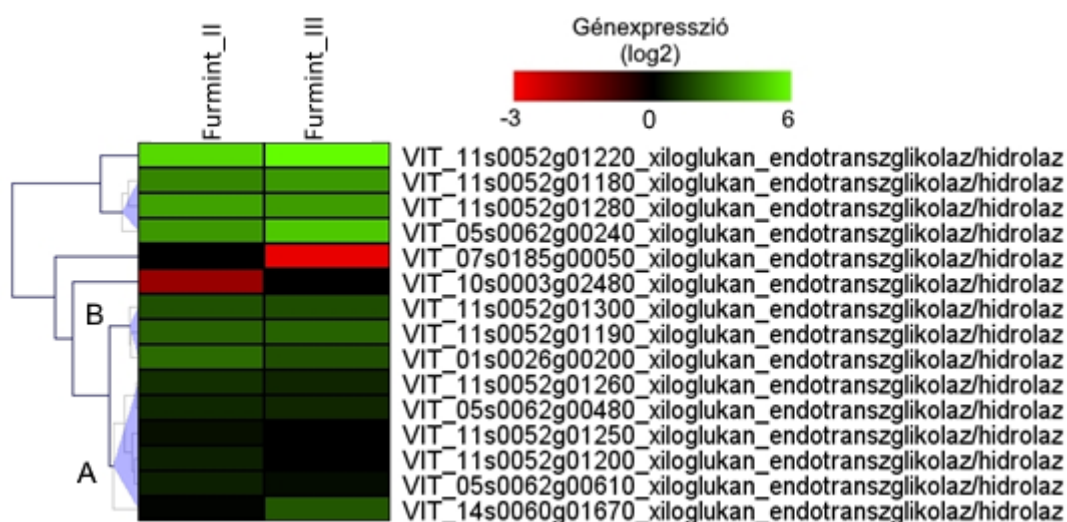
6.5.5. Egyéb antioxidáns rendszerek

További ROS elimináló enzimeket kódoló gének expresszió változásait vizsgálva azt tapasztaltam, hogy az aszúsodás során nem jellemző szőlő szuperoxid-dizmutáz és kataláz enzimek aktivitása. Szuperoxid-dizmutáz enzimek közül mindössze két gén expressziója nőtt meg (*VIT_08s0007g07280*, *VIT_16s0013g00260*) kataláz enzimet kódoló gének közül kettőnek csökkent az expressziója (*VIT_00s0698g00010*, *VIT_04s0044g00020*) (M. 4. táblázat). Kilencven peroxidázt azonosítottam a *V. vinifera* genomában. Ezek közül 16 aktiválódott a kettes aszúsodási fázisban és 15 a hármásban. A *VIT_07s0191g00050* gén mindkét fázisban represszálódott, és további öt peroxidáz expressziója csökkent a harmadik fázisban (M. 4. táblázat).

6.5.6. Xiloglukán anyagcsere folyamata

A xiloglukán anyagcsere erősen indukálódott a II. aszúsodási fázisban Furmint mintákban, aminek egyfelől magyarázata lehet a gyümölcs érésehez köthető *xiloglukán-endotranszglykoláz* gének természetes indukálódása, de a *B. cinerea* fertőzés kiváltotta sejtfal erősítés is. A 20. ábrán ábrázolom azoknak a *xiloglukán-endotranszglykoláz* géneknek a hierarchikus klaszterezett expressziós értékeit, melyeknek az expressziója az aszúsodási fázisok között pozitív vagy negatív irányban változott a kontrollhoz képest.

Mindkét fázisban a legerősebben aktiválódó gének a *VIT_11s0052g01220*, *VIT_11s0052g01180*, *VIT_11s0052g01280*, *VIT_05s0062g00240*. Az „A” klaszter génjeinél kismértékű represszálódás tapasztalható, míg a „B” klaszter génjeinek az expressziója konstans értéken marad. A *VIT_07s0185g00050* gén expressziója a harmadik fázisra jelentősen lecsökken.



20. ábra A GO dúsulási tesztben kapott xiloglukán anyagcsere folyamatért felelős Furmint xiloglukán-endotranszglykolázok/hidrolázok expressziója hierarchikus klaszterezéssel ábrázolva a különböző aszúsodási fázisokban. Az expressziós változás log₂ értékben van megadva a kontrollhoz képest.

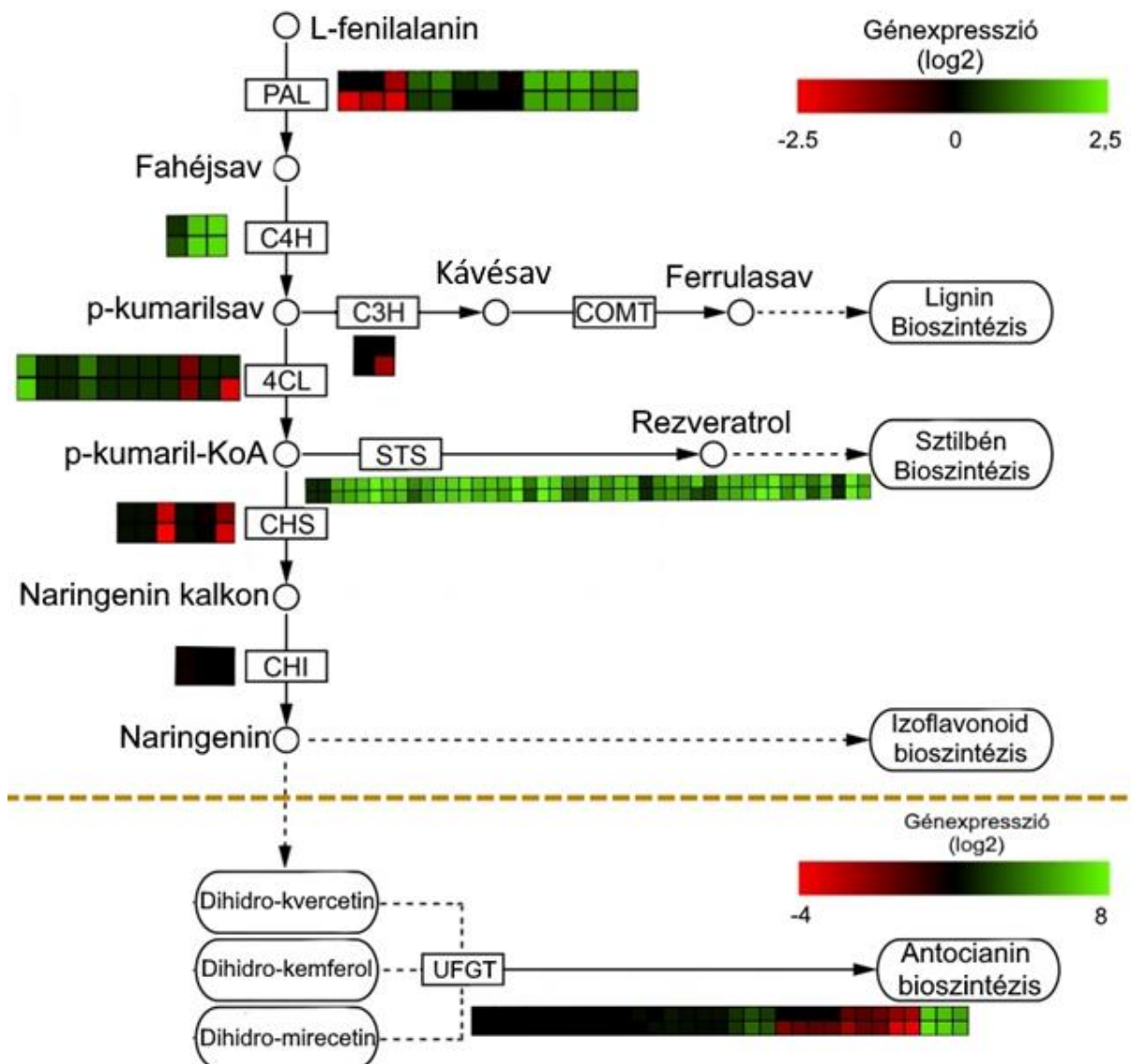
6.5.7. L-fenilalanin lebontásából eredő másodlagos anyagcseretermékek szintézise

A növényi sejtekben az L-fenilalanin lebontásával fenilpropanoid, sztilbén és flavonoid prekursorok képződnek. A GO kategóriák dúsulási tesztje szerint szignifikáns aktiválódást csak a második aszúsodási fázisban mutatott az L-fenilalanin lebontási folyamat, de a folyamat részletezése során a harmadik fázis génextpressziós értékeit is vizsgáltam. A harmadik fázisban több *fenilalanin-ammónia-liáz* izoforma (PAL) expressziója csökkent, amelyek a kettesben aktívak voltak (21. ábra). Ez az oka annak, hogy míg a II. fázisban a dúsulási teszt szignifikánsan aktíválódo folyamatnak tekinti az L-fenilalanin lebontást, addig a III. fázisban már nem.

A lignin, sztilbén és flavonoid bioszintézis prekursorai a fahéjsav és a belőle képződő p-kumarinsav. A lignin monomerjei, a monolignolok szintézise ágazik le először a szintézis közös útvonaláról, amikor a p-kumarinsavat a p-kumarinsav 3-hidroxiláz (C3H) enzim hidroxilálja és ezzel kávéssav keletkezik. A kávéssav további oldallánc módosulásokon mehet keresztül, ami kialakítja a ligninek különböző típusait.

A sztilbén és flavonoid bioszintézise a 4-kumarinsav-koenzim-A-ligáz (4CL) aktivitásának köszönhetően halad tovább a közös bioszintézis útvonalon. A p-kumarin-KoA-t malonil-KoA-val a sztilbén-szintáz a flavonok prekursorává alakítja. Ezek a sztilbének különböző hatékonyságú antimikrobiális hatással rendelkeznek. Azonban, ha a p-kumarin-KoA-t a kalkon-szintáz és kalkon-izomeráz konszekutív reakcióban Naringeninné alakítja, akkor flavonoid származékok képződnek. A 21. ábrán bemutatom a Furmint minták kettes és hármas aszúsodási fázisában lévő szőlőbogyókban a fenilalanin lebontásáért felelős gének aktivitását, továbbá a szubsztrátjukból képződő fahéjsav további átalakítását. A PAL génektől eltérően a fahéjsav-4-hidroxiláz (C4H) géneknek az aktivációja mindkét fázisban magas volt. Ezeknek a géneknek az aktivációja a kettes fázisban azzal magyarázható, hogy a lignin, sztilbén és flavonoid bioszintézis útvonalak – mely molekulák aktívan részt vesznek a stressz toleranciában és patogének elleni harcban – prekursorai ebből a folyamatból képződnek. A lignin bioszintézis leágazását jelentő C3H enzimaktivitású gének expressziója a kettes fázisban nem változott az ép bogyóhoz képest, a harmadik fázisban viszont a *VIT_08s0040g00780* gén expressziója csökkent. Ez arra utal, hogy a bogyó nem képez jelentős mennyiségű új fenilpropanoidot, amivel lignifikációval védekezhetne a nekrotróf gomba ellen. A 4CL enzimaktivitással rendelkező gén izoformák aktivációja a két fázisban hasonló, csak a *VIT_02s0109g00250* gén expressziójában van különbség, melynek az expressziója a harmadik fázisban erős repressziót mutat. A p-kumaril-KoA intermediernél válik másodjára ketté a bioszintézis útvonala, a sztilbének és flavonok bioszintézisére.

A flavonoidok bioszintéziséért felelős *kalkon-szintáz* (CHS) és *kalkon-izomeráz* (CHI) gének expressziója csökken mindkét fázisban vagy a kontroll szintjén marad. Ettől eltérően szinte az összes sztilbén szintáz aktivitású gén expressziója megnő mindkét fázisban.



21. ábra Fenilpropanoid bioszintézis útvonalat katalizáló gének expressziója a Furmint II. és III. aszúsodási fázisban. A színes négyzetek az adott csoporthoz tartozó egy-egy izoforma expresszióját jelentik meg, felül a II., alul a III. aszúsodási fázisban. PAL - *fenil-alanin-ammónia-liáz*, C4H - *transz fahéjsav-4-monooxygenáz*, C3H - *p-kumaril 3-hidroxiláz*, 4CL - *4-kumaril-Koa-ligáz*, STS - *sztilbén-szintáz*, CHS - *kalkon-szintáz*, CHI - *kalkon-izomeráz*, UFGT - *UDP-glükóz:flavonol 3-O-D-glikoziltranszferáz*. Az expressziós változás log₂ értékben van megadva az ép szőlőbogyó expressziójával összehasonlítva.

6.5.8. PR fehérjék a Furmint aszúsodás folyamatában

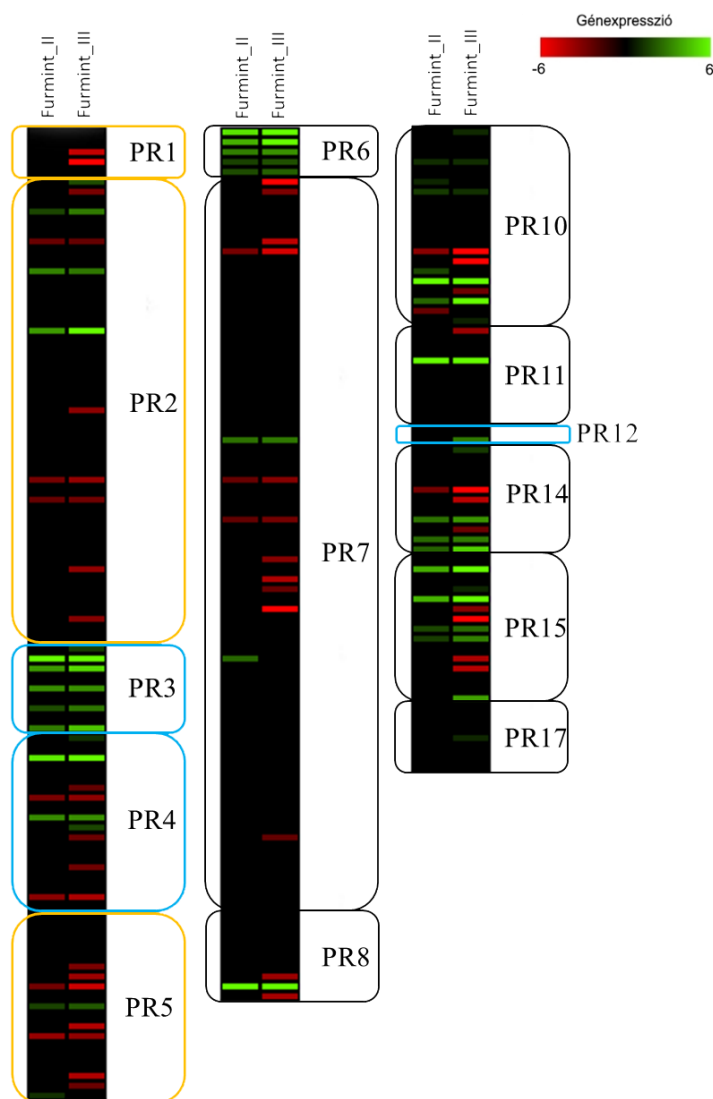
A növényi PR fehérjéket funkciójuk szerint csoportosítjuk, amit egyebek mellett a domén szerkezetük alapján prediktálhatunk. Az IPR azonosítók a nemzetközi InterPro konzorcium által képzett domén azonosítók, melyek a fehérjék osztályozásáról, doménszerkezetükről, és egyéb fontos jellemzőikről adnak információt. Uniprot adatbázisból kigyűjtöttem az elérhető PR fehérjékre jellemző IPR azonosítókat, majd a leggyakrabban előfordulókat azonosítottam a szőlő génjeiben. Azoknál a PR csoportoknál, ahol több IPR azonosító is egyezett, ott azokat a szőlő géneket soroltam az adott PR csoportban, amelyek az adott funkcióval rendelkező fehérje csoporthoz hasonló IPR azonosítókkal rendelkeztek (8. táblázat).

8. táblázat A PR fehérjékhez köthető Interpro domének. Vastagon kiemelve a funkcióra leginkább jellemző Interpro azonosító.

PR csoport	Azonosított Interpro domén
PR1	IPR001283 , IPR018244, IPR014044, IPR035940
PR2	IPR000490 , IPR017853
PR3	IPR016283 , IPR001002, IPR018371, IPR036861, IPR000726, IPR023346
PR4	IPR001153 , IPR001002, IPR018371, IPR036861, IPR016283, IPR023346, IPR036861
PR5	IPR001938 , IPR037176, IPR017949
PR6	IPR000864 , IPR036354
PR7	IPR015500 , IPR036852, IPR003137, IPR010259, IPR000209, IPR037045
PR8	IPR001223 , IPR001579, IPR017853
PR9	IPR002016 , IPR010255, IPR000823, IPR019794, IPR019793, IPR033905
PR10	IPR000916 , IPR024949, IPR023393
PR11	IPR001223 , IPR011583, IPR029090, IPR017853
PR12	IPR08176 , IPR003614, IPR036574
PR13	IPR001010 , IPR0036391
PR14	IPR000528 , IPR036312, IPR016140,
PR15	IPR001929 , IPR006045, IPR019780, IPR014710, IPR011051
PR16	IPR001929 , IPR006045, IPR019780, IPR014710, IPR011051
PR17	IPR007541

V. vinifera-ban *PR13*, *PR16* típusú géneket nem sikerült azonosítanom. A *PR9* típusú gének a peroxidáz funkciós csoporttal rendelkeznek, melyeket korábbi fejezetben már vizsgáltam (ld. 6.5.5). A *PR1*, *PR2* és *PR5* csoportba tartozó gének SA-közvetítette jelátviteli útvonalon foglalnak helyet és expressziós változásukról összeségében elmondható, hogy többnyire represszálódnak (22. ábra, M. 6. táblázat). A *PR1* és *PR5* csoport határozott represszálódást mutat a második és harmadik fázisban. A *PR2* csoportba tartozó gének közül hat gén expressziójában történik szignifikáns változás a II. aszúsodási fázisban. Három gén (*VIT_02s0012g01610*, *VIT_05s0077g01150*, *VIT_06s0080g00420*) expressziója a II. és a III.

fázisban is magasabb a kontrollhoz képest, továbbá az utóbbi két génnek az expressziója a későbbi fázisban tovább emelkedik. A tradicionálisan JA-közvetítette jelátviteli útvonalhoz köthető *PR3* (Endokitináz), *PR4* (Kitináz), és *PR12* (Defenzin) csoportból a *PR3*-ként azonosított összes változó gén expressziója megnövekedett. A *PR4* típusú gének között megnövekedett és lecsökkent expressziós szintet is azonosítottam, de a *VIT_04s0008g04980* gén aktiválódása kiemelkedik közülük. A *PR12* csoportba tartozó gének közül csak a *VIT_07s0130g00030* gén expressziója nőtt meg, az azonosított két génből. Az eredmények tükrében a JA- és SA közvetítette védekezési útvonalak közül a Furmint aszúsodása során a JA útvonal indukálódik.



22. ábra Az azonosított PR-szerű fehérjéket kódoló gének expressziós változása a szőlőbogyóban aszúsodás hatására. kék: SA-hoz köthető *PR* gének, narancssárga: JA-hoz köthető *PR* gének. Pontos értékek az M. 6 táblázatban találhatóak.

Az azonosított *PR6* (Proteináz inhibitor) család génei közül mindegyiknél indukálódás figyelhető meg, így ez a csoport a legintenzívebb aktiválódó PR csoport a kontrollhoz képest.

A *PR7* csoport tagjai szubtiláz aktivitású fehérjéket kódolnak. A Furmintban ezeknek a géneknek aszúsodás hatására két kivétellel kis mértékben csökken az expressziójuk vagy nem változik. A *PR8* (Kitináz III) csoportból a *VIT_15s0046g01600* gén, a *PR11* (Kitináz) csoportból a *VIT_11s0149g00280* expressziója mindkét aszúsodási fázisban magas, a *PR10* (Ribonukleáz-szerű) csoport néhány tagja szintén erős indukálódást mutat (*VIT_05s0077g01690* és *VIT_07s0005g00920*). A *PR14* (Lipid transzport) csoportba tartozó gének expressziója változó, azonban megfigyelhető, hogy a harmadik aszúsodási fázisban az expressziós változás nagyobb, mint a II. fázisban. A *PR15* (Oxalát-oxidáz) típusú gének expressziója szintén nagyon változékony, de a *VIT_09s0002g01320* és a *VIT_12s0059g00740* gén esetében az expresszió kiemelkedik, főleg a III. fázisban.

A PR családok azonosított génjeinek expressziós változásában megfigyelhető, hogy ha a gének expressziója változott a kontrollhoz képest, akkor mindkét aszúsodási fázisban ugyanolyan előjelű a változás.

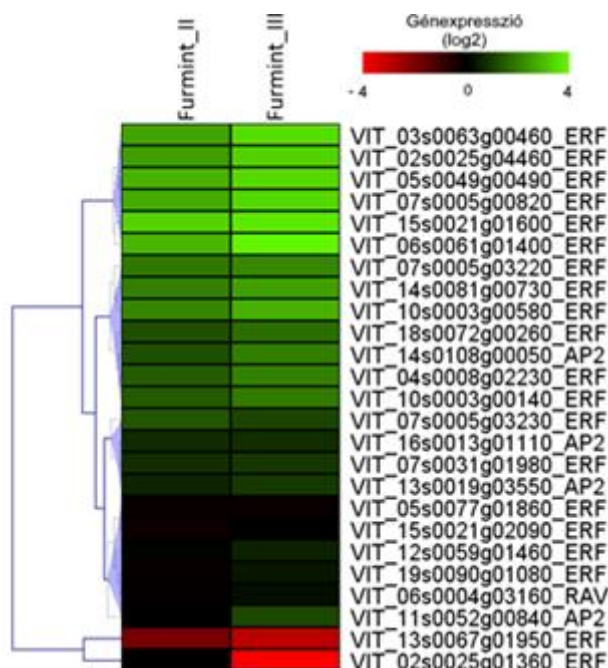
A JA-hoz köthető védekezési gének indukcióját a JA jelátviteli úton történt génexpressziós változások is felerősítik. A jelátviteli úton elhelyezkedő gének vizsgálata során a kétszeres expressziós különbségnél kisebb változásokat is figyelembe vettem, mert ezeknek a géneknek az expressziójában a kis változás is nagy élettani hatással lehet. Hét *JAZ* gén indukálódott a Furmint aszúsodása során: *VIT_01s0146g00480*, *VIT_04s0008g00110*, *VIT_09s0002g00890*, *VIT_10s0003g03790*, *VIT_10s0003g03800*, *VIT_10s0003g03810*, *VIT_11s0016g00710* (M. 7. táblázat). Ez az indukálódás összhangban van a JA közvetítette PR gének (*PR3*, *PR4*, *PR12*) és *VvbHLH* transzkripciós faktorok (*MYC2* TF alcsaládja) erős aktiválódásával.

Az eddig azonosított nyolc *I3-LOX* génből (Bertazzon *et al.* 2019) kettő mutatott indukciót Furmint aszúsodása során *B. cinerea* fertőzés hatására: *VIT_14s0128g00780* és *VIT_09s0002g01080* (M. 7. táblázat).

6.5.9. Transzkripciós faktorok expressziója a Furmint aszúsodása során

A növényi transzkripciós faktoroknak hat családja (*AP2/ERF*, *bHLH*, *MYB*, *NAC*, *WRKY*, *bZIP*) köthető a kórokozók elleni védekező mechanizmusok szabályozásához. Az ezekbe a családokba tartozó gének expresszióját kigyűjtöttem az aszúsodott minták teljes transzkriptom eredményeiből. Azokat a géneket ábrázoltam, melyek legalább egy fázisban változást mutattak, vagy irodalmi adatokból ismert folyamatot aktiválnak. A korábbi eredmények bemutató ábrához hasonlóan itt is az így kiválasztott gének expressziós érték kettes alapú logaritmusát szemléltettem és hierarchikus klaszterezéssel rendeztem őket a könnyebb áttekinthetőség miatt.

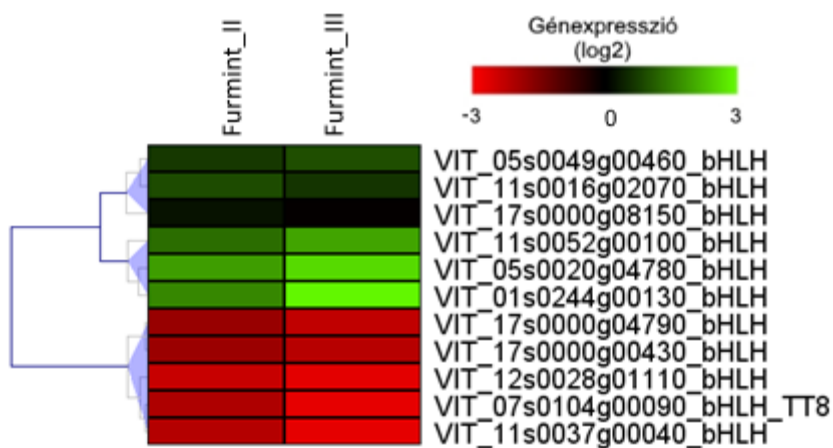
A 100 *AP2/ERF* családba tartozó TF közül 25-nek az expressziója változott a Furmint minták esetében és érték el a küszöbértéket (23. ábra). Az *AP2* alcsaládba tartozó változó expressziót mutató gének közül mindegyik aktiválódott. Megfigyelhető, hogy az expressziójuk a harmadik aszúsodási fázisban a *VIT_16s0013g01110* gén kivételével megnő. A *RAV* alcsaládba tartozó egyetlen gén (*VIT_06s0004g03160*) expressziója az *AP2* alcsaládéhoz hasonlóan a harmadik fázisban megnő.



23. ábra Az *AP2/ERF* transzkripciós faktor család expressziós változás küszöbértéket átlépett géneinek értékei különböző aszúsodási fázisokban. Az expressziós változást log₂ értékben ábrázoltam a kontrollhoz képest.

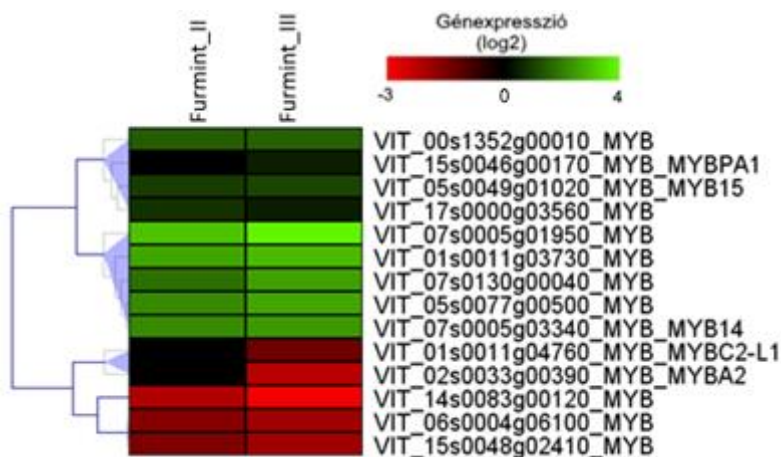
Az *ERF* alcsaládba tartozó gének expressziós változása a legnagyobb a családon belül. Az expressziós változás mértéke az aszúsodás előrehaladtával vagy azonos szinten marad, vagy tovább nő vagy csökken, attól függően, hogy a kettes fázisban milyen előjelű volt a változás.

A szőlőben azonosított 115 *bHLH* típusú transzkripciós faktorból 11 expressziós értéke lépte át a küszöbértéket a kontrollhoz képest. A *bHLH* TF család kevésbé ismert a szőlőben, de a kevés változó génből hat esetében beszélhetünk aktiválódásról. Három gén expressziója (*VIT_11s0052g00100*, *VIT_05s0020g04780*, *VIT_01s0244g00130*) a fertőzés korai szakaszában való aktiválódáson túl az aszúsodás előrehaladásával még jobban nő (24. ábra).



24. ábra A *bHLH* transzkripció faktor család expressziós változás küszöbértéket átlépett géneinek értékei különböző aszúsodási fázisokban. Az expressziós változást log₂ értékben ábrázoltam a kontrollhoz képest.

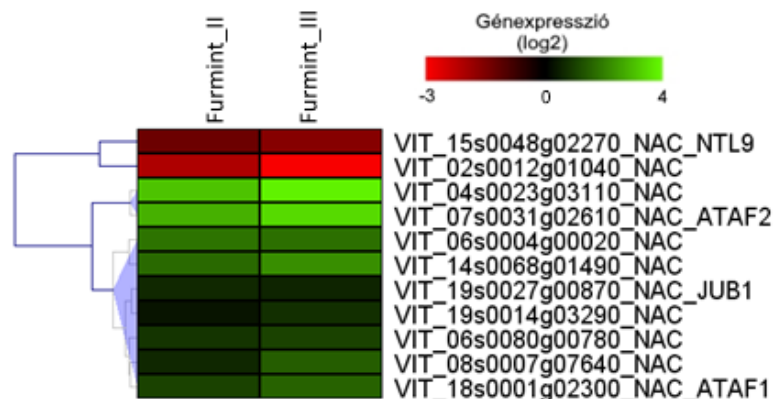
A szőlőben azonosított 138 *MYB* típusú transzkripció faktorból 14 expressziós értéke lépte át a küszöbértéket a kontrollhoz képest (25. ábra). Ebből a 14 génből nyolc aktiválódott és három represszálódott a kettes aszúsodási fázisban. A harmadik fázisban viszont már kilenc aktiválódott és öt represszálódott. Legnagyobb expressziós változás a *VIT_07s0005g01950* gén esetében, a legnagyobb represszálódás pedig a *VIT_14s008300120* gén esetében volt megfigyelhető. Mindkét szélsőséges értéket a harmadik fázisban azonosítottam.



25. ábra Az *MYB* transzkripció faktor család expressziós változás küszöbértéket átlépett géneinek értékei különböző aszúsodási fázisokban. Az expressziós változást log₂ értékben ábrázoltam a kontrollhoz képest.

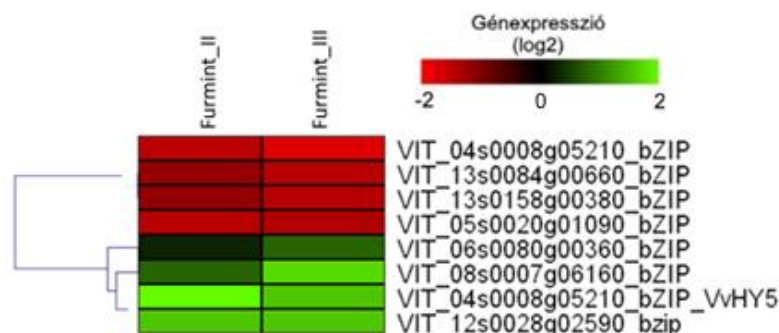
A szőlőben azonosított 71 *NAC* típusú transzkripció faktorból 11 expressziós értéke lépte át a küszöbértéket a kontrollhoz képest. Kilenc gén esetében aktiváló, két gén esetében

represszálódó a változás. A *VIT_04s0023g03110* és *VIT_07s0031g02610* gének expressziója a kezdeti magas expressziós értéktől függetlenül az aszúsodás során tovább nő (26. ábra).



26. ábra A *NAC* transzkripciós faktor család expressziós változás küszöbértéket átlépett génjeinek értékei különböző aszúsodási fázisokban. Az expressziós változást \log_2 értékben ábrázoltam a kontrollhoz képest.

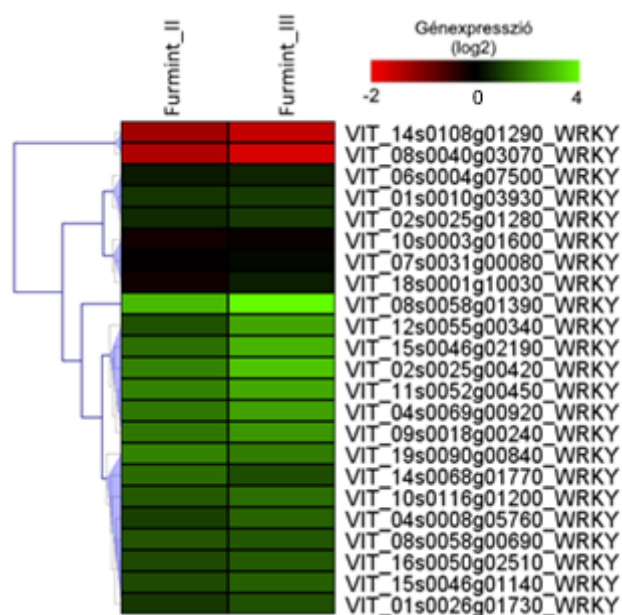
A szőlőben azonosított 47 *bZIP* TF-ból Furmint aszúsodott mintákban mindössze 11 expressziója változott meg, ebből nyolcnak érte el a küszöbértéket a változás mértéke (27. ábra). A nyolcból négy gén mindkét fázisban represszálódott, két gén esetében (*VIT_06s0080g00360*, *VIT_08s0007g06160*) a harmadik aszúsodott fázisban nagyobb expressziós értéket értek el. Az eredmények azt sugallják, hogy a *bZIP* TF-ok nem játszanak aktív szerepet a *B. cinerea* elleni védekezésben, sőt inkább többnyire represszálódnak. A *VvHY5* gén expressziója megemelkedik a második fázisra, de a harmadikban visszaesik.



27. ábra A *bZIP* transzkripciós faktor család expressziós változás küszöbértéket átlépett génjeinek értékei különböző aszúsodási fázisokban. Az expressziós változást \log_2 értékben ábrázoltam a kontrollhoz képest.

A szőlőben azonosított 59 *WRKY* típusú transzkripciós faktorból 23 expressziós értéke lépte át a küszöbértéket a kontrollhoz képest. Mindössze két gén (*VIT_14S0108g01290*, *VIT_08S0040g03070*) expressziója csökken a kontrollhoz képest. Nem látszik markáns eltérés

a *WRKY* génexpressziós profilon az aszúsodott fázisok között, ami arra enged következtetni, hogy ezek a gének a gomba inváziója során folyamatosan magas szinten expresszálódnak (28. ábra).

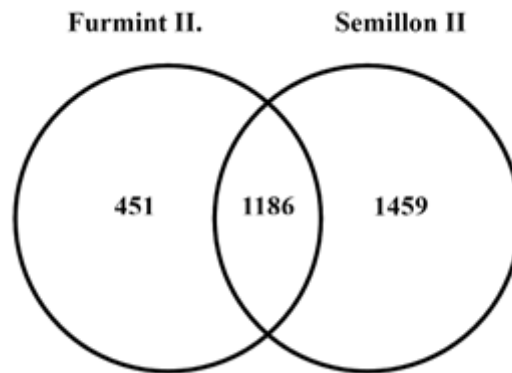


28. ábra A *WRKY* transzkripciós faktor család expressziós változás küszöbértéket átlépett génjeinek értékei különböző aszúsodási fázisokban. Az expressziós változás \log_2 értékben van megadva a kontrollhoz képest.

6.6. Furmint és Semillon nemesrothadás expressziós profiljának összehasonlítása

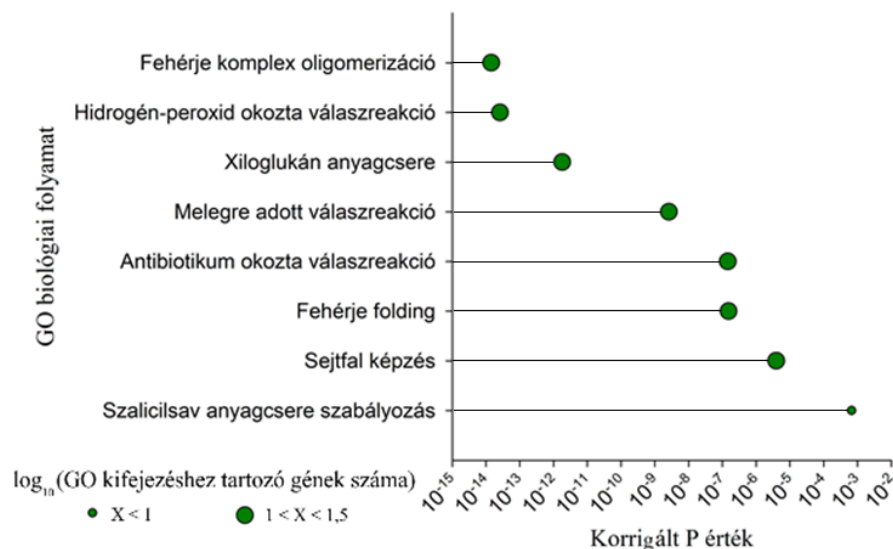
Blanco-Ulate és munkatársai 2015-ben publikálták átfogó munkájukat, melyben többek között totál transzkriptóma (Illumina Hiseq2000) elemzést végeztek a nemesrothadás három különböző fázisában gyűjtött Semillon fajtájú szőlőbogyó mintákon. Az általunk használt nemesrothadás osztályozás eltérő a Blanco-Ulate és munkatársai által alkalmazottól. Blanco-Ulate és munkatársai munkájuk során az első aszúsodási fázisnak olyan szőlőbogyókat gyűjtöttek, melyek a mi osztályozásunk szerint nem képeznek külön csoportot. Morfológiai megfigyelésből a Furmint kettes fázis a Semillon hármasknak, a hármask pedig a négyes fázisnak felel meg. A különböző szekvenálásokból származó változó gének listáit összehasonlítva a morfológiai megfigyelésből adódó minták párosítása nagyobb egyezést mutatott. Ebből adódóan a továbbiakban a saját aszú osztályozásunkat használom a Semillon mintáknál is és így is jelölöm őket.

Összehasonlítottam a Tokaji Furmint és a Kaliforniai Semillon második aszúsodási fázisban aktiválódott transzkriptumait. Az összehasonlítási eredmények szerint a Furmint mintákban aktiválódott gének 73%-a (1186/1637) és a Semillon 45%-a (1186/2645) megtalálható mindkét csoportban (29. ábra).



29. ábra A Furmint és a Semillon (Blanco-Ulate *et al.* 2015) második nemesrothadási fázisban lévő szőlőbogyók aktiválódott génjeinek Venn diagramja.

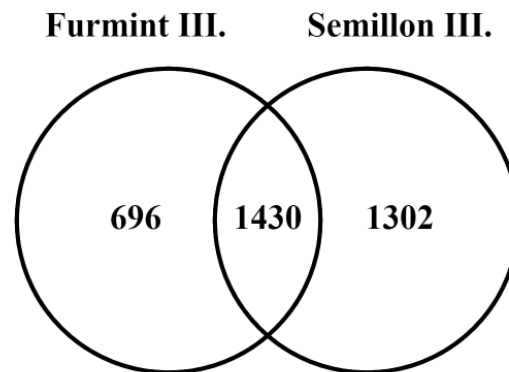
GO kifejezés dúsulási elemzést végeztem az unióban található génekre. Az elemzés során Furmint vizsgálatától eltérően itt háttérnek a *V. vinifera* teljes cDNS génlistáját használtam. Erre azért volt szükség, hogy a két eltérő fajtájú szőlő biológiai folyamatai biztosan reprezentálva legyenek a háttér génlistában, továbbá így érzékenyítve van a teszt is. A vizsgálatból kiderült, hogy az unióban aktiválódó folyamatok többsége megegyezik a Furmintnál már korábban leírtakkal (ld. 16. ábra). Ez azt bizonyítja, hogy a Furmint aszúsodása során azonosított folyamatok többsége más szőlő fajtában is megfigyelhető (30. ábra).



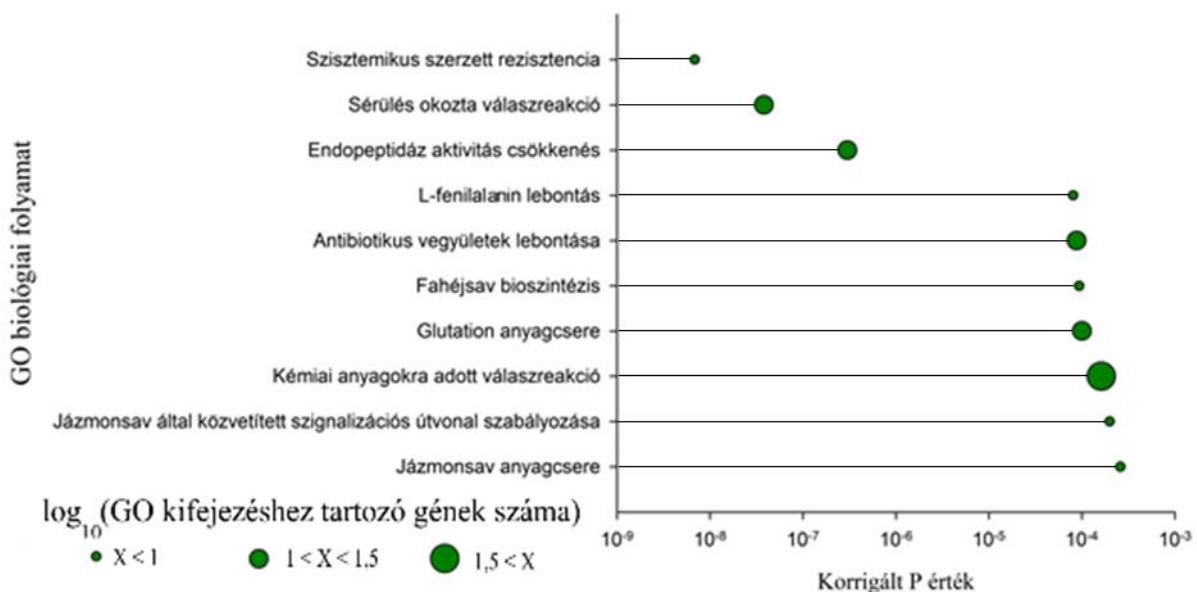
30. ábra A Furmint aszú II. fázisában és a Semillon nemesrothadás II. fázisában aktiválódó gének dúsulási teszt eredménye. Az X tengelyen az FDR valószínűségi (P) értékek, az Y tengelyen a feldúsult biológiai folyamat megnevezése látható.

A Furmint és a Semillon harmadik fázisában aktiválódott génjeinek összehasonlítása során hasonlóan nagy számban kaptam közös géneket, mint a második fázis esetén. A Furmint

mintákban aktiválódott gének 67%-a (1430/2126) és a Semillonnak 52%-a (1430/2732) megtalálható mindkét csoportban (31. ábra).



31. ábra A Furmint és a Semillon (Blanco-Ulate *et al.* 2015) harmadik nemesrothadási fázisában lévő szőlőbogyók aktiválódott géneinek száma Venn diagramon ábrázolva.



32. ábra A Furmint III. aszúsodási fázis és a Semillon III. nemesrothadási fázis aktiválódó géneinek dúsulási teszt eredménye. Az X tengelyen az FDR valószínűségi (P) értékek, az Y tengelyen a feldúsult biológiai folyamat megnevezése látható.

A Furmint III. fázis és a Semillon III. fázis közösen aktiválódó géneik dúsulási teszt eredményében megjelent a jázmonsav közvetítette szignalizációs útvonal és a jázmonsav anyagcsere, ami korábban a Furmint mintáknál nem jelentkezett szignifikáns folyamatként (32. ábra).

Összehasonlítottam a Furmint és a Semillon II. fázisban lévő nemesrothadt minták transzkripciós faktorainak változását (9. táblázat). Az összehasonlítás során kétszeresnél kisebb

gének expressziós változásokat is számításba vettem, mert az összehasonlítás célja a profil meghatározása volt, ahol az indukálódott és represszálódott gének mennyiségét vizsgáltam. Továbbá a TF-ok expressziójának kis mértékű változása is jelentős élettani hatással bírhat.

A Furmint és a Semillon szőlőfajták aszúsodása során a változó expressziót mutató TF-ok száma 175 volt. Az aktiválódott/represszálódott gének aránya a Furmint esetében sokkal nagyobb volt (4,2), mint a Semillonnál (1,7). *AP2/ERF* család esetében a Semillon mintákban 36 TF expressziója változott, aminek a harmada represszálódott, míg a Furmint minták esetében összesen 33 TF expressziója változott, aminek több mint 90%-a aktiválódott. A *bHLH*, *bZIP* és *NAC* TF esetében a Semillon nemesrothadt bogyókban közel kétszerese volt az aktiválódott és háromszorosa a represszálódó gének száma, mint a Furmintnál. A *MYB* TF család esetében az Furmint mintákban 17 gén expressziós változása érte el a küszöbértéket, addig a Semillon minták esetében 29. Hasonló mennyiségű *MYB* TF gén indukálódott, a két kísérletben viszont a Semillon mintákban több mint háromszorosa volt a represszálódó gének mennyisége a Furminthoz képest. A *WRKY* TF család esetében szintén hasonló számú gén indukálódik, de a Semillon mintáknál közel háromszor annyi represszálódik, mint a Furmintnál.

9. táblázat Indukálódott és represszálódott transzkripciós faktor gének száma a Furmint és Semillon II. (Blanco-Ulate *et al.* 2015) nemesrothadási fázisban.

TF család	Összes TF gén	Furmint II.		Semillon II.	
		Indukálódott	Represszálódott	Indukálódott	Represszálódott
<i>AP2/ERF</i>	100	30	3	27	9
<i>bHLH</i>	115	6	7	13	19
<i>bZIP</i>	47	4	3	7	9
<i>NAC</i>	71	9	2	17	9
<i>MYB</i>	138	14	3	18	11
<i>WRKY</i>	59	25	3	26	8

Összehasonlítottam a Furmint és a Semillon szőlőfajták nemesrothadása során változó expressziót mutató PR típusú gének számát (10. táblázat). A két vizsgált szőlőfajtánál azonosított változó expressziót mutató PR gének száma a Semillonnál közel másfélszer annyi volt, mint a Furmintnál (Furmint: 46, Semillon: 71). A Furmint minták esetében a gének 72%-a, míg a Semillon minták esetében közel 69%-nak nőtt az expressziója a kontrollhoz képest. A Furmint mintáktól eltérően – ahol csak a JA (*PR3*, *PR4*, *PR12*) útvonalhoz köthető PR gének aktiválódtak (22. ábra) – a Semillon minták esetében mind a SA (*PR1*, *PR5*), mind a JA (*PR3*, *PR4*, *PR12*) útvonalhoz köthető PR gének aktiválódtak. A *PR2* gének csoportja mindkét fertőzésformánál hasonló expressziós profilt mutat. Az ebbe a csoportba tartozó

VIT_02s0012g01610, VIT_05s0077g01150, VIT_06s0080g00420 gének erősen indukálódnak, míg a VIT_03s0063g02490 represszálódik. A PR6, PR15 család génjei mindkét esetben hasonlóan határozott indukciót mutatnak.

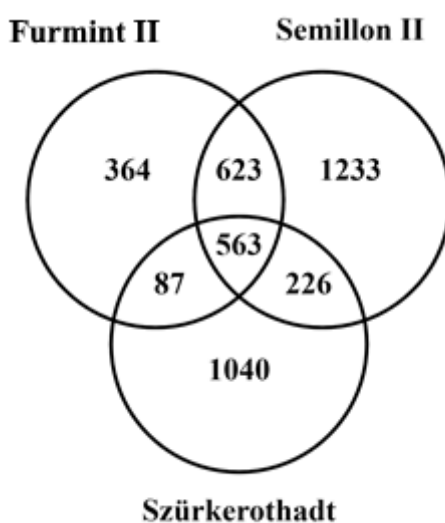
10. táblázat Indukálódott és represszálódott PR gének mennyisége a Furmint és Semillon II. (Blanco-Ulate *et al.* 2015) nemesrothadási fázisban.

PR család	Összes PR típusú gén	Furmint II.		Semillon II.	
		Indukálódott	Represszálódott	Indukálódott	Represszálódott
<i>PR1</i>	5	0	0	2	1
<i>PR2</i>	47	3	3	3	4
<i>PR3</i>	9	5	0	6	0
<i>PR4</i>	18	2	2	5	5
<i>PR5</i>	19	1	2	10	3
<i>PR6</i>	5	5	0	4	0
<i>PR7</i>	73	2	3	0	0
<i>PR8</i>	10	1	0	0	1
<i>PR10</i>	20	6	2	13	5
<i>PR11</i>	10	1	0	0	0
<i>PR12</i>	2	0	0	0	0
<i>PR14</i>	11	3	1	2	3
<i>PR15</i>	15	4	0	4	0
<i>PR17</i>	7	0	0	0	0

6.7. A nemesrothadás és a szürkerothadás összehasonlítása

Tokaj-hegyalján nem sikerült reprezentatív mennyiségű szürkerothadt mintát gyűjtenem. Ezért az aszúsodott és a szürkerothadt expressziós profil összehasonlításához Kelloniemi *et al.* (2015) munkáját használtam fel. Munkájuk során ültetvényből gyűjtöttek Marselan szőlőfürtöket és laboratóriumi körülmények között fertőzték *B. cinerea*-val. Microarray hibridizációs technikával (Nimblegen microarray 090818 vitis exp hx12) határozták meg a szőlő transzkripció profilját. A 090818 vitis exp hx12 microarray chip 29549 prediktált gént tud vizsgálni a 12X V1 automatikus annotált adatbázis alapján. A chip és az általam használt referencia genom megegyezik. A változó expressziót mutató gének mindkét módszerben reprezentálva voltak, tehát összehasonlítható a két eredmény.

A szürkerothadt minták génexpressziós profil vizsgálata során összehasonlítottam az aktiválódó gének számát a Furmint és Semillon nemesrothadás és a Marselan szürkerothadt mintákban. Míg a Furmint és a Semillon nemesrothadása során az aktiválódó gének nagyban átfednek (1186 gén, változó expressziójú gének 38%), addig a Furmint mintát összehasonlítva Marselan szürkerothadttal alig több mint 600 gén (változó expressziójú gének 22%), továbbá a Semillon szürkerothadt relációban is kevesebb, mint 800 gén egyezik meg (változó expressziójú gének 21%). A három mintatípusban egyszerre aktiválódó gének száma 563 (33. ábra). A két nemesrothadt mintában az azonos változó gének aránya közel kétszer olyan nagy, mint a Furmint szürkerothadt relációban. Ebből következtethetünk, hogy a szürkerothadt minták esetében más gének aktiválódnak, ezzel eltérő expressziós profilt alakítanak ki a nemesrothadáshoz képest.



33. ábra Furmint II., Semillon II. (Blanco-Ulate *et al.* 2015) nemesrothadt és a Marselan (Kelloniemi *et al.* 2015) szürkerothadt szőlőbogyókban aktiválódott gének számának összehasonlítása Venn diagramon.

A szürkerothadás és az aszúsodás során változó expressziót mutató TF-ok expressziós értékeit a 11. táblázatban mutatom be. Az összehasonlítás során kétszeresnél kisebb génexpressziós változásokat is számításba vettem, mert az összehasonlítás célja a profil meghatározása volt, ahol az indukálódott és represszálódott gének mennyiségét vizsgáltam.

A szürkerothadás esetében kevesebb TF expressziója változik meg, mint az aszúsodás során. *AP2/ERF* család esetében a szürkerothadás során 18 TF expressziója változott, ennek közel a fele represszálódott, míg a Furmint minták esetében összesen több mint 33 TF expressziója változott, aminek több mint 90%-a aktiválódott.

A *bHLH* és *bZIP* TF-ok esetében a Furmint mintákban közel azonos volt az aktiválódó és represszálódó gének száma és a szürkerothadathoz viszonyítva közel kétszer annyi gén expressziója változott a *bZIP* család esetében. A szürkerothadás folyamatában a *bHLH* TF családban represszálódott gének aránya kétszerese az aktiválódottakhoz képest. A *NAC* TF esetében mindkét fertőzésformában többségben vannak az aktiválódott gének és számuk is közel azonos (aszú: 9 gén, szürkerothadt: 12 gén). A *MYB* TF család esetében az aszúsodott mintákban 14 gén indukálódott, addig a szürkerothadt minták esetében csak 6. A Furmint mintákban 28 *WRKY* TF gén expressziós értéke változott, amiből közel 90% aktiválódott, addig a szürkerothadtak esetében csak 18 gén expressziója változott a kontrollhoz képest, bár azoknak 94%-a aktiválódott. Markáns különbséget az *AP2/ERF*, *MYB* és *WRKY* transzkripciósi faktorok expressziójában tapasztaltam. Ezeknek az eltérően kifejeződő géneknek szerepük lehet abban, hogy az aszúsodás egy kedvező lefolyású, lassabb fertőzésforma.

11. táblázat Indukálódott és represszálódott transzkripciósi faktorok száma a Furmint aszúsodása és a Marselan (Kelloniemi *et al.* 2015) szürkerothadása során.

TF család	TF összes gén	Furmint II.		Szürkerothadt	
		Indukálódott	Represszálódott	Indukálódott	Represszálódott
<i>AP2/ERF</i>	100	30	3	10	8
<i>bHLH</i>	115	6	7	4	8
<i>bZIP</i>	47	4	3	2	1
<i>NAC</i>	71	9	2	12	3
<i>MYB</i>	138	14	3	6	7
<i>WRKY</i>	59	25	3	17	1

Összehasonlítottam a szürkerothadás és az aszúsodás során változó expressziót mutató PR típusú gének számát (12. táblázat). A két vizsgált fertőzésformában azonosított változó expressziót mutató *PR* gének száma közel azonos (aszú: 46, szürkerothadt: 49). Az aszúsodott

minták esetében a gének 70%-a, míg a szürkerothadt minták esetében közel 90%-nak nőtt az expressziója a kontrollhoz képest. A Furmint mintáktól eltérően – ahol csak a JA (*PR3*, *PR4*, *PR12*) útvonalhoz köthető PR proteinek aktiválódtak (22. ábra) – a szürkerothadt minták esetében mind a SA (*PR1*, *PR2*, *PR5*), mind a JA (*PR3*, *PR4*) útvonalhoz köthető PR proteinek aktiválódtak. Szürkerothadás során aktiválódott *PR2* gének közül itt is megfigyelhető a *VIT_06s0080g00420* gén indukciója, hasonlóan a Furmint és Semillon szőlőfajtáknál nemesrothadás során. Ez a fehérje predikciók alapján a plazmamebránhoz kötődő horgony doménnel rendelkezik, így feltételezhetően aktív szerepet játszik a gomba elleni védekezésben. Ezen eredmények tükrében feltételezhető, hogy már a *B. cinerea* fertőzés korai stádiumában indukálódik ez a gén függetlenül a fajtától és a későbbi fertőzés kimenetelétől. *PR7* gének közül a szürkerothadt esetében fokozottabb indukálódás figyelhető meg. A *PR10*, *PR15* gének mindkét esetben hasonló mennyiségben aktiválódnak. A *PR6* gének közül a Furmint és Semillon mintákról eltérően a Marselan mintákban csak egy gén indukálódott.

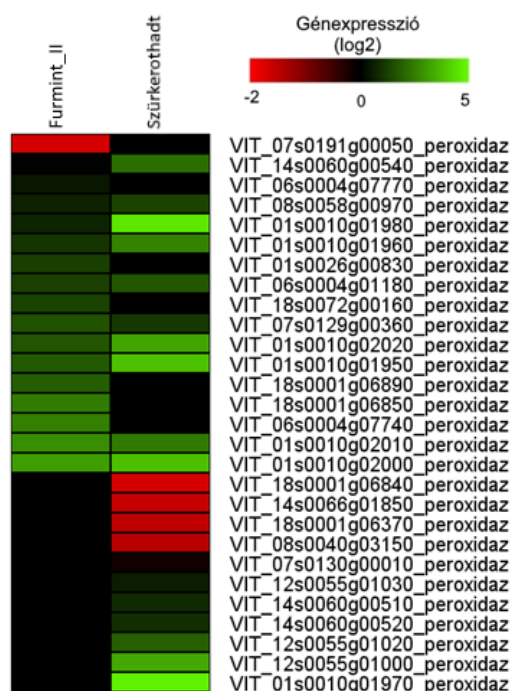
12. táblázat Indukálódott és represszálódott *PR* gének száma a Furmint aszúsodása és a Marselan (Kelloniemi *et al.* 2015) szürkerothadása során.

PR család	Összes PR típusú gén	Furmint II.		Szürkerothadt	
		Indukálódott	Represszálódott	Indukálódott	Represszálódott
<i>PR1</i>	5	0	0	3	0
<i>PR2</i>	47	3	3	4	1
<i>PR3</i>	9	5	0	6	0
<i>PR4</i>	18	2	2	1	2
<i>PR5</i>	19	1	2	6	0
<i>PR6</i>	5	5	0	1	0
<i>PR7</i>	73	2	3	3	1
<i>PR8</i>	10	1	0	0	0
<i>PR10</i>	20	6	2	8	1
<i>PR11</i>	10	1	0	2	0
<i>PR12</i>	2	0	0	0	0
<i>PR14</i>	11	3	1	1	1
<i>PR15</i>	15	4	0	8	0
<i>PR17</i>	7	0	0	0	0

Összehasonlítottam az aszúsodás és a szürkerothadás során, hogyan változik a reaktív oxigénszarmazékok eliminálásáért felelős gének expressziója. Az aszúsodáshoz hasonlóan kevés szuperoxid-dizmutáz aktiválódott szürkerothadás során (*VIT_14s0030g00910*, *VIT_14s0030g01080*, *VIT_14s0036g01320*). Az indukálódott SOD gének eltérőek, de az indukálódás mértéke mindkét fertőzésformánál jellemzően kétszerese volt a kontrollhoz képest.

A glutation peroxidáz izoformák esetében nem volt kimutatható expressziós változás, míg a katalázok expressziója a Furmint mintákban csökkent, a peroxidázok esetében azonban sokkal változatosabb a helyzet (34. ábra).

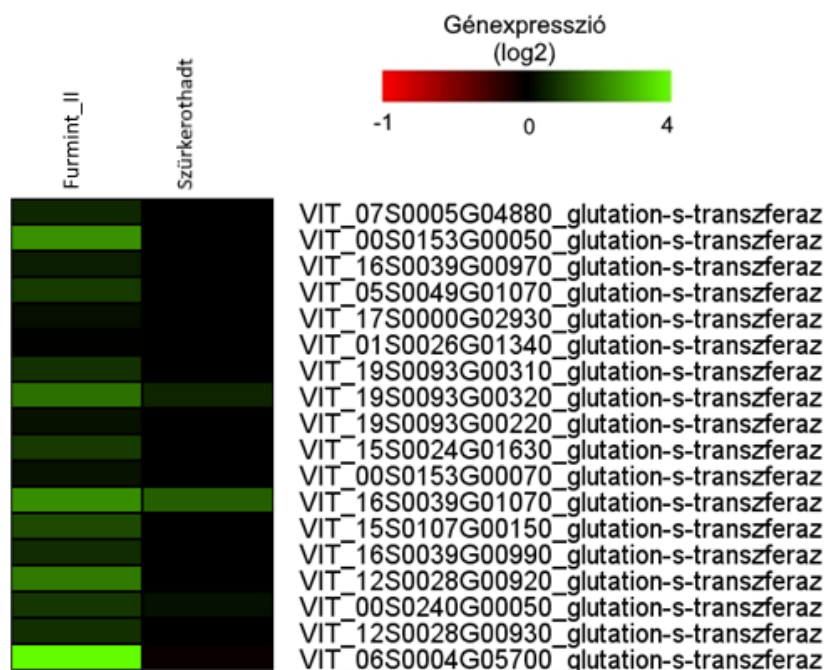
A Furmint minták vizsgálata során kiderült, hogy a peroxidázok aktív szerepet játszhatnak a hidrogénperoxid eliminálásában, ezért nem meglepő módon a szürkerothadt minták esetében is változatos az expressziójuk. 15 peroxidáz gén aktiválódik az aszúsodás során és 16 a szürkerothadás során. Az aktiválódott peroxidáz gének közül kilenc azonos. A legnagyobb pozitív expressziós változást mutató gének a lignin peroxidázok csoportjába tartoznak (*VIT_01s0010g01980*, *VIT_01s0010g01960*, *VIT_01s0010g02020*, *VIT_01s0010g01950*, *VIT_01s0010g02010*, *VIT_01s0010g02000*, *VIT_01s0010g01970*). A Furmint minták esetében mindössze egy peroxidáz gén represszálódott (*VIT_07s0191g00050*), azonban a szürkerothadt minták esetében négy gén expressziója csökkent (*VIT_18s0001g06840*, *VIT_14s0066g01850*, *VIT_18s0001g06370*, *VIT_08s0040g03150*).



34. ábra Szőlő *peroxidáz* gének expressziós értékei a Furmint II. aszúsodási fázisban és a Marselan (Kelloniemi *et al.* 2015) szürkerothadt minták esetében. Az expressziós változás \log_2 értékben van ábrázolva a kontrollhoz képest.

A legjelentősebb expressziós profil különbséget a ROS elimináló rendszerek között a *glutathion-S-transferáz*-ok génexpressziós profiljában tapasztaltam. Az aszúsodott mintáknál 18 *GST* gén aktiválódott, míg a szürkerothadt mintáknál alig négy gén (*VIT_19S0093G00320*, *VIT_16S0039G01070*, *VIT_00S0240G00050*, *VIT_06S0004G05700*). Ezeknek a géneknek az

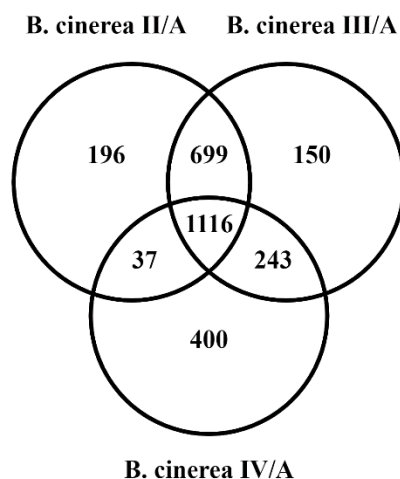
expresszió növekedése is kisebb az aszúsodott minták esetében tapasztalt 3-8 szoros változásnál (35. ábra).



35. ábra Szőlő *glutation-S-transzferáz* gének expressziós értékei a Furmint II. aszúsodási fázisban és a szürkerothadt Marselan (Kelloniemi *et al.* 2015) minták esetében. Az expressziós változás log₂ értékben van ábrázolva a kontrollhoz képest.

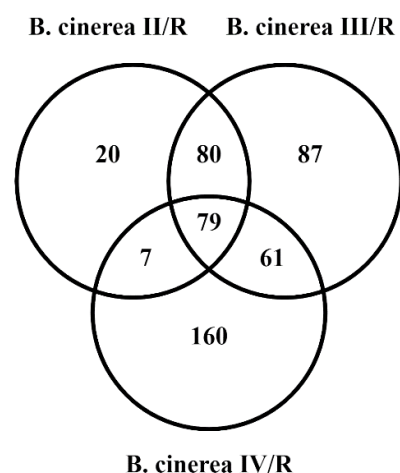
6.8. *A. B. cinerea* gomba transzkripció eredményei

A. B. cinerea transzkripció eredményei mind a négy aszúsodási fázisban (I., II., III., IV.) értékelhető eredményeket hoztak, mert a IV. aszúsodási fázisban is élő gomba található az elhalt bogyóban. A gomba gének indukcióját vagy represszióját a II., III. és IV. fázisban vizsgáltam úgy, hogy az adott fázisban kapott expressziós értékeket az I. fázisban kapott eredményekhez viszonyítottam. A három aszúsodási fázisban indukálódó és represszálódó géneket Venn diagramon ábrázoltam (36. és 37. ábra). A második fázisban az aktiválódó gének 54%-a (2048 génből), a harmadik fázisban 51%-a (2208 génből) és a negyedik fázisban pedig 62%-a (1796 génből) megegyezett az aszúsodás során. Tehát ezek a gének az aszúsodás II., III. és IV. fázisában is indukálva voltak. Ez az 1116 gén az aszúsodás során kialakult gomba transzkripció profil magját képezi. A második és harmadik fázisban további 699 aktiválódó gén egyezett meg, ami a IV. fázisban már nem volt indukálva. A III. és IV. fázisban további 243 gén indukálódott, ami a korábbi fázisokban nem volt aktív.



36. ábra A *B. cinerea* gomba aktiválódott génjeinek száma a különböző aszúsodási fázisokban Venn diagramon ábrázolva. „A”: aktiválódott.

A represszálódott gének száma töredéke az aktiválódottaknak, ami azért következhetett be, mert az aszúsodás I. fázisában a gomba többnyire konídiumos formában van jelen vagy a fertőzés nagyon korai stádiumában van, amikor a csíratömlő és appresszorium képzése zajlik. A represszálódott gének között nagy számban megtalálhatóak a *B. cinerea* virulencia faktoraiként azonosított gének (sejtfal-bontó enzimek, transzmembrán fehérjék stb). A *B. cinerea* fertőzés korai génaktivitása manapság már jól felderített terület (Blanco-Ulate *et al.* 2014, van Kan *et al.* 2006), ezért nagy biztonsággal mondhatjuk, hogy az II., III., IV. aszúsodási fázisban represszálódó gének többsége az I. fázisban történt nagy expresszióval magyarázható. Feltételezhetjük ugyanis, hogy az I. fázisból származó gombasejtek sem nyugalmi állapotú transzkripcióval rendelkeznek, hanem már indukálódtak bennük a virulencia korai faktoraik.



37. ábra A *B. cinerea* gomba represszálódó génjeinek száma a különböző aszúsodási fázisokban Venn diagramon ábrázolva. „R”: represszálódott.

A GO kifejezés dúsulási tesztet elvégezve azt az eredményt kaptam, hogy leginkább a transzport folyamatok aktiválódnak (13. táblázat). A kettes fázisban kevesebb transzport folyamat aktiválódik a hármashoz képest és azok is jellemzően aminosavak és polimerizátumok transzportjára irányulnak. Ezzel szemben a hármas fázisban jelentős mennyiségű szénhidrát, peptid és kofaktor transzport-folyamat jelenik meg. A hármas fázisban a bogyóban alig található élő növényi sejt, így a gomba tápanyagok felvételére koncentrálnak. A terpén és mikotoxin bioszintézis mindkét fázisban megjelenik, továbbá a módosított aminosavak transzportja, ami a másodlagos anyagcseretermékek szintéziséhez is szükséges. A IV. fázisban transzport folyamatok már nem aktívak, helyettük a másodlagos anyagcseretermékek bioszintézise és a DNS rekombinációja válik aktívvá. Ezek a folyamatok a konídium képzésre jellemzőek.

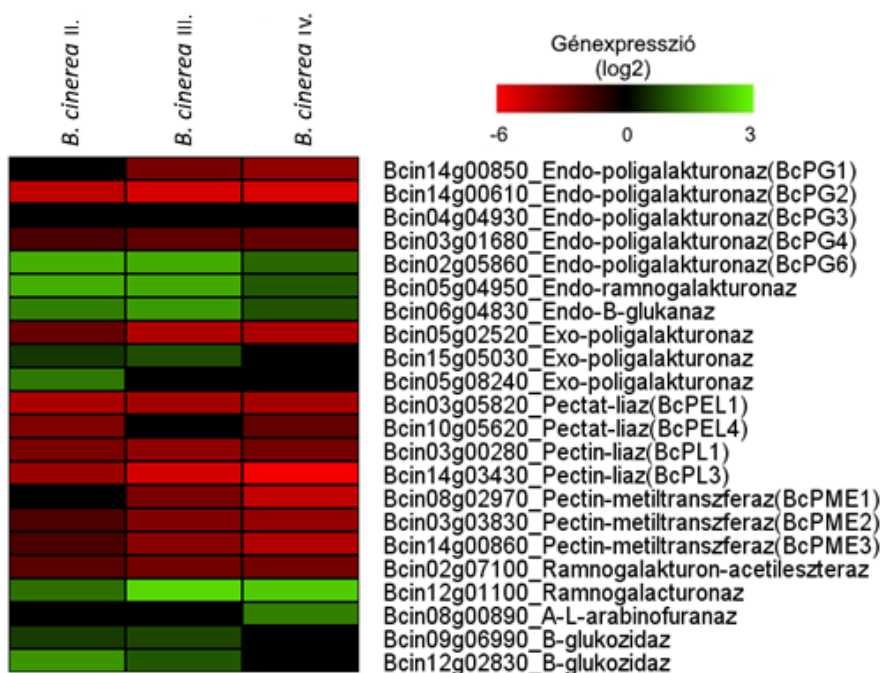
13. táblázat II. és III. aszúsodási fázisban feldúsuló biológiai folyamatokat azonosító GO kifejezések a *B. cinerea* transzkriptom mintázat eredményeiben.

II. fázisban aktiválódó folyamatok	Mindkét fázisban aktiválódó folyamatok	III. fázisban aktiválódó folyamatok
<ul style="list-style-type: none"> • Plazmamembrán transzport • Szerves hidroxil vegyület transzport • L-lizin transzmembrán transzport • Egy értékű kation transzport • Oligopeptid transzport • Arginin transzport 	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamin transzmembrán transzport • Terpén bioszintézis • Módosított aminosav transzport • Aminosav transzmembrán transzport • Mikotoxin bioszintézis 	<ul style="list-style-type: none"> • Szénhidrát import a plazmamembránon keresztül • Glükóz import • Fruktóz transzport • Mannitol transzport • Szorbitol transzport • Pentóz transzport • Mannóz transzport • Galaktóz transzport • drog transzmembrán transzport • Proton transzport • Kén vegyületek transzportja • Kofaktor transzport • Tripeptid transzport • Oligopeptid transzport • Szerves kation transzport

6.8.1. *B. cinerea* korai szénhidrát bontó génjeinek vizsgálata

Megvizsgáltam a Blanco-Ulate és munkatársai (2014) által azonosított 275 extracelluláris szignál szekvenciával rendelkező, potenciálisan a fertőzés korai szakaszában aktív szénhidrát bontó enzimet kódoló gén expresszióját (38. ábra). Az endo-poligalakturonázok csoportjából a *BcPG1*, *BcPG2*, és *BcPG4* gének mutatnak az aszúsodás későbbi fázisaiban (II., III., IV.) repressziót, míg a *BcPG6* ezzel ellentétben indukciót. A *B. cinerea* korai fertőzési szakaszában a *BcPgl* és *BcPg2*-nek van kulcsszerepe a sejtfal bontásban (Espino *et al.* 2010), mely

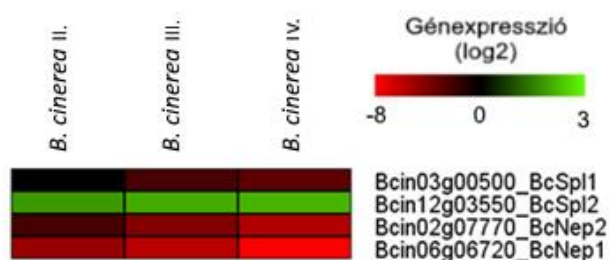
enzimeket kódoló gének esetünkben is erősen aktiválódtak, a későbbi erős represszálódásból következően. A *BcPG1* gén expressziója csak a harmadik fázisra esik vissza. Az exo-poligalakturonázok közül a *Bcin05g02520* mutat az aszúsodás korai szakaszában erős indukálódást, majd a későbbi szakaszokban repressziót. A *Bcin15g05030* és *Bcin05g08240* exo-poligalakturonáz gén aktivitása a kettes és hármas fázisban emelkedik meg. A pektin-liázok és pektát-liázok a fertőzés korai szakaszában erős expressziót mutattak, mert a későbbi szakaszokban nagyon erősen represszálódnak ezek a gének. A pektin-metilészterázok és a ramnogalakturon-acetiltransferáz esetében is hasonló az expresszió lefutása az aszúsodás során. Az endo-ramnogalakturonáz, ramnogalakturonáz és endo- β -glukanáz expressziói az eddig bemutatott szénhidrát bontó enzimeket kódoló gének expressziójától eltérően jelentősen aktiválódnak az aszúsodás II., III. IV. fázisaiban az I. fázishoz képest. A β -glükozidázok (*Bcin09g06990* és *Bcin12g02830*) a II. és III. fázisban, az α -arabinofuranozidáz-t kódoló gén pedig a IV. fázisban indukálódik.



38. ábra A fertőzés korai stádiumában indukálódó szénhidrát bontó enzimek közül (Blanco-Ulate *et al.* 2014) a Furmint mintákban változó expressziós értéket mutató *B. cinerea* gének expressziós értékeinek összefoglalója. Az egymást követő aszúsodási fázisokat római számokkal jelöltem (II., III., IV.). A transzkriptumszint változásokat az ép (tünetmentes) bogyóban detektált génkifejeződés mértékéhez viszonyítottam.

6.8.2. Növényi sejthalált indukáló gének vizsgálata

A növényi sejthalált indukáló, *B. cinerea* által termelt korai kiválasztott fehérjék génjeinek működését a 39. ábrán mutatom be. A cerato-platanin fehérjéket kódoló gének közül a *BCSpl1* gén expressziója csökken a III. és IV. fázisban, ami arra utal, hogy a fertőzés korai szakaszában volt aktív szerepe. A *BcSpl2* gén expressziója a kontrollhoz képest az aszúsodás folyamán végig magas értéken marad. Az azonosított két *Nep* (nekrózis és etilén indukciós faktor) gén közül mindkettő nagyon erős represszálódást mutat a II., III. és IV. fázisokban.



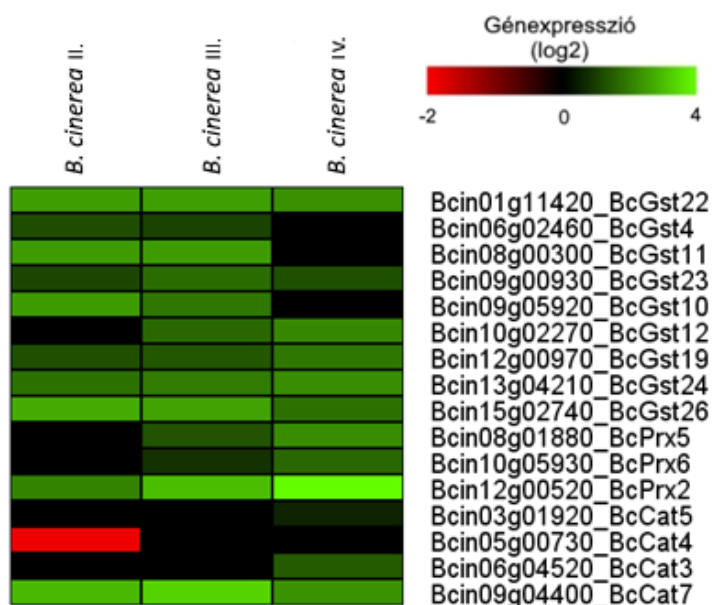
39. ábra A *B. cinerea* cerato-platanin (*Spl*) és nekrosis és etilén indukciós faktor (*Nep*) gének expressziós értékei a Furmint aszúsodása során. Az egymást követő aszúsodási fázisokat római számokkal (II., III., IV.) jelöltem.

6.8.3. ROS elimináló gének vizsgálata

A *B. cinerea*-nak a fertőzése során fellépő extrém oxidatív környezetet kell túlélnie, mely kivédésére ROS elimináló enzimek expresszióját megnöveli. A Furmint aszúdosása során a *B. cinerea* ROS elimináló folyamatok kulcsenzimeinek génexpressziós mintázatát az 40. ábrán mutatom be. A gomba genomjában négy szuperoxid-dizmutázt azonosítottak, de egyik gén expressziója sem változik meg az aszúsodás alatt. Tíz katalázt azonosítottam, melyek közül a *BcCat7* mind a három aszúsodási fázisban magas szinten expresszálódik, a *BcCat3* és *BcCat5* expressziója pedig csak a negyedik fázisban emelkedik meg. A *BcCat4* expressziója a második fázisban represszálódik. Kilenc peroxidáz enzimet azonosítottam, melyből három expressziója emelkedett meg az aszúsodás során. A *Bcprx2* gén expressziója már a második aszúsodási fázisban megemelkedik és a későbbi fázisokban egyre magasabb értéket vesz fel. A *Bcprx5* és *Bcprx6* gének expressziója csak a harmadik fázisban kezd el emelkedni, de hasonlóan a *Bcprx2*-höz ezeknek is a negyedik fázisban a legmagasabb a kifejeződésük.

Glutation-S-transzferázt kódoló génből 27-et sikerült azonosítanom a gomba genomjában. Ezek közül ötnek volt mind a három aszúsodási fázisban magas az expressziós értéke (*Bcgst22*, *Bcgst23*, *Bcgst19*, *Bcgst24*, *Bcgst26*). A *Bcgst4*, *Bcgst11* a második és a harmadik, míg a *Bcgst12* génnek a harmadik és negyedik fázisban emelkedik az expressziója. Tehát az

azonosított *glutation-S-transzferáz* izoformák közel 30% indukálódott a Furmint aszúsodása során.

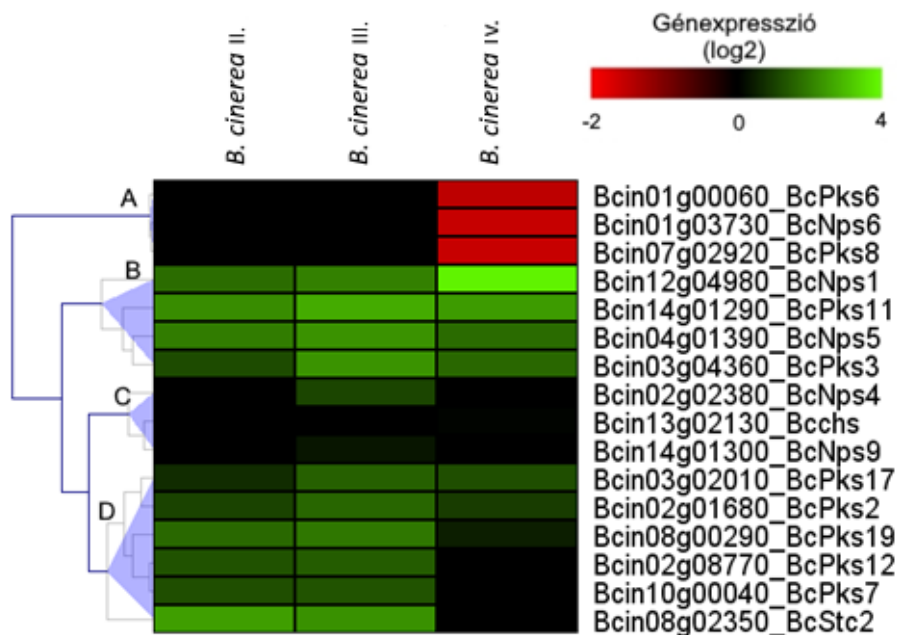


40. ábra A *glutation-S-transzferáz*, *peroxidáz* és *kataláz* enzimeket kódoló gének expressziós változása az aszúsodás során a *B. cinerea*-ban. GST: *glutation-S-transzferáz*, PRX: *peroxidáz*, Cat: *kataláz*. Az egymást követő aszúsodási fázisokat római számokkal (II., III., IV.) jelöltem.

6.8.4. A *B. cinerea* másodlagos anyagcsere gének

A *B. cinerea* másodlagos anyagcsere-termékeinek szintéziséért 44 kulcsenzim tehető felelőssé (Collado 2015). Ezeket az enzimeket kódoló géneknek az expresszióját megvizsgáltam a Furmint aszúsodott bogyó mintákban. Tizenhat génnél találtam szignifikáns változást akár pozitív akár negatív irányban. Ezek a gének a következő csoportba tartoznak: öt nem riboszómális peptid-szintetáz (*BcNps*), kilenc poliketid-szintáz (*BcPks*), egy szeszkviterpén-cikláz (*BcStc*) és egy kalkon-szintáz (*BcChs*) (41. ábra). Az „A” klaszter elemei a negyedik, tehát az utolsó aszúsodási fázisban mutatnak csak represszálódást, ami arra utal, hogy a korábbi aszúsodott fázisokban magas volt az expressziójuk. Ebbe a klaszterbe tartozik a *BcPks6* gén, ami a gomba által termelt fitotoxin, a botciniksav szintézisének egyik kulcsenzime (Dalmais *et al.* 2011). A *BcNps6* gén szintén az A klaszterbe tartozik és a koprogén sziderofór vegyület kialakításáért felelős, mely nélkülözhetetlen a Fe^{3+} ionok felvételében (Bushley and Turgeon 2010). A klaszter utolsó tagja a *Bcpks8* funkciója jelenleg nem ismert. A „B” klaszter elemeire jellemző, hogy mind a három aszúsodási fázisban magas szinten expresszálódnak. Jelenleg egyedül a *BcPks3* gén termékéről van némi információnk, miszerint a poliketid-szintáz ismeretlen eredetű aminosavakat tartalmaz (PKS-NRPS keverék) (Collado 2015). A „C”

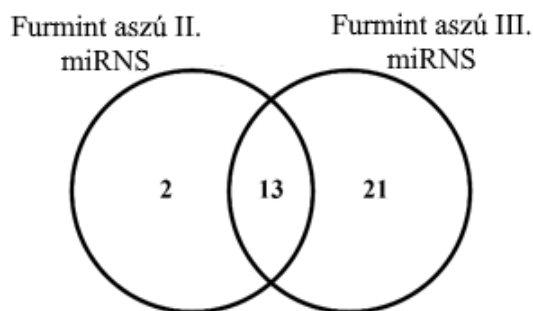
klaszterbe tartozó gének expressziója a harmadik aszúsodási fázisban emelkedik meg enyhén. A *BcNps4* és *BcNps9* gének funkciójáról nincsen információ, azonban a *BcChs* gén a piron termelésben vesz részt. A „D” klaszter elemei jellemzően a kettes és hármas fázisban aktívak és a negyedik fázisra csökken az epxressziójuk. A *BcPks7* a melanin szintéziséért felelős gén. A többi poliketid-szintáz (*BcPks17*, *BcPks2*, *BcPks19*, *BcPks12*) szerepe egyelőre tisztázatlan. A klaszter utolsó tagja a *BcStc2*, ami egy szeszkviterpén-cikláz.



41. ábra A *B. cinerea* gomba másodlagos anyagcseretermékeiért felelős enzimeket kódoló gének expressziós értékei az aszúsodás során. Pks-poliketid-szintáz, Nps-nem riboszómális peptid szintáz, Chs-kalkon-szintáz, Stc-szeszkviterpén-cikláz.

6.9. Kis RNS szekvenálás eredménye

Az kis RNS szekvenálása során azonosítottam 36 *V. vinifera* kis RNS variánst (21 miRNS főcsoport), amelyek eltérően fejeződnek ki az aszúsodás folyamata alatt (42. ábra). Az vizsgálat során a transzkriptom analízishez hasonlóan csak a kettes és hármas aszúsodási fázist vizsgáltam. A kettes fázisban 15 kis RNS expressziója változott, amiből kilencnek nőtt a mennyisége. A hármas fázis esetében 34 kis RNS-ből 19 expressziója nőtt meg szignifikánsan.



42. ábra *V. vinifera* eltérő expressziót mutató kis RNS-ek száma az aszúsodás során.

Az miRNS-ek célszekvenciájának prediktálása a psRnaTarget szerver segítségével történt (Dai *et al.* 2018). A vizsgálat során csak azokat a találatokat vettem számításba, melyeknek a hasonlósági értéke a célszekvencia és a kis RNS között kevesebb, mint három volt és a maximális hozzáférhetőségi energiája kisebb, mint 25. Az azonosított kis RNS-eket először a *V. vinifera* majd a *B. cinerea* cDNS könyvtárára illesztettem.

A kettes aszúsodási fázisban megnövekedett expressziót mutató kis RNS-ek célgénjei között van két kis RNS biogenezishez köthető gén (*VIT_15s0021g02580*, *VIT_17s0000g04440*), egy feltételezhetően NB-LRR fehérjét kódoló gén (*VIT_13s0067g00790*) és egy HD-Zip transzkripciósfaktor (*VIT_06s0004g02800*) (14. táblázat, részletes eredmények M. 8 táblázat). Ezeknek az azonosított célgéneknek az expressziója 1,7-2,5 érték között csökken a II. aszúsodási fázisban a kontrollhoz képest (14. ábra, 2. oszlop).

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

14. táblázat *V. vinifera* eredetű miRNS-ek szőlő célgénjei és azok funkciói a II. aszúsodási fázisban.

<i>V. vinifera</i> gén azonosító	Vv. gén expressziós változás II. fázisban	Gén funkció	Kis RNS azonosító	Kis RNS expressziós változás II. fázisban
<i>VIT_15s0021g02580</i>	-2,0	Kis RNS biogenezishez köthető gén, CCR4-„nem transzkripciósfaktor” komplex	<i>VvmiR396b</i>	2,4
			<i>VvmiR396a</i>	2,2
			<i>VvmiR396d</i>	2,4
<i>VIT_13s0067g00790</i>	-1,9	Rezisztenciához köthető gén, NB-LRR gén	<i>VvmiR3632-3p</i>	2,3
			<i>VvmiR166a</i>	1,5
<i>VIT_06s0004g02800</i>	-2,5	HD-Zip transzkripciósfaktor	<i>VvmiR166a</i>	1,5
<i>VIT_17s0000g04440</i>	-1,7	Kis RNS biogenezishez köthető gén	<i>VvmiR396b</i>	2,4
			<i>VvmiR396a</i>	2,2
			<i>VvmiR396d</i>	2,4
<i>VIT_19s0177g00260</i>	3,5	Szerin/treonin-protein kináz aktivitás	<i>VvmiR408</i>	-3,2

A harmas fázisban megnövekedett expressziót mutató azonosított kis RNS-ek célgénjei között van több transzkripciósfaktor is (15. táblázat, részletes eredmények M. 8 táblázat). Három GRAS családba, kettő HD-Zip családba, kettő SBP családba tartozó és egy MYB transzkripciósfaktor családba tartozó gén. Az egyes TF családok csendesítéséért jellemzően néhány kis RNS felelős, így a GRAS családot a *VvmiR171b* és a *VvmiR171i*, a HD-Zip TF családot a *VvmiR166a*, az SBP TF családot a *VvmiR156b* és a MYB családot a *VvmiR159c* csendesíti (15. táblázat). A TF-ok csendesítésének hatására az expressziójuk 1,6-4,7-szer alacsonyabb, mint a

kontroll mintákban (15. ábra, 2. oszlop). A kettes fázishoz hasonlóan megjelennek a kis RNS biogenezishez köthető gének (*VIT_15s0021g02580*, *VIT_17s0000g04440*) és az NB-LRR receptor típusú fehérjét kódoló gén (*VIT_13s0067g00790*) csendesítéséért felelős kis RNS-ek. A harmadik fázisban azonosított kis RNS-ek között nem sikerült olyan azonosítani, aminek expressziója csökken és a célszekvencia prediktálás során számításba lehetne venni.

15. táblázat *V. vinifera* eredetű miRNS-ek szőlő célgénjei és azok funkciói a III. aszúsodási fázisban.

V. vinifera gén azonosító	Vv. gén expressziós változása III. fázisban	Gén funkció	Kis RNS azonosító	Kis RNS expressziós változása III. fázisban
<i>VIT_02s0154g00400</i>	-1,6	GRAS transzkripció faktor	<i>VvmiR171b</i>	2,2
			<i>VvmiR171i</i>	3,6
<i>VIT_04s0023g01380</i>	-2,4	GRAS transzkripció faktor	<i>VvmiR171b</i>	2,2
			<i>VvmiR171i</i>	3,6
<i>VIT_15s0048g00270</i>	-2,8	GRAS transzkripció faktor	<i>VvmiR171b</i>	2,2
			<i>VvmiR171i</i>	3,6
<i>VIT_15s0021g02580</i>	-2,0	Kis RNS biogenezishez köthető gén, CCR4–nem transzkripció komplex	<i>VvmiR396b</i>	3,2
			<i>VvmiR396a</i>	2,9
			<i>VvmiR396d</i>	2,8
<i>VIT_13s0019g04320</i>	-2,2	HD–Zip transzkripció faktor	<i>VvmiR166a</i>	2,3
<i>VIT_06s0004g02800</i>	-4,7	HD–Zip transzkripció faktor	<i>VvmiR166a</i>	2,3
<i>VIT_11s0065g00170</i>	-1,9	SBP Transzkripció faktor	<i>VvmiR156b</i>	2,6
<i>VIT_13s0067g00790</i>	-2,3	Rezisztenciához köthető gén, NB–LRR gén	<i>VvmiR3632-3p</i>	2,5
<i>VIT_14s0068g01780</i>	-1,9	SBP Transzkripció faktor	<i>VvmiR156b</i>	2,6
<i>VIT_13s0019g03630</i>	-1,8	Nem karakterizált	<i>VvmiR395k</i>	4,3
<i>VIT_07s0191g00220</i>	-6,9	Nem karakterizált	<i>VvmiR396b</i>	3,2
			<i>VvmiR396a</i>	2,9
			<i>VvmiR396d</i>	2,8
<i>VIT_17s0000g04440</i>	-2,5	Kis RNS biogenezishez köthető gén	<i>VvmiR396b</i>	3,2
			<i>VvmiR396a</i>	2,9
			<i>VvmiR396d</i>	2,8
<i>VIT_19s0090g00590</i>	-1,9	MYB transzkripció faktor	<i>VvmiR159c</i>	1,6
<i>VIT_01s0011g01130</i>	-1,6	Nem karakterizált	<i>VvmiR159c</i>	1,6

A *V. vinifera*-ban azonosított kis RNS-eket illesztettem a *B. cinerea* genomra is, azt vizsgálva, hogy a növény-gomba kölcsönhatás során létrejöhet-e a szőlő kis RNS-ek által *B. cinerea*-ban géncsökkentés. A kettes fázisban mindössze egy, a hármas fázisban két célgén tudtam azonosítani. A kettes fázisban az azonosított kis RNS feltételezhető célgénje a gomba *Bcin07g05140* génje, mely egy dajkafehérje (hősokkfehérje) (16. táblázat, részletes eredmények M. 8 táblázat). A hármas fázisban a kettes fázisban azonosított dajkafehérjén túl a *Bcin09g00540* gént is azonosítottam, ami a mitokondriumban lokalizálódó NADH-

dehidrogenáz enzimet kódolja (17. táblázat, részletes eredmények M. 8 táblázat). A NADH-dehidrogenáz funkcióját tekintve az elektrontranszportlánc első lépéséért felelős, redukálja a kinont kinollá NADH segítségével.

16. táblázat *V. vinifera* eredetű miRNS-ek *B. cinerea* célgénjei és azok funkciói a II. aszúsodási fázisban.

<i>B. cinerea</i> gén azonosító	<i>B. cinerea</i> gén expressziós változás a II. fázisban	Gén funkció	Kis RNS azonosító	Kis RNS expressziós változás II. fázisban
<i>Bcin07g05140</i>	-2,1	Hősokkfehérje	<i>VvmiR3633a-3p</i>	2,3

17. táblázat *V. vinifera* eredetű miRNS-ek *B. cinerea* célgénjei és azok funkciói a III. aszúsodási fázisban.

<i>B. cinerea</i> gén azonosító	<i>B. cinerea</i> gén expressziós változás a III. fázisban	Gén funkció	Kis RNS azonosító	Kis RNS expressziós változás III. fázisban
<i>Bcin07g05140</i>	-2,0	Hősokkfehérje	<i>VvmiR3633a-3p</i>	2,0
<i>Bcin09g00540</i>	-1,3	NADH dehidrogenáz (Kinon)	<i>VvmiR3530-3p</i>	3,3

6.10. Illatanyag gyűjtés az aszúsodott és szürkerothadt szőlőfürtökről

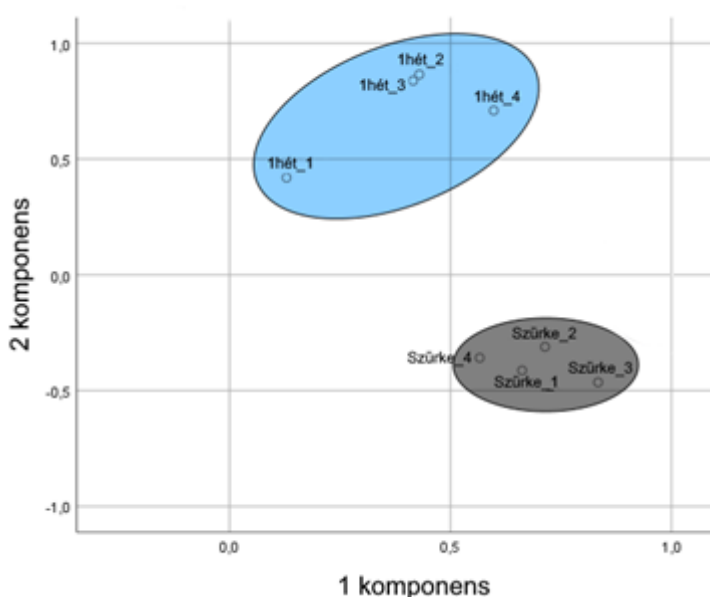
Az aszúsodás klímakamrában történő modellezése során intakt, egész Furmint szőlőfürtöket használtam mintáknak (43. ábra „A”). A gyűjtött fürtöket a kísérlet megkezdése előtti napon *B. cinerea* konídium szuszpenzióval kezeltem és 24 órán keresztül benedvesített zárt dobozban tároltam őket 21 °C-on. Ezt követően kerültek klímakamrába, ahol az aszúsodásra jellemző klimatikus viszonyokat teremttem (1. ábra). Az aszúsodással párhuzamosan ugyanilyen hőmérsékleti profil mellett, de folyamatosan magas relatív páratartalmat fenntartva szürkerothadt szőlőfürtöket is előállítottam. A szürkerothadás kialakulása annyira gyors, hogy egy hét elteltével a szőlőfürtöt befedték a gombaképletek, erős ecetes és alkoholos szaga volt. Az első hét elteltével az aszúsodást mutató szőlőfürtökről és a szürkerothadtakról (43. ábra „B” és „D”) illatanyag gyűjtést végeztem.

Az aszúsodott szőlőfürtöket az illatanyag leszívást követően visszahelyeztem a klímakamrában és további két héten keresztül tartottam szabályozott aszúsodásra jellemző klimatikus körülmények között. A mintaszedéstől számított harmadik héten a szőlőfürt nemesrothadásra jellemző morfológiai tüneteket mutatott (43. ábra „C”). Megfigyelhető volt a mozaikos bogyó töppedés, gomba micélium nem vagy csak alig volt látható, ecetes illat nem volt tapasztalható.



43. ábra Aszúsodott és szürkerothadt illatanyag meghatározáshoz felhasznált, *B. cinerea* konídium szuszpenzióval kezelt Furmint szőlőfürtök. A: érett egészséges szőlőfürt, B: 1 hete aszúsodó szőlőfürt, C: 3 hete aszúsodó szőlőfürt, D: szürkerothadt szőlőfürt.

A szőlőfürtök légteréből 4 órás dinamikus illatanyaggyűjtést végeztem 4-4 ismétlésben. A szőlőfürtökről gyűjtött illatanyag mintákat GC-MS műszerrel vizsgáltam. A kromatogramokat kiértékelve 35 csúcs érte el a küszöbértéknek számító össz csúcsterület 1% -t és ezek közül 32 vegyületet sikerült azonosítanom. Főkomponens elemzést végeztem az adatokkal (44. ábra). Az elemzés során jól elkülönülve klasztereződnek a különböző típusú minták. A szürkerothadtak közel klasztereződnek egymáshoz, aminek az oka, hogy nagymennyiségű gombától illetve egyéb mikrobától származó illatanyaggal egészül ki a növényi illatanyag mindkét esetben.



44. ábra Klímakamrában modellezett szürkerothadt és egy hete aszúsodó szőlőfürtök illatanyag komponenseinek főkomponens elemzése. Kék: 1 hete aszúsodó szőlőfürt, szürke: szürkerothadt.

Az aszúsodott és szürkerothadt illatanyag profil komponenseit tekintve hasonlóak. Mindkét mintatípusnál többféle alifás alkohol, monoterpén és aromás vegyületek jelentek meg. Jelentős mennyiségben vannak a karbonsav származékú illatanyag komponensek, amik sejtmembrán sérülés hatására jelennek meg (17. táblázat). Az azonosított csúcsok csúcs alatti területeit a belső standardhoz viszonyítva normalizáltam. Ennek köszönhetően a különböző mintákban azonosított csúcsok csúcs alatti területei összevethetőek (45. ábra) és következtethetünk az adott vegyületek mennyiségére.

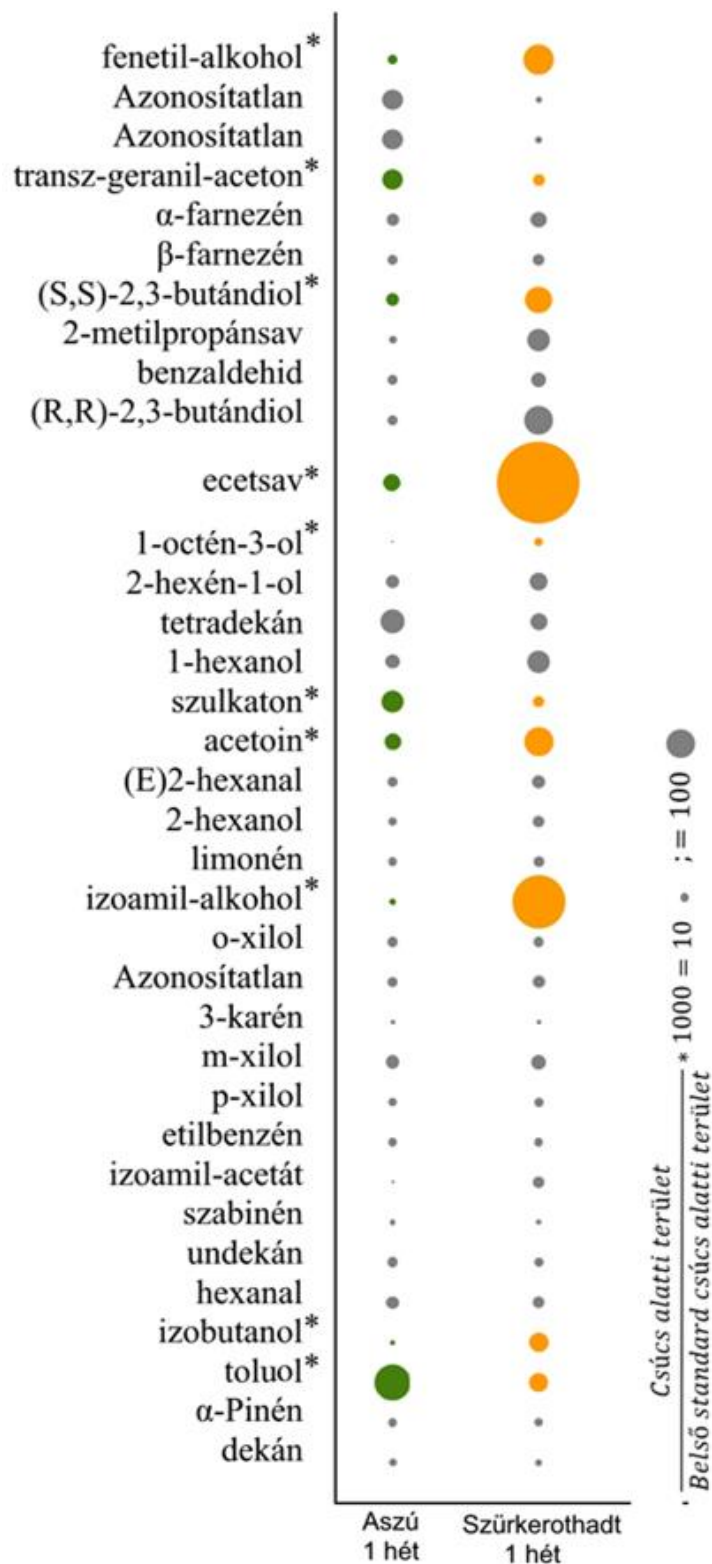
Statisztikai elemzés során kilenc komponens mennyisége különbözött szignifikánsan az eltérő minta típusokban. Ezek közül a fenetil-alkohol, [S,S]-2,3-butándiol, esetsav, 1-oktén-3-ol,

acetoin, izoamil-alkohol és izobutanol mennyisége szignifikánsan nagyobb volt a szürkerothadt mintákban. A transz-geranil-aceton, szulkaton, és toluol vegyületek mennyisége az egy hete aszúsodó mintákban emelkedett meg.

18. táblázat Az aszúsodott és szürkerothadt minták illatanyag komponenseinek csoportosítása.

Alifás alkán: dekán, undekán, tetradekán
Alifás alkohol: 2-hexén-1-ol, 1-oktén-3-ol, [R,R]-2,3-butándiol, [S,S]-2,3-butándiol, Izobutil-alkohol, izoamil-alkohol, 2-hexanol, 1-hexanol
Alifás aldehid: hexanal, 2-hexenal
Alifás keton: acetoin
Alifás észter: izoamil-acetát
Alifás karbonsav: ecetsav, 2-metil-propánsav
Aromás: toluol, etilbenzén, benzaldehid, p-xilol, m-xilol, o-xilol, fenetil-alkohol
Monoterpén: α -pinén, szabinén, limonén, 3-karén, transz-geranil-aceton, szulkaton
Szeszkviterpén: α -farnezen, β -farnezen

Szeszkviterpének nem jellemző szőlő illatanyagok és az, hogy mindkét minta típusban megjelentek azt sugallja, hogy vagy a gomba váltotta ki a termelődésüket vagy gomba eredetű illatanyagról van szó. Az ecetsav mennyisége a szürkerothadt mintákban egy nagyságrenddel nagyobb, ez a megtelepedett ecetsav baktériumoknak tulajdonítható. Az 1-oktén-3-ol gomba eredetű illó komponens. A szürkerothadt minták esetében a mennyisége szignifikánsan nagyobb volt. Az izoamil-alkohol mennyisége jelentősen megnövekedett a szürkerothadt mintákban, ami az ecetsavhoz hasonlóan a másodlagosan megjelenő mikrobákhoz köthető. Az általuk okozott anaerob erjedés során keletkezhetett az izoamil-alkohol.



45. ábra Szürkerothadt és egy hete aszúsodó szőlőfürtök illatanyagkomponenseinek mennyiségi összehasonlítása. Zöld (1 hete aszúsodó) és narancssárga (szürkerothadt) színnel jelöltem a szignifikáns vegyületek mennyiség jelző korongjait. „*” jelöli azokat a vegyületeket, ahol szignifikáns a különbség ($p < 0,05$).

7. Eredmények megvitatása és következtetések

7.1. *B. cinerea* biomassza eredmények megvitatása

A *B. cinerea* gomba biomassza ELISA alapú meghatározása során nyert eredmények összhangban állnak a totál transzkriptom szekvenálás *B. cinerea* referencia cDNS adatbázisra illesztett eredményével (9., 12. ábra). Mindkét technikával nagyon kis mennyiségben mutattam ki a gombát az első fázisba tartozó bogyókon. A második és harmadik fázisban a *B. cinerea* mennyisége az ELISA módszer szerint és a leolvasott szekvenciák szerint is egyre nagyobb mennyiségben található meg a szőlőbogyókban. A negyedik aszúsodási fázisban mért biomassza mennyiség enyhén csökken a harmadikhoz képest, amit a szekvencia illesztés módszerrel nem tapasztalunk. Az elmaradt csökkenés abból adódik, hogy a növényi sejtek elhaltak, így szinte csak gombaeredetű nukleinsav szekvenciákat tartalmaztak a minták. A szőlőbogyó szöveteinek külön vizsgálata sikeresen növelte az ELISA technika érzékenységét, így 2017-ben már sikeresen kimutattam a bogyó felszínén is a *B. cinerea*-t (9. ábra). A kísérletből bebizonyosodott, hogy a gomba az aszúsodás előrehaladtával a bogyó húzába koncentrálódik, és a héjban csökken a mennyisége.

7.2. Szőlőbogyó élősövet eredmények megvitatása

A szőlőbogyó élősövet vizsgálata során kapott eredmények jól korrelálnak a totál transzkriptom szekvenálás *V. vinifera* referencia cDNS adatbázisra illesztett eredményeivel (10., 12. ábra). Mindkét mérési módszer tapasztalatai alapján az a következtetés vonható le, hogy a második fázisra az élő szőlősejtek mennyisége lecsökken, a harmadik fázisra pedig szinte alig marad élő sejt a bogyó héjban és húzában. A negyedik aszúsodási fázisban a szekvenált leolvasási szekvenciák (read-ek) alig 5%-a illeszkedett a referencia cDNS adatbázisra, az élősövet vizsgálat során pedig a negyedik fázisban lévő bogyó héjában és húzában nem volt értékelhető intenzitású fluoreszcencia jel kimutatható. Ez azért történhetett, mert a negyedik aszúsodási fázisban már csak a magban található élő növényi sejtek, ezeknek tulajdonítható a negyedik fázisban észlelt 5 százaléknyi szőlő read. A magok azonban az élősövet vizsgálat során már el lettek távolítva.

7.3. Furmint totál transzkriptom szekvenálási eredmények megvitatása

A Furmint szőlőbogyók aszúsodását célzó transzkripció vizsgálat során kiderült, hogy növény-gomba interakcióról csak az első három aszúsodási fázisban beszélhetünk, mert a negyedik fázisra a növényi sejtek elhaltak (10. ábra). A kettes és hármas fázisban hasonló biológiai folyamatok játszódnak le a növényi sejtekben, ami a gomba lassú penetrációja miatt lehetséges (16., 17. ábra).

7.3.1. Hősokkfehérje gének expressziós eredményeinek megvitatása

A Furmint minták növényi transzkriptom szekvenálási eredményein végzett biológiai folyamatok dúsulási tesztje során a fehérje oligomerizációs folyamat szignifikánsan aktíválódott (18. ábra). A folyamatban résztvevő, többnyire nem ATP-függő kis hősokkfehérjék a „holdáz”-ok vagy dajkafehérjék. A holdázok a natív fehérjéhez kapcsolódva átmeneti rezervoárt alkotnak, hogy a fehérje ne tekeredjen fel, amíg el nem éri célállomását. A későbbi feltekeredéshez már ATP-függő dajkafehérjékre van szükség (Park és Seo 2015). A Furmint mintákban főleg az I. és II. csoportba tartozó nem ATP-függő dajkafehérjék expressziója nőtt meg, melyek elősegítik a biotikus és abiotikus stressz elleni védekezést (McLouglin *et al.* 2016). A II. hősokkfehérje csoportba tartozó gének expressziója magasabb, mint a többi kis hősokkfehérje expressziója. Elképzelhető, hogy ennek a csoportnak a szerepe nagyobb a biotikus stressz elleni védekezésben. Erre utal, hogy Kuang és munkatársai (2017) igazolták, hogy a II. osztályba tartozó kis hősokkfehérje csendesített *Oryza meyeriana*-ban a patogének elleni válasz reakciója kisebb, ahogy a só és hő elleni toleranciájuk is gyengébb.

7.3.2. ROS elimináló gének expressziós eredményeinek megvitatása

A glutation-s-transzferáz gének expressziós profiljának vizsgálata során (19. ábra) kiemelkedett a *VIT_06S0004G05700* gén, melynek mindkét aszúsodási fázisban a legmagasabb az expressziós értéke. Ez a gén a Tau glutation-s-transzferáz családba tartozik, melyekre jellemző, hogy hidegre, dehidratációra, erős UV hatásra, só stresszre, nehézfémekre és oxidatív stresszre megnő az expressziójuk (Dixon *et al.* 2009). Manapság új funkciót társítanak a Tau család egyes tagjaihoz. Martinez-Márquez és munkatársai (2017) bizonyították, hogy a Tau GST enzimek részt vesznek a transz-rezveratrol extracelluláris transzportjában. Mivel az esetünkben nagy aktivitást mutató *VIT_06S0004G05700* génről nem rendelkezünk további ismeretekkel, de az erősen indukálódó sztilbén bioszintézis miatt elképzelhető, hogy ezek szállításában vesznek részt. A GST gének specifikus aktíválódást mutatnak nemesrothadás során, ami szürkerothadás vagy zsendülés állapotában lévő bogyókban nem tapasztalható (Blanco-Ulate *et al.* 2015, Kelloniemi *et al.* 2015).

A nekrotróf gombák elleni növényi védekezés egyik kulcslépése a behatolás körül lokális ROS termelés. Ennek létrejöttében szőlő esetében kulcsfontosságú a H₂O₂ termelő *VvGLP3* (*germin-like protein 3*) és a szuperoxidot generáló *VvRbohD* gének (Godfrey *et al.* 2007, Dubreuil-Maurizi *et al.* 2010). Az érett szőlőbogyók esetében *B. cinerea* fertőzés hatására nem volt detektálható szignifikáns *VvGLP3* gén indukálódás, a *VvRbohD* expresszió viszont kissé megnőtt a korai szakaszban. Ezzel szemben a *B. cinerea* fertőzésre gyakorlatilag ellenálló,

zsendülés állapotában lévő szőlőbogyókban 24-48 óra alatt több mint tízszeresére emelkedik ezeknek a géneknek az expressziója (Kelloniemi *et al.* 2015).

7.3.3. Furmint másodlagos anyagcseretermékek szintézis eredmények megvitatása

A nemesrothadás indukálja a sikimát és fenilpropanoid metabolizmusból származó fenolos vegyületek felhalmozódását. Ez magyarázatot ad a botritizálódott fehér borok magasabb polifenol tartalmára a nem botritizálódott borokkal szemben (Nikfardjam *et al.* 2006). A fenolos komponensek kulcsszerepet játszanak a borok ízvilágában, aromájukban, színükben és egészségmegőrző szerepükben (Waterhouse 2002). A növény-patogén interakcióban a fenolos vegyületek antimikrobiális és antioxidáns képességüknél fogva védik a szőlőbogyót (Teixeira *et al.* 2013).

A fenilpropanoid útvonal első lépését, a fenilalanin nem oxidatív deaminációját a *VvPAL* enzimek végzik. A Furmint nemesrothadása során a *VvPAL* gének egy része erősen indukálódnak (21. ábra). Ez különösen érdekes eredmény, mert fehér szőlőben a *VvPAL* gének nem expresszálódnak vagy csak nagyon alacsony szinten (Boss *et al.* 1996). A nemesrothadás során tíz *VvPAL* gén expressziója növekedett meg 1-3 (\log_2) értékkel, míg szürkerothadás esetén az indukciójuk kisebb volt vagy el is maradt (Kelloniemi *et al.* 2015, Haile *et al.* 2020). A *VvC4H* és *Vv4CL* enzimek elengedhetetlenek a fenilpropanoid útvonal további, egymásra épülő metabolikus folyamataiban. A *VvC4H* és *Vv4CL* megnövekedett expressziós szintjét fehér szőlő nemesrothadása során már korábban igazolták (Blanco-Ulate *et al.* 2015). A korábbi eredményekhez hasonló mértékű indukálódás figyelhető meg az aszúsodott Furmint minták és szürkerothadt mintáknál is (Agudelo-Romero *et al.* 2015, Kelloniemi *et al.* 2015). Ismert összefüggés, hogy az oxidatív stressz növényekben a fenilpropanoid útvonal aktiválódását bekapcsolja (Cheynier *et al.* 2013). Így a *B. cinerea* fertőzés okozta megemelkedett ROS koncentráció magyarázatot ad, hogy miért aktiválódik mindkét fertőzésformában a központi fenilpropanoid útvonal. A lignin bioszintézishez vezető út a p-kumarilsav *VvC3H* enzim által katalizált hidroxilációjával ágazik le. Az így keletkező kávéssav a kávéssav-3-O-metiltranszferáz (COMT) segítségével metileződés közben ferrulasavvá alakul. A Furmint nemesrothadása során a *VvC3H* gének expressziója nem változik vagy represszálódnak, hasonlóan más nemesrothadásos és szürkerothadásos mintákhoz (Blanco-Ulate *et al.* 2015, Kelloniemi *et al.* 2015). Azonban a zsendülésben lévő szőlőbogyókban *B. cinerea* fertőzése hatására közel háromszorosára emelkedett a *VvC3H* expressziója (Kelloniemi *et al.* 2015). Az érett szőlőbogyók csökkent *VvC3H* aktivitása feltehetőleg alacsony lignin bioszintézissel is jár, így a sejtfal erősítési mechanizmus elmaradása is hozzájárul a *B. cinerea*-val szemben

megnövekedett fogékonyságukkal. A *VvCOMT* gének szőlőben többnyire gátoltak *B. cinerea* fertőzés hatására, azonban kiemelkedik a *VIT_02s0025g02940* gén aktivitása, amely 5,4-6,3 (log₂)-szeres növekedést mutat nemesrothadás fertőzésforma esetében. A *VIT_02s0025g02940* gén 3-O-metiltransferáz aktivitásán túl kén tartalmú illó és aroma komponensek bioszintézisében is részt vesz. Így elképzelhető hogy ez a gén is szorosan összefügg a botritizálódott borok egyedi aromaösszetételének kialakításával.

A Furmint aszúsodása során a sztilbén-szintáz-t kódoló gének expressziója megnövekedik a szőlőbogyókban, hasonlóan más nemesrothadt mintákban tapasztaltakhoz (Blanco-Ulate *et al.* 2015). A sztilbén-szintáz-ok aktivátoraként számoltatott *VvMYB14* és *VvMYB15* transzkripciós faktorok indukciója csak nemesrothadásakor figyelhető meg (25. ábra), szürkerothadás esetén nem (Höll *et al.* 2013). Ez összhangban van azzal a ténnyel, hogy a nemesrothadás során több *sztilbén-szintáz* gén is jelentősen indukálódik.

A *VvCHI* gének kulcsfontosságúak a flavonoidok bioszintézisében. A Furmint aszúsodása során *VvCHI* gének közül enyhe indukciót mutatott a *VIT_13s0067g03820* (M. 5. táblázat), ami szintén megfigyelhető volt más nemesrothadt minták esetében is (Blanco-Ulate *et al.* 2015). Szürkerothadás esetében azonban a *VvCHI* gének expressziója nem változik, vagy represszálódást mutat (Agudelo-Romero *et al.* 2015, Kelloniemi *et al.* 2015).

Az antocianinok bioszintézisében a végső glikolizálásért az UDP-Glc:flavonoid 3-O-glikoziltransferáz (UF3GT) a felelős. Normál körülmények között fehér szőlőben a *VvUF3GT* gének nem expresszálódnak (Boss *et al.* 1996). Azonban fehér szőlő nemesrothadása során több, a kék szőlőfajták esetén fertőzés nélkül is aktív *VvUF3GT* gén transzkripciója megnövekedett (Ali *et al.* 2011, Blanco-Ulate *et al.* 2015). Továbbá három, a genomban egy klaszterben elhelyezkedő *VvUF3GT* gén (*VIT_05s0062g00270*, *VIT_05s0062g00300*, *VIT_05s0062g00310*) kizárólag a nemesrothadás során indukálódik (Agudelo-Romero *et al.* 2015, Blanco-Ulate *et al.* 2015, Kelloniemi *et al.* 2015). Expressziójuk olyan nagy, hogy aszúsodott Furmint mintákban a legerősebben indukálódó gének közé tartoznak (M. 5. táblázat).

A *VvMYBA1* és *VvMYBA2* transzkripciós faktorok az *VvUF3GT* gének regulátorai. A Semillon nemesrothadásos mintákhoz hasonlóan (Blanco-Ulate *et al.* 2015) a Furmint aszúsodása során sem indukálódik a *VvMYBA1*, *VvMYBA2*. A két egybevágó eredmény tükrében kijelenthető, hogy az *VvUF3GT* gének indukciója és így a megnövekedett antocianin bioszintézis nem a *VvMYBA1/2* transzkripciós faktorok által történik az aszúsodás során. Nemesrothadás során fehérszőlőben az antocianinok bioszintézisét feltételezhetően a *B. cinerea* indukálja, ám egyelőre ismeretlen mechanizmus által.

7.3.4. Aszúsodott Furmint TF profilok megvitatása

A transzkripciós faktorokat génexpressziós szabályozókként tartjuk számon. Az aszúsodott Furmint minták esetében hat, a kórokozók elleni védekezésben bizonyítottan aktív szerepet játszó TF család (AP2/ERF, bHLH, MYB, NAC, WRKY, bZIP) expresszióját vizsgáltam meg (Ng *et al.* 2018).

Az AP2/ERF transzkripciós faktor család biotikus stressz mellett főként szárazság stresszre indukálódik. A nemesrothadásnál megfigyelt erős indukálódásuk (Blanco-Ulate *et al.* 2015) összefügg a bogyók töppedésével, aminek legfőbb oka az ép bőrszövet elvesztése a *B. cinerea* fertőzése miatt. Ezzel összhangban a szürkerothadás során, amikor a bogyók víztartalma magas, ezek a gének többnyire nem aktívak (Haile *et al.* 2020, Kelloniemi *et al.* 2015).

A. thaliana modellnövényben az antocianin szintézishez szükség van egy aktiváló komplex kialakulásához, ami egy TTG (Transparent Testa Glabra), egy bHLH-III_f és egy R2R3 MYB alegységből épül fel. A MYB alegységet *A. thaliana*-ban az *AtMYB23* gén (*At5G40330*) kódolja, aminek homológja szőlőben a *VIT_14s0066g01220* gén. Szőlőben az expressziója enyhén megnövekszik (1,7) a második fázisban. A bHLH-III_f alegységet *A. thaliana*-ban az *AtTT8* gén (*At4g09820*) kódolja, aminek a szőlő homológja a *VIT_07S0104G00090* gén. Ez a gén represszálódást mutat (-3,6) mind a két aszúsodási fázisban (Gonzalez *et al.* 2008). Ezekből az adatokból arra következtettek, hogy nem az *A. thaliana*-ban megismert folyamat felelős a Furmint aszúsodása során jelentkező nagy antocianin bioszintéziséért és ezzel a színváltozásért.

A MYB TF család tagjai közül (25. ábra) a *VvMYB5a* (*VIT_08s0007g07230*) és *VvMYB5b* (*VIT_06s0004g00570*) géneket tartják a fenilpropanoid útvonal kulcsregulátorainak, azonban ezek a gének Furmint minták esetében nem érték el sem a pozitív, sem a negatív expressziós küszöbértéket. A MYB TF-ok közül a *VIT_07S0005G01950* gén aktiválódik legjobban a Furmint harmadik aszúsodási fázisban. Ez a gén az *A. thaliana* *AtMYB108* homológja. Az *A. thaliana*-ban feltárt mechanizmus alapján a *VIT_07S0005G01950* gén terméke kölcsönhatásba lép egy feltételezhetően kalmodulin-kötő fehérjével (*VIT_08s0040g00470*), ami növeli a biotikus stressz toleranciát (Cheng *et al.* 2016). A *VvMYBC2-4a* (*VIT_03S0038G02310*) gén terméke a *VvC4H* gén negatív regulátoraként egy fenilpropanoid útvonal gátló faktor (Kazan 2006), de ennek a transzkripciós faktornak az expressziója sem változott egyik időpontban sem. A *VvMYBF1* gén (*VIT_07s0005g01210*) által kódolt fehérje a flavon bioszintézis első lépését aktiválja, de egyik fázisban sem változik az expressziója a kontrollhoz képest. Azonban a *VvMYBC2-L1* (*VIT_01S0011G04760*) fenilpropanoid útvonal szupresszor gén expressziója lecsökkent a Furmint harmadik fázisra, ami arra utal, hogy ebben az esetben megnövekedhet a fenilpropanoid útvonal aktivitása (Cavallini *et al.* 2015). Szőlőben a *VvMYBPA1* gén felelős a

proantocianidok bioszintézisének szabályozásáért. A Furmint minták esetében a kettes fázisban kevésbé, de a hármas fázisban már erősebben aktiválódott. A *VvMYBPA1* gén expressziós növekedése szerepet játszhat az anticianinok felhalmozódásában, így az aszúszemek barnás-lilás színük kialakításában.

A NAC TF család esetében a *VvJUB1* gén csökkenti a szenescenciát, növeli az abiotikus stressz toleranciát és növeli a *VvPRI* fehérjék expresszióját. Korábban úgy gondolták, hogy inkább biotróf kórokozók hatására indukálódik az expressziója (Toth *et al.* 2016), ennek ellenére a Furmint aszúsodott mintákban a *VvJUB1* gén expressziója szintén enyhén megemelkedik. A *VvNTL9* gén (*VIT_15s004802270*) *A. thaliana* (*At4g35580*) homológja bizonyítottan gátolja a *PRI* gének expresszióját, közvetlenül a promóter régióhoz való kötődésével (Kim *et al.* 2012). A Furmint minták esetében represszálódik ennek a TF-nak az expressziója, azonban a *VvPRI* géneknek az expressziója nem növekszik. Az *A. thaliana* *AtATAF1* és *AtATAF2* gének homológja a szőlő *VIT_18s0001g02300* és *VIT_07s0031g02610* gének, melyeknek transzkripciója jelentősen megnő az aszúsodás alatt, míg szürkerothadás esetében csak kismértékben indukálódnak. Az *ATAF1* és *ATAF2* gének termékei nekrotróf kórokozókvaló kölcsönhatás során negatívan szabályozzák a PR proteinek expresszióját.

A bZIP TF családba tartozó *VvHy5* (*VIT_04s0008g05210*) génről korábban kimutatták, hogy UV-B sugárzás hatására érett szőlőbogyókban megnövekszik az expressziója. Továbbá *VvHY5* mRNS szintje jól korrelál a bogyóhéjban található fenolos vegyületek (flavonok, sztilbének) mennyiségével, melyek csökkentik az UV sugárzás káros hatásait (Carbonell-Bejerano 2014). A Furmint aszúsbogyókban mért génexpressziója a második és harmadik aszúsodási fázisban is emelkedett az első fázishoz viszonyítva (27. ábra). A bZIP TF-okat a SA függő NPR-1 fehérjék indukálhatják (Pieterse *et al.* 2012). A tipikusan SA függő PR gének nem indukálódtak a Furmint aszúsodása során, amiből arra következtethetünk, hogy a SA jelző útvonal nem aktív Furmintban, ennek következtében a bZIP TF-ok nem indukálódtak.

A WRKY transzkripciós faktorok a növényvilágban betölthetnek mind negatív, mind pozitív szabályzó funkciót a kórokozókval szemben védekezés tekintetében. Egyik legjobban karakterizált WRKY gén a *WRKY33*, ami indukálja a védekező géneket, a hősokkfehérjéket, az etilén által szabályozott jelátviteli útvonalakat és a hőstresszre adott választ (Li *et al.* 2011). Az *A. thaliana* *AtWRKY33* gén homológja *V. vinifera*-ban a *VIT_06s0004g07500*, ami enyhe indukálódást mutat aszúsodás során (28. ábra). A *VvWRKY1* (*VIT_17s0000g01280*) gén szőlőben történő túltermeltetés hatására szignifikánsan megnövelte a xiloglukan-endotranszglikoziláz, *VvPR2*, GRAS és AP2/ERF transzkripciós faktorok, *COMT*, kalciumkötő proteinek, lipoxigenázok és *JAZ* gének expresszióját (Marchive *et al.* 2013). Furmint

aszúsodása során ezek a gének többnyire erős aktiválódást mutatnak, annak ellenére, hogy a *WRKY1* gén expressziója nem változik. Más nemesrothadásos minták esetében (Blanco-Ulate *et al.* 2015) is hasonló volt ezeknek a géneknek az indukálódása, azzal a különbséggel, hogy a *WRKY1* gén is indukálódott. A legjobban indukálódó *VIT_08s0058g01390* WRKY TF gén funkciójáról jelenleg nincsen ismeretünk. A nukleotid és fehérje szekvenciáját megvizsgálva több online adatbázisban kiderült, hogy ez a gén szőlőre specifikus. Más fajokban a legnagyobb hasonlóságot mutató gének is mindössze 50% egyezést mutatnak, aminek jelentős része a konzerválódott WRKY domén. Más szőlőfajta nemesrothadásának vizsgálata során (Blanco-Ulate *et al.* 2015) is ez a gén nagyon magas expressziós értéket mutatott. Jövőbeni kutatási területnek a jelenleg ismeretlen funkcióval rendelkező *VIT_08s0058g01390* gén kiváló célpont lehet, mert úgy tűnik, hogy fajtától és földrajzi elhelyezkedéstől függetlenül nagyon erősen indukálódik nemesrothadás során.

7.3.5. A Furmint aszúsodás transzkriptom profiljának összehasonlítása más nemes- és szürkerothadt minták génexpressziós mintázatával

A Furmint aszúsodása során vizsgált TF eredményeket részletesen összehasonlítottam a Semillon fajtájú nemesrothadt szőlőbogyók TF expressziós profiljával (Blanco-Ulate *et al.* 2015) (9. táblázat, M. 1. ábra). Az összehasonlításból kiderült, hogy a két mRNS mintázatban nagy a hasonlóság, nem figyelhető meg markánsan eltérő expressziós mintázat a két földrajzilag és genetikailag eltérő nemesrothadt minta között.

Ezzel ellentétben, a szürkerothadás (Kelloniemi *et al.* 2015) során a bHLH és bZIP transzkripciós faktorok expressziója alig változik, mindössze néhány gén aktiválódik vagy represszálódik, miközben nemesrothadás (Blanco-Ulate *et al.* 2015) során ennek a két TF családnak a kifejeződése erősen átrendeződik (9., 11. táblázat). A NAC transzkripciós faktorok expressziója ugyanakkor meglepően hasonló a szürkerothadás és a nemesrothadás során. A WRKY transzkripciós faktorok expressziójáról elmondható, hogy mindkét fertőzési formában (Agudelo-Romero *et al.* 2015, Blanco-Ulate *et al.* 2015, Haile *et al.* 2020, Kelloniemi *et al.* 2015) nagyon aktívak, de több esetben ellentétes az azonos géneknek expressziós változás iránya a két fertőzésformában. A szürkerothadás során kialakuló transzkripciós profil jelentősen eltér az aszúsodott Furmint bogyókéétól. (M. 2. ábra). Kevesebb *TF* és *PR* gén (10., 12 táblázat) aktiválódik, továbbá az aszúsodás során jelentősen indukálódó védekezési mechanizmusok közül is csak néhány mutatható ki a szürkerothadt mintákban.

A nemesrothadás során sokkal több *sztilbén-szintáz* gén indukálódik és az indukálódás mértéke is egy nagyságrenddel nagyobb, mint szürkerothadt minták esetében (Agudelo-Romero *et al.* 2015, Haile *et al.* 2020). Szürkerothadás során mindössze néhány *sztilbén-szintáz* indukálódik

(*VIT_16s0100g01200*, *VIT_16s0100g00990*) a többségük pedig represszálódik. A sztilbéneknek fontos szerepük van a gombák elleni védekezésben, antifungális hatásuk miatt (Pezet *et al.* 2004). A szürkerothadás során elmaradt *sztilbén-szintáz* indukálódás hozzájárulhat a szőlőbogyó nagyobb fogékonyságának *B. cinerea*-val szemben

Egy következő fontos különbség a GST gének transzkripciójában mutatható ki (35. ábra). A szürkerothadás során mindössze 5-7 GST gén mutat kismértékű indukciót fertőzés hatására (Agudelo-Romero *et al.* 2015, Haile *et al.* 2020, Kelloniemi *et al.* 2015), míg a nemesrothadás során erős expresszió növekedés tapasztalható. Ezeknek a védekező géneknek az elmaradt indukciója vezethet a gomba agresszívebb kolonizációjához szürkerothadás során.

A peroxidázok tekintetében a *B. cinerea* fertőzés érett szőlőbogyóban hasonlóan indukálódó génexpressziós profilt alakít ki mind a nemesrothadás, mind a szürkerothadás során, azonban nemesrothadás során a gének indukálódása erősebb (M. 4. táblázat). A zsendülési stádiumban lévő bogyók *B. cinerea* fertőzése esetén a peroxidáz gének expressziója csökken (Blanco-Ulate *et al.* 2015, Kelloniemi *et al.* 2015, Agudelo-Romero *et al.* 2015, Haile *et al.* 2020).

A JA jelátviteli útvonal kezdő lépése az alfa-linolénsav oxigenálása a 13-lipoxigenáz enzim (13-lox) segítségével (Avanci *et al.* 2010). Az eddig azonosított nyolc *13-LOX* génből (Bertazzon *et al.* 2019) kettő mutatott indukciót Furmint aszúsodása során és más nemesrothadt minták esetében (Podolyan *et al.* 2010, Blanco-Ulate *et al.* 2015) *B. cinerea* fertőzés hatására: *VIT_14s0128g00780* és *VIT_09s0002g01080* (M. 7. táblázat). A növényi sejtekben a JAZ proteinek a MYC2 transzkripciós faktorokhoz kötődnek, ezzel megakadályozva, hogy a MYC2 TF aktiválja a jázmonsav indukálta védekezési géneket. Jázmonsav hatására azonban a JAZ fehérje komplex ubikvitinálódik és lebomlik, miközben a MYC2 TF felszabadul a gátlás alól és indukálja a JA útvonalra jellemző védekezési géneket (Yang *et al.* 2019). Több JAZ gén is indukálódott a Furmint aszúsodása során (*VIT_01s0146g00480*, *VIT_04s0008g00110*, *VIT_09s0002g00890*, *VIT_10s0003g03790*, *VIT_10s0003g03800*, *VIT_10s0003g03810*, *VIT_11s0016g00710*) (M. 7. táblázat), melyek a szürkerothadás során nem indukálódtak (Kelloniemi *et al.* 2015). Ez az indukálódás magyarázatot ad a Furmint aszúsodás során tapasztalt JA-közvetítette PR gének (*VvPR3*, *VvPR4*, *VvPR12*) és *VvbHLH* transzkripciós faktorok (MYC2 TF alcsaládja) erős aktiválódására. Nem fogékony, zsendülési stádiumban lévő bogyók esetében a 13-LOX gének represszálódnak és a JAZ gének közül is csak a *VIT_01s0146g00480* és *VIT_09s0002g00890* mutat kismértékű indukciót (Kelloniemi *et al.* 2015). Ez összhangban van a még nem érett szőlőbogyók erős SA indukálta védekezésével, ami magyarázatot ad az alacsony *B. cinerea* fogékonyságra (Kelloniemi *et al.* 2015). A SA-mediálta védekezés marker génjei a *VvPR1*, *VvPR2* és *VvPR5* gének. A Furmint aszúsodása során ezek

a gének nem mutattak markáns expressziós változást. Más nemesrothadás (Blanco-Ulate *et al.* 2015) és szürkerothadás (Kelloniemi *et al.* 2015) során ezeknek a gének az aktivitása megnövekedett, ami arra utal, hogy a Furmint aszúsodására főként csak a JA-mediálta védekezési mechanizmus jellemző a *B. cinerea* ellen. A *VvPR6* géncsoportba tartozó gének nemesrothadás során kiemelkedő expressziós indukálódást mutattak (M. 9. táblázat). Az öt azonosított génből mindegyik indukálódott a második és harmadik aszúsodási fázisban is Furmint és Semillon (Blanco-Ulate *et al.* 2015) szőlőminták esetében. Ezzel ellentétben a szürkerothadás során (Kelloniemi *et al.* 2015) irodalmi adatok alapján ezeknek a géneknek az indukcióját nem, vagy csak 1-2 esetben figyelték meg. Ezek a gének proteáz inhibitorok, melyek feltételezhetően fontos szerepet játszanak a *B. cinerea* fertőzés lassításában, ezzel az aszúsodás felé billentve a fertőzési kimenetel mérlegének a nyelvét.

Az eredmények összehasonlítása arra mutat rá, hogy nemesrothadás során a bogyóban kialakuló génexpressziós profil karakterisztikus és a szürkerothadástól eltér.

Az éretlen szőlőbogyó rezisztenciája a *B. cinerea*-val szemben több tényezőtől áll össze: a bogyó alacsony víztartalma, magas tannin tartalma, másodlagos anyagcseretermékek és lokális ROS felhalmozás a behatolás körül (Deytieux-Belleau *et al.* 2009, Agudelo-Romero *et al.* 2015, Kelloniemi *et al.* 2015). Ezen védekezési mechanizmusok közül az érett szőlőbogyóban csak a másodlagos anyagcseretermékek felhalmozása lép életbe, ezért a gomba szaporodását a növény nem tudja kontrollálni a sérült bőrszövet mentén, és kialakul a szürkerothadás vagy ideális időjárási feltételek esetén a nemesrothadás.

7.4. Kis RNS eredmények megvitatása

Nemesrothadt szőlőbogyó minták kis RNS szekvenálása első ízben történt meg. A vizsgálatban a 21 nukleotid hosszúságú kis RNS-eket vizsgáltam. Az eredményekből kiderült, hogy a Furmint aszúsodása során a szőlő eredetű kis RNS-ek minőségük és mennyiségük az aszúsodás előrehaladtával növekszik (42. ábra). A kis RNS szekvenálás eredményeként 36 eltérően expresszálódó kis RNS-t mutattam be, de ezek összesen 21 főcsoportba tartoznak. Biotikus stressz hatására szőlőben az irodalmi adatok szerint 10-20 kis RNS indukálódik, így az általam azonosított 21 db kis RNS átlagos számú eltérően expresszálódó kis RNS-nek minősül (Snyman *et al.* 2017, Eichmeier *et al.* 2019).

A Furmint aszúsodásának második fázisában megnőtt a *VvmiR396b*, *VvmiR396a* és *VvmiR396d* kis RNS-ek expressziója. Célgénjük a *VIT_15s0021g02580* kis RNS biogenezishez köthető gén. A *A. thaliana*-ban már korábban leírták, hogy az *AtmiR396* kis RNS megjelenése negatívan befolyásolja a levelek növekedését a GRF (Growth Regulating Factor) csendesítése által (Rodriguez *et al.* 2010). A *VvmiR166a* kis RNS expressziója is megemelkedett, aminek a

célpontja egy HD-ZIP transzkripciós faktor. *A. thaliana*-ban *AtmiR166a* kisRNS hasítja a HD-ZIP III mRNS-ét, így csökkentve a merisztéma képzést és embrió genezist (Ohashi-Ito *et al.* 2005). A *VvmiR408* kis RNS-nek a második Furmint aszúsodási fázisban csökken az expressziója, ezzel célgénjeinek az expresszió növekedését várjuk. A psRNA target szervert segítségével prediktált feltételezhetően szerin/treonin protein kináz aktivitású (*VIT_19s0177g00260*) gén expressziója ennek megfelelően növekedett. Ezen felül a *VvmiR408* célgénjei közé tartozik több réz tartalmú protein: lakkázok, szuperoxid-dizmutázok, stressz válaszban és lignifikációban szerepet játszó gének (Mica *et al.* 2009). Ez magyarázattal szolgálhat néhány lakkáz (*VIT_18s0001g00680*, *VIT_18s0122g00170*) erős indukciójára.

A harmadik aszúsodási fázisban három GRAS transzkripciós faktor expressziója csökken. Ezek a gének a megemelkedett expressziót mutató *VvmiR171b* és *VvmiR171i* kis RNS-ek célgénjei. A GRAS transzkripciós faktorok kulcs szerepet játszanak a növényi merisztéma kialakításában, merisztéma homeosztázisban, gyökér növekedésben és stressz toleranciában (Zhang *et al.* 2018).

A *VvmiR156b* kis RNS célpontja a *VIT_11s0065g00170* SBP transzkripciós faktor. Ez a gén egy növény specifikus TF-t kódol, ami fontos szereppel bír a növények növekedésében és fejlődésében (Zeng *et al.* 2019).

A *VvmiR395* kis RNS célpontja a *VIT_13s0019g03630* gén, mely egyelőre nem karakterizált szőlőben. *A. thaliana*-ban az *AtmiR395* kis RNS expressziója szulfát hiányos környezetben emelkedik meg, és ezzel együtt a célpontjai az ATP-szulfuriláz és szulfát-transzporter 2 expressziója lecsökken (Liang *et al.* 2010).

A *VvmiR159c* kis RNS célgénje egy MYB transzkripciós faktor (*VIT_19s0090g00590*), mely a generatív merisztémákért felelős gének promoteréhez képes kötődni és ezzel serkenteni expressziójukat (Rhoades *et al.* 2002).

A szőlő kis RNS eredményeiben nem volt kimutatható célzott miRNS-alapú védekezés a nekrotróf gomba ellen. A megemelkedett expresszióval rendelkező kis RNS-ek célgénjei többnyire a merisztémát, levélzetet és általános növekedést serkentő gének ellen termelődtek. A növény törekszik az erőforrásait a fertőzés megállítására vagy legalábbis lassítására fordítani, miközben a növekedését és fejlődését szünetelteti.

A kis RNS szekvenálás során a *V. vinifera* miRNS-ek mellett a *B. cinerea* miRNS-ek is szekvenálásra kerültek, de adatfeldolgozásukra – elérhető *B. cinerea* miRNS adatbázis hiányában – csak később kerülhet sor.

7.5. A *B. cinerea* transzkriptóm eredmények megvitatása

A *B. cinerea* transzkriptóma vizsgálata során 3314 gén expresszáldott szignifikánsan eltérően a kontrollhoz képest, ami a teljes génkészletének közel 30%-a. A változó gének több, mint 95%-ban indukálódtak. A magas indukáló gének aránya részben a kontrollnak választott I. aszúsodási fázisnak is köszönhető, mert ekkor a gomba feltehetőleg konídiumos vagy a fertőzés nagyon korai szakaszában jár. Így ehhez viszonyítva a gomba további génexpressziós értékeit, jelentős génexpressziós indukciót tapasztalunk. A *B. cinerea* extracelluláris szénhidrátbontó enzimeinek génaktivitás vizsgálata során azt tapasztaltam, hogy az endo-poligalakturonáz gének már az aszúsodás korai szakaszában erősen aktívak voltak, és az exo-poligalakturonázok velük együtt, vagy csak később indukálódtak (38. ábra). Ez az eredmény részben ellentmond Kapat és munkatársai (1998) eredményének, akik bab levél fertőzés során azt tapasztalták, hogy az exo-poligalakturonázok indukálódnak hamarabb. Az endo-galakturonázokhoz hasonlóan a pektát-liázok, a pektin-liázok és a pektin-metilészteráz gének mutatnak az első fázisban erős indukciót és a későbbi fázisokban repressziót (Blanco-Ulate *et al.* 2014). A szürkerothadás és nemesrothadás során a *B. cinerea* génexpressziós profilja hasonló, azonban néhány egyedi vonás felfedezhető a két fertőzésformában. A Furmint aszúsodási folyamatára jellemző a *BcPG6* gén indukálódása, ami a szürkerothadt fertőzésformánál nem indukálódik. A szürkerothadt minták esetében (Haile *et al.* 2020, Kelloniemi *et al.* 2015) több kutináz gén is aktiválódik (*Bcin15g03080*, *Bcin01g10830*, *Bcin13g05760*, *Bcin01g09430*), ami a nemesrothadásra egyáltalán nem volt jellemző. ROS elimináló enzimszereket kódoló gének közül a szürkerothadt minták esetében (Rolke *et al.* 2004) több kataláz, peroxidáz, továbbá egy SOD gén (*Bcin03g03390*) is indukálódik (40. ábra). A GST enzimeket kódoló gének ezzel ellentétben a nemes rothadás során aktiválódnak (Lovato *et al.* 2019, Schumacher *et al.* 2015). A növényi sejthalált indukáló *Spl* és *Nep B. cinerea* gének a korai szénhidrát bontó enzimekhez hasonlóan a későbbi aszúsodási fázisokban erős represszáldást mutatnak. Ebből a represszáldásból arra következtettek, hogy ezeknek a sejthalált indukáló fehérjéknek jelentős szerepe van a korai fertőzésben. A szürkerothadás során (Haile *et al.* 2020) a *B. cinerea*-ban több másodlagos anyagcseretermék szintézisében résztvevő gén aktiválódott, mint az aszúsodás során. A *BcPks6* gén a botciniksav bioszintézis kulcsenzime, mely szürkerothadás során (Kelloniemi *et al.* 2015) a nemesrothadáshoz hasonló mértékben indukálódik.

7.6. Illatanyag eredmények megvitatása

Aszúsodott szőlőbogyók légtéréből gyűjtött illatanyagok azonosítása és mennyiségi meghatározása eddig még nem történt meg a Tokaj-hegyaljai Furmint minták esetében. A jelenleg fellelhető irodalmi adatok az ép és aszúsodott bogyókból szilárd fázisú

mikroextrakcióval vagy folyadék extrakció útján nyert illékony aromakomponensek azonosítására és mennyiségi meghatározására korlátozódnak (Miklós *et al.* 2004, Miklós és Kerényi 2004, Furdiková *et al.* 2019).

Munkám során meghatároztam a klímakamrában modellezett aszúsodott és szürkerothadt Furmint szőlőbogyók illatanyag profilját. A komponensek azonosításán túl az illatanyagok relatív mennyiségét is meghatároztam (45. ábra). A statisztikai elemzés során szignifikánsan nagyobb mennyiségben volt jelen a fenetil-alkohol, [S,S]-2,3-butándiol, ecetsav, 1-oktén-3-ol, az izoamil-alkohol és az acetoin a szürkerothadt minták légtéréből gyűjtött illatanyag mintákban. A transz-geranil-aceton és szulkaton vegyületek az egy hete aszúsodó minták légtérében voltak szignifikánsan nagyobb mennyiségben, míg az izobutanol ugyanebben a csoportban kisebb mennyiségben volt jelent.

Az ecetsav megjelenése az aszúsodás során ismert folyamat, mert a bogyó sérült felszínén a *B. cinerea* mellett egyéb alkoholos erjedést folytató mikrobák is megtelepednek (Drysdale és Fleet 1988). Az aszúsodás során az ecetsav mennyisége a fűt légtérében nem változott szignifikánsan, ami arra utal, hogy a baktériumok nemesrothadás során nem képesek nagy mennyiségben elszaporodni. Ezzel ellentétben a szürkerothadt fűtök légtérében közel tízszer nagyobb mennyiségben volt jelen az ecetsav, mint az aszú esetében.

A fenetil-alkoholt gyakran kellemes rózsa illatához hasonlítják. Ezt a másodlagos anyagcsereterméket egyaránt termelik a szőlő és fonalas gombák is, és gyakori illatanyag komponense a szőlőbogyóknak és boroknak. Fenetil-alkoholt azonosítottak már korábban nemesrothadt aszúbogyókból (Miklós *et al.* 2004), de szürkerothadt mintákban emelkedik meg jelentősen a mennyisége (Lopez *et al.* 2017). A Tokaj-hegyaljáról származó szőlőfűtőkről gyűjtött illatanyagmintákban az aszút modellező fűtőknél a fenetil-alkohol kis mennyiségben megjelent hasonlóan Lopez és mtsai. eredményeihez, azonban a szürkerothadtaknál sokkal nagyobb mennyiségben volt kimutatható.

A C6-C8 alkoholok gyakori másodlagos anyagcseretermékek a növények és fonalas gombák illatanyagprofiljában. Illatukat gyakran kapcsolják a zöld és a gyümölcsillathoz. Az 1-hexanolt, 2- vagy 3-hexen-1-olt, 1-heptanolt, 1-, 2- vagy 3-oktanolt és 1-oktén-3-olt már korábban azonosították mustban (Furdiková *et al.* 2017) és aszúnál (Miklós *et al.* 2004). Az 1-oktén-3-ol illata a zöld illathoz és a jellegzetes gomba illathoz hasonlít. Ez a vegyület egy tipikus *B. cinerea* illatanyag, ami a linolsav oxidatív lebontása során keletkezik (Magyar 2011). A Tokaj-hegyaljai minták esetében sikerült azonosítanom az 1-, 2-hexanolt, a 2-hexén-1-olt és az 1-oktén-3-olt. Az 1-oktén-3-ol mennyiségét tekintve nem emelkedik ki a többi illatkomponenshez

képest, de szürkerodhadás során szignifikánsan több képződik belőle, mint az aszúsodott minták esetében.

Az izoamil-alkohol megjelenése a fűrtök légterében az alkoholos fermentációnak a jele. Tokajon a Furmint szőlőfajta különösen hajlamos a mikrobák által termelt izoamil-alkoholos erjedésre (Furdiková *et al.* 2019). Vizsgálataim során a szürkerothadt fűrtökről gyűjtött illatanyagmintákban közel kétszer olyan nagy mennyiségben találtam izoamil-alkoholt, mint az aszúsodott mintáknál.

Saját vizsgálataim során aldehid funkciós csoportot tartalmazó vegyületek közül hexanalt és 2-hexanalt sikerült azonosítanom kis mennyiségben. Ezek a komponensek megjelennek szilárd fázisú extrakciós illatanyag kivonási mérések elemzésében is, de csak mellék komponensekként. Nagy mennyiségben megtalálható aldehid funkciós csoportal rendelkező illatkomponensek az aszú esetében a 2-heptanal, 2,4-heptadianal, nonanal és 2-heptenal (Furdiková *et al.* 2019, Miklósy *et al.* 2004).

Keto funkciós csoportot tartalmazó illatkomponensek közül az acetoint azonosítottam a Furmint mintákban. Az acetoin a szürkerothadt minták esetében nagyobb mennyiségben képződött, mint az aszúsodott fűrtöknél.

A Furmint szőlőbogyókban aszúsodás során jelentősen megemelkedik az illékony észter komponensek mennyisége. Míg az egészséges szőlőbogyókban mindössze 12-t, addig az aszúsban 26 vegyületet azonosítottak már korábban (Furdiková *et al.* 2019). Légtér analízis során én csak egy észter vegyületet tudtam azonosítani, az izoamil-acetátot. Mennyiségét tekintve mindkét minta típusban hasonlóan alacsony mennyiségben volt jelen, ami egybevág korábbi vizsgálatok eredményével (Miklósy *et al.* 2004).

Terpén vegyületek a Furmint szőlőbogyókban aszúsodás során mennyiségi és minőségi változáson is átesnek. Az egészséges szőlőbogyókban mindössze hat terpén vegyületet azonosítottak (linalol, hotrienol, terpineol, damascenon, geranil-aceton és szulkaton). Ezek közül legnagyobb mennyiségben a damascenon és a geranil-aceton volt megtalálható. A légtérből nyert aszúsodott és szürkerothadt szőlőbogyó illatanyag profil alapján a transz-geranil-aceton és szulkaton a legnagyobb mennyiségben jelenlévő terpén vegyületek. Mindkét vegyület esetében az egy hete klímakamrában aszúsodó szőlőfűrtől vett illatanyag mintában volt a legmagasabb a koncentrációja. Korábbi illatanyag vizsgálatok során a Furmint szulkaton és transz-geranil-aceton mennyiségében az egészséges és nemesrohadásos bogyók között nem találtak különbséget, ami az egészséges szőlőbogyók magas szulkaton szintje miatt volt. Az adatok alapján a Furmintban a szulkaton és transz-geranil-aceton mennyisége az aszúsodás elején emelkedik meg és szürkerothadás hatására feltehetőleg csökken a kibocsátásuk

(Furdiková *et al.* 2019).

A klímakamrában modellezett aszúsodott és szürkerothadt szőlőfürtök illatanyag profiljainak vizsgálata során kiderült, hogy a fertőzés két formája során hasonló profil alakul ki, ami a vegyületek minőségét illeti. A szürkerothadt fürtökre a fermentációhoz köthető alkoholos vegyületek nagy mennyiségben való megjelenése és az 1-oktén-3-ol gomba alkohol megemelkedett koncentrációja volt jellemző.

A Furmint légtéranalízisével kevesebb illatanyagot sikerült kimutatni, mint az extrakciós eljárásokkal (Miklósy *et al.* 2004, Furdiková *et al.* 2019), azonban az újfajta megközelítés árnyaltabb képet ad a szőlőbogyóból valóban felszabaduló illatanyagokról.

7.7. Új tudományos eredmények

- 1) Kimutattam, hogy az aszúsodás során a Furmint szőlőbogyó sejtjei a folyamat korai szakaszában elpusztulnak.
- 2) Összeállítottam a Furmint szőlőfajta aszúsodásának transzkripciós mintázatát mind a szőlő-, mind a *B. cinerea* sejtjeire vonatkozóan.
- 3) A Furmint aszúsodása során a *glutation-S-transzferáz*, *PR6* gének és a fenilpropanoid anyagcserében szerepet játszó bizonyos gének (*VvMyb14*, *VvMyb15*, *VvMybPA1*, *VvMybC2-L1*, *VvUF3GT*) transzkripciója markánsan eltér a szőlő szürkerothadása során tapasztalt génexpressziós változásoktól.
- 4) Aszúsodás során a *B. cinerea* sejtjeiben nem következik be a *kutináz* gének aktiválódása, szürkerothadás során viszont a *kutináz* gének (*Bcin01g10830*, *Bcin01g09430*, *Bcin07g01240*) működése fokozódik.
- 5) Összeállítottam a Furmint nemesrothadásának kis RNS mintázatát és szekvenciaelemzés segítségével prediktáltam az eltérően kifejeződő kis RNS-ek szőlő célgénjeit.
- 6) Meghatároztam több olyan illatanyag jelenlétét, melyek a szürkerothadt és nemesrothadt Furmint szőlőbogyókban eltérő mennyiségben termelődnek. A szürkerothadt mintákban több ecetsav, izoamil-alkohol, fenetil-alkohol és 1-oktén-3-ol mutatható ki, a nemesrothadt minták pedig több transz-geranil-acetont és szulkatont termelnek.

8. Összefoglalás

Disszertációmban a Tokaj-hegylajai nemesrothadásban résztvevő Furmint szőlő és *B. cinerea* gomba kölcsönhatásának vizsgálati eredményeit mutattam be. A munkám kiterjedt makroszkopikus vizsgálatokra, növény és gomba totál transzkriptóma vizsgálatára, kis RNS szekvenálási eredményekre és illatanyagprofil meghatározásra.

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

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

A transzkripciós eredményekből kiderült, hogy a Furmint aszúsodásának II. és III. fázisában hasonló biológiai folyamatok játszódnak le a bogyóban. Erősen indukálódnak a sejtfal módosításáért felelős enzimek, antioxidáns rendszerek (GST, peroxidázok), hősokkfehérjék, PR fehérjék, biotikus stressz elleni védekezésben szerepet játszó transzkripciós faktorok és a fenil-propanoid útvonal enzimeit kódoló gének.

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

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

Ilyen marker folyamat a nemesrothadás során erős GST, peroxidáz és PR6 gének aktivitása, melyek a szürkerothadás során szinte teljesen hiányoznak. A biotikus stressz elleni védekezésben is szerepet játszó AP2/ERF transzkripciós faktor család indukciója egy nagyságrenddel nagyobb a nemesrothadás során, feltételezhetően a töppedés okozta ozmotikus stressz miatt. Azonosítottam egy nemesrothadás során specifikusan indukálódó WRKY transzkripciós faktort, mely feltételezhetően szerepet játszik az aszúsodásban. A *VvMYB14* és *VvMYB15* gének expressziója megnő nemesrothadás során, és az általuk indukált sztilbén-szintáz gének expressziója is sokkal nagyobb, mint a szürkerothadás során. Ép fehér szőlőben nem indukálódnak a *VvUF3GT* gének, melyek az antocianin bioszintézis egyik kulcslépéséért felelnek. Azonban kutatási eredményeim megerősítik azt, hogy nemesrothadás során jelentősen indukálódnak ezek a gének, ami megmagyarázza az aszúbogyók barnás-lila színét.

A totál transzkriptom vizsgálat és a klímakamrában modellezett aszúsodás eredményeiből arra lehet következtetni, hogy a két eltérő fertőzési forma kialakulásáért felelős kulcstényező a *B. cinerea* megjelenését követő időjárási viszonyok. Amennyiben a fertőzés után a gomba számára kedvezőtlen meleg, száraz időjárás köszönt be, akkor a gomba növekedése lelassul, amivel a szőlő időt nyer, és ha nem is megállítani, de sztilbénekkal, sejtfalmódosításokkal, redox rendszer aktiválással képes lassítani a gomba terjedését. Ekkor megy végbe a nemesrothadás. Ezzel ellentétben, ha a fertőzés megindításáért felelős csapadékos, magas relatív páratartalmú, felhős időjárás elhúzódik, akkor a gomba olyan agresszíven képes fejlődni, hogy a bogyónak nincs ideje reagálni rá, és szürkerothadás történik.

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

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

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

A keletkezett szürkerothadt és aszúsodott fürtök légtéréből illatanyag gyűjtés végeztem, majd azonosítottam és meghatároztam az illatanyagok mennyiségét. Az aszúsodás előrehaladtával a szőlőfürt illatanyag profilja változik. A szürkerothadt illatanyagprofil hasonlít az aszúéhoz, azonban néhány, főleg erjedésből származó alkohol mennyisége kiugróan megnő.

Doktori disszertációmban a Furmint aszúsodásának részletes molekuláris biológiai vizsgálatát végeztem el, melynek eredményeképpen meghatároztam olyan marker géneket és géncsoportokat, amik az aszúsodásra specifikusak.

9. Summary

In my Ph.D. dissertation I present results on the molecular details of the *Vitis vinifera*-*Botrytis cinerea* interaction during noble rot in Tokaj-Hegyalja (Hungary). My research covers some macroscopic studies, plant and fungal total transcriptome analyses, small RNA analyses and volatile profile determination.

The distribution of *Botrytis cinerea* was determined by ELISA technique in noble rot berries. In mature, healthy berries (stage I. of noble rot) *B. cinerea* can be detected only on the berry surface, but in subsequent noble rot stages the fungal biomass is gradually increasing inside the berry. The highest biomass amount of *B. cinerea* was detected in the third stage of noble rot, then the concentration of fungal biomass decreased for the last stage.

I have adapted a semi-automatized living tissue detection system, which is able to determine the vitality of fruit tissues. This method is based on fluorescein-diacetate stain, which emits green light when exposed to UV light in living cells. The fluorescent green light was detected by high sensitivity full frame camera, then images were analysed by an algorithm that I had developed. A great percentage of grapevine berry cells died already in stage II. In stage III. living cells could be detected only around the seeds. These findings are consistent with our mRNA sequencing results, where the ratio of mapped reads that could be aligned with the *V. vinifera* reference cDNA database declined drastically in the successive stages of noble rot.

The results of transcriptome sequencing revealed that similar biological processes were induced in stage II. and III. noble rot berries. Genes encoding cell wall modifying enzymes, antioxidant systems (GSTs, peroxidases), heat shock proteins, PR proteins, response to biotic stress transcription factors and enzymes of the phenylpropanoid pathway were strongly induced during noble rot. The gene expression pattern of Furmint berries subjected to noble rot was highly similar to the expression pattern of other grapevine varieties undergoing noble rot. This observation leads to the conclusion, that noble rot is a common biological process, which is not strictly cultivar-dependent. Nevertheless, Furmint also showed some genotype-specific molecular processes, such as the activation of *JAZ* genes, the induction of genes encoding *bHLH* TFs or the exclusive activation of JA-induced *PR3*, *4* and *12* genes within the group of genes encoding Pathogenesis-Related proteins.

Characteristic gene expression patterns of noble rot were successfully identified in comparison with gray mold or immature grape berry infection. These marker processes comprised the increased transcript level of GST and peroxidase isoforms, which are mostly lacking in berries

affected by gray mold. The transcript levels of *AP2/ERF* TFs (which provide tolerance to biotic and abiotic stress) are significantly increased during noble rot. This process might be connected to osmotic stress due to the shrivelling of berries.

The *VIT_08s0058g01390* gene is a *V. vinifera*-specific WRKY TF, which has the highest expression value among the WRKY TFs in the Tokaj-Hegyalja samples. This gene is a noble rot-specific WRKY TF. The expression of *VvMYB14* and *VvMYB15* TF genes were also increased during noble rot. These TFs possess a regulatory role in the activity of *stilbene synthase* genes, therefore the transcription of *stilbene synthase* genes is more pronounced in noble rot berries than in gray mold berries.

The *VvUF3GT* genes have a key role in anthocyanin biosynthesis, but these genes are typically not transcribed in healthy white grape berries. Strikingly, as a result of noble rot induction *VvUF3GT* genes are strongly expressed in Furmint, contributing to the brownish purple colour of noble rotted Furmint berries. Considering results of the transcriptome study and the modeling of noble rot development in growth chambers, we can conclude that the key factor deciding about the outcome of the infection is the weather.

If the weather is warm and dry following the onset of the fungal infection, the growth of *B. cinerea* slows down. In this case, grape berries are able to initiate some defence processes (biosynthesis of stilbenes, cell wall modification, activation of the redox system), which further restrict the growth of the fungus and noble rot develops.

If rainy, humid weather sustains after the beginning of the infection, then gray mold develops, because the plant is running out of time to induce defence responses.

This research is the first example of small RNA sequencing of grape berries enduring noble rot. Grapevine small RNAs suppress plant development and cell growth in the berries at an early stage of noble rot. At a later stage this suppression of development and cell growth is even more pronounced, and TFs become the main small RNA targets.

Concerning the transcription of *Botrytis cinerea*, less *cutinase*, *catalase*, *secondary metabolite* and *peroxidase* genes are induced in the fungus during noble rot than in gray mould. Despite these differences, the gene expression profiles of the fungus in noble rot and gray mold are similar, suggesting that the outcome of the infection is not highly dependent on the metabolism of the fungus.

I simulated the process of gray mold and noble rot in a climate chamber simultaneously, mimicking a prolonged rainy period, which favors gray mold and a cycle of consecutive dry

and humid periods, supporting noble development. Volatile compounds were collected from the air space of the resulting gray mold and noble rot clusters, and then these volatiles were identified and quantified. As botrytization progresses, the volatile emission of bunches changes. The volatile profile of gray mold is similar to that of noble rot, however, the amount of some alcohols, mainly from fermentation, increases dramatically.

I present my results here, retrieved from a detailed molecular study of noble rot that takes place in the Tokaj vine region of Hungary. A set of marker genes and gene groups that are specific for noble rot of Furmint are revealed.

10. Irodalomjegyzék

1. Adachi H., Nakano T., Miyagawa N., Ishihama N., Yoshioka M., Katou Y., Yaeno T., Shirasu K., Yoshioka H. (2015) WRKY Transcription Factors Phosphorylated by MAPK Regulate a Plant Immune NADPH Oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 27(9):2645-2663.
2. Aderem A., Ulevitch R.J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406(6797):782-787.
3. Agresti A. (1992) A Survey of Exact Inference for Contingency Tables *Statistical Science* 7(1):131-153.
4. Agudelo-Romero P., Erban A., Rego C., Carbonell-Bejerano P., Nascimento T., Sousa L., Martínez-Zapater M., J., Kopka J., Fortes M., A. (2015) Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany* 66(7):1769–1785.
5. Albert M., Werner M., Proksch P., Fry S.C., Kaldenhoff R. (2004) The cell wall modifying xyloglucan *endotransglycosylase/hydrolase* LeXTH1 is expressed during the defence reaction of tomato against the plant parasite. *Cuscuta reflexa Plant Biology* 6(4):402–407.
6. Ali M.B., Howard S., Chen S., Wang Y., Yu O., Kovacs L.G., Qiu W. (2011) Berry skin development in Norton grape: distinct patterns of transcriptional regulation and flavonoid biosynthesis. *BMC Plant Biology* 11:7
7. Ali S., Ganai B.A., Kamili A.N., Bhat A.A., Mir Z.A., Bhat J.A., Tyagi A., Islam S.T., Mushtaq M., Yadav P., Rawat S., Grover A. (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiology Research* 212–213:29–37.
8. Ambawat S., Sharma P., Yadav R., Yadav C. (2013) MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19(3):307–321.
9. Amselem J., Cuomo C.A., van Kan J.A., Viaud M., Benito E.P., Couloux A., Coutinho P.M., de Vries R.P., Dyer P.S., Fillinger S., Fournier E., Gout L., Hahn M., Kohn L., Lapalu N., Plummer K.M., Pradier J.M., Quévillon E., Sharon A., Simon A., ten Have A., Tudzynski B., Tudzynski P., Wincker P., Andrew M., Anthouard V., Beever R.E., Beffa R., Benoit I., Bouzid O., Brault B., Chen Z., Choquer M., Collémare J., Cotton P., Danchin E.G., Da Silva C., Gautier A., Giraud C., Giraud T., Gonzalez C., Grossetete S., Güldener U., Henrissat B., Howlett B.J., Kodira C., Kretschmer M., Lappartient A., Leroch M., Levis C., Mauceli E., Neuvéglise C., Oeser B., Pearson M., Poulain J., Poussereau N., Quesneville H., Rascle C., Schumacher J., Ségurens B., Sexton A., Silva E., Sirven C., Soanes D.M., Talbot N.J., Templeton M., Yandava C., Yarden O., Zeng Q., Rollins J.A., Lebrun M.H., Dickman M. (2011) Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics* 7(8):e1002230
10. Andersen E.J., Ali S., Byamukama E., Yen Y., Nepal M.P. (2018) Disease Resistance Mechanisms in Plants. *Genes (Basel)* 9(7):339.

11. Anderson J.P., Badruzaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:3460–3479.
12. Arenas Y.C., Kalkman E.R.I.C., Schouten A., Dieho M., Vredenburg P., Uwumukiza B., Ruiz M.O., van Kan J.A.L. (2010) Functional analysis and mode of action of phytotoxic Nep1-like proteins of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74(5-6):376–386.
13. Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M., Sheen J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415(6875):977-983.
14. Avanci N.C., Luche D.D., Goldman G.H., Goldman M.H. (2010) Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research* 9(1):484-505.
15. Aziz A., Heyraud A., Lambert B. (2004) Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*. 218(5):767-774.
16. Bais Anthony J., Murphy Peter J., Dry Ian B. (2000) The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Functional Plant Biology* 27:425-433.
17. Bari R., Jones J.D. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69(4):473-488.
18. Barna B., Fodor J., Harrach B. D., Pogány M., Király Z. (2012). The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry* 59:37–43.
19. Beckers G.J.M., Spoel S.H. (2006) Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology* 8:1–10.
20. Béla K., Horváth E., Gallé Á., Szabados L., Tari I., Csiszár J. (2015) Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* 176:192-201.
21. Belchí-Navarro S., Almagro L., Bru-Martínez R., Pedreño M.A. (2018) Changes in the secretome of *Vitis vinifera* cv. Monastrell cell cultures treated with cyclodextrins and methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry* 135:520-527.
22. Bell J.N., Ryder T.B., Wingate V.P.M., Bailey J. A., Lamb C. J. (1986): Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a compatible and incompatible plant-pathogen interaction. *Molecular Cellular Biology* 6:1615-1623.
23. Bertazzon, N., Bagnaresi, P., Forte, V., Mazzucotelli E., Filippin L., Guerra D., Zechini A., Cattivelli L., Angelini E. (2019) Grapevine comparative early transcriptomic profiling suggests that Flavescence dorée phytoplasma represses plant responses induced by vector feeding in susceptible varieties. *BMC Genomics* 20(1):526.
24. Blanco-Ulate B., Labavitch J.M., Vincenti E., Powell A.L.T., Cantu D. (2016) Hitting the Wall: Plant Cell Walls During *Botrytis cinerea* Infections. In: Fillinger S., Elad Y. (szerk.) *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer Kiadó 370pp.

25. Blanco-Ulate B., Amrine K.C., Collins T.S., Rivero M. R., Vicente R. A., Morales-Cruz A., Doyle I. C., Ye Z., Allen G., Heymann H., Ebeler E. S., Cantu D. (2015) Developmental and Metabolic Plasticity of White-Skinned Grape Berries in Response to *Botrytis cinerea* during Noble Rot. *Plant Physiology* 169(4):2422-2443.
26. Blanco-Ulate B., Morales-Cruz A., Amrine K.C., Labavitch J.M., Powell A.L., Cantu D. (2014) Genome-wide transcriptional profiling of *B. cinerea* genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. *Frontiers in Plant Science* 5:435.
27. Boddi S., Comparini C., Calamassi R., Pazzagli L., Cappugi G., Scala A (2004). Ceratoplatenin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and hyphae of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani. *FEMS Microbiol Letters* 233(2):341-346.
28. Boller T., Felix G. (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379-406.
29. Boss P.K., Davies C., Robinson S.P. (1996) Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology* 32(3): 565–569.
30. Bozsó Z., Ott P.G., Kecskes M.L., Czellig A., Klement Z. (2001) Non-specific, Peroxidase and H₂O₂ Associated Reactions of Tobacco Leaves after Infiltration with hrp/hrmA Mutants of *P. syringae* pv. *syringae* 61. In: De Boer S.H. (szerk.) *Plant Pathogenic Bacteria*. Springer, Dordrecht.
31. Bradley D.J., Kjellbom P., Lamb C.J. (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70(1):21-30.
32. Browse J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology* 60, 183–205.
33. Bu Q., Jiang H., Li C.B., Zhai Q., Zhang J., Wu X., Sun J, Xie Q. (2008) Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors *ANAC019* and *ANAC055* in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Research* 18:756–767.
34. Bushley K.E., Turgeon B.G. (2010) Phylogenomics reveals subfamilies of fungal nonribosomal peptide synthetases and their evolutionary relationships. *BMC Evolutionary Biology* 10:26.
35. Büttner P., Koch F., Voigt K., Quidde T., Risch S., Blaich R., Brückner B., Tudzynski P. (1994) Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Current Genetics* 25(5):445–450.
36. Carbonell-Bejerano P., Diago M.P., Martínez-Abaigar J., Martínez-Zapater J.M., Tardaguila J., Núñez-Olivera E. (2014) Solar ultraviolet radiation is necessary to enhance grapevine fruit ripening transcriptional and phenolic responses. *BMC Plant Biology* 14:183.
37. Carra A., Gambino G., Schubert A. (2007) A cetyltrimethylammonium bromide-based method to extract low-molecular-weight RNA from polysaccharide-rich plant tissues. *Analytical Biochemistry* 360(2):318–320.
38. Cavalier D.M., Lerouxel O., Neumetzler L., Yamauchi K., Reinecke A., Freshour G., Zabolina O.A., Hahn M.G., Burgert I., Pauly M., Raikhel N.V., Keegstra K. (2008) Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *Plant Cell*. 20(6):1519-1537.

39. Cavallini E., Matus J. T., Finezzo L., Zenoni S., Loyola R., Guzzo F., Schlechter R., Ageorges A., Arce-Johnson P., Tornielli G. (2015) The phenylpropanoid pathway is controlled at different branches by a set of R2R3-MYB C2 repressors in grapevine. *Plant Physiology* 167(4):1448–1470.
40. Cheng Q., Han B., Yang L., Wu M., Zhong Q., Wu H., Wang X., Wang Y., Xia X. (2016) The cotton MYB108 forms a positive feedback regulation loop with CML11 and participates in the defense response against *Verticillium dahliae* infection *Journal of Experimental Botany* 67(6):1935–1950.
41. Cheynier V., Comte G., Davies K.M., Lattanzio V., Martens S. (2013) Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* 72:1–20.
42. Choquer M., Fournier E., Kunz C., Levis C., Pradier J.M., Simon A., Viaud M. (2007) *Botrytis cinerea* virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters* 277(1):1–10.
43. Chunlei G., Rongrong G., Xiaozhao X., Min G., Xiaoqin L., Junyang S., Yi Z., Xiping W. (2014) Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family, *Journal of Experimental Botany*, 65(6):1513–1528.
44. Ciliberti N., Fermaud M., Languasco L., Rossi V. (2015) Influence of fungal strain, temperature, and wetness duration on infection of grapevine inflorescences and young berry clusters by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 105(3):325–233.
45. Ciliberti N., Fermaud M., Roudet J., Languasco L., Rossi V. (2016) Environmental effects on the production of *Botrytis cinerea* conidia on different media, grape bunch trash, and mature berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 22(2):262–270.
46. Coelho J., Almeida-Trapp M., Pimentel D., Soares F., Reis P., Rego C., Mithöfer A., Fortes A.M. (2019) The study of hormonal metabolism of Trincadeira and Syrah cultivars indicates new roles of salicylic acid, jasmonates, ABA and IAA during grape ripening and upon infection with *Botrytis cinerea*. *Plant Science* 283:266-277.
47. Cohn J., Sessa G., Martin G.B. (2001) Innate immunity in plants. *Current Opinion Immunology* 13(1):55-62.
48. Collado I.G., Macias-Sánchez A.J., Hanson J.R. (2007) Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Natural Product Reports* 24(4):674–686.
49. Collado I.G., Aleu J., Hernández-Galán R., Duran-Patron R. (2000) *Botrytis* species: an intriguing source of metabolites with a wide range of biological activities. Structure, chemistry and bioactivity of metabolites isolated from *Botrytis* species. *Current Organic Chemistry* 4:1261–1286.
50. Collado I.G., Viaud M. (2015) Secondary metabolism in *Botrytis cinerea*: Combining genomic and metabolomic approach 296-302 p. In: Fillinger S., Elad Y. (Szerk) *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* Svájcs Springer International Kiadó 486 p.
51. Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.M., Nielsen K.K., Rasmussen U., Vad K. (1993) Plant chitinases. *The Plant Journal* 3(1):31–40.

52. Colmenares A.J., Aleu J., Durán–Patrón R., Collado I.G., Hernández–Galán R. (2002) The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology* 28(5):997–1005.
53. Cotton P., Kasza Z., Bruel C., Rasclé C., Fèvre M. (2003) Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters* 227(2):163–169.
54. Dai X., Zhuang Z., Zhao P.X. (2018) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research* 46(W1):49–54.
55. Dalmais B., Schumacher J., Moraga J., LE Pêcheur P., Tudzynski B., Collado I.G., Viaud M. (2011) The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology* 12(6):564–79.
56. De Lorenzo G., Cervone F., Bellincampi D., Caprari C., Clark A.J., Desiderio A., Devoto A., Forrest R., Leckie F., Nuss L. (1994) Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication *Biochemical Society Transactions* 22(2):394-397.
57. Delaunoy B., Cordelier S., Conreux A., Clément C., Jeandet P. (2009) Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnology Journal* 7(1):2–12.
58. Delaunoy B., Farace G., Jeandet P., Clément C., Baillieul F., Dorey S., Cordelier S. (2014) Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research* 21(7):4837–4846.
59. Derbyshire M.C., Mbengue M., Barascud M., Navaud O., Raffaele S. (2018) Small RNAs from the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* highlight candidate host target genes associated with quantitative disease resistance. *Molecular Plant Pathology* 20(9):1279–1297.
60. Deytieux–Belleau C., Geny L., Roudet J., Mayet V., Donèche B., Fermaud M. (2009) Grape berry skin features related to ontogenic resistance to *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 125(4):551–563.
61. Dieguez S.C., Lois L.C., Gomez E.F., De la Pena M.L.G. (2003) Aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Albariño *Lebensmittel–Wissenschaft und–Technologie* 36:585–590.
62. Ding Z.J., Yan J.Y., Li C.X., Li G.X., Wu Y.R., Zheng S.J. (2015) Transcription factor WRKY46 modulates the development of Arabidopsis lateral roots in osmotic/salt stress conditions via regulation of ABA signaling and auxin homeostasis. *Plant Journal* 84(1):56-69.
63. Dixon D.P., Edwards R. (2010) Glutathione Transferases. *The Arabidopsis Book* 8:e0131
64. Dixon D., Hawkins T., Hussey P., Edwards R., (2009) Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *Journal of Experimental Botany* 60(4):1207-1218.
65. Dodds P.N., Rathjen J.P. (2010) Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11(8):539–548.
66. Dröge-Laser W., Kaiser A., Lindsay W.P., Halkier B.A., Loake G.J., Doerner P., Dixon R.A., Lamb C., (1997) Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that

- phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. *The EMBO Journal* 16(4):726–738.
67. Drysdale G.S., Fleet G.H. (1988) Restricted access Acetic Acid Bacteria in Winemaking: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture* 39:143-151.
 68. Dubreuil-Maurizi C., Trouvelot S., Frettinger P., Pugin A., Wendehenne D., Poinssot B. (2010) Beta-aminobutyric acid primes an NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species production during grapevine-triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(8):1012–21.
 69. Dudareva N., Klempien A., Muhlemann J.K., Kaplan I. (2013) Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *The New Phytologist* 198(1):16–32
 70. Durrant W. E., Dong X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42:185–209.
 71. Durrant, W., E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K., Jones, D., G. (2000) cDNA-AFLP Reveals a Striking Overlap in Race-Specific Resistance and Wound Response Gene Expression Profiles. *The Plant Cell* 12(6):963–977
 72. Eichmeier A., Kiss T., Penazova E., Pecenka J., Berraf-Tebbal A., Baranek M., Pokluda R., Cechova J., Gramaje D., Grzebelus D. (2019) MicroRNAs in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay are differentially expressed in response to *Diaporthe* Species. *Genes (Basel)* 10(11):905.
 73. El-Sharkawy S., Sherif I., Mila M., Bouzayen M., Jayasankar S. (2009) Molecular characterization of seven genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors during plum fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany* 60:907-922
 74. Elad Y., Pertol I., Prado A.M.C., Stewart A. (2015) Plant hosts of *Botrytis* spp. 413 p. In: Fillinger S., Elad Y. (Szerk) *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* Svájc Springer International kiadó 486 p.
 75. Espino J.J., Gutiérrez-Sánchez G., Brito N., Shah P., Orlando R., González C. (2010) The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics* 10(16):3020–3034
 76. Felix G., Duran J.D., Volko S., Boller T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* 18(3):265-76.
 77. Finking R., Marahiel M.A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual Review of Microbiology* 58:453–488.
 78. Fonseca S., Chini A., Hamberg M., Adie B., Porzel A., (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Natural Chemical Biology* 5:344–50
 79. Frías M., Brito N., González M., González C. (2014) The phytotoxic activity of the cerato-platanin BcSpl1 resides in a two-peptide motif in the protein surface. *Molecular Plant Pathology* 15(4):342–351
 80. Frías M., González C., Brito N. (2011) BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytologist* 192:483–495
 81. Fuentes S., Sullivan W., Tilbrook J., Tyerman S. (2010) A novel analysis of grapevine berry tissue demonstrates a variety-dependent correlation between tissue vitality and berry shrivel. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16(2):327–336
 82. Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki K., (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the

- points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9:436–442.
83. Fujita Y., Fujita M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research* 124:509–525.
 84. Furdíková K., Makyšová K., Špánik I. (2017) Effect of indigenous *S. cerevisiae* strains on higher alcohols, volatile acids, and esters in wine. *Czech Journal of Food Sciences* 35:131–142.
 85. Furdíková K., Makyšová K., Drtilová T., Klemková T., Durcanská K., Špánik I. (2019) Comparison of volatiles in noble-rotten and healthy grape berries of Tokaj. *LWT - Food science and Technology* 105:37-47.
 86. Galletti R., Ferrari S., De Lorenzo G. (2011) *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 157(2):804-814.
 87. Gijzen M., Nürnberger T. (2006) Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa *Phytochemistry* 67:1800–1807
 88. Glazebrook J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43:205–227.
 89. Glazebrook J. (2001) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*—2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* 4(4):301–308.
 90. Godfrey D., Able A. J., Dry I. (2007) Induction of a grapevine germin-like protein (*VvGLP3*) gene is closely linked to the site of *Eryiphe necator* infection: A possible role in defence? *Molecular Plant Microbe Interactions* 20(9):1112–1125.
 91. Gómez-Gómez L., Boller T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 5(6):1003-1011.
 92. González C., Brito N., Sharon A. (2015) Infection process and fungal virulence factors 237-238 p. In: Fillinger S., Elad Y. (Szerk) *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Svájc Springer International kiadó 486 p.
 93. Gonzalez A., Zhao M., Leavitt M., Lloyd M., (2008) Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* 53(5):814–827.
 94. Goossens J., Mertens J., Goossens A. (2017) Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling. *Journal of Experimental Botany* 68(6):1333–1347.
 95. Graham L.E., Schippers J.H.M., Dijkwel P.P., Wagstaff C. (2012). Ethylene and senescence processes *Annual Plant Reviews* 44, 305–341
 96. Guillaumie S., Mzid R., Méchin V., Léon C., Hichri I., Destrac-Irvine A., Trossat-Magnin C., Delrot S., Lauvergeat V. (2010) The grapevine transcription factor WRKY2 influences the lignin pathway and xylem development in tobacco. *Plant Molecular Biology* 72(1-2):215-34.
 97. Gullner G., Komives T., Király L., Schröder P. (2018) Glutathione S-Transferase Enzymes in Plant-Pathogen Interactions *Frontiers in Plant Science* 9:1836.
 98. Haile Z.M., Malacarne G., Pilati S., Sonogo P., Moretto M., Masuero D., Vrhovsek U., Engelen K., Baraldi E., Moser C. (2020) Dual transcriptome and metabolic analysis of

- Vitis vinifera* cv. pinot noir berry and *Botrytis cinerea* during quiescence and egressed infection. *Frontiers in Plant Science* 10:1704
99. Hasanuzzaman M., Nahar K., Anee T. I., Fujita M. (2017). Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and molecular biology of plants* 23(2):249–268.
 100. Hayashi T., Kaida R. (2011) Functions of xyloglucan in plant cells. *Molecular Plant Pathology*. 4(1):17-24.
 101. Hevia M.A., Canessa P., Müller–Esparza H., Larrondo L.F. (2015) A circadian oscillator in the fungus *Botrytis cinerea* regulates virulence when infecting *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(28):8744–8749.
 102. Hichri I., Heppel S. C., Pillet J., Léon C., Czemmel S., Delrot S. (2010) The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine. *Molecular Plant* 3, 509–523.
 103. Hirai M.Y., Sugiyama K., Sawada Y., Tohge T., Obayashi T., Suzuki A., Araki R., Sakurai N., Suzuki H., Aoki K., Goda H., Nishizawa O.I., Shibata D., Saito K. (2007) Omics-based identification of *Arabidopsis Myb* transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis *PNAS* 104(15):6478-6483.
 104. Holz G., Coertze S., Williamson B. (2007) *The Ecology of Botrytis on Plant Surfaces*. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (Szerk) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht. Springer kiadó, 5 pp.
 105. Höll J., Vannozzi A., Czemmel S., D'Onofrio C., Walker A.R., Rausch T., Lucchin M., Boss P.K., Dry I.B., Bogs J. (2013) The R2R3–MYB transcription factors MYB14 and MYB15 regulate stilbene biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell* 25(10):4135–4149
 106. Ilc T., Werck–Reichhart D., Navrot N. (2016) Meta–analysis of the core aroma components of grape and wine aroma. *Frontiers in Plant Science* 30(7):1472
 107. Imler J.L., Hoffmann J.A. (2001) Toll receptors in innate immunity. *Trends in Cell Biology* 11(7):304-311.
 108. Ishihama N., Yoshioka H. (2012) Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 15(4):431-437.
 109. Jackson R.S. (2014) Botrytis 288-296. p. In: Robinson, R.K., Batt, C. A., Patel, P. D.(Szerk.) *Encyclopedia of Food Microbiology*. Burlington Academic kiadó, 3248 p.
 110. Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Huguency P., Dasilva C., Horner D., Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyère C., Billault A., Segurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pè M.E., Valle G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A.F., Weissenbach J., Quétier F., Wincker P; French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449(7161):463-467.
 111. Jakoby M., Weisshaar B., Dröge–Laser W., Vicente–Carbajosa J., Tiedemann J., Kroj T., Parcy F. (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 7(3):106–111

112. Jayani R.S., Saxena S., Gupta R. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry* 40(9):2931–2944.
113. Jiang H., Li H., Bu Q., Li C. (2009) The RHA2a-interacting proteins anac019 and anac055 may play a dual role in regulating aba response and jasmonate response. *Plant Signaling & Behavior* 4:464–466.
114. Jin J., Tian F., Yang D–C., Meng Y–Q., Kong L., Luo J., Gao G. (2017) PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Research* 45(D1):1040–1045.
115. Johnson H., Robinson J. (2003) The world atlas of wine. 5. kiadás London: Barnes & Noble kiadó 352 p.
116. Jones, J., Dangl, J. (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323–329 .
117. Judet–Correia D., Bollaert S., Duquenne A., Charpentier C., Bensoussan M., Dantigny P. (2010) Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 142(1–2):106–113.
118. Kámán-Tóth E., Dankó T., Gullner G., Bozsó Z., Palkovics L., Pogány M. (2019) Contribution of cell wall peroxidase- and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species to *Alternaria brassicicola*-induced oxidative burst in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology* 20(4):485–499.
119. Kapat A., Zimand G., Elad Y. (1998) Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *B. cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52(2):127–137.
120. Kärkönen A., Kuchitsu K. (2015) Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry*. 112:22–32.
121. Kars I., Krooshof G.H., Wagemakers L., Joosten R., Benen J. A., van Kan J.A. (2005) Necrotizing activity of five *B. cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *The Plant Journal* 43(2):213–225.
122. Katsir L., Schilmiller A.L., Staswick P.E., He S.Y., Howe G.A. (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *PNAS* 105:7100–7105
123. Kazan K., (2006) Negative regulation of defence and stress genes by EAR–motif–containing repressors. *Trends in Plant Science* 11(3):109–112
124. Kelloniemi J., Trouvelot S., Héloir M.C., Simon A., Dalmais B., Frettinger P., Cimerman A., Fermaud M., Roudet J., Baulande S., Bruel C., Choquer M., Couvelard L., Duthieuw M., Ferrarini A., Flors V., Le Pêcheur P., Loisel E., Morgant G., Poussereau N., Pradier J.M., Rasclé C., Trdá L., Poinssot B., Viaud M. (2015) Analysis of the molecular dialogue between gray mold (*Botrytis cinerea*) and grapevine (*Vitis vinifera*) reveals a clear shift in defense mechanisms during berry ripening. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 28(11):1167–1180
125. Khush R.S., Lemaitre B. (2000) Genes that fight infection: what the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends Genetics* 16(10):442–449.
126. Kim H.J., Nam H.G., Lim P.O. (2016) Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence *Current Opinion in Plant Biology* 33:48–56.
127. Kim S., Park H.C., Kim K.E., Jung M.S., Han H.J., Kim S.H., Kwon Y.S., Bahk S., An J., Bae D.W., Yun D.J., Kwak S.–S., Chung W.S. (2012) A NAC transcription factor and

- SNI1 cooperatively suppress basal pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 40(18):9182–9192.
- 128.Klement Z., Bozsó Z., Kecskés M.L., Besenyei E., Arnold C., Ott P.G. (2003) Local early induced resistance of plants as the first line of defence against bacteria. *Pest Management Science* 59(4):465-474.
- 129.Kuang J., Liu J., Mei J., Wang C., Hu H., Zhang Y., Sun M., Ning X., Xiao L. (2017) A class II small heat shock protein OsHsp18.0 plays positive roles in both biotic and abiotic defense responses in rice. *Scientific Reports* 7:11333.
- 130.Lam E., Kato N., Lawton M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411(6839):848-853.
- 131.Le Hénanff G., Profizi C., Courteaux B., Rabenoelina F., Gérard C., Clément C., Baillieul F., Cordelier S., Dhondt-Cordelier S. (2013) Grapevine NAC1 transcription factor as a convergent node in developmental processes, abiotic stresses, and necrotrophic/biotrophic pathogen tolerance. *Journal of Experimental Botany* 64(16):4877-4793.
- 132.Lehoczky J., Reichart G., Pete J. (1968) A szőlő védelme 96-97 p. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó 263 p.
- 133.Li J., Brader G., Palva E.T. (2004) The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16(2):319-31.
- 134.Li S.J., Fu Q.T., Cheng H.G., Huang W.D., Hu D.Q. (2011) *Arabidopsis thaliana* WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance. *Planta* 233(6):1237–1252.
- 135.Liang G., Yang F., Yu D. (2010) MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 62(6):1046–1057
- 136.Licausi F., Giorgi F.M., Zenoni S., Osti F., Pezzotti M., Perata P. (2010) Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics* 11:719
- 137.Liu H., Yang W., Liu D., Han Y., Zhang A., Li S. (2011) Ectopic expression of a grapevine transcription factor VvWRKY11 contributes to osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Molecular Biology Reports* 38(1):417-27.
- 138.Liu S., Kracher B., Ziegler J., Birkenbihl R.P., Somssich I.E. (2015) Negative regulation of ABA signaling by WRKY33 is critical for *Arabidopsis* immunity towards *Botrytis cinerea*. *Elife* 15;4:e07295.
- 139.Lopez 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. *Frontiers in Chemistry* 5:20.
- 140.Lorenzo O., Piqueras R., Sánchez-Serrano J.J., Solano R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15(1):165-78.
- 141.Lovato A., Zenoni S., Tornielli G.B., Colombo T, Vandelle E., Polverari A. (2019) Plant and fungus transcriptomic data from grapevine berries undergoing artificially–induced noble rot caused by *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 156:110924
- 142.Maffei M.E. (2010) Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany* 76(4), 612-631.

143. Magyar I., Bene Z. (2006) Morphological and taxonomic study on mycobiota of noble rotted grapes in the Tokaj wine district *Acta Alimentaria* 35(2):237–246.
144. Magyar I. (2011) Botrytized wines. In R. S. Jackson (Ed.). *Advances in Food and Nutrition Research*. (pp. 147–206) 63:147–206 Burlington: Academic press
145. Marchive C., Léon C., Kappel C., Coutos-Thévenot P., Corio-Costet M.F., Delrot S., Lauvergeat V. (2013) Over-expression of VvWRKY1 in grapevines induces expression of jasmonic acid pathway-related genes and confers higher tolerance to the downy mildew *PLoS ONE* 8(1): e54185
146. Martínez-Márquez A., Martınez-Esteso M., Viella-Anton M., Selles-Marchart S., Morante-Carrier A.J., Hurtado E., Palazon J., Bru-Martınez R. (2017) A Tau Class Glutathione-S-Transferase is Involved in Trans-Resveratrol Transport Out of Grapevine Cells. *Frontiers in Plant Science* 8:1457
147. McLoughlin F., Basha E., Fowler M., Kim M., Bordowitz J., Katiyar-Agarwal S., Vierling E. (2016) Class I and II small heat shock proteins together with hsp101 protect protein translation factors during heat stress. *Plant Physiology* 172(2):1221–1236.
148. Medzhitov R., Janeway C.A. (1997) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91(3):295-298.
149. Mica E., Piccolo V., Delledonne M., Ferrarini A., Pezzotti M., Casati C., Del Fabbro C., Valle G., Policriti A., Morgante M., Pesole G., Pè M.E., Horner D.S. (2009) High throughput approaches reveal splicing of primary microRNA transcripts and tissue specific expression of mature microRNAs in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics* 10:558
150. Miklósy É., Kalmár Z., Kerényi Z. (2004) Identification of some characteristic aroma compounds in noble rotted grape berries and aszú wines from Tokaj by GC-MS *Acta Alimentaria* 33(3):215–226.
151. Miklósy É., Krényi Z. (2004) Comparison of the volatile aroma components in noble rotted grape berries from two different locations of the Tokaj wine district in Hungary. *Analytical Chimica Acta* 513:177-181.
152. Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2012) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819(2):86-96.
153. Moffat C.S., Ingle R.A., Wathugala D.L., Saunders N.J., Knight H., Knight M.R. (2012) ERF5 and ERF6 play redundant roles as positive regulators of JA/Et-mediated defense against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *PLoS One* 7(4):e35995.
154. Mohr P., Cahill D. (2007) Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple Genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Functional & Integrative Genomics* 7, 181–191.
155. Mølgaard A., Kauppinen S., Larsen S. (2000) Rhamnogalacturonan acetyltransferase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure* 8(4):373–383.
156. Mulema J. M. K., Okori P., Denby K. J. (2011). Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana*-*Botrytis cinerea* interaction using two-dimensional liquid chromatography. *African Journal of Biotechnology* 10, 17551–17563.
157. Müller M., Munne-Bosch S. (2015) Ethylene response factors: a keyregulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiology* 169, 32–41.
158. Naár Z., Szarvas J. (2012) *Borászati Mikrobiológia*. Eger: Eszterházy Károly Főiskola nyomda, 196 p.

159. Nafisi M., Stranne M., Zhang L., Jan A.L., Yumiko S. (2014) The endo-arabinanase BcAra1 is a novel host-specific virulence factor of the necrotic fungal phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 27(8):781–792.
160. Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology* 140:411-432.
161. Nawrath C., Métraux J.P. (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant cell* 11(8):1393–1404.
162. Negri S., Lovato A., Boscaini F., Salvetti E., Torriani S., Commisso M., Danzi R., Ugliano M., Polverari A., Tornielli G.B., Guzzo F. (2017) The Induction of Noble Rot (*Botrytis cinerea*) Infection during Postharvest Withering Changes the Metabolome of Grapevine Berries (*Vitis vinifera* L., cv. Garganega). *Frontiers in Plant Science* 8:1002.
163. Ng D.W., Abeysinghe J.K., Kamali M. (2018). Regulating the Regulators: The Control of Transcription Factors in Plant Defense Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3737.
164. Nikfardjam M.P., László G., Dietrich H. (2006) Resveratrol-derivatives and antioxidative capacity in wines made from botrytized grapes. *Food Chemistry* 96(1):74–79.
165. Nishitani K., Vissenberg K. (2007) Roles of the XTH protein family in the expanding cell. In: Verbelen J-P, Vissenberg K, (Szerk) The expanding cell. *Plant Cell Monographs* Vol. 5. Berlin: Springer 89–116.
166. Nuruzzaman M., Sharoni A., Kikuchi S. (2013) Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology* 4:248
167. Ohashi-Ito K., Kubo M., Demura T., Fukuda H. (2005) Class III homeodomain leucine-zipper proteins regulate xylem cell differentiation. *Plant and Cell Physiology* 46(10):1646–1656.
168. Ott P. G. (2002) A korai indukált reizosztencia (EIR) és a hiperszenzitív reakció (HR) növényben lezajló folyamatainak és kölcsönhatásainak jellemzése. Doktori értekezés, Szent István Egyetem Kertészettudományi kar
169. Ott P., Szabó L., Balázs E., Klement Z. (1997) Submicroscopic evidence of bacterially induced resistance in tobacco leaves *Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica* 32:265-280.
170. Park C.J és Seo Y.S. Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *Plant Pathology Journal* (4):323-333.
171. Pauly M., Keegstra K. (2016) Biosynthesis of the Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Xyloglucan. *Annual Review of Plant Biology*. 67:235-59.
172. Pieterse C.M., Van der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A., Van Wees S.C. (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28:489–521.
173. Pech J.C., Purgatto E., Bouzayen M., Latché A. (2012) Ethylene and fruit ripening *Annual Plant Reviews* 44:275–304.
174. Pedley K.F., Martin G.B. (2005) Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity *Current Opinion in Plant Biology* 8(5):541–547.

175. Peña-Cortés H., Barrios P., Dorta F., Polanco V., Sánchez C., Sánchez E., (2004). Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant response to pathogen and insects and in fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* 23, 246–260.
176. Per T.S., Khan M.I.R., Anjum N.A., Masood A., Hussain S.J., Khan N.A. (2018). Jasmonates in plants under abiotic stresses: crosstalk with other phytohormones matters. *Environmental and Experimental Botany* 145, 104–120.
177. Peterson M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H.B., Lacy M., Austin M.J., Parker J.E., Sharma S.B., Klessig D.F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A.B., Mundy J. (2000) Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103(7):1111-20.
178. Pezet R., Gindro K., Viret O., Spring J.–L. (2004) Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65(6):297–303.
179. Phukan, U. J., Jeena, G. S., Shukla, R. K. (2016) WRKY Transcription Factors: Molecular Regulation and Stress Responses in Plants. *Frontiers in plant science* 7:760.
180. Pinedo C., Wang C.M., Pradier J.M., Dalmais B., Choquer M., Le Pêcheur P., Morgant G., Collado I.G., Cane D.E., Viaud M. (2008) Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. *ACS Chemical Biology* 3(12):791–801.
181. Podolyan A., White J., Jordan B., Winefield C. (2010) Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13–lipoxygenases expressed in grape berries of Sauvignon Blanc. *Functional Plant Biology* 37(8):767–784.
182. Poinssot B., Vandelle E., Bentéjac M., Adrian M., Levis C., Brygoo Y., Garin J., Sicilia F., Coutos–Thévenot P., Pugin A. (2003) The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 16(6):553–564.
183. Prestegard J.H., Liu J., Widmalm G. (2017) Oligosaccharides and Polysaccharides. In: Essentials of Glycobiology, Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., szerk. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory nyomda; 2017.
184. Puranik S., Sahu P.P., Srivastava P.S., Prasad M. (2012) NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science* 17, 369–381.
185. Raineri J., Ribichich K.F., Chan R.L. (2015) The sunflower transcription factor *HaWRKY76* confers drought and flood tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants without yield penalty *Plant Cell Reports* 34(12):2065-2080.
186. Raskin I. (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 43: 439-463.
187. Rasul S., Dubreuil–Maurizi C., Lamotte O., Koen E., Poinssot B., Alcaraz G., Wendehenne D., Jeandroz S. (2012) Nitric oxide production mediates oligogalacturonide–triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 35(8):1483–99.
188. Reid K.E., Olsson N., Schlosser J., Peng F., Lund S.T. (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real–time RT–PCR during berry development. *BMC Plant Biology* 6:27.

- 189.Reino J.L., Hernández-Galán R., Durán-Patrón R., Collado I.G. (2004) Virulence – Toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus. *Botrytis cinerea Journal of Phytopathology* 152(10):563–566.
- 190.Ren H., Wu X., Lyu Y., Zhou H., Xie X., Zhang X., Yang H. (2017) Selection of reliable reference genes for gene expression studies in *Botrytis cinerea*. *Journal of Microbiological Methods* 142:71-75.
- 191.Revina T.A., Gerasimova N.G., Kladnitskaia G.V., Chalenko G.I., Valueva T.A. (2008) Effect of proteinaceous proteinase inhibitors from potato tubers on the growth and development of phytopathogenic microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44(1):101–105.
- 192.Rhoades W.M., Reinhart J. B., Lim P. L., Burge B. C., Bartel B., Bartel P.D. (2002) Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell* 110(4): 513–520.
- 193.Rivière C., Pawlus A.D., Mérillon J.M. (2012) Natural stilbenoids: Distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in *Vitaceae*. *Natural Product Reports* 29(11):1317–1333.
- 194.Rizvi S.M., Raman A. (2016) Volatiles from *Botrytis cinerea*-infected and healthy berries of *Vitis vinifera* influence the oviposition behaviour of *Epiphyas postvittana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 160:47–56.
- 195.Robert-Seilaniantz A., Grant M., Jones J.D.G. (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate salicylate antagonism. *Annual Review in Phytopathology* 49, 317–343.
- 196.Rodriguez R.E., Mecchia M.A., Debernardi J.M., Schommer C., Weigel D., Palatnik J.F. (2010) Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development* 137(1):103–112.
- 197.Rolke Y., Liu S., Quidde T., Williamson B., Schouten A., Weltring K.M. (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. *Molecular Plant Pathology* 5(1):17–27
- 198.Rushton P.J., Somssich I.E., Ringler P., Shen Q.J. (2010) WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* 15(5):247–258.
- 199.Sablowski R.W., Meyerowitz E.M. (1998) A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA *Cell* 92(1):93-103.
- 200.Saigne-Soulard C., Abdelli-Belhadj A., Téléf-Micouleau M., Bouscaut J., Cluzet S., Corio-Costet M.F., Mérillon J-M. (2015) Oligosaccharides from *Botrytis cinerea* and Elicitation of Grapevine Defense 939–950 In: Ramawat K., Mérillon J.M. (Szerk.) *Polysaccharides*. Svájç: Springer International kiadó, 2241 p.
- 201.Sakuno E., Tani H., Nakajima H. (2007) 2-epi-botcinin A and 3-O-acetylbotcinic acid from *Botrytis cinerea*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 71(10):2592-5
- 202.Scharf D.H., Heinekamp T., Brakhage A.A. (2014) Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. *PLoS Pathogen* 10:e1003859
- 203.Schumacher J., Simon A., Cohrs K.C., Traeger S., Porquier A., Dalmais B. (2015). The VELVET complex in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*: impact of BcLAE1 on differentiation, secondary metabolism, and virulence. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 28(6):659–674.

204. Seki M., Narusaka M., Abe M., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y., Shinozaki K. (2001) Monitoring the Expression Pattern of 1300 *Arabidopsis* Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. *The Plant Cell* 13(1):61–72.
205. Sewelam N., Kazan K., Thomas-Hall S.R., Kidd B.N., Manners J.M., Schenk P.M. (2013) Ethylene response factor 6 is a regulator of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *PLoS One* 8(8):e70289.
206. Shah P., Atwood J.A., Orlando R., El Mubarek H., Podila G.K., Davis M.R. (2009) Comparative proteomic analysis of *Botrytis cinerea* secretome. *Journal of Proteome Research* 8(3):1123–1130.
207. Sharp J.K., Valent B., Albersheim P. (1984) Purification and partial characterization of a beta-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *Journal of Biological Chemistry* 259(18):11312–20.
208. Sheard L.B., Tan X., Mao H., Withers J., Ben-Nissan G., (2010) Jasmonate perception by inositolphosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 468:400–405.
209. Siewers V., Smedsgaard J., Tudzynski P. (2004) The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea*, *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3868–3876.
210. Snyman M.C., Solofoharivelo M.C., Souza-Richards R., Stephan D., Murray S., Burger J.T. (2017) The use of high-throughput small RNA sequencing reveals differentially expressed microRNAs in response to aster yellows phytoplasma-infection in *Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay'. *PLoS One* 12(8):e0182629
211. Shlezinger N., Minz A., Gur Y., Ido H., Yasin D., Nicholas J. T., Amir S. (2011) Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. *PLoS Pathogens* 7:e1002185
212. Spoel S.H., Dong X. (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses *Cell Host Microbe* 3, 348–351.
213. Spoel S.H., Koornneef A., Claessens S.M., Korzelius J.P., Van Pelt J.A., Mueller M.J., Buchala A.J., Métraux J.P., Brown R., Kazan K., Van Loon L.C., Dong X., Pieterse C.M. (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15(3):760-770.
214. Staats M., Van Baarlen P., Van Kan J.A. (2005) Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22(2):333–346.
215. Staunton J., Weissman K.J. (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports* 18:380–416.
216. Sun R.Z., Cheng G., Li Q., He Y.N., Wang Y., Lan Y.B., Li S.Y., Zhu Y.R., Song W.F., Zhang X., Cui X.D., Chen W., Wang J. (2017) Light-induced Variation in Phenolic Compounds in Cabernet Sauvignon Grapes (*Vitis vinifera* L.) Involves Extensive Transcriptome Reprogramming of Biosynthetic Enzymes, Transcription Factors, and Phytohormonal Regulators. *Frontiers Plant Science* 19;8:547.
217. Szatmári Á., Klement Z. (2003) Hasonlóságok és különbségek a növény- és állatvilág immunmechanizmusban. *Növénytermelés* 52: 703-712.
218. Tak H., Mhatre M. (2013) Cloning and molecular characterization of a putative bZIP transcription factor *VvbZIP23* from *Vitis vinifera*. *Protoplasma* 250(1):333-345.

219. Takada S., Hibara K., Ishida T., Tasaka M. (2001) The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128(7):1127-35.
220. Tani H., Koshino H., Sakuno E., Nakajima H. (2005) Botcinins A, B, C, and D, metabolites produced by *Botrytis cinerea*, and their antifungal activity against *Magnaporthe grisea*, a pathogen of rice blast disease. *Journal of Natural Products* 68(12):1768–72..
221. Teixeira A., Eiras–Dias J., Castellarin S.D., Gerós H. (2013) Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences* 14(9): 18711–18739.
222. Temme N., Tudzynski P. (2009) Does *Botrytis cinerea* Ignore H₂O₂–induced oxidative stress during infection? Characterization of Botrytis Activator Protein 1. *Molecular Plant–Microbe Interactions:MPMI* 22(8):987–98.
223. ten Have A., Mulder W., Visser J., van Kan J.A. (1998) The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 11(10):1009-1016.
224. Ton J., Flors V., Mauch-Mani B. (2009) The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science* 14, 310–317.
225. Toth Zs., Winterhagen P., Kalapos B., Su Y., Kovacs L., Kiss E. (2016) Expression of a grapevine NAC transcription factor gene is induced in response to *powdery mildew* colonization in salicylic acid–independent manner *Scientific Reports* 4;6:30825
226. Tripathi P., Dubey N.K. (2004) Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 32:235–245
227. Underwood W. (2012) The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science* 7(3):85.
228. Uknes S., Mauch-Mani B., Moyer M., Potter S., Williams S., Dincher S., Chandler D., Slusarenko A., Ward E., Ryals J. (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4(6):645-656.
229. Ülker B., Somssich I.E. (2004) WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology* 7(5):491–498.
230. Valette–Collet O., Cimerman A., Reignault P., Levis C., Boccara M. (2003) Disruption of *B. cinerea* pectin methylesterase gene *pme1* reduces virulence on several host plants. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 16(4):360–267.
231. Van Den Driessche T., Keulemans J., Geeraerd A. (2012) Evaluation of fast volatile analysis for detection of *Botrytis cinerea* infections in strawberry. *Food Microbiology* 32(2):406–414.
232. van Kan J.A. (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11(5):247-253.
233. van Kan J.A., Stassen J.H., Mosbach A., Faino L., Farmer A.D., Papanotiriou D.G., Zhou S., Seidl M.F., Cottam E., Edel D., Hahn M., Schwartz D.C., Dietrich R.A., Widdison S., Scalliet G. (2017) A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 18(1):75-89.
234. van Loon L.C., Pierpoint W.S., Boller T. (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis–related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12, 245–264.

235. van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M., (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44, 135–162.
236. Vlot A.C., Dempsey D.M.A., Klessig D.F. (2009) Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47, 177–206.
237. Voigt C.A. (2014) Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae *Frontiers in Plant Science* 5:168.
238. Vuts J., Koczor S., Imrei Z., Jósваи J. K., Lohonyai Zs., Molnár B. P, Kárpáti Zs., Szócs G., Tóth M. (2018) Módszerek a kémiai ökológiaában *Növényvédelem* 79 (54):3.
239. Wang A, Tan D, Takahashi A, Li TZ, Harada T (2007) MdERFs, two ethylene response factors involved in apple fruit ripening. *Journal Experimental Botany* 58:3743-3748.
240. Wang K., Liao Y., Kan J., Han L., Zheng Y. (2015) Response of direct or priming defense against *Botrytis cinerea* to methyl jasmonate treatment at different concentrations in grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 194:32-39.
241. Wang X., Basnayake B., Zhang H., Li G., Li W., Virk N., Mengiste T., Song F. (2009) The *Arabidopsis* ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 22 (10):1227–1238.
242. Wasternack C., Kombrink E. (2010) Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology* 5:63–77.
243. Waterhouse A.L. (2002) Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Science* 957: 21–36
244. Weiberg A., Wang M., Lin F.M., Zhao H., Thang Z., Kaloshian I., Huang H., Jin H. (2013) Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* 342(6154):118-123.
245. Weiste C., Iven T., Fischer U., Oñate-Sánchez L., Dröge-Laser W. (2007) In planta ORFeome analysis by large-scale over-expression of GATEWAY®-compatible cDNA clones: screening of ERF transcription factors involved in abiotic stress defense. *Plant Journal* 52:382–390.
246. Wiemann P., Keller N.P. (2014) Strategies for mining fungal natural products *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41(2):301–313.
247. Williams B., Kabbage M., Kim H.J., Britt R., Dickman M.B. (2011) Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment *PLoS Pathogens* 7(6):e1002107
248. Xu X., Chen C., Fan B., Chen Z. (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell* 18(5):1310-1326.
249. Yang J., Duan G., Li C., Liu L., Han G., Zhang Y., Wang C (2019) The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* 18(10):1349
250. Yu D., Xu F., Zeng J., Zhan J. (2012) Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. *Iubmb Life*.64:285–95.

251. Zeng R.F., Zhou J.J., Liu S.R., Gan Z.M., Zhang J.Z., Hu C.G. (2019) Genome-wide identification and characterization of *squamosa-promoter-binding protein (SBP)* genes involved in the flowering development of citrus clementina. *Biomolecules* 9(2):E66
252. Zeyen R.J., Carver T.L.W., Lyngkjaer M.F. (2002). "Epidermal cell papillae," in *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*, szerk: R. R. Belanger, W. R. Buschnell, A. J. Dik, and T. L. W. Carver (St. Paul, MN: APS Press), 107–125.
253. Zhang B., Liu J., Yang Z.E., Chen E.Y., Zhang C.J., Zhang X.Y., Li F.G. (2018) Genome-wide analysis of *GRAS* transcription factor gene family in *Gossypium hirsutum* L. *BMC Genomics* 19(1):348.
254. Zheng Z.Y., Qamar S.A., Chen Z.X., Mengiste T. (2006) Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens *The Plant Journal* 48, 592–605.
255. Zhu Z., An F., Feng Y., Li P., Xue L, Jiang Z., Kim J.M., To T.K., Li W., Zhang X., Yu Q., Dong Z., Chen W.Q., Seki M., Zhou J.M., Guo H. (2011) Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *PNAS* 108(30):12539-44.

11. Mellékletek

M. 1. táblázat A transzkriptom szekvenálás RT-qPCR-el történő validálása során használt primer szekvenciák és RT-qPCR beállítási paraméterek.

Gén azonosító	Használt primer	RT-qPCR paraméterei	
<i>Bcin08g00340</i>	Forward 5' - CGGTTCCCTCAGTTTTGTGT	Enzim aktiválás és lánc denaturáció: 95 °C 6 perc	
	Reverse 5' - CGAGACTGAATAACGCGACA		
<i>Bcin13g02250</i>	Forward 5' - TAGGTGACGGCCATTGTGTA		
	Reverse 5' - CGAATACTCCCCGAAACAAA		
<i>Bcin13g02210</i>	Forward 5' - CAGTGCTACCCTTACACCGT	Primer betapadási hőmérséklet és lánchosszabítási folyamat: 60 °C 1 perc	Ismétlésszám: 40
	Reverse 5' - AGAGTAAGGTTGGGGTTCGGT		
<i>Bcin14g03170</i>	Forward 5' - CATTGCCAATATGGATGCTG		
	Reverse 5' - TTGAAGTGCGTTGCTACACC		
<i>Bcin04g00060</i>	Forward 5' - CCTCAGAAGGCACCTCACAA		
	Reverse 5' - GCCCAAGGTTCCGCCATTAGA		
<i>VIT_07s0151g00130</i>	Forward 5' - AGCAGCAGTCACAAATTGGC		
	Reverse 5' - GGGCTGAGAAGTTGAGGGAT		
<i>VIT_07s0005g00740</i>	Forward 5' - TCATCACTGCCCTCAATTGC	Lánc denaturáció: 95 °C	
	Reverse 5' - GTCGATGGCTCTGATTGCTC		
<i>VIT_07s0141g00690</i>	Forward 5' - TAGGTTGGATGCGGTGGATT		
	Reverse 5' - TCACCATCAAGCTTCGGAGA		
<i>VIT_06s0004g05700</i>	Forward 5' - GCGAGAGGAAGCGATTGAAG		
	Reverse 5' - AGGCTCCCAACCGAACTTTA		
<i>VIT_05s0062g00310</i>	Forward 5' - TTGGAACCAGAGGCCCTAAG		
	Reverse 5' - TGCTTTGATAACACCGCGAG		

M. 2. táblázat Szőlőbogyók szárazanyagtartalma az aszúsodási fázisok szerint.

Fázis	Szárazanyagtartalom (mg/mg)	Átlag (mg/mg)	Szórás (mg/mg)	Tukey HSD (p<0,05)
I.	0,229	0,228	0,028	A
	0,199			
	0,256			
II.	0,264	0,255	0,008	A
	0,249			
	0,253			
III.	0,360	0,285	0,065	A
	0,256			
	0,240			
IV.	0,674	0,603	0,065	B
	0,548			
	0,587			

M. 3. táblázat A transzkriptom szekvenálás RT-qPCR-el történő validálásának génexpressziós értékei. Az expressziós értékek log₂ értékekben vannak megadva, az első fázishoz viszonyítva.

	FÁZISOK					
	II.		III.		IV.	
	RNA-Seq	RT-qPCR	RNA-Seq	RT-qPCR	RNA-Seq	RT-qPCR
<i>Bcin08g00340</i>	4,43	3,74	4,85	4,86	1,56	3,11
<i>Bcin13g02250</i>	4,16	4,64	4,05	4,65	2,74	4,49
<i>Bcin13g02210</i>	2,84	1,64	3,47	2,19	2,24	1,86
<i>Bcin14g03170</i>	3,54	3,91	3,27	3,54	2,33	2,85
<i>Bcin04g00060</i>	0,61	-1,91	1,93	0,17	4,67	3,38
<i>VIT_07s0141g00690</i>	5,08	4,80	6,00	6,06	5,31	4,64
<i>VIT_06s0004g05700</i>	4,06	4,13	4,62	4,29	4,85	4,29
<i>VIT_05s0062g00310</i>	6,79	6,88	7,52	7,31	6,75	5,22
<i>VIT_07s0151g00130</i>	3,41	4,74	3,44	4,86	-0,14	0,29
<i>VIT_07s0005g00740</i>	4,88	5,98	5,51	6,76	3,44	3,57
Korreláció	0,93		0,90		0,85	

M. 4. táblázat Aszúsodás során a szőlőben indukálódó és represszálódó ROS ellensúlyozásában részvevő gének expressziós értékei. Az expressziós értékek log₂ értékekben vannak megadva, az első fázishoz viszonyítva.

Gén azonosító	Funkció	II. vs I. fázis	III. vs I. fázis
VIT_00s0207g00220	glutation-peroxidáz	1,63	2,04
VIT_06s0080g00260	glutation-peroxidáz	-	2,21
VIT_08s0007g07280	szuperoxid-dizmutáz	-	2,00
VIT_16s0013g00260	szuperoxid-dizmutáz	-	2,29
VIT_00s0698g00010	kataláz	-2,29	-2,37
VIT_04s0044g00020	kataláz	-2,41	-2,40
VIT_07s0191g00050	peroxidáz	-2,78	-3,97
VIT_14s0060g00540	peroxidáz	2,09	-
VIT_06s0004g07770	peroxidáz	2,98	2,54
VIT_08s0058g00970	peroxidáz	3,51	3,23
VIT_01s0010g01980	peroxidáz	3,67	2,74
VIT_01s0010g01960	peroxidáz	4,89	5,96
VIT_01s0026g00830	peroxidáz	5,75	6,30
VIT_06s0004g01180	peroxidáz	5,81	8,09
VIT_18s0072g00160	peroxidáz	6,05	9,41
VIT_07s0129g00360	peroxidáz	7,79	7,41
VIT_01s0010g02020	peroxidáz	8,15	4,78
VIT_01s0010g01950	peroxidáz	8,75	10,97
VIT_18s0001g06890	peroxidáz	9,42	7,77
VIT_18s0001g06850	peroxidáz	15,60	25,61
VIT_06s0004g07740	peroxidáz	16,73	24,58
VIT_01s0010g02010	peroxidáz	20,95	26,35
VIT_01s0010g02000	peroxidáz	26,96	45,56
VIT_11s0016g05320	peroxidáz	-	-3,42
VIT_18s0001g01140	peroxidáz	-	-3,10
VIT_05s0077g00720	peroxidáz	-	-2,85
VIT_00s1677g00010	peroxidáz	-	-2,20
VIT_10s0116g01780	peroxidáz	-	-1,67

M. 5. táblázat A Furmint aszúsodása során a szőlőben indukálódó és represszálódó L-fenilalanin lebontásból keletkező másodlagos anyagcseretermékek szintézisében részvevő gének. Az expressziós értékek log₂ értékekben vannak megadva, az első fázishoz viszonyítva.

Gén azonosító	Funkció	Furmint II.	Furmint III.	Gén azonosító	Funkció	Furmint II.	Furmint III.
VIT 16s0039g01120	PAL	2.05	1.99	VIT 10s0042g00860	STS	2.14	2.11
VIT 16s0039g01240	PAL	1.94	1.82	VIT 16s0100g01010	STS	1.79	1.68
VIT 16s0039g01300	PAL	1.43	0.00	VIT 16s0100g01020	STS	2.22	2.21
VIT 16s0039g01360	PAL	0.84	0.00	VIT 16s0100g00930	STS	1.53	1.23
VIT 16s0039g01100	PAL	1.88	1.78	VIT 16s0100g00850	STS	1.60	1.33
VIT 16s0039g01130	PAL	2.13	2.00	VIT 16s0100g00800	STS	2.27	2.28
VIT 16s0039g01280	PAL	1.75	1.45	VIT 10s0042g00930	STS	2.46	2.57
VIT 16s0039g01170	PAL	1.29	0.00	VIT 16s0100g01100	STS	1.60	1.27
VIT 16s0039g01110	PAL	2.07	1.97	VIT 16s0100g00940	STS	2.58	2.53
VIT 08s0040g01710	PAL	1.57	1.35	VIT 10s0042g00870	STS	2.04	1.89
VIT 19s0027g01220	PAL	-1.27	-2.04	VIT 16s0100g01160	STS	2.13	2.18
VIT 06s0004g02620	PAL	0.00	-1.58	VIT 16s0100g01150	STS	2.08	1.96
VIT 13s0019g04460	PAL	0.00	-2.18	VIT 16s0100g00810	STS	2.37	2.28
VIT 06s0004g08150	C4H	1.23	0.97	VIT 10s0042g00920	STS	2.25	2.17
VIT 11s0078g00290	C4H	2.23	2.08	VIT 16s0100g00830	STS	2.21	2.23
VIT 11s0065g00350	C4H	2.26	2.25	VIT 16s0100g00950	STS	1.93	1.84
VIT 02s0109g00250	4CL	0.00	-2.11	VIT 16s0100g00780	STS	1.70	1.35
VIT 13s0019g05260	4CL	0.00	0.00	VIT 16s0100g01000	STS	2.26	2.12
VIT 06s0061g00450	4CL	-0.82	-0.92	VIT 16s0100g00840	STS	2.28	2.13
VIT 01s0010g02740	4CL	0.00	0.00	VIT 16s0100g00860	STS	2.62	2.62
VIT 14s0171g00300	4CL	0.00	0.00	VIT 16s0100g01170	STS	2.14	2.11
VIT 08s0007g05050	4CL	0.00	0.00	VIT 16s0100g00910	STS	2.05	1.93
VIT 16s0039g02040	4CL	0.00	0.00	VIT 16s0100g01110	STS	1.95	1.80
VIT 11s0052g01090	4CL	1.56	1.36	VIT 16s0022g01020	STS	0.00	0.00
VIT 11s0052g01110	4CL	0.00	0.00	VIT 16s0022g01190	STS	0.00	0.00
VIT 14s0171g00290	4CL	0.00	0.00	VIT 03s0180g00200	UF3GT	0.00	0.00
VIT 17s0000g01790	4CL	1.92	2.22	VIT 03s0180g00280	UF3GT	1.46	1.35
VIT 02s0025g03660	4CL	1.76	1.85	VIT 03s0180g00320	UF3GT	0.00	1.42
VIT 11s0016g01040	C3H	0.00	0.00	VIT 03s0017g01990	UF3GT	0.00	0.00
VIT 08s0040g00780	C3H	0.00	-1.19	VIT 03s0017g02000	UF3GT	1.44	1.33
VIT 14s0068g00920	CHS	-0.90	-1.97	VIT 03s0017g02110	UF3GT	1.37	1.43
VIT 05s0136g00260	CHS	0.73	0.93	VIT 03s0017g02120	UF3GT	2.64	3.38
VIT 16s0022g01140	CHS	0.00	0.00	VIT 03s0017g02140	UF3GT	3.23	3.87
VIT 14s0068g00930	CHS	-1.78	-3.23	VIT 05s0062g00270	UF3GT	5.61	6.24
VIT 16s0022g01020	CHS	0.00	0.00	VIT 05s0062g00300	UF3GT	6.37	6.98
VIT 16s0022g01190	CHS	0.00	0.00	VIT 05s0062g00310	UF3GT	6.79	7.52
VIT 14s0066g00400	CHI	0.00	0.00	VIT 05s0062g00740	UF3GT	1.37	0.00
VIT 13s0067g02870	CHI	0.00	0.00	VIT 05s0094g00990	UF3GT	-1.15	-1.20
VIT 13s0067g03820	CHI	0.79	0.77	VIT 05s0094g01000	UF3GT	0.00	0.00
VIT 10s0042g00910	STS	1.93	2.07	VIT 08s0007g04580	UF3GT	0.00	0.00
VIT 10s0042g00890	STS	2.54	2.50	VIT 11s0052g01600	UF3GT	-2.32	-3.73
VIT 16s0022g01070	STS	0.00	0.00	VIT 12s0034g00030	UF3GT	0.00	0.00
VIT 16s0100g00880	STS	2.23	2.09	VIT 12s0034g00060	UF3GT	0.00	-0.92
VIT 16s0100g01130	STS	1.60	1.31	VIT 12s0034g00080	UF3GT	-1.95	-3.39
VIT 16s0100g01200	STS	2.08	2.36	VIT 12s0034g00130	UF3GT	0.00	-0.83
VIT 16s0100g01120	STS	1.97	1.77	VIT 16s0115g00340	UF3GT	0.00	0.00
VIT 16s0100g01040	STS	2.48	2.48	VIT 16s0050g01600	UF3GT	0.00	0.00
VIT 16s0100g01070	STS	2.15	2.56	VIT 17s0000g07790	UF3GT	-0.72	-1.15
VIT 16s0100g01140	STS	2.03	2.11	VIT 18s0001g06080	UF3GT	-1.00	-2.18
VIT 16s0100g00920	STS	2.06	1.96	VIT 18s0001g06090	UF3GT	1.63	1.57
VIT 16s0100g00770	STS	2.12	1.95	VIT 18s0001g06120	UF3GT	2.44	2.52
VIT 16s0100g00750	STS	1.29	1.16	VIT 18s0041g00740	UF3GT	0.00	0.00
VIT 16s0100g01060	STS	2.20	1.24	VIT 19s0085g00750	UF3GT	0.00	0.00
VIT 16s0100g00990	STS	1.77	1.68	VIT 00s0324g00050	UF3GT	0.00	-1.05
VIT 16s0100g00900	STS	2.01	1.77	VIT 00s0324g00060	UF3GT	0.00	-1.54
VIT 16s0100g01030	STS	1.71	1.63	VIT 07s0151g00540	UF3GT	0.00	0.00
VIT 10s0042g00880	STS	0.00	0.00				
VIT 16s0100g01190	STS	2.11	2.12				

M. 6. táblázat Azonosított *PR* gének expressziós értékei a Furmint aszúsodása során. Az expressziós értékek az I. fázishoz vannak viszonyítva.

PR	Gén azonosító	Furmint II.	Furmint III.	PR	Gén azonosító	Furmint II.	Furmint III.
PR1-szerű	VIT_00s0207g00130	-	-		VIT_08s0007g03650	-	-
	VIT_03s0088g00690	-	-		VIT_09s0002g00450	-	-
	VIT_03s0088g00700	-	-4,22		VIT_09s0002g01030	-	-
	VIT_03s0088g00710	-	-5,93		VIT_09s0002g01040	-1,63	-2,08
	VIT_11s0052g01620	-	-		VIT_09s0054g01010	-	-
PR2-szerű	VIT_00s0780g00020	-	2,48	PR7-szerű	VIT_10s0003g02170	-	-
	VIT_01s0011g05500	-	-2,22		VIT_10s0003g02220	-	-
	VIT_01s0127g00610	-	-		VIT_10s0092g00170	-	-2,58
	VIT_02s0012g01610	2,36	3,37		VIT_10s0116g00140	-	-
	VIT_02s0025g02770	-	-		VIT_11s0016g00960	-	-3,67
	VIT_03s0017g00070	-	-		VIT_11s0016g03870	-	-1,77
	VIT_03s0063g02490	-1,82	-1,7		VIT_11s0103g00550	-	-
	VIT_05s0062g00770	-	-		VIT_12s0057g01450	-	-6,79
	VIT_05s0062g01430	-	-		VIT_13s0019g02480	-	-
	VIT_05s0077g01150	3,53	3,3		VIT_13s0019g02490	-	-
	VIT_06s0004g00720	-	-		VIT_13s0019g02530	-	-
	VIT_06s0004g04750	-	-		VIT_13s0019g02540	-	-
	VIT_06s0061g00100	-	-		VIT_13s0019g02550	2,99	-
	VIT_06s0061g00120	-	-		VIT_13s0019g02560	-	-
	VIT_06s0061g00130	-	-		VIT_13s0019g02580	-	-
	VIT_06s0080g00420	3,99	6,68		VIT_13s0019g02590	-	-
	VIT_07s0031g01790	-	-		VIT_13s0019g02600	-	-
	VIT_07s0129g00230	-	-		VIT_13s0019g02610	-	-
	VIT_08s0007g05990	-	-		VIT_13s0019g02620	-	-
	VIT_08s0007g06000	-	-		VIT_13s0019g02640	-	-
	VIT_08s0007g06010	-	-		VIT_13s0047g00200	-	-
	VIT_08s0007g06020	-	-		VIT_15s0048g01120	-	-
	VIT_08s0007g06030	-	-		VIT_15s0048g01130	-	-
	VIT_08s0007g06040	-	-2,76		VIT_15s0048g01170	-	-
	VIT_08s0007g06060	-	-		VIT_15s0048g01180	-	-
	VIT_08s0007g06080	-	-		VIT_15s0048g01200	-	-
	VIT_08s0007g06090	-	-		VIT_15s0048g01210	-	-
	VIT_08s0007g07560	-	-		VIT_16s0022g02200	-	-
	VIT_09s0002g06500	-	-		VIT_16s0022g02420	-	-
	VIT_09s0002g06880	-	-		VIT_16s0022g02460	-	-
	VIT_09s0070g00310	-2,16	-2,96		VIT_16s0050g00490	-	-1,64
	VIT_10s0003g03690	-	-		VIT_16s0098g00950	-	-
	VIT_10s0116g01640	-1,72	-1,99		VIT_16s0098g00970	-	-
VIT_11s0016g00220	-	-	VIT_16s0098g01160	-	-		
VIT_11s0016g01100	-	-	VIT_16s0100g00030	-	-		
VIT_11s0016g02960	-	-	VIT_16s0100g00060	-	-		
VIT_11s0016g04360	-	-	VIT_18s0001g09360	-	-		
VIT_11s0016g05560	-	-	VIT_18s0001g10320	-	-		
VIT_12s0057g00890	-	-	VIT_18s0001g10330	-	-		
VIT_12s0059g01320	-	-2,89	VIT_18s0001g10340	-	-		
VIT_13s0019g01180	-	-	VIT_18s0001g10350	-	-		
VIT_13s0019g03300	-	-	VIT_18s0001g14870	-	-		
VIT_14s0006g00520	-	-	VIT_19s0015g01420	-	-		
VIT_16s0098g01560	-	-	VIT_15s0046g01570	-	-		
VIT_18s0001g12390	-	-2,53	VIT_15s0046g01590	-	-3,22		
VIT_18s0122g00980	-	-	VIT_15s0046g01600	7,94	9,38		
VIT_19s0090g01070	-	-	VIT_15s0046g01610	-	-3,47		
PR3-szerű	VIT_00s1290g00010	-	2,21	PR10-szerű	VIT_01s0011g05060	-	1,83
	VIT_03s0038g03400	6,75	8,49		VIT_01s0011g05150	-	-
	VIT_05s0094g00200	3,99	5,22		VIT_01s0011g05170	-	-
	VIT_05s0094g00220	-	-		VIT_01s0011g05180	1,89	1,9
	VIT_05s0094g00240	3,76	3,81		VIT_04s0023g00830	-	-
	VIT_05s0094g00260	-	-		VIT_05s0077g01530	1,76	-
	VIT_05s0094g00300	2,5	3,28		VIT_05s0077g01540	2,15	1,95
	VIT_05s0094g00320	-	-		VIT_05s0077g01550	-	-
VIT_05s0094g00360	3,4	4,8	VIT_05s0077g01560	-	-		
PR4-szerű	VIT_01s0011g01990	-	1,96	VIT_05s0077g01570	-	-	
	VIT_01s0011g02020	-	-	VIT_05s0077g01580	-	-	
	VIT_04s0008g04980	5,57	8,38	VIT_05s0077g01600	-	-	
	VIT_04s0023g02680	-	-	VIT_05s0077g01650	-2,62	-6,91	
	VIT_05s0020g00440	-	-	VIT_05s0077g01670	-	-8,63	
	VIT_05s0077g02080	-	-1,64	VIT_05s0077g01680	2,35	-	
VIT_07s0151g00460	-2,21	-2,78	VIT_05s0077g01690	7,13	7,03		

PR	Gén azonosító	Furmint II.	Furmint III.	PR	Gén azonosító	Furmint II.	Furmint III.	
	VIT_09s0002g01800	-	-		VIT_05s0102g01190	-	-1,96	
	VIT_09s0002g05810	3,69	3,79		VIT_07s0005g00920	2,94	6,72	
	VIT_11s0016g04740	-	2,36		VIT_07s0005g01390	-1,75	-	
	VIT_13s0067g02060	-	-1,89		VIT_12s0028g03640	-	1,65	
	VIT_13s0074g00150	-	-		VIT_00s0540g00020	-	-3,11	
	VIT_14s0081g00020	-	-		VIT_00s0540g00050	-	-	
	VIT_14s0081g00030	-	-1,97		VIT_11s0149g00270	-	-	
	VIT_14s0081g00050	-	-		VIT_11s0149g00280	6,62	10,72	
	VIT_14s0108g01660	-	-		VIT_11s0149g00300	-	-	
	VIT_17s0000g08530	-2,73	-3,63		VIT_11s0149g00330	-	-	
	VIT_18s0001g04980	-	-		VIT_11s0149g00350	-	-	
PR5-szerű	VIT_02s0025g04230	-	-	PR11-szerű	VIT_11s0149g00380	-	-	
	VIT_02s0025g04250	-	-		VIT_11s0149g00330	-	-	
	VIT_02s0025g04260	-	-		VIT_11s0149g00350	-	-	
	VIT_02s0025g04270	-	-		VIT_11s0149g00380	-	-	
	VIT_02s0025g04280	-	-		VIT_11s0206g00030	-	-	
	VIT_02s0025g04290	-	-2,29		VIT_15s0046g01080	-	-	
	VIT_02s0025g04300	-	-3,2		PR12-szerű	VIT_01s0010g02030	-	-
	VIT_02s0025g04310	-2,04	-4,45		VIT_07s0130g00030	-	3,32	
	VIT_02s0025g04320	-	-		VIT_00s0399g00020	-	2,14	
	VIT_02s0025g04340	2,3	2,71		VIT_06s0004g08060	-	-	
	VIT_03s0038g02160	-	-	VIT_07s0151g00740	-	-		
	VIT_03s0038g02170	-	-3,74	VIT_07s0151g00760	-	-		
	VIT_04s0023g03550	-3,03	-2,82	VIT_08s0058g01210	-2,08	-6,56		
	VIT_08s0007g00760	-	-	VIT_08s0058g01230	-	-3,97		
	VIT_11s0065g00650	-	-	VIT_10s0003g05780	-	-		
	VIT_11s0065g01050	-	-	VIT_12s0028g01180	3,19	3,87		
	VIT_16s0098g00640	-	-3,7	VIT_12s0055g01140	-	-1,88		
	VIT_18s0001g11930	-	-1,81	VIT_14s0066g01240	3,02	3,36		
	VIT_18s0001g14480	1,96	-	VIT_14s0108g00520	2,9	5,04		
	PR6-szerű	VIT_05s0020g05000	5,41	8,66	VIT_07s0005g02380	-	-	
VIT_05s0020g05020		4,4	10,76	VIT_09s0002g01320	4,36	6,69		
VIT_05s0020g05040		3,44	3,79	VIT_11s0016g01220	-	-		
VIT_08s0007g00820		2,29	2,57	VIT_12s0028g01310	-	1,75		
VIT_13s0067g01980		2,49	2,87	VIT_12s0059g00740	4,47	6,77		
VIT_00s0454g00010		-	-6,99	VIT_14s0060g02750	-	-2,6		
PR7-szerű	VIT_00s0454g00030	-	-2,33	PR15-szerű	VIT_14s0060g02760	-	-8,34	
	VIT_00s0454g00040	-	-		VIT_14s0128g00570	2,39	3,05	
	VIT_00s0878g00010	-	-		VIT_14s0128g00600	2,21	3,48	
	VIT_02s0025g02850	-	-		VIT_14s0128g00690	-	-	
	VIT_02s0025g02880	-	-		VIT_14s0128g00990	-	-3,62	
	VIT_02s0025g04600	-	-4,09		VIT_14s0128g01030	-	-3,88	
	VIT_02s0025g04780	-2,16	-4,72		VIT_16s0098g01910	-	-	
	VIT_02s0025g04790	-	-		VIT_17s0000g05360	-	-	
	VIT_02s0025g04800	-	-		VIT_18s0086g00410	-	4,1	
	VIT_02s0025g04810	-	-		PR17-szerű	VIT_03s0091g00130	-	-
	VIT_02s0025g04820	-	-	VIT_03s0091g00140		-	-	
	VIT_03s0038g00470	-	-	VIT_03s0091g00150		-	-	
	VIT_03s0038g02230	-	-	VIT_03s0091g00160		-	1,77	
	VIT_03s0063g00220	-	-	VIT_03s0091g00180		-	-	
	VIT_03s0063g00240	-	-	VIT_12s0028g00040		-	-	
	VIT_03s0063g00250	-	-	VIT_12s0035g01650		-	-	
	VIT_03s0063g00260	-	-					
	VIT_04s0044g01970	-	-					
	VIT_06s0004g00210	-	-					
	VIT_06s0004g04830	-	-					
	VIT_06s0004g05590	-	-					
	VIT_06s0004g05610	-	-					
	VIT_06s0004g05630	-	-					
	VIT_06s0009g01220	-	-					
	VIT_06s0009g01260	-	-					
	VIT_06s0080g00150	3,2	3,32					
	VIT_07s0005g00830	-	-					
	VIT_07s0005g04410	-	-					
	VIT_07s0031g00500	-	-					
	VIT_07s0129g00490	-1,77	-2,59					

M. 7. táblázat Furmint JAZ és 13-LOX gének expressziós értékei az aszúsodás során. Az expressziós értékek log₂ értékekben vannak megadva, az első fázishoz viszonyítva.

Gén azonosító	Funkció	Furmint II.	Furmint III.
<i>VIT_01s0146g00480</i>	JAZ gén	3,34	3,76
<i>VIT_04s0008g00110</i>	JAZ gén	-	1,73
<i>VIT_09s0002g00890</i>	JAZ gén	1,43	1,51
<i>VIT_10s0003g03790</i>	JAZ gén	3,63	4,35
<i>VIT_10s0003g03800</i>	JAZ gén	3,23	3,80
<i>VIT_10s0003g03810</i>	JAZ gén	1,98	2,03
<i>VIT_11s0016g00710</i>	JAZ gén	2,00	2,21
<i>VIT_14s0128g00780</i>	13-LOX	1,42	1,45
<i>VIT_09s0002g01080</i>	13-LOX	2,25	2,62

M. 8. táblázat Aszúsodott Furmint kis RNS célgének részletes eredményei. Az expressziós értékek log₂ értékekben vannak megadva, az első fázishoz viszonyítva.

Kis RNS azonosító	expressziós érték	Célgén azonosító	E érték	Hozzáférhetőségi energia	Kis RNS kezdete	Kis RNS vége	Célgén start	Célgén vége	Illeszkedés vizuálisan	Inhibíció típusa
VvmiR396b	2,4	VIT_15s0021g02580	0,5	22,8	1	20	235	254	Hasítás
VvmiR396a	2,2	VIT_15s0021g02580	0,5	22,8	1	21	234	254	Hasítás
VvmiR396d	2,4	VIT_15s0021g02580	0,5	22,8	1	21	234	254	Hasítás
VvmiR3632-3p	2,3	VIT_13s0067g00790	1	21,9	1	22	575	596	Hasítás
VvmiR166a	1,5	VIT_06s0004g02800	1	22,1	1	19	565	583	Hasítás
VvmiR166a	1,5	VIT_13s0067g00790	1	24,0	1	19	571	589	Hasítás
VvmiR396b	2,4	VIT_17s0000g04440	2,5	20,5	1	20	1342	1361	:	Hasítás
VvmiR396a	2,2	VIT_17s0000g04440	2,5	20,5	1	21	1341	1361	:	Hasítás
VvmiR396d	2,4	VIT_17s0000g04440	2,5	20,5	1	21	1341	1361	:	Hasítás
VvmiR408	-3,2	VIT_19s0177g00260	2,5	24,4	1	21	1196	1216	::	Hasítás
VvmiR171b	2,2	VIT_02s0154g00400	0,5	22,1	1	21	507	527	Hasítás
VvmiR171i	3,6	VIT_02s0154g00400	0,5	22,1	1	21	507	527	Hasítás
VvmiR171b	3,6	VIT_04s0023g01380	0,5	24,9	1	21	588	608	Hasítás
VvmiR171i	2,2	VIT_04s0023g01380	0,5	24,9	1	21	588	608	Hasítás
VvmiR171b	2,2	VIT_15s0048g00270	0,5	18,8	1	21	1308	1328	Hasítás
VvmiR171i	3,6	VIT_15s0048g00270	0,5	18,8	1	21	1308	1328	Hasítás
VvmiR396b	3,2	VIT_15s0021g02580	0,5	22,8	1	20	235	254	Hasítás
VvmiR396a	2,9	VIT_15s0021g02580	0,5	22,8	1	21	234	254	Hasítás
VvmiR396d	2,8	VIT_15s0021g02580	0,5	22,8	1	21	234	254	Hasítás
VvmiR166a	2,3	VIT_13s0019g04320	1	24,0	1	19	571	589	Hasítás
VvmiR166a	2,3	VIT_06s0004g02800	1	22,1	1	19	565	583	Hasítás
VvmiR156b	2,6	VIT_11s0065g00170	1	13,4	1	20	1106	1125	Hasítás
VvmiR3632-3p	2,5	VIT_13s0067g00790	1	21,9	1	22	575	596	Hasítás
VvmiR156b	2,6	VIT_14s0068g01780	1,5	11,7	1	20	866	885	Hasítás
VvmiR395k	3,6	VIT_13s0019g02940	2,5	22,1	1	21	920	940	Hasítás

Kis RNS azonosító	expressziós érték	Célgén azonosító	E érték	Hozzáférhetőségi energia	Kis RNS kezdete	Kis RNS vége	Célgén start	Célgén vége	Illeszkedés vizuálisan	Inhibíció típusa
<i>VvmiR396b</i>	3,2	<i>VIT_07s0191g00220</i>	2,5	17,6	1	20	470	489,.....:	Hasítás
<i>VvmiR396a</i>	2,9	<i>VIT_07s0191g00220</i>	2,5	17,6	1	21	469	489,.....:	Hasítás
<i>VvmiR396d</i>	2,8	<i>VIT_07s0191g00220</i>	2,5	17,6	1	21	469	489,.....:	Hasítás
<i>VvmiR396b</i>	3,2	<i>VIT_17s0000g04440</i>	2,5	20,5	1	20	1342	1361	::;	Hasítás
<i>VvmiR396a</i>	2,9	<i>VIT_17s0000g04440</i>	2,5	20,5	1	21	1341	1361	::;	Hasítás
<i>VvmiR396d</i>	2,8	<i>VIT_17s0000g04440</i>	2,5	20,5	1	21	1341	1361	::;	Hasítás
<i>VvmiR159c</i>	1,6	<i>VIT_19s0090g00590</i>	2,5	12,0	1	21	845	865: ..:	Hasítás
<i>VvmiR159c</i>	1,6	<i>VIT_01s0011g01130</i>	2,5	14,9	1	21	32	52,.....:;	Hasítás
<i>VvmiR3633a-3p</i>	2,3	<i>Bcin07g05140</i>	4	19,438	1	22	1699	1720	::: ..:	Hasítás
<i>VvmiR3633a-3p</i>	2,0	<i>Bcin07g05140</i>	2,5	17,4	1	22	1717	1738::	Transzlációs
<i>VvmiR3530-3p</i>	3,3	<i>Bcin09g00540</i>	2,5	11,3	1	22	186	207::	Hasítás

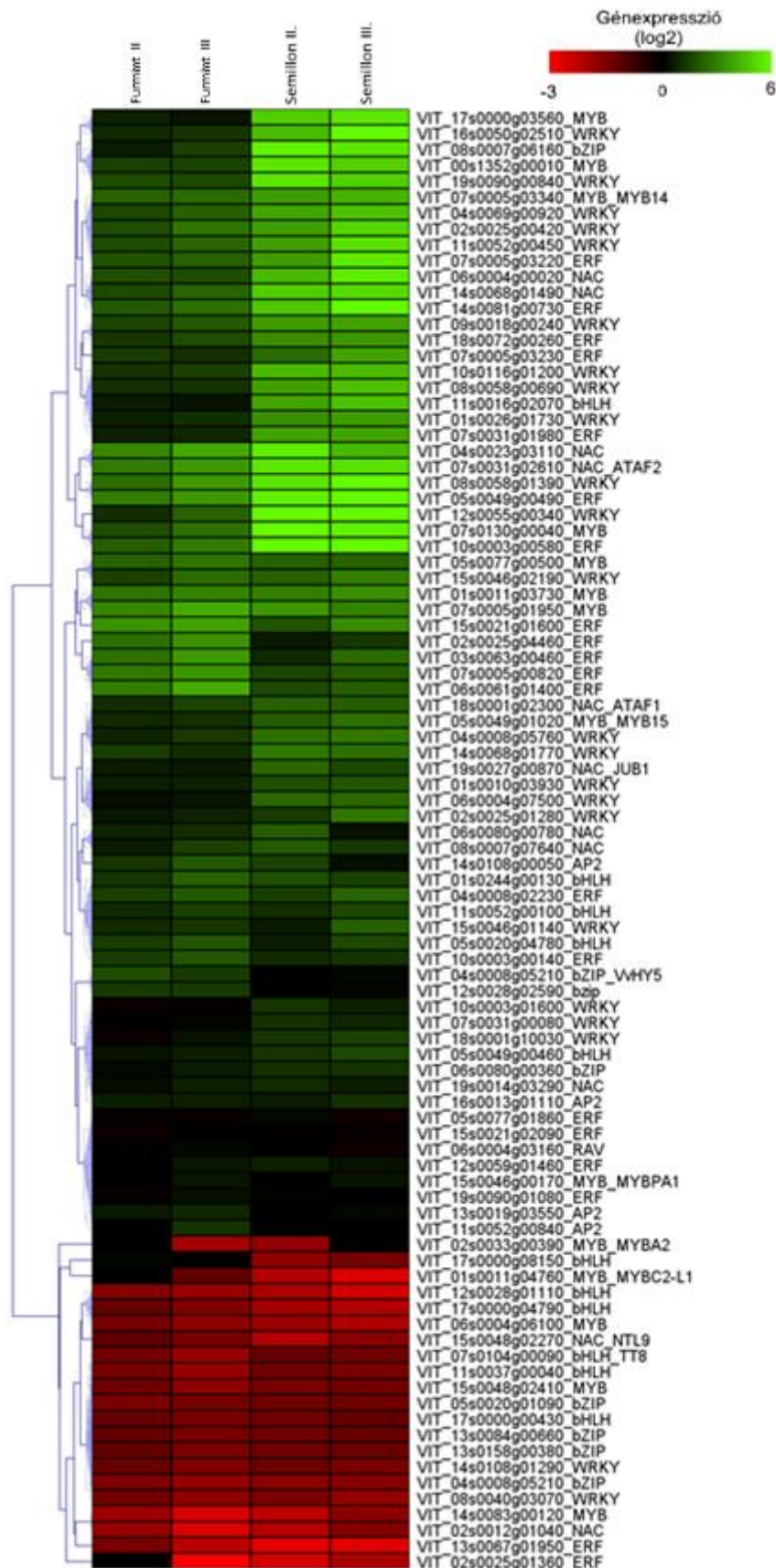
M. 9. táblázat PR6 gének expressziós értékei az aszúsodás vagy szürkerothadás során. Az expressziós értékek log₂ értékekben vannak megadva, az első fázishoz viszonyítva.

Szőlőfajta		Furmint		Semillon ¹		Trincadeira ²	Marselan ³
Fertőzésforma		Nemesrothadt				Szürkerothadt	
		II. fázis	III. fázis	II. fázis	III. fázis		
PR6-szerű gének	<i>VIT_05s0020g05000</i>	2,44	3,11	6,19	6,48	-	-
	<i>VIT_05s0020g05020</i>	2,14	3,43	4,80	3,85	1,10	3,40
	<i>VIT_05s0020g05040</i>	1,78	1,92	3,66	3,69	1,72	-
	<i>VIT_08s0007g00820</i>	1,20	1,36	1,51	1,66	-	-
	<i>VIT_13s0067g01980</i>	1,32	1,52	-	1,25	-	-

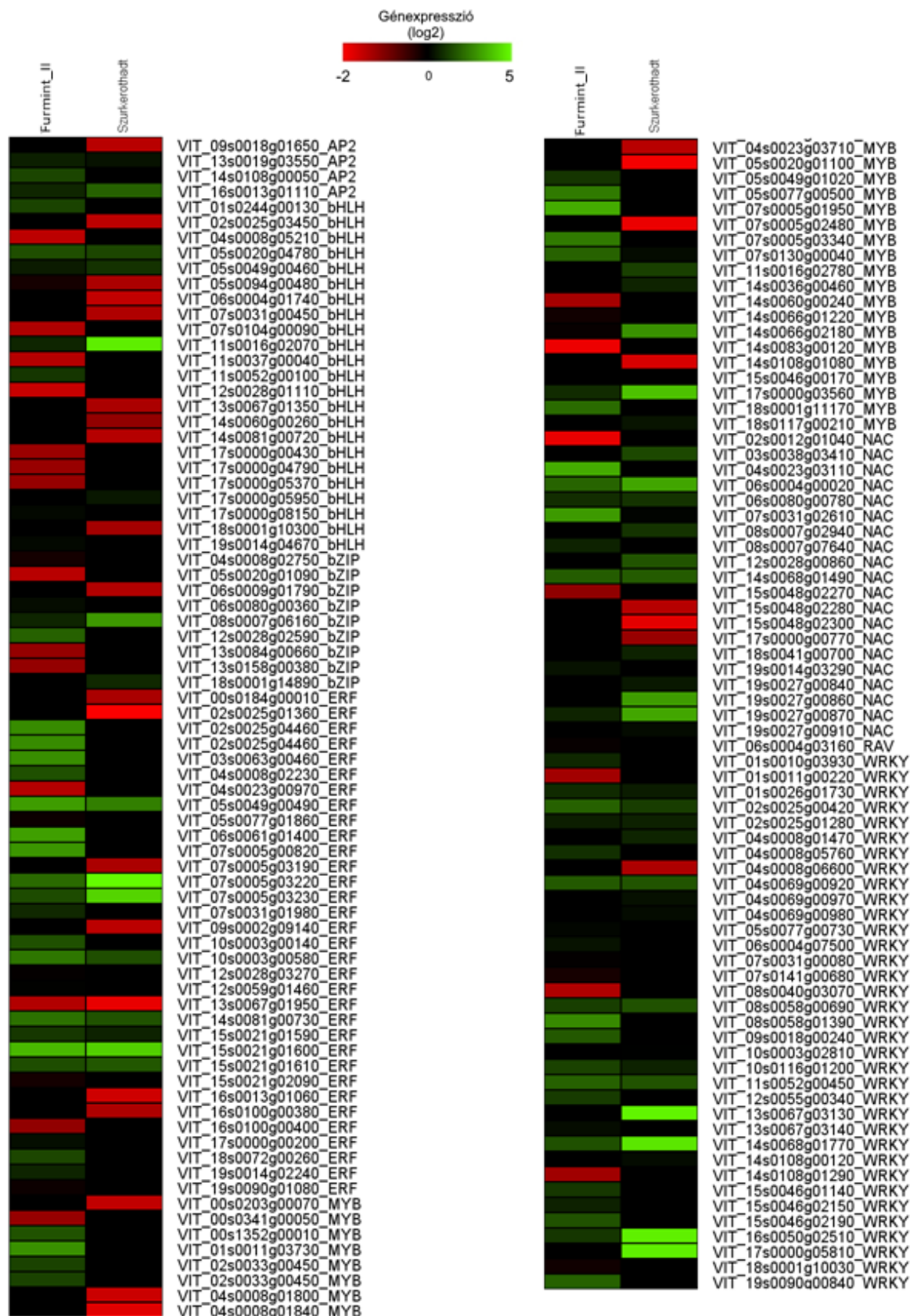
¹ Blanco-Ulate *et al.* 2015

² Agudelo-Romero *et al.* 2015

³ Kelloniemi *et al.* 2015



M. 1. ábra Furmint és Semillon (Blanco-Ulate *et al.* 2015) nemesrothadása során változó expressziós értéket mutató, a kórokozók elleni védekezéshez köthető transzkripciós faktorok génexpressziós értékei.



M. 2. ábra A Furmint nemesrothadása és Marselan szürkekelethajtás során eltérően kifejeződő transzkripciós faktorokat kódoló gének szemléltetése.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm **Pogány Miklós** témavezetőmnek a szakmai felkarolását, hogy biztatott az önálló kutatásra, és hogy próbálta átadni végtelen optimizmusát az étellel szemben.

Köszönöm **Horváthné Petróczy Mariettának**, hogy munkám során mindig segített és támogatott.

Köszönöm **Szepsy Istvánnak**, hogy lehetőséget biztosított mintát gyűjteni szőlőbirtokán, és hogy a szőlőről felhalmozott emberöltőnyi tudását minden találkozásunkkor csepegtette belénk.

Köszönöm **Váczy Kálmánnak** és **Hegyi-Kaló Júliának** a segítségüket és szakmai iránymutatásukat.

Köszönöm **Kámán-Tóth Evelinnek**, **Oláh Csillának** a labormunkában való segítségét. Köszönöm a segítségét **Vági Pálnak** és **Tóth Lászlónak**, akik nélkül az élő szövet vizsgálat nem jöhetett volna létre. Köszönöm **Molnár Béla Péternek** és **Szelényi Magdolnának** az illatanyag gyűjtésben nyújtott segítségüket.

Köszönöm a munkám során nyújtott támogatást a Növényvédelmi Intézet összes munkatársának, akiktől rengeteg segítséget kaptam és még többet tanultam.

Külön köszönet illeti **Szüleimet**, akik megteremtették a lehetőséget, hogy elvégezzem a képzést és mindig biztatnak az új dolgok felfedésére.

Köszönöm **Laurának**, hogy kutató munkám során mindvégig támogatott, hallgatta a számára értelmetlen téziseket és elnézte nekem a rendszeres éjszakába nyúló disszertáció írásomat.

Köszönöm **Kondor Bernadettnek**, hogy lehetőséget biztosított a disszertációm befejezéséhez, és köszönöm az EGIS Gyógyszergyár Zrt.-nek, hogy anyagi támogatást nyújtott ehhez.

Köszönet a GINOP-2.3.2-15-2016-00061 (Szőlő-bor kutatás fejlesztési kiválósági központ létrehozása) projekt anyagi támogatásáért.