

dc_2039_22

MTA Doktora pályázat

Doktori Tézisek

**NEKROTRÓF ÉS HEMIBIOTRÓF GOMBAKÓROKOZÓK KÖLCSÖNHATÁSAI
MODELL- ÉS HASZONNÖVÉNYEKKEL**



Dr. Pogány Miklós

Agrártudományi Kutatóközpont

Növényvédelmi Intézet

Budapest, 2022

Bevezetés

Kutatói pályám kezdetétől abban a kiváltságos helyzetben van részem, hogy beteg növények anyagcsere-változásainak izgalmas összefüggéseit tanulmányozhatom. Ennek során egyrészt arra keresem a választ, hogy milyen élettani változások vezetnek a növénykórokozó mikrobák által megbetegített növényeken megfigyelhető tünetekhez. Másrészt melyek azok a molekuláris folyamatok, amikkel a növények védekeznek a kórokozókkal szemben.

Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolásához munkatársaimmal szívesen és nagy lelkesedéssel támaszkodtunk a molekuláris biológia és a genomika robbanásszerű fejlődésének köszönhető új technológiák kipróbálására, majd igyekeztünk ezeket laboratóriumunkban is meghonosítani.

Korábban nem volt lehetőségem arra, hogy a növényi kór- és rezisztenciafolyamatokat egy-egy kulcsgén szintjén vizsgálhassam. Szintén nem álltak rendelkezésemre olyan nagy adatmennyiséget szolgáltató genomikai módszerek, amelyek segítségével ugyanabban a növényi mintában egyszerre több ezer fehérjét kódoló növényi gén működésének, aktivitásának a pillanatnyi állapotát rögzíthettük és kigyűjthettük volna. Olyan helyzet volt ez, mint amikor egy tűt keresünk a szénakazalban. Ezekben a hiányosságokban hozott áttörést az *Arabidopsis thaliana* inszerciós mutánsgyűjtemények (SALK, GABI) genotípusaihoz való hozzáférhetőség megnyílása, a vírusindukált-géncsendesítés technológiájának adaptálása, vagy a transzkriptom vizsgálatokhoz kifejlesztett microarray módszer, és az Illumina technológiára épülő új generációs RNS szekvenálás.

Az értekezés keretét a növények gombakórokozóinak életmódjában megfigyelhető egymástól eltérő stratégiák (biotróf, nekrotróf, hemibiotróf) szolgáltatják. A kórokozók életmód alapján történő hagyományos csoportosításában három stratégiát különböztetünk meg: biotróf, nekrotróf és hemibiotróf stratégiát. A **biotróf** gombakórokozók élő növényi szövetekből táplálkoznak és jellemző a stratégiájukra, hogy hosszú távon, az életciklusuk végéig együtt élnek a parazitált gazdanövényeikkel. A **nekrotróf** gombakórokozók virulencia stratégiája kevésbé tűnik összetettnek, mint a biotróf életmódú kórokozóké. Lényege a megfertőzött növényi szövetek elpusztítása és az elhalt szövetekből történő táplálkozás. Ehhez toxinokat, sejtfalbontó enzimeket és reaktív oxigénszármazékokat (ROS) termelnek, melyek következtében a gazdanövény sejtjei elhalnak, nekrotizálódnak. A növénykórokozó gombák

harmadik csoportját a **hemibiotróf** életmódú kórokozók alkotják. Ide olyan kórokozó gombák tartoznak, melyek stratégiájában keverednek a biotróf és nekrotrof életmód sajátosságai, életciklusuk rövidebb vagy hosszabb első felében inkább biotróf kórokozóként viselkednek, később pedig inkább nekrotrof jegyeket mutatnak (Mengiste 2012).

A növények és kórokozók kölcsönhatásai kétoldalú fegyverkezési versenyként értelmezhetőek, melyben a növényi sejtek védelmi rendszere két alapvető fokozattal rendelkezik (Jones and Dangl 2006, Jones és mtsai 2016). Az első szint a mikrobákra jellemző általános molekuláris mintázatok, vagy MAMP-ok (microbe-associated molecular patterns) felismerésén alapuló általános rezisztencia, vagy PTI (pattern-triggered immunity) (Bigeard és mtsai 2015, Yu és mtsai 2017).

A kórokozó és növényi sejtek kölcsönhatásának második rétege a kórokozó mikroba fajok különböző rasszainak vagy törzseinek azon tulajdonságára vezethető vissza, hogy a növényi általános rezisztencia visszaszorítására kifinomult virulencia faktorokat, vagyis effektorokat termelnek (Sharpee és Dean 2016). A növény és kórokozók közötti fegyverkezési verseny effektorokra adott növényi válasza a növényi sejtek védelmi rendszerének második alapvető rétege, a hiperszenzitív-típusú specifikus rezisztencia vagy ETI (effector-triggered immunity). Az ETI során a növényi sejtek a kórokozó effektorait ismerik fel többnyire intracelluláris, nukleotid-kötőhelyet (NBS) és leucin-gazdag ismétlődéseket (LRR) tartalmazó NLR receptorfehérjék, tehát R (rezisztencia) fehérjék segítségével (Jones és Dangl 2006, Dodds és Rathjen 2010). Az általános rezisztenciával összehasonlítva fontos különbség, hogy az ETI kórokozó rassz-specifikus, és a növényi oldal irányából szintén genotípus-specifikus. Szintén fontos különbség, hogy míg a PTI tünetmentes rezisztenciaforma, az ETI az érintett növényi sejtek egy részének programozott sejthalálát eredményezi, ez a hiperszenzitív válasz vagy HR (Dodds and Rathjen 2010, Thomma és mtsai 2011). Az ETI aktiválása (a HR-t leszámítva) hasonló molekuláris változásokkal jár az érintett növényi sejtekben, mint a PTI indukciója (hasonló génkifejeződési mintázat változások, MAP kináz kaszkádok aktiválódása, oxidatív robbanás (fokozott ROS képződés), immunfolyamatokat szabályozó növényi hormonok (szalicilsav, jázmonsav, etilén) anyagcseréjének és jelátvitelének fontos változásai. Azonban az ETI-hez köthető változások gyorsabbak, robusztusabbak és hosszabb lefutásúak, mint a PTI során megfigyelt molekuláris változások (Tsuda és Katagiri 2010, Thomma és mtsai 2011). Az ETI feltehetőleg azért jár hasonló sejten belüli változásokkal, mint a PTI, mert az NLR

receptorok aktiválása visszahat a PTI rendszerre és felszabadítja a PTI által szabályozott védelmi rendszert az effektorok gátló hatása alól. Tehát az ETI lényegében a PTI helyreállításán és magasabb szintre emelt működésén keresztül fejt ki hatását (Ngou és mtsai 2021, Yuan és mtsai 2021).

A szalicilsav, a jázmonsav és az etilén növényi hormonok a kórokozó mikrobákkal szembeni sejt- és szövetszintű védelem meghatározó szereplői. E három hormon közül a szalicilsav mind a PTI, mind az ETI folyamataihoz szükséges vegyület (Li és mtsai 2019). A szalicilsav, a jázmonsav és az etilén eltérő szerepet tölt be a különböző életmódú kórokozókkal szemben kifejeződő növényi védekezésben. A szalicilsav alapvető fontosságú jelátvivő molekula a biotróf életmódú kórokozókkal szembeni védekezésben (Gaffney és mtsai 1993, Wildermuth és mtsai 2001, Ádám és mtsai 2018). A jázmonsavnak és az etilénnek ezzel szemben a nekrotróf (elsősorban nekrotróf fonalas gomba) kórokozókkal szembeni védelemben tulajdonítanak kitüntetett szerepet (Thomma és mtsai 1998, 1999).

A növény-kórokozó kölcsönhatások gyakori tünete az érintett növényi sejtek elhalása, ami általában a növényi programozott sejthalál valamelyik típusának a következménye (Minina és mtsai 2014). Biotróf és hemibiotróf fonalas gombákkal kapcsolatban számos esetben kimutatták azt, hogy a gazdanövényeiken előidézett kórfolyamat során olyan effektorokat termelnek, amikkel a növényi sejtekben gátolják a programozott sejthalál fellépését (Pliego és mtsai 2013, Selin és mtsai 2016, Prasad és mtsai 2022). Nekrotróf életmódú gombakórokozók viszont effektoraik segítségével aktiválhatják a programozott sejthalál folyamatát gazdanövényeikben, ami segíti a virulenciájukat, mivel elhalt szövetekkel táplálkoznak.

Az NLR rezisztencia fehérjék aktiválódását követő jelátviteli folyamat, aminek főbb lépései a MAP kináz kaskád részvétele, Ca^{2+} ionok beáramlása az extracelluláris térből a citoplazmába, reaktív oxigén és nitrogén származékok (ROS/RNS) felhalmozódása és szalicilsav képződés, az érintett növényi sejtek programozott sejthalálában végződik (Mur és mtsai 2008, Dalio és mtsai 2021). A ROS képződésének fő forrásai a sejtmembránban lokalizált RBOH NADPH-oxidáz fehérjék, és a különböző sejtalkotók (mitokondriumok, kloroplasztiszok, peroxiszómák) (Mignolet-Spruyt és mtsai 2016). Növényi hormonok szerepével kapcsolatban izgalmas megfigyelés az, hogy a programozott sejthalál által érintett sejtek előzetesen megnövekedett szalicilsav tartalmat mutatnak, a szalicilsav antagonistá jázmonsav viszont az

elhaló sejteket körülvevő életben maradó sejtek zónájában halmozódik fel (Betsuyaku és mtsai 2018). E két vegyület kölcsönhatásának feltehetőleg az elhaló és életben maradó sejtek egyensúlyának fenntartásában van szerepe. A sejthalál kiváltásáért felelős szignálokat a jelenleg leginkább támogatott modell szerint a mitokondriumok integrálják.

Az értekezés keretében posztdoktori és szenior kutatói munkásságom öt témáját ismertetem:

- 1) Extracelluláris oxidatív robbanás szerepe egy nekrotróf gombakórokozó fertőzése során
- 2) Hidegedzés, oxidatív stressz és egy nekrotróf kórfolyamat kereszttolerancia viszonyainak vizsgálata kalászos gabonafajokban
- 3) Furmint szőlő aszúsodásának transzkriptom vizsgálata
- 4) Nemesrothadás modellezése klímakamrában, szürkerothadás és nemesrothadás illatanyag markerei
- 5) *Cercospora nicotianae*: a *Nicotiana benthamiana* lehetséges új modell kórokozója

Módszerek

Extracelluláris ROS szerepének vizsgálata: Vadtípusú és NADPH-oxidáz mutáns *Arabidopsis* genotípusokat fertőztünk *A. brassicicola* konídium szuszpenzióval. Megfigyeltük a kísérletekben használt növények tüneteit, az elhalt szövetek arányát, a növényeken táplálkozó *A. brassicicola* biomassza képzését (ez utóbbit qPCR módszerrel elemeztük). Fénymikroszkóppal megfigyeltük a nekrotróf gomba fejlődését, az elhalt sejtek és a hidrogén-peroxid (ROS) megjelenésének mintázatát a leveleken, fluoreszcensz mikroszkóppal vizsgáltuk szintén a ROS képződését. RNS kivonást követően RT-PCR és RT-qPCR módszerrel kimutattuk a kérdéses NADPH-oxidáz és sejtfa peroxidáz gének fokozott transzkriptum szintjeit a gombával való fertőzést követően vadtípusú növényekben és ugyanezen gének gátolt vagy csökkent kifejeződését a mutánsokban és géncsendesített mintákban. A mintáinkból kivont RNS felhasználásával transzkriptum mintázat vizsgálatot csináltunk saját laborunkban nyomtatott cDNS microarray lemezek segítségével és RT-qPCR módszerrel. A NADPH-oxidáz mutáns növényeknek vizsgáltuk az etilén és szalicilsav termelését gázkromatográffal és HPLC módszerrel, végül online fehérje-fehérje kölcsönhatás adatbázis

és újabb T-DNS mutánsok segítségével vizsgáltuk az *Arabidopsis* NADPH-oxidáz és sejtfallal peroxidáz fehérjék lehetséges kölcsönható partnereit.

Kalászos gabonafélék hidegedzése, az oxidatív stressz és a *Pyrenophora teres* kórokozóval szembeni kereszttolerancia viszonyok vizsgálata: Hidegedzett és edzetlen kalászos gabona növények oxidatív stresszel (metil-viologén, hidrogén-peroxid) szembeni ellenállóságát elemeztük vezetőképesség-mérési vizsgálatokkal. Összehasonlítottuk a növények ellenálló képességét a nekrotrof *P. teres* f. *teres* kórokozóval szemben, figyelemmel kísérve a fertőzés során képződő ROS mértékét is. Kimutattunk több génműködésben megfigyelhető változást is a hidegedzett növényekben microarray módszer segítségével.

Furmint szőlő aszúsodásának transzkriptom szintű vizsgálata:

A Tokaj-hegyaljai Mád Betsek dűlőjében gyűjtött ép és aszúsodott Furmint szőlőbogyókból RNS kivonást követően a szekvenáló partnerünk szekvenáló könyvtárakat készített, majd a mintáinkkal Illumina szekvenálást végzett. Minden egyes aszúsodási fázist 10 független párhuzamos biológiai ismétlés képviselt, melyek mindegyikéből RNS-t vontunk ki, és mindegyik párhuzamos RNS mintát külön szekvenáltattunk meg. A nyert szekvenciák bioinformatikai elemzésével a kezelések közt eltérően kifejeződő szőlőgéneket azonosítottak, melyeket utána funkcionális elemzésnek vetettünk alá. Számos redox- és hormon anyagcserében, illetve jelátvitelben érintett gén aszúsodásban betöltött lehetséges szerepét mérlegeltük. Az aszúsodott bogyók redox- és hormon anyagcseréjével összefüggésben összehasonlítottuk az egyes aszúsodási fázisok össz antioxidáns kapacitását Trolox módszerrel és az abszcizinsav tartalom változását uHPLC-MS analitikai módszerrel.

Szürke- és nemesrothadás illatanyag vizsgálata: Ehhez a munkához csak ép bogyókat tartalmazó Furmint fürtöket gyűjtöttünk Mádon, hatvan darab fürtöt használtunk a vizsgálat során. A tőkékről való eltávolítást követően a fürtöket laboratóriumunkba szállítottuk. A *Botrytis cinerea* B05.10 referencia izolátumával permeteztük a leszüretelt Furmint fürtöket. Az inokulált fürtöket 24 órán keresztül zárt, közel 100 % relatív páratartalmú műanyag dobozokban tartottuk. Ezután a fürtök felét 3 hétig őszi, Tokaj-hegyaljai időjárást modellező hőmérséklet és páratartalom viszonyokra állított növénynevelő kamrában inkubáltuk, nyitott, jól szellőző műanyag tálcákon. A fürtök másik felét szürkerothadást okozó kezelésnek vetettük alá. A fürtökről 1 és 3 héttel a kezelések kezdete után fotókat készítettünk, az

analitikai és molekuláris vizsgálatokat 1 héttel a kezelések kezdete után végeztük el. A bogyók cukortartalmának változását kézi refraktométerrel Brix fokban határoztuk meg. A *B. cinerea* biomassza mennyiségének növekedését valós idejű qPCR módszerrel elemeztük. A szürke- és nemesrothadt fűrtök által kibocsátott illatanyagokat poliészter sütőzacskókban, dinamikus mintavétellel gyűjtöttük (Vuts és munkatársai 2018). Analitikai vizsgálatuk gázkromatográfhoz kapcsolt tömegspektrométerrel történt Molnár és munkatársai (2017) módszere szerint.

A *C. nicotianae*-*N. benthamiana* kölcsönhatás jellemzése: Ennek a vizsgálat sorozatnak a célja az volt, hogy igazoljuk a *N. benthamiana* dohány fogékonyságát *C. nicotianae* fonalas gombával szemben, összehasonlítsuk a *N. benthamiana* és a *N. tabacum* fogékonyságát a kórokozóval szemben és RNS interferencián alapuló géncsendesítési kísérletekkel bizonyítsuk ennek a gomba-növény kölcsönhatásnak a kézenfekvő alkalmazhatóságát molekuláris növénykórtani kísérletekben. A fenti célok megvalósítása érdekében *N. benthamiana* és *N. tabacum* növényeket fertőztünk a gombával, megfigyeltük a növényeken kifejlődő tüneteket, qPCR vizsgálatokkal összehasonlítottuk a *C. nicotianae* növekedését a két dohányfajban. Dohány rattle vírus (TRV) alapú géncsendesítő konstrukciókkal gátoltuk az etilénhez és a jázmonsavhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalakat és megfigyeltük ezek hatását a *N. benthamiana* *Cercospora* iránti fogékonyságára. Végül specifikus fluorofór és fluoreszcensz mikroszkóp segítségével kimutattuk a gomba által termelt gazdanövényre nem specifikus cercosporin toxinhoz köthető szingulett oxigén termelést *N. benthamiana* növényeken.

Eredmények és következtetések

Extracelluláris oxidatív robbanás szerepe nekrotróf gombakórokozó fertőzése során

A növényi sejtek immunválaszának egyik legjellemzőbb összetevője a reaktív oxigén származékok (ROS) fokozott képződése, az oxidatív robbanás. Ez a jelenség mind a PTI, mind az ETI velejárója, több hullámban jelentkezik és elsősorban (de nem kizárólag) a sejtközötti járatokban figyelhető meg (Baker és Orlandi 1995, O'Brien és mtsai 2012). Növény-kórokozó kölcsönhatásokban az oxidatív robbanásnak többféle alapvető fontosságú szerepet tulajdonítanak. Ilyenek a növényi programozott sejthalál szabályozása, oxidatív glikoprotein

és lignin keresztkötések kialakítása a sejt falban, transzkripciós változások előidézése, fehérjeműködés szabályozása poszttranszlációs redox változásokkal illetve direkt antimikrobiális hatás (Lamb és Dixon 1997, Pogány és mtsai 2006, Lehmann és mtsai 2015). A növényi sejtekben több enzimrendszer vonatkozásában is igazolták azt, hogy külön-külön hozzájárulnak a sejt közötti járatok ROS felhalmozódásához. Ide tartoznak a sejt membránba beágyazott NADPH-oxidáz fehérjék, az apoplastban lokalizált III. osztályú peroxidázok (sejt fal peroxidázok), amin- és poliamin oxidázok, oxalát oxidázok és kinon-reduktázok (Kärkonen and Kuchitsu 2015). Ennek a kutatásnak a központi kérdése az volt, hogy a NADPH-oxidázok és a sejt fal peroxidázok részt vesznek-e az *Alternaria brassicicola* nekrotróf gomba fertőzésére adott növényi válaszban, és ha igen, akkor milyen szerepeket tölthetnek be? A vizsgálatokat *Arabidopsis thaliana* modell növényen végeztük.

Génexpressziós és mikroszkópos vizsgálatok segítségével megállapítottam, hogy az RBOHD NADPH-oxidáz és PRX33 és PRX34 sejt fal peroxidázok egyaránt hozzájárulnak a nekrotróf *Alternaria brassicicola* fertőzése nyomán fellépő oxidatív robbanáshoz *Arabidopsis* növények leveleinek sejt közötti járataiban. *Arabidopsis* inszerciós mutánsok felhasználásával igazoltam, hogy a növényi sejtek extracelluláris oxidatív robbanásának két legfontosabb növényi faktora, az RBOHD NADPH-oxidáz és a PRX33/34 sejt fal peroxidázok működése segíti a nekrotróf *A. brassicicola* kolonizációját. Ráműtattam továbbá arra, hogy az RBOHD által termelt reaktív oxigén származékok (ROS) gátolják, a PRX33/34 peroxidázok által termelt ROS viszont fokozzák a gomba által okozott sejt halál folyamatot. Farmakológiai, analitikai, bioinformatikai és további egyéb molekuláris és sejt tani módszerekkel (qRT-PCR, *Arabidopsis* T-DNS mutánsok, hisztológia) alátámasztva rávilágítottam arra, hogy az RBOHD az etilénnel, a szalicilsavval és az ERECTA Ser/Thr protein kinázzal kölcsönhatásban fejt ki a sejt halál szabályozásában betöltött szerepét (Pogány és mtsai 2009, Kámán-Tóth és mtsai 2019). Végül alkottam egy modellt az RBOHD, a sejt fal peroxidázok és feltételezhető kölcsönható partnereik szerepével kapcsolatban, amit az *A. brassicicola* nekrotróf gombakórokozó által előidézett sejt halál folyamatában tölthetnek be.

Hidegedzés, oxidatív stressz és egy nekrotróf kórfolyamat kereszttolerancia viszonyainak vizsgálata kalászos gabonafajokban

A növények, mint helyhez kötött életmódot folytató élőlények meghatározó módon támaszkodnak a szélsőséges külső hőmérséklettől védő sejtélettani folyamatokra. Fagypont alatti külső hőmérséklet túlélésében segítségükre van a hidegedződés jelensége, ami előzetes alacsony (de fagypont feletti) lehűlésekkel járó hőmérsékleti viszonyok között alakul ki szervezetükben (Kalberer és mtsai 2006). Hidegedződés következtében nem csupán egy későbbi fagyveszély kedvezőtlen hatásaitól lesznek részben védettek az alkalmazkodásra képes növények, hanem kereszttolerancia alakulhat ki más kedvezőtlen külső környezeti feltételekkel szemben is. A szakirodalomban találunk példát hidegedzett növények kén-dioxid, szárazság és fotooxidatív károsodás, nehézfém stressz, továbbá kórokozók fertőzésével szembeni kereszttoleranciájára (Norman és mtsai 2001, Zhou és mtsai 2014, Streb és mtsai 2008, Kuwabara és Imai 2009). A ROS felhalmozódásának alapvető szerepet tulajdonítanak a kereszttolerancia jelenségében is (Vranová és mtsai 2002, Pastori és Foyer 2002, Bowler és Fluhr 2002). Ennek a témának a kutatása során kalászos gabonafélék hidegedzésének a hatását vizsgáltuk oxidatív stresszt okozó kémiai kezelésekkel és az árpa hálózatos levélfoltosságát okozó nekrotróf *Pyrenophora teres f. teres* gombakórokozóval szemben (Lightfoot és Able 2010).

Búza és árpanövények hidegedzésével vissza tudtuk szorítani az oxidatív stresszt okozó paraquat és hidrogén-peroxid kezelések szövetkárosító hatását a növények leveleiben. Nekrotróf gombakórokozók fertőzése együtt jár a megbetegített növényi szövetekben fellépő oxidatív stresszel (Able 2003). Tekintettel arra, hogy a hidegedzés fokozta kísérleteinkben kalászos gabona növények oxidatív stresszel szembeni toleranciáját, megvizsgáltam, hogy előzetes hidegedzéssel lehet-e befolyásolni két árpafajta ellenállóságát a nekrotróf *Pyrenophora teres f. teres* kórokozóval szemben. Eredményeim rávilágítottak arra, hogy hidegedzéssel javítható a gombakórokozó iránti ellenállóság mind a rezisztens, mind a fogékony árpa genotípusban, és ez megnyilvánult mind az enyhébb betegségtünetekben, mind a gomba gyengébb növekedésében. Fény derült arra is, hogy a hidegedzett árpa növények védettebbek a kórokozó által okozott oxidatív stresszel szemben, szöveteikben alacsonyabb mennyiségben halmozódtak fel reaktív oxigén származékok. Ebben a kísérletsorozatban leírt eredményeim tudományos újdonsága abban fogható meg, hogy az abiotikus és biotikus kereszttolerancia

jelenségét több oldalról térképezem fel egy kísérleti rendszerben: kalászos gabonafélék hidegedzésének hatását vizsgálom az oxidatív stresszel szembeni toleranciára, egy nekrotróf gombakórokozó elleni rezisztenciára és a beteg növények ROS képződésére, illetve több árpagén eltérő kifejeződésére is fény derül.

Furmint szőlő aszúsodásának transzkriptom szintű vizsgálata

Az aszúborok készítésének nélkülözhetetlen alapanyagául szolgáló aszúsodott szőlő a *Botrytis cinerea* nekrotróf növénykórokozó gomba fertőzésének következtében képződik. Ez a különleges és hasznos formája a szőlőbogyó-*Botrytis* kölcsönhatásnak – amit nemesrothadásnak is nevezünk - gyakran bekövetkezik a tokaji borvidéken és jól megkülönböztethető a kölcsönhatás jellemzőbb és káros formájától, a szürkerothadástól. Kísérleteinkben a tokaji borvidék zászlóshajójának tekinthető Furmint szőlőfajta aszúsodott bogyóinak transzkriptom szintű vizsgálatát végeztük el RNS szekvenálás segítségével, melynek eredményeit a nemzetközi szakirodalomban közölt más nemesrothadt és szürkerothadt szőlőminták transzkripciós mintázat eredményeivel vetettünk össze. Nemesrothadt mintáink szőlősejtjeinek hormonanyagcserével és jelátvitellel, valamint redoxfolyamatokkal kapcsolatos génexpressziós változásait dolgoztuk fel és értelmeztük.

Aszúsodás vonatkozásában ez az első nagyléptékű transzkriptom vizsgálat, ami Tokaj-hegyaljai nemesrothadt szőlőminták szőlősejtjeinek génkifejeződési mintázatát veszi górcső alá. Az aszúsodás folyamatára több redox szabályozott és redox anyagcserében szerepet játszó gén megváltozott működése jellemző. Ebben az esetben olyan transzkriptum szint változást mutató géneket kerestünk, melyeknek az aktivitása csak az aszúsodás/nemesrothadás során változik meg, szürkerothadás következtében viszont nem (Blanco-Ulate és mtsai 2015, Kelloniemi és mtsai 2015, Agudelo-Romero és mtsai 2015). Megállapítottam, hogy az egyik legfontosabb növényi redox szenzor fehérje, az NPR1 negatív regulátorait kódoló *NIMIN-1* és *NIMIN-2* gének működése robusztus emelkedést mutat aszúsodott Furmint szőlőbogyókban (szürkerothadás közben viszont nem változik a működésük). Ez a molekuláris változás gátolhatja az aszúsodott szőlőbogyók szalicilsav jelátvitelét és közvetve csökkentheti a sejtek fogékonyságát *Botrytis* iránt (a szalicilsav-jázmonsav antagonizmus miatt). Aszúsodott szőlőbogyókban szintén egyöntetűen megváltozik a *glutathion S-transferáz* gének

transzkriptum mintázata (génexpresszió növekedés) és a kloroplasztiszban található redox fehérjéket kódoló gének kifejeződése (génexpresszió csökkenés). Ezt a két molekuláris jelenséget az aszúsodás során bekövetkező színváltozáshoz és antocianin felhalmozódáshoz kötöttem. Furmint szőlő aszúsodását tanulmányozva arra a következtetésre jutottam, hogy a szeneszcencia- és stresszhormonok anyagcsere-útvonalai aktiválódnak nemesrothadás során. Ez különösen igaz az abszcizinsavra, ami kulcsszerepet játszik Furmint aszúsodásának folyamatában. Látványosan megnő a mennyisége az aszúsodott bogyókban már a nemesrothadás legkorábbi fázisában és a bogyók transzkripciós mintázata is hűen tükrözi az abszcizinsav szöveti szintjének emelkedését. Az abszcizinsav szerepe kulcsfontosságúnak tűnik a nemes- és szürkerothadás egymástól való elkülönülésében, mert szürkerothadásnak kitett szőlőbogyókban nem figyelhetőek meg az abszcizinsavhoz köthető növényi válaszfolyamatok (Kelloniemi és mtsai 2015, Agudelo-Romero és mtsai 2015, Coelho és mtsai 2019).

Az etilén-válaszhoz kapcsolt ERF (Ethylene Response Factor) transzkripciós faktorok szintén egyöntetűen aktiválódnak nemesrothadt Furmint szőlőbogyókban.

A juvenil hormonok működése ugyanakkor úgy foglалható össze, hogy az ide kapcsolható gének vagy nem mutatnak lényeges aktivitás változást aszúsodás során (citokininek), vagy jellemzően csökken a szerepük (auxinok).

Nemesrothadás modellezése klímakamrában, szürkerothadás és nemesrothadás illékony szerves markerei

Ebben a kísérletsorozatban Furmint szőlő nemes- és szürkerothadását próbáltam meg szabályozható hőmérsékletű, páratartalmú és megvilágítású növénynevelő kamrákban modellezni. Összehasonlítottam továbbá a különböző szőlőbogyó-*Botrytis* kölcsönhatások illatanyag mintázatainak eltéréseit. Jelen vizsgálatok megkezdése előtt nem volt egyértelmű, hogy a fürtök környezetében uralkodó hőmérséklet, páratartalom és a mikroszkópikus gomba *B. cinerea* fertőző képleteinek mennyisége miként befolyásolja a kölcsönhatás kimenetelét szürke- vagy nemesrothadás irányába? Szürkerothadt, illetve szürkepenésszel fertőzött gyümölcsfajok (szőlő és eper) bogyóinak illatanyag kibocsátásával kapcsolatban állnak már

rendelkezésünkre adatok (Lopez Pinar és mtsai 2016, Van den Driessche 2012). Tokaj-hegyaljai nemesrothadt szőlőbogyó minták illékony komponenseinek vizsgálatára is találunk példát a szakirodalomban (Furdíková és mtsai 2019). Ezekben a korábbi vizsgálatokban azonban összetört bogyóminták, és kipréselt must illatanyag mintázatait kutatták, szemben az általam végzett ép szőlőfürtök illatanyag termelését célzó dinamikus (nem-invazív) mintavétellel megvalósított vizsgálattal (Vuts és munkatársai 2018). Másrészt munkám további újdonsága volt a korábbi kutatásokkal szemben, hogy egyszerre, ugyanabban a kísérleti rendszerben tudtam vizsgálni a szürke- és nemesrothadás illatanyag termelésre és a *Botrytis cinerea* gomba növekedésére, kolonizációjára gyakorolt hatásait.

Szabályozható klímájú növénynevelő kamrákban sikeresen szimuláltuk a szőlőbogyók botritizációjának két alapvető formáját, a nemes- és szürkerothadást. Kísérleteink tapasztalatai arra engednek következtetni, hogy a szőlőbogyó-*Botrytis* kölcsönhatás két eltérő formájának kialakulását elsősorban az ültetvény légkörében jelen lévő páratartalom határozza meg. Ennek a vizsgálatorozatnak köszönhetően sikerült egy szellemi tulajdon védelmi eljárás alatt álló technológiát is kidolgoznunk, melynek lényege a szőlő nemesrothadásának elősegítése mind zárt rendszerben, mind nyitott – ültetvényben megvalósítható körülmények között, olyan esetekben, amikor az ültetvényben uralkodó mikroklíma egyébként nem kedvez a nemesrothadás kialakulásának. A *B. cinerea* gomba biomassza mennyisége látványosan emelkedett a kölcsönhatás mindkét formájában, azonban a nemesrothadt bogyókban ennek mértéke enyhébb volt. Korábban szürkerothadt szőlőbogyó mintákban vizsgálták a *B. cinerea* biomassza emelkedését valós-idejű qPCR módszerrel két különböző szőlőfajtában (Trincadeira – szürkerothadás iránt fogékonyabb és Syrah – ellenállóbb), a bogyók különböző érettségi állapotában (Coelho és mtsai 2019).

Furmint szürkerothadása során a szőlőbogyó által kibocsátott illékony szerves vegyületek közül nagyobb mennyiségben képződik a fenetil-alkohol, az izobutil-alkohol, az izoamil-alkohol, az 1-oktén-3-ol, az ecetsav, az acetoin és az [S,S]-2,3-butándiol, mint aszúsodás során. A fenetil-alkohol kivételével (melynek rózsára emlékeztető illata van) a másik 6 komponens jelenléte negatív megítélés alá esik a szőlőből készült bor aromaösszetételének értékelésekor (Ribéreau-Gayon és mtsai 2006). Az 1-oktén-3-ol egy gombák által gyakran termelt nyolc szénatomos oxilipin vegyület, mely linolsav oxidációja közben keletkezik, amit lipoxigenáz és

hidroperoxid-liáz enzimek katalizálnak a gombasejtekben. Gombákra és talajra emlékeztető illata van (Combet és mtsai 2006, Steel és mtsai 2013).

Nemesrothadás kialakulása során két olyan illatanyag marker vegyületet találtunk, ami sokkal kevésbé volt jellemző a szükerothadásban érintett Furmint mintákra: ezek a transzgeranilaceton és a szulkaton voltak. A szulkaton fokozott képződését kimutatták már több tokaji aszúsodott szőlőbogyó présnedv esetében (egészséges bogyókból származó musttal összehasonlítva) (Furdíková és mtsai 2019). A szükerothadt minták alacsonyabb transzgeranilaceton kibocsátása összefügghet a *Botrytis* által kifejtett gátló hatással, amit a vegyület bioszintézisének akadályozására gyakorolhat. Kimutatták korábban, hogy a *Botrytis* gátolja egy másik geraniol származék, a geranil-acetát termelődését különféle szőlőfajták mustjában (Lopez Pinar és mtsai 2016). A geraniol monoterpenoiddal kapcsolatban ismert az, hogy antifungális hatásának köszönhetően gátló hatást gyakorol a *Botrytis*-re (Tsao és Zhou 2000).

***Cercospora nicotianae*: a *Nicotiana benthamiana* lehetséges új modell kórokozója**

A *Nicotiana benthamiana* egy Ausztráliából származó endemikus dohányfaj (Goodspeed 1954), növényvirologiai kutatások egyik leggyakrabban használt modell szervezete (Chakrabarty és mtsai 2007; Fan és mtsai 2014; Obrepalska-Stepłowska és mtsai 2013; Senthil-Kumar and Mysore 2015). A *N. benthamiana* a növényvírusok széles köre iránt fogékony gazdanövény. Növénykórokozó gombák viszont sokkal kisebb számban állnak rendelkezésre ezen a növényfajon folytatott biológiai vizsgálatokhoz. Ezek egy része ráadásul biotróf életmódú, tehát táptalajon nem tenyészthetőek (Xiao és mtsai 2003, Hall 1989), illetve szóba jöhet még néhány hemibiotróf és nekrotrof növénykórokozó gomba faj is. Ezek közül azonban a legkézenfekvőbbek, a *Sclerotinia sclerotiorum* és a *Botrytis cinerea* széles gazdanövénykörű, polifág fajok (Veluchamy és mtsai 2012, Asai és Yoshioka 2009). *N. benthamiana*-n végzett molekuláris növénykórtani célú kísérletekhez ezért előnyös lenne egy dohányra adaptálódott virulencia stratégiával rendelkező, táptalajon fenntartható növénykórokozó fonalas gomba elérhetősége. Ezt a hiányt igyekeztem betölteni a következőkben bemutatott vizsgálataimmal.

Ennek a munkának az eredményei egy új, korábban nem hasznosított növény-gomba kölcsönhatás reprodukálható módszertani részleteit és a kölcsönhatás gyakorlati

alkalmazhatóságát bizonyító molekuláris növénykórtani kísérleteket ölelik fel. A *Cercospora nicotianae*, egy főként *Solanaceae* családhoz tartozó növényfajokat fertőző konídiumos gomba vizsgálatainkban megbízható kórokozónak bizonyult a funkcionális növénybiológiában alapvető modell szervezetként használt *Nicotiana benthamiana* immunfolyamatainak tanulmányozásához. A *N. benthamiana* *COI1* és *EIN2* gének működését VIGS technológiával csökkentettük, ami szignifikánsan növelte a növények fogékonyságát *C. nicotianae*-val szemben. Ez arra utal, hogy a cercospórás levélfoltosság betegségével szemben a jázmosav- és etilén jelátvitelnek nagy jelentősége van a vizsgált növényben (Thomma és mtsai 1999, Liu és mtsai 2004, Guo and Stotz 2007, Chen és mtsai 2009, Ho és mtsai 2009). Ennek a kísérletnek a tapasztalata egyúttal azt is igazolja, hogy a jellemzett növény-gomba kölcsönhatás jól használható növényi gének mikrobák által okozott kórfolyamatokban játszott szerepének vizsgálatára.

Fontos megfigyelés, hogy a *N. benthamiana* sokkal fogékonyabb a cercospórás levélfoltosság betegsége iránt, mint a gomba klasszikus gazdanövénye a *N. tabacum*. Tekintettel arra, hogy a növényi RNS interferencia mechanizmusoknak nem csupán a növényi sejtek vírusokkal szembeni védekezésében van kiemelkedő jelentőségük, hanem baktériumokkal, gombákkal és oomikóta szervezetekkel szembeni ellenállóságukban is, ezért elképzelhető, hogy a nagyfokú vírusfogékonyság háttérében álló sérült RNS-függő RNS polimeráz működés állhat a *Nicotiana benthamiana* fokozott gombafogékonysága mögött is (Yang és mtsai 2004, Ellendorf és mtsai 2009, López és mtsai 2011, Staiger és mtsai 2013, Yang és Huang 2014).

Összefoglalás

Az értekezés keretében tárgyalt munkáim között az jelenti az összekötő kapcsot, hogy mindegyik dolgozat szöveti nekroízist okozó kórokozó gombák kórfolyamatainak vizsgálatára irányul, tehát a nekrotrófia jelenségének növényi sejtekre gyakorolt hatásairól mutat meg új részleteket. Eredményeim fő területei nekrotróf kórokozók növényi sejtekben kiváltott redoxbiológiai változásaira és a növényi hormonok kórélettani szerepének kutatására irányulnak. Fontos súlyt képviselnek munkámban azok az eredmények is, amik az aszúsodás folyamatának kutatásához kötődnek. Ezek az eredmények nem csupán alapkutatási

szempontból lehetnek jelentősek, hanem társadalmi szempontból hasznosuló fejlesztéseket is szolgálhatnak.

A doktori mű forrásául szolgáló saját közlemények:

Pogány M, von Rad U, Grün S, Dongó A, Pintye A, Simoneau P, Bahnweg G, Kiss L, Barna B and Durner J (2009) Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria* pathosystem. *Plant Physiology* 151, 1459-1475.

Kámán-Tóth E, Dankó T, Gullner G, Bozsó Z, Palkovics L and 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, 485-499.

Pogány M, Harrach B, Bozsó Z, Künstler A, Janda T, von Rad U, Vida Gy and Veisz O (2016) Cold hardening protects cereals from oxidative stress and necrotrophic fungal pathogenesis. *Open Life Sciences* 11, 78-85.

Pogány M, Dankó T, Hegyi-Kaló J, Kámán-Tóth E, Szám DR, Hamow KÁ, Kalapos B, Kiss L, Fodor J, Gullner G, Váczy KZ and Barna B (2022) Redox and hormonal changes in the transcriptome of natural noble rot development. *Plants*, 11, 864.

Dankó T, Szelényi M, Janda T, Molnár BP and Pogány M (2021) Distinct volatile signatures of bunch rot and noble rot. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 114, 101626.

Fodor J, Kámán-Tóth E, Dankó T, Schwarczinger I, Bozsó Z and Pogány M (2018) Description of the *Nicotiana benthamiana-Cercospora nicotianae* pathosystem. *Phytopathology* 108, 149-155.

Tóth E, Czuppon B, Fodor J, Bozsó Z és Pogány M (2015) Egy molekuláris növénykórtani vizsgálatok céljára javasolható növény–gomba kölcsönhatás. *Növényvédelem* 51, 309-316.

Irodalomjegyzék

Able AJ (2003) Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma* 221, 137-143.

Ádám AL, Nagy ZÁ, Kátay G, Mergenthaler E and Viczián O (2018) Signals of systemic immunity in plants: progress and open questions. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 1146.

Agudelo-Romero P, Erban A, Rego C, Carbonell-Bejerano P, Nascimento T, Sousa L, Martínez-Zapater JM, Kopka J and Fortes AM (2015) Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany* 66, 1769–1785.

Asai S and Yoshioka H (2009) Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 619-629.

- Baker CJ and Orlandi EW (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33, 299-321.
- Betsuyaku S, Katou S, Takebayashi Y, Sakakibara H, Nomura N and Fukuda H (2018) Salicylic acid and jasmonic acid pathways are activated in spatially different domains around the infection site during effector-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 59, 8-16.
- Bigeard J, Colcombet J and Hirt H (2015) Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant* 8, 521-539.
- Blanco-Ulate B, Amrine KCH, Collins TS, Rivero RM, Vicente AR, Morales-Cruz A, Doyle CL, Ye Z, Allen G, Heymann H, Ebeler SE and Cantu D (2015) Developmental and metabolic plasticity of white-skinned grape berries in response to *Botrytis cinerea* during noble rot. *Plant Physiology* 169, 2422-2443.
- Bowler C and Fluhr R (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science* 5, 241-246.
- Chakrabarty R, Banerjee R, Chung S-M, Farman M, Citovsky V, Hogenhout SA, Tzfira T and Goodin M (2007) pSITE vectors for stable integration or transient expression of autofluorescent protein fusions in plants: Probing *Nicotiana benthamiana*-virus interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 740-750.
- Chen YY, Lin YM, Chao TC, Wang JF, Liu AC, Ho FI and Cheng CP (2009) Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene- salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiologia Plantarum* 136, 324-335.
- Coelho J, Almeida-Trapp M, Pimentel D, Soares F, Reis P, Rego C, Mithöfer A and Fortes AM (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.
- Combet E, Henderson J, Eastwood DC and Burton KS (2006) Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties analysis and biosynthesis. *Mycoscience* 47, 317-326.
- Dalio RJD, Paschoal D, Arena GD, Magalhães DM, Oliveira TS, Merfa MV, Maximo HJ and Machado MA (2021) Hypersensitive response: From NLR pathogen recognition to cell death response. *Annals of Applied Biology* 178, 268-280.
- Dodds PN and Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11, 539-548.
- Ellendorff U, Fradin EF, de Jonge R and Thomma BPHJ (2009) RNA silencing is required for *Arabidopsis* defense against *Verticillium* wilt disease. *Journal of Experimental Botany* 60, 591-602.
- Fan HY, Sun HW, Wang Y, Zhang YL, Wang XB, Li DW, Yu JL and Han CG (2014) Deep sequencing-based transcriptome profiling reveals comprehensive insights into the responses of *Nicotiana benthamiana* to Beet necrotic yellow vein virus infections containing or lacking *RNA4*. *PLoS One* 9, e85284.
- Furdíková K, Machyňáková A, Drtilová T, Klemková T, Ďurčanská K and Špánik I (2019) Comparison of volatiles in noble-rotten and healthy grape berries of Tokaj. *LWT - Food Science and Technology* 105, 37-47.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H and Ryals J (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261, 754-756.
- Goodspeed TH (1954) The genus *Nicotiana*: origins, relationships and evolution of its species in the light of their distribution, morphology and cytogenetics. *Chronica Botanica*, Waltham MA 16, 1-536.
- Guo X and Stotz HU (2007) Defense against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis* is dependent on jasmonic acid, salicylic acid and ethylene signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 1384-1395.
- Hall G (1989) *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. In: IMI Descriptions of Fungi and Bacteria. CAB International, Wallingford UK 98, 975.

- Ho FI, Chen YY, Lin YM, Cheng CP and Wang JF (2009) A tobacco rattle virus-induced gene silencing system for a soil-borne vascular pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Botanical Studies* 50, 413-424.
- Jones JD and Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- Jones JD, Vance RE and Dangl JL (2016) Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* 354, aaf6395
- Kalberer SR, Wisniewski M and Arora R (2006) Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: current understanding and emerging concepts. *Plant Science* 171, 3-16.
- Kámán-Tóth E, Dankó T, Gullner G, Bozsó Z, Palkovics L and 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, 485-499.
- Kärkönen A and Kuchitsu K (2015) Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* 112, 22-32.
- Kelloniemi J, Trouvelot S, Héloir MC, 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 Pecheur P, Loisel E, Morgant G, Poussereau N, Pradier J-M, Rasclé C, Trda L, Poinssot B and 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, 1167-1180.
- Kuwabara C and Imai R (2009) Molecular basis of disease resistance acquired through cold acclimation in overwintering plants. *Journal of Plant Biology* 52, 19-26.
- Lamb C and Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Biology* 48, 251-275.
- Lehmann S, Serrano M, L'Haridon F, Tjamos SE and Metraux JP (2015) Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* 112, 54-62.
- Li N, Han X, Feng D, Yuan D and Huang LJ (2019) Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering? *International Journal of Molecular Sciences* 20, 671.
- Lightfoot DJ and Able AJ (2010) Growth of *Pyrenophora teres* in planta during barley net blotch disease. *Australasian Plant Pathology* 39, 499-507.
- Liu Y, Schiff M and Dinesh-Kumar SP (2004) Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to Tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 38, 800-809.
- López A, Ramírez V, García-Andrade J, Flors V and Vera P (2011) The RNA silencing enzyme RNA polymerase V is required for plant immunity. *PLoS Genetics* 7, e1002434.
- Lopez Pinar A, Rauhut D, Ruehl E and Buettner A (2016) Effects of *Botrytis cinerea* and *Erysiphe necator* fungi on the aroma character of grape must: A comparative approach. *Food Chemistry* 207, 251-260.
- Mengiste T (2012) Plant immunity to necrotrophs. *Annual Review of Phytopathology* 50, 267-294.
- Mignolet-Spruyt L, Xu E, Idänheimo N, Hoerberichts FA, Mühlenbock P, Brosché M, Van Breusegem F and Kangasjärvi J (2016) Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany* 67, 3831-3844.
- Minina EA, Bozhkov PV and Hofius D (2014) Autophagy as initiator or executioner of cell death. *Trends in Plant Science* 19, 692-697.
- Molnár BP, Tóth Z and Kárpáti Z (2017) Synthetic blend of larval frass volatiles repel oviposition in the invasive box tree moth *Cydalima perspectalis*. *Journal of Pest Science* 90, 873-885.

- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H and Prats E (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* 59, 501-520.
- Ngou BPM, Ahn HK, Ding P and Jones JD (2021) Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* 592, 110-115.
- Norman HA, Krizek DT and Mirecki RM (2001) Changes in membrane lipid and free fatty acid composition during low temperature preconditioning against SO₂ injury in coleus. *Phytochemistry* 58, 263-268.
- O'Brien JA, Daudi A, Butt VS and Bolwell GP (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236, 765-779.
- Obrepalska-Stepelowska A, Wieczorek P, Budziszewska M, Jeszke A and Renaut J (2013) How can plant virus satellite RNAs alter the effects of plant virus infection? A study of the changes in the *Nicotiana benthamiana* proteome after infection by Peanut stunt virus in the presence or absence of its satellite RNA. *Proteomics* 13, 2162-2175.
- Pastori G and Foyer CH (2002) Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* 129, 460-468.
- Pliego C, Nowara D, Bonciani G, Gheorghe DM, Xu R, Surana P, Whigham E, Nettleton D, Bogdanove AJ, Wise RP and Schweizer P (2013) Host-induced gene silencing in barley powdery mildew reveals a class of ribonuclease-like effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26, 633-642.
- Pogány M, Harrach BD, Hafez YM, Barna B, Király Z and Páldi E (2006) Role of reactive oxygen species in abiotic and biotic stresses in plants. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 41, 23-35.
- Pogány M, von Rad U, Grün S, Dongó A, Pintye A, Simoneau P, Bahnweg G, Kiss L, Barna B and Durner J (2009) Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria* pathosystem. *Plant Physiology* 151, 1459-1475.
- Prasad L, Katoch S and Shahid S (2022) Microbial interaction mediated programmed cell death in plants. *3 Biotech* 12, 1-18.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B and Lovaud A (2006) *The Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*, 2nd ed.; Wiley, Chichester Volume 1.
- Selin C, De Kievit TR, Belmonte MF and Fernando W (2016) Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: progress and challenges. *Frontiers in Microbiology* 7, 600.
- Senthil-Kumar M and Mysore KS (2015) Tobacco rattle virus-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Nature Protocols* 9, 1549-1562.
- Sharpee WC and Dean RA (2016) Form and function of fungal and oomycete effectors. *Fungal Biology Reviews* 30, 62-73.
- Staiger D, Korneli C, Lummer M and Navarro L (2013) Emerging role for RNA-based regulation in plant immunity. *New Phytologist* 197, 394-404.
- Steel CC, Blackman JW and Schmidtke LM (2013) Grapevine bunch rots: Impacts on wine composition quality and potential procedures for the removal of wine faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 5189-5206.
- Streb P, Aubert S, Gout E, Feierabend J and Bligny R (2008) Cross tolerance to heavy-metal and cold-induced photoinhibition in leaves of *Pisum sativum* acclimated to low temperature. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 14, 185-193.
- Thomma BP, Eggermont K, Penninckx IA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP and Broekaert WF (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 15107-15111.

- Thomma BP, Eggermont K, Tierens KFJ and Broekaert WF (1999) Requirement of functional *ethylene-insensitive 2* gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 121, 1093-1101.
- Thomma BP, Nürnberger T and Joosten MH (2011) Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell* 23, 4-15.
- Tsao R and Zhou T (2000) Antifungal activity of monoterpenoids against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. *Journal of Essential Oil Research* 12, 113-121.
- Tsuda K and Katagiri F (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 459-465.
- Van den Driessche T, Keulemans J, Geeraerd A, Nicolai BM and Hertog MLATM (2012) Evaluation of fast volatile analysis for detection of *Botrytis cinerea* infections in strawberry. *Food Microbiology* 32, 406-414.
- Veluchamy S, Williams B, Kim K and Dickman MB (2012) The CuZn superoxide dismutase from *Sclerotinia sclerotiorum* is involved with oxidative stress tolerance virulence and oxalate production. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 78, 14-23.
- Vranová E, Inzé D and van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53, 1227-1236.
- Vuts J, Koczor S, Imrei Z, Jósvai JK, Lohonyai Z, Molnár B, Kárpáti Z, Szócs G és Tóth M (2018) Módszerek a kémiai ökológiában. *Növényvédelem* 79, 89-109.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G and Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562-565.
- Xiao S, Charoenwattana P, Holcombe L and Turner JG (2003) The *Arabidopsis* genes *RPW81* and *RPW82* confer induced resistance to powdery mildew diseases in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 289-294.
- Yang L and Huang H (2014) Roles of small RNAs in plant disease resistance. *Journal of Integrative Plant Biology* 56, 962-970.
- Yang SJ, Carter SA, Cole AB, Cheng NH and Nelson RS (2004) A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 6297-6302.
- Yu X, Feng B, He P and Shan L (2017) From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annual Review of Phytopathology* 55, 109-137.
- Yuan M, Jiang Z, Bi G, Nomura K, Liu M, Wang Y, Cai B, Zhou JM, He SY and Xin XF (2021) Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature* 592, 105-109.
- Zhou J, Xia X-J, Zhou Y-H, Shi K, Chen Z and Yu J-Q (2014) RBOH1-dependent H₂O₂ production and subsequent activation of MPK1/2 play an important role in acclimation-induced crosstolerance in tomato. *Journal of Experimental Botany* 65, 595-607.