

dc_2039_22

MTA Doktora Pályázat

Doktori Értekezés

NEKROTRÓF ÉS HEMIBIOTRÓF GOMBAKÓROKÓZÓK KÖLCSÖNHATÁSAI
MODELL- ÉS HASZONNÖVÉNYEKSEL



Dr. Pogány Miklós

Agrártudományi Kutatóközpont

Növényvédelmi Intézet

Budapest, 2022

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	6
2. Általános irodalmi áttekintés	8
2.1. Növények kórokozókkal szembeni védekezése	8
2.1.1. Általános rezisztencia vagy PTI	8
2.1.2. Specifikus hiperszenzitív-típusú rezisztencia vagy ETI	9
2.1.3. Gén a génnel szembeni modell	10
2.2. Gombakórokozók életmódbeli sajátosságai: biotrófia, nekrotrófia, hemibiotrófia	11
2.3. Növényi hormonok szerepe a kórokozó gombák elleni növényi védekezésben	14
2.4. A növényi programozott sejthalál szerepe nekrotróf gombák kórfolyamataiban	15
2.5. A növényi programozott sejthalál mechanizmusa növény-kórokozó kölcsönhatásokban	16
2.6. A növényi programozott sejthalál két feltételezett típusa: autofágia és apoptózis	17
2.7. Az <i>Alternaria brassicicola</i> növényi kórokozó gomba	18
2.8. A <i>Botrytis cinerea</i> növényi kórokozó gomba	18
2.9. Nekrotróf kórokozókkal szembeni növényi rezisztencia	19
3. Anyag és Módszer	19
3.1. Az extracelluláris ROS szerepének vizsgálatához használt anyagok és módszerek	20
3.2. Anyagok és módszerek a hidegedzéssel, az oxidatív stresszel és a <i>Pyrenophora teres</i> kórokozóval szembeni kereszttolerancia viszonyok vizsgálatában	22
3.3. Furmint szőlő aszúsodásának transzkriptom szintű vizsgálatához használt anyagok és módszerek	23
3.4. Szürke- és nemesrothadás illatanyag vizsgálatához használt anyagok és módszerek	25
3.5. A <i>C. nicotianae</i> - <i>N. benthamiana</i> kölcsönhatás jellemzése során használt módszerek	26
4. Eredmények	29
4.1. Extracelluláris oxidatív robbanás szerepe nekrotróf gombakórokozó fertőzése során	29
4.1.1. ROS-termelő enzimrendszerek transzkripciója	31

4.1.2. ROS termelő enzimrendszerek kiütésének vagy csendesítésének hatása az <i>Arabidopsis-Alternaria</i> kölcsönhatás tüneteire és a ROS felhalmozódására	33
4.1.3. ROS termelő enzimrendszerek kiütésének vagy csendesítésének hatása az <i>A. brassicicola</i> gomba növekedésére	35
4.1.4. Reaktív oxigén származékok (ROS) kimutatása a ROS termelésében sérült <i>Arabidopsis</i> mintákban	37
4.1.5. Az RBOHD NADPH-oxidáz kölcsönható partnerei	41
4.1.6. PRX33 és PRX34 sejtfal peroxidázok lehetséges kölcsönható partnerei	46
4.1.7. Az RBOHD és a PRX33/PRX34 fehérjék kórélettani szerepe és az eredményeim hatása a munka tárgyát felölelő tudományterületre	48
4.1.7.1. Az extracelluláris oxidatív robbanás szerepe a beteg növények sejthalál folyamataiban	48
4.1.7.2. Az extracelluláris oxidatív robbanás hatása a nekrotróf <i>A. brassicicola</i> gombakórokozó iránti fogékonyságra	50
4.1.7.3. Az RBOHD NADPH-oxidáz feltehetőleg nem transzkripció aktivátor	50
4.1.7.4. Milyen hatást gyakoroltak a növényi sejtek extracelluláris oxidatív robbanásának kutatása során elért eredményeim a témához köthető tudományterületre?	51
4.2. Hidegedzés, oxidatív stressz és egy nekrotróf kórfolyamat kereszttolerancia viszonyainak vizsgálata kalászos gabonafajokban	51
4.2.1. Hidegedzés hatása búza és árpa növények oxidatív stresszel szembeni toleranciájára	52
4.2.2. Hidegedzés hatása a nekrotróf <i>Pyrenophora teres f. teres</i> tüneteire és virulenciájára árpa gazdanövényen	53
4.2.3. Hidegedzés hatása árpagének transzkripciójára	55
4.2.4. Kereszttolerancia vizsgálataim fő következtetései és az eredmények hatása a munka tárgyát felölelő tudományterületre	56
4.3. Furmint szőlő aszúsodásának transzkriptom szintű vizsgálata	57
4.3.1. Furmint és Semillon szőlőfajták nemesrothadása során hasonló transzkripció mintázatok figyelhetőek meg	59
4.3.2. Növényi hormonok anyagcsere-változásaira utaló folyamatok aszúsodott Furmint szőlőbogyó transzkriptomban	63

4.3.2.1. Abszcizinsavhoz köthető génexpressziós változások	63
4.3.2.2. ERF transzkripciós faktorok	65
4.3.2.3. Auxinhoz köthető transzkripciós folyamatok	66
4.3.2.4. Citokininekhez köthető génexpresszió	67
4.3.2.5. Szalicilsavhoz köthető transzkripciós változások	67
4.3.2.6. Jázmonsavhoz köthető génexpressziós folyamatok	67
4.3.3. Redox folyamatok nyomon követése aszúsodott Furmint transzkriptomban	68
4.3.3.1. Glutation S-transzferázok	68
4.3.3.2. Transzkripciós változások a fenilpropanoid anyagcsere-útvonal tagjait kódoló génekben	70
4.3.3.3. A szőlőbogyó antioxidáns rendszerének egyéb komponenseit kódoló gének	72
4.3.4. Redox-szabályozott és redox jelátvitelhez köthető gének transzkripciója nemesrothadás során	74
4.3.4.1. NPR1 kölcsönható <i>NIMIN-1</i> és <i>NIMIN-2</i> gének	74
4.3.4.2. MCP1 metakaspáz	75
4.3.4.3. Redox folyamatokhoz köthető kloroplasztisz fehérjéket kódoló gének gátlása	75
4.3.4.4. Alkohol-dehidrogenáz 1	77
4.3.4.5. WRKY transzkripciós faktorok	77
4.4. Nemesrothadás modellezése klímakamrában, szürkerothadás és nemesrothadás illatanyag markerei	78
4.4.1. A nemesrothadás és szürkerothadás párhuzamos előidézése növénynevelő kamrában	79
4.4.2. A szürke- és nemesrothadás eltérő módon befolyásolja a szőlőbogyók cukortartalmát és a <i>B. cinerea</i> biomassza mennyiségét	81
4.4.3. A nemesrothadás és a szürkerothadás illatanyag markerei	82
4.4.4. Nemesrothadás modellezése és illatanyag vizsgálataim fő következtetései és az eredmények hatása	83
4.5. <i>Cercospora nicotianae</i> : a <i>Nicotiana benthamiana</i> lehetséges új modell kórokozója	85
4.5.1. A <i>N. benthamiana</i> növény a <i>C. nicotianae</i> gombafaj gazdanövénye	87

4.5.2. A <i>N. benthamiana</i> lényegesen fogékonyabb a <i>C. nicotianae</i> fertőzése iránt, mint a <i>N. tabacum</i>	88
4.5.3. Növényi stresszhormonok jelátvitelének gátlása tovább fokozza a <i>N. benthamiana</i> fogékonyságát <i>C. nicotianae</i> iránt	89
4.5.4. A <i>C. nicotianae</i> szingulett oxigén termelése	92
4.5.5. A <i>Cercospora nicotianae</i> - <i>Nicotiana benthamiana</i> növény-gomba kölcsonhatással elért eredményeim fő következtetései	93
5. Összefoglalás, tézispontok	94
Köszönetnyilvánítás	98
Irodalmi hivatkozások	99
Mellékletek	119

1. 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 szintű vizsgálatokhoz kifejlesztett microarray módszer, és az Illumina technológiára épülő új generációs RNS szekvenálás.

Kutatómunkámban különösen fontos állomásoknak tekintem (és az értekezésben bemutatom) azokat a felfedezéseket, melyek gazdaságilag jelentős haszonnövényekhez köthetőek. Hálás vagyok azért, hogy a korábbi modell növényekkel (dohány, *A. thaliana*) szerzett növénybiológiai tapasztalataimat elkezdhettem használni szőlő és árpa gazdanövények mikrobákkal létesített kölcsönhatásainak vizsgálatára. Ezek az eredmények nem csupán alapkutatási szempontból lehetnek jelentősek, hanem társadalmi szempontból hasznosuló fejlesztéseket is szolgálhatnak.

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

1) Extracelluláris oxidatív robbanás szerepe nekrotróf gombakórokozó fertőzése során

Pogány M, von Rad U, Grün S, Dongó A, Pintye A, Simoneau P, Bahnweg G, Kiss L, Barna B és 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 és 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.

2) Hidegedzés, oxidatív stressz és egy nekrotróf kórfolyamat keresztolerancia viszonyainak vizsgálata kalászos gabonafajokban

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

3) Furmint szőlő aszúsodásának transzkriptom szintű vizsgálata

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 és hormonal changes in the transcriptome of natural noble rot development. *Plants* 11, 864.

4) Nemesrothadás modellezése klímakamrában, szürkerothadás és nemesrothadás illékony szerves markerei

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

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

Fodor J, Kámán-Tóth E, Dankó T, Schwarczinger I, Bozsó Z és Pogány M (2017) 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.

Az értekezés keretében tárgyalt munkáim között az jelenti az összekötő kapcsot, hogy mindegyik dolgozat szöveti nekrozist okozó kórokozó gombák kórfolyamatainak vizsgálatára irányul, tehát a nekrotrófia jelenségének növényi sejtekre gyakorolt hatásairól mutat meg új részleteket.

2. Általános irodalmi áttekintés

2.1. Növények kórokozókkal szembeni védekezése

2.1.1. Általános rezisztencia vagy PTI

A növényi sejtek kórokozó mikrobákkal szembeni védelmi rendszerét leíró ma is érvényesnek tekintett modell a Jones és Dangl által javasolt „Z” vagy „Cikk-cakk” modell (Jones és Dangl 2006, Jones és mtsai 2016). A modell a növények és kórokozóik kölcsönhatásait kétoldalú fegyverkezési versenyhez hasonlítja és a növényi sejtek oldaláról kétszintű védelmi rendszert ír le. 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). Ilyen gombákra jellemző molekuláris mintázatok a gomba sejtfalából származó kitin, kitozán, β -glukán és galakturonsav, valamint a gombák sejtmembránjában található ergoszterol (Geoghegan és mtsai 2017, Schellenberger és mtsai 2019, Pradhan és mtsai 2021). Növénykórokozó gombák fertőzése során a növényi sejt felszín is sérül, ami további általános rezisztenciához köthető felismerési folyamatokat vált ki a növényi sejtekben. Ezeket a saját sejt felszínről származó molekuláris mintázatok DAMP (damage-associated molecular patterns) rövidítéssel jelöljük. Pektin poliszacharid hasításával keletkező oligogalakturon vegyületek jellegzetes DAMP-ok (Brutus és mtsai 2010). A kórokozó eredetű MAMP-okat és a növényi eredetű DAMP-okat a növényi sejt többnyire a sejt felszínén elhelyezkedő mintázat-felismerő receptor-szerű kinázokkal érzékeli (Boutrot és Zipfel 2017, Gust és mtsai 2017). A mintázat-felismerő receptorok (PRRs) aktiválódása kapcsolja be a növényi sejt védekezésének első rétegét, tehát az általános rezisztenciát, ami jelentős molekuláris változásokkal jár együtt az érintett sejtekben. MAP- (mitogén aktivált protein) kináz kaskád lép működésbe, kalcium ionok áramlanak a sejt belsejébe, reaktív oxigén származékok (ROS) és kallóz termelődik a sejt közötti járatokban, védekezéshez-köthető transzkripció faktorok hangolják át a sejt magi génműködést, a sejt különféle antimikrobiális hatású vegyületeket termel (Lorang 2019). Fontos, hogy mindezeket az általános rezisztenciához (PTI-hez) köthető molekuláris változásokat nem követik látható tünetek és egy adott mikroba faj (mely lehet kórokozó, vagy akár nem kórokozó) minden törzse vagy rassza kiválthatja, tehát az indukciója nem rassz-specifikus (Dodds és Rathjen 2010, Thomma és mtsai 2011).

2.1.2. Specifikus hiperszenzitív-típusú rezisztencia vagy ETI

A kórokozó és növényi sejtek kölcsönhatásának második rétege a „Z” modell alapján a kórokozó mikroba fajok különböző rasszainak vagy törzseinek azon tulajdonságára vezethető vissza, hogy a növényi általános rezisztencia visszaszorítására kifinomult virulencia faktorokat, vagyis effektorokat termelnek, melyek célpontjai a gazdanövény sejtjeinek belsejében, vagy az extracelluláris térben találhatóak (Sharpee és Dean 2016). A *Cladosporium fulvum* Avr2 effektora cisztein-proteázok működését gátolja paradicsomban (Van Esse és mtsai 2008), az *Ustilago maydis* Pep1 effektora a kukorica POX12 peroxidáz működését és a növény redox jelátvitelét módosítja (Hemetsberger és mtsai 2012), a *Verticillium dahliae* VdLsc1 effektor az izokorizmat hidrolízisével a szalicilsav növényi hormon képződését gátolja gyapot növényekben (Liu és mtsai 2014). A *Mycosphaerella graminicola* Mg1LysM, a *Magnaporthe oryzae* Slp1 és a *Cladosporium fulvum* Ecp6 effektorok a gombasejtfalból származó kitinláncok megkötésével gátolják a kórokozó növényi PRR receptorok általi felismerését (Marshall és mtsai 2011, Mentlak és mtsai 2012, Chen és mtsai 2014, de Jonge és mtsai 2010). Növénypatogén gombák tehát effektorokat termelnek annak érdekében, hogy a gazdanövényeik általános rezisztenciáját gátolják. Abban az esetben, amikor egy növénykórokozó gomba rassz effektorai segítségével betegséget idéz elő egy gazdanövényének bizonyos egyedeiben, effektorok által kiváltott fogékonyság (effector-triggered susceptibility vagy ETS) következik be (Jones és Dangl 2006). A növény és kórokozói 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 NBS-LRR (vagy NLR) receptorfehérjék, tehát R (rezisztencia) fehérjék segítségével. Ilyenkor a növények a kórokozó virulenciát szolgáló fegyvereit fordítják önmaga ellen (Jones és Dangl 2006, Dodds és Rathjen 2010). A *Magnaporthe oryzae* Avr-Pita effektorát - ami feltehetőleg metalloproteáz aktivitású fehérje – a rizssejtek citoplazmájában található Pi-ta NLR rezisztencia fehérje érzékeli (Orbach és mtsai 2000). A *Cladosporium fulvum* Ecp4 és Ecp5 effektorait a *Solanum pimpinellifolium* Cf-ECP4 és CF-ECP5 rezisztencia fehérjéi érzékelik a sejtközötti járatokban (Laugé és mtsai 2000, Pradhan és mtsai 2021). Ezekben az említett példákban kórokozó eredetű effektorok növényi R fehérjék általi felismerése a

specifikus rezisztencia folyamatának aktiválásához vezet az érintett növényi sejtekben. Az általános rezisztenciával összehasonlítva fontos különbség, hogy az ETI kórokozó rassz-specifikus, és a növényi oldal irányából szintén genotípus-specifikus (melynek genetikai háttere a következő alfejezetben olvasható). Szintén fontos különbség, hogy míg a PTI tünetmentes rezisztenciaforma, az ETI az érintett növényi sejtek egy részének programozott sejtthalálát eredményezi, ez a hyperszenzitív válasz vagy HR (Dodds és 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). A növényi rezisztencia két rétege, a PTI és az ETI tehát nem választható szét élesen egymástól: ugyan a kórokozó mikrobák alapvetően eltérő típusú molekuláit érzékelik, ezekhez jellemzően egymástól eltérő receptorokat használnak, ám az általuk aktivált jelátviteli és biokémiai folyamatok nagymértékben átfednek.

Két frissen megjelent magas színvonalú dolgozat felfedezései logikus magyarázatot nyújtanak a PTI és az ETI során tapasztalható molekuláris és biokémiai hasonlóságokra (Ngou és mtsai 2021, Yuan és mtsai 2021a). Eredményeik alapján azt a következtetést vonják le, hogy az ETI 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.

2.1.3. Gén a génnel szembeni modell

Az ETI során bekövetkező effektor-R fehérje kölcsönhatások molekuláris szinten leképezik és követik Harold Flor gén a génnel szembeni modelljét (Flor 1946, Hornok 2004). Flor modellje

azt vetíti előre, hogy rezisztens kimenetű kölcsönhatás csak abban az esetben következik be, ha domináns rezisztencia gént (*R*) hordozó gazdanövény genotípus komplementer domináns avirulencia gént (effektor gént) hordozó kórokozó razzal találkozik. Az inkompatibilitás (rezisztencia) feltétele tehát az egymással komplementer domináns gén párok kölcsönhatása. Mind a növényi rezisztencia gén nukleotid sorrendjének megváltozásából fakadó funkcionális változás (*R* génből *r*), mind a kórokozó effektor gén megváltozása vagy elvesztése (*Avr* génből *avr*) a kölcsönhatást kompatibilissé, tehát fogékonná változtatja. Meg kell jegyezni, hogy a gén a génnel szembeni modell nem alkalmazható a növény-kórokozó gomba kölcsönhatások teljes körére. Helytálló azokban az esetekben, amikor e két feltétel teljesül: i) a kórokozó gomba életmódjának meghatározó eleme az élő növényi szövetek kifinomult kolonizációja és az élő szövetekből történő táplálkozás, illetve ii) a kórokozó gomba effektorainak felismerése esetén a növényi sejtek gyors programozott sejthalállal, HR-rel válaszolnak (Hammond-Kosack és Kanyuka 2007).

2.2. Gombakórokozók életmódbeli sajátosságai: biotrófia, nekrotrófia, hemibiotrófia

Az értekezés keretét a növények gombakórokozóinak életmódjában megfigyelhető egymástól eltérő stratégiák szolgáltatták. A növénykórokozó gombákat életmódjuk alapján csoportosítják egyrészt hagyományos módon (Horbach és mtsai 2011), másrészt az elmúlt két évben a hagyományos csoportosítás hiányosságainak megoldására javaslat született egy bonyolultabb, ám a valóságot pontosabban leíró új csoportosításra (Hane és mtsai 2020). A hagyományos csoportosítás három életmódbeli stratégiát különböztet 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. Általában nem termelnek toxinokat és sejtfalbontó enzimek kibocsátása is kevésbé jellemző rájuk (Mengiste 2012). Kórfolyamatuk szerves részét képezi, hogy effektoraik segítségével álcázzák jelenlétüket a növényi sejtek előtt és a gazdasejtek anyagcseréjének manipulálásával a gazdaszervezet működését fenntartják (Lo Presti és mtsai 2015). Obligát biotróf fonalas gombakórokozók a gazdasejtek sejtmembránján betüremkedéseket fejlesztenek, ezek a hausztóriumok, majd hausztóriumaik segítségével táplálkoznak a növényi sejtek szénhidrát, lipid és aminosav készletét használva (Horbach és

mtsai 2011). Tipikus biotróf gombakórokozók a tömlősgombákhoz tartozó lisztharmatok és az anyarozs fertőzést okozó *Claviceps purpurea*, vagy a bazídiumos gombákhoz tartozó rozsdá- és üszöggombák (García-Guzmán és Heil 2014).

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. Az elhalt szöveteket a kórokozó akadálytalanul birtokba veszi, táplálékforrásként hasznosítja (Mengiste 2012). A nekrotróf gombakórokozók génkészletében nagyszámú sejtfalbontó enzimet kódoló gént találunk (Kabbage és mtsai 2015). Ezek mellett többféle alacsony molekulatömegű toxint is termelnek, melyek lehetnek gazdanövényre specifikus (szelektív), vagy nem specifikus toxinok (Barna 1998, Van Kan 2006). Számos biotróf kórokozóval kapcsolatban ismert az, hogy képesek a növényi sejtek hiperszenzitív válaszában gátlására. Nekrotróf gombakórokozókkal kapcsolatban viszont közismert az, hogy olyan virulenciafaktorokat termelnek, amikkel a növényi programozott sejthalál folyamatát maguk is elősegítik, ezzel is gyorsítva a növényi szövetek elhalását (Desmond és mtsai 2008, Rossi és mtsai 2011). Nekrotróf gombakórokozók jellegzetes képviselői a *Botrytis cinerea*, az *Alternaria brassicicola*, a *Sclerotinia sclerotiorum*, az árpa hálózatos levélfoltosságát okozó *Pyrenophora teres* f. *teres*, vagy a *Rhizoctonia solani* (Newman és Derbyshire 2020).

A növénykórokozó gombák harmadik csoportját a **hemibiotróf** életmódú kórokozók alkotják. Ide olyan kórokozó gombák tartoznak, melyek stratégiájában keverednek a biotróf és nekrotróf életmód sajátosságai, életciklusuk rövidebb vagy hosszabb első felében inkább biotróf kórokozóként viselkednek, később pedig inkább nekrotróf jegyeket mutatnak (Mengiste 2012). A burgonyavész kórokozója, az oomikóta *Phytophthora infestans* jellegzetes hemibiotróf kórokozó, mely a fertőzés korai (biotróf) szakaszában a gazdanövény sejthalál folyamatait gátló effektort (AVR3a) termel, később viszont a kórfolyamat nekrotróf fázisában sejthalált elősegítő effektorokat (INF1, NP1-like) juttat hausztóriumai segítségével a gazdanövény sejtjeibe (Vleeshouwers és Oliver 2014). Tipikus hemibiotróf gombakórokozók a már korábban említett *Magnaporthe oryzae* vagy a búza levélfoltosságot okozó *Zymoseptoria tritici* (García-Guzmán és Heil 2014).

A közelmúltban növénykórokozó gombák életmódszerinti csoportosításának új rendszerére tettek javaslatot ausztrál és holland kutatók (Hane és mtsai 2020). Ezt véleményük szerint az teszi indokolttá, hogy a hagyományos háromosztatú csoportosítás túlságosan leegyszerűsíti, és nem tükrözi a kórokozó fonalas gombák életmódbeli sokféleségét. Sok, különösen jelenleg hemibiotrófokhoz sorolt faj besorolása bizonytalan és az elmúlt években többször változott (Sánchez-Vallet és mtsai 2015, Videira és mtsai 2017). Ezen kívül Hane és munkatársai azzal is érvelnek, hogy az obligát parazitizmus esetétől eltekintve (ami egyértelműen biotróf életmódhoz köthető) hiányoznak azok a diagnosztikus, tehát nyilvánvaló, kézzelfogható kritériumok, ami alapján a fajok egyértelmű módon elkülöníthetőek lennének a három hagyományos életmód szerinti besorolás alapján. A szerzők ezért egy saját fejlesztésű számítógépes programot készítettek, ami növénykórokozó gombákat négy fő életmódcsoportba és ezeken belül további (összesen hét) alcsoportba helyezi el. A 4 főcsoport a következő: monomertróf – Mo (biotrófok), polimertróf – P (nekrotrófok), mezotróf – Me (hemibiotrófok) és vaszkulartróf – V (hervadást, rothadást és antraknózist okozó gombák). Alcsoport szerinti beosztás alapján: 1) hausztóriumos monomertrófok (Mo2) például lisztharmatok, rozsdagombák, 2) hausztórium-nélküli monomertrófok (Mo3) pl. *Dothistroma septosporum*, 3) extracelluláris mezotrófok (MeE) pl. *Zymoseptoria* spp., *Venturia* spp., *Leptosphaeria maculans*, 4) intracelluláris mezotrófok (MeI) pl. *Colletotrichum* spp., *Magnaporthe oryzae*, 5) széles gazdanövénykörű polimertrófok (PB – B = broad host-range) pl. *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia* spp., *Alternaria brassicicola*, *Fusarium graminearum*, 6) szűk gazdanövénykörű polimertrófok (PN – N = narrow host-range) pl. *Pyrenophora* spp., *Cochliobolus* spp., vaszkulartrófok (V) pl. *Fusarium solani*. Fontos részlet ezzel az új életmódbeli csoportosítási rendszerrel és az ezt kiszolgáló informatikai fejlesztéssel kapcsolatban, hogy a csoportokba sorolás alapja egyszerűen a kórokozó gombák örökítőanyagában található szénhidrátot ható enzimeket kódoló gének (glikozil-transzferázok, glikozid-hidrolázok, poliszacharid-liázok és szénhidrát-észterázok) jelenléte, mennyisége. A monomertrófok esetében jellemzően alacsony ez az érték, a polimertrófoknál viszont magas (Hane és mtsai 2020). A növénykórokozó gombák életmód szerinti csoportosításának ez az új rendszere ugyan nem hibátlan, de összességében pontosabb képet nyújt az egyes fajok tényleges életmódbeli hovatartozásáról. Kérdéses azonban, hogy viszonylagos összetettsége miatt mennyire válik elfogadottá a

növénypatológus társadalom tagjai között. Jelen MTA doktora értekezés további fejezeteiben a hagyományos háromosztatú életmód szerinti csoportosítást követem.

2.3. Növényi hormonok szerepe a kórokozó gombák elleni növényi védekezésben

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 szalicilsav-jelátviteli útvonal és a jázmonsav/etilén jelátviteli útvonal nem függetlenek egymástól, hanem kölcsönös, koncentráció-függő gátló hatást gyakorolnak egymásra (Laurie-Berry és mtsai 2006, Mur és mtsai 2006, Spoel és mtsai 2007, Spoel és Dong 2008, Pieterse és mtsai 2009).

A szalicilsav kórokozó mikrobákkal szembeni hatásmechanizmusa elsősorban az NPR1 (vagy másik rövidítéssel NIM1) fehérje közvetítésével megy végbe. Növényi sejtekben a szalicilsav fizikai kölcsönhatást létesít a NIM1-gyel és emelkedő szalicilsav szint esetén a citoplazmában található NPR1 oligomer molekulák redoxfüggő folyamat keretében monomerizálódnak. Az aktív NPR1 monomer molekulák a sejtmagba helyeződnek át, ahol egyéb transzkripció faktorokkal együttműködve előidézik a szalicilsav-függő gének expressziós mintázatának változását (Mou és mtsai 2003, Wu és mtsai 2012). A NIM1 fehérje fontos negatív regulátorai a NIM1-kölcsönható NIMIN fehérjék (Weigel és mtsai 2001, 2005).

A jázmonsav a Coronatine Insensitive 1 (COI1) F-box fehérjéből és a Jasmonate ZIM Domain (JAZ) fehérjékből álló receptorkomplex segítségével, továbbá az etilén által is szabályozott ORA59 és ERF1 AP2/ERF transzkripció faktorok közvetítésével fejt ki génműködést szabályozó hatását (Pré és mtsai 2008, Li és mtsai 2019). Az etilén jelátvitelében kulcsszerepe van a növényi sejtek endoplazmatikus retikulumában található EIN2 fehérjének, melynek C-

terminális funkcionális egysége (CEND) növekvő etilén szint hatására leválik az EIN2 fehérjéről és a sejtmagba belépve aktiválja az EIN3 transzkripciós faktort, ami beindítja a növényi sejtek etilénre adott válaszát (Alonso és mtsai 1999, Ju és mtsai 2012, Qiao és mtsai 2012).

2.4. A növényi programozott sejthalál szerepe nekrotróf gombák kórfolyamataiban

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. A jelenségre fordított gén a génnel szembeni kölcsönhatásként is hivatkoznak azokban az esetekben, amikor a nekrotróf gomba effektora a gazdanövény egy ismert R fehérjéjével lép kölcsönhatásba (Shao és mtsai 2021). A *Pyrenophora tritici-repentis* és a *Parastagonospora nodorum* Tox effektorai búzán, a *Cochliobolus heterostrophus* és *C. sativus* szintén Tox effektorai kukoricán, búzán és árpán idéznek elő ilyen programozott sejthalállal végződő fordított gén a génnel szembeni kölcsönhatást. Ide tartozik az a nekrotróf és biotróf kórokozók különbözőségét látványosan szemléltető növénykórtani példa is, ami a zab Pc-2/Vb NLR rezisztencia fehérje esetében figyelhető meg. A Pc-2 vagy más néven Vb R fehérje a biotróf rozsdagomba *Puccinia coronata* bizonyos rasszaival szemben nyújt hiperszenzitív típusú rezisztenciát zab gazdanövényben. Ugyanakkor a nekrotróf *Cochliobolus victoriae* viktorin gazdanövény-specifikus toxinja (effektora) is ugyanezt az ETI receptort veszi célba, de ebben az esetben a növényi programozott sejthalál Pc-2/Vb általi aktiválása a növény *C. victoriae* (nekrotróf) kórokozó iránti fogékonyságát eredményezi (Wolpert és mtsai 2002, Lorang és mtsai 2012). Nekrotróf kórokozók nem csupán a növényi R fehérjék kijátszásán keresztül aktiválhatják a növényi anyagcsere programozott sejthalál útvonalaikat. A *Botrytis cinerea*

például az endopoligalakturonáz aktivitású PG1 és PG2 fehérjék révén támadja a növényi sejtfalat, ami az érintett sejtek elhalását eredményezi (Kars és mtsai 2005).

2.5. A növényi programozott sejthalál mechanizmusa növény-kórokozó kölcsönhatásokban

Az NLR rezisztencia fehérjék aktiválódását követő jelátviteli folyamat, aminek főbb lépései a MAP kináz kaszkád 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. A citoplazmában megemelkedő Ca^{2+} ion és ROS szint hatására eltolódik a mitokondriumok membránpotenciálja és megváltozik a külső membrán csatorna-fehérjéinek áteresztő képessége. Citokróm-c áramlik ki a citoplazma felé, a mitokondriális elektrontranszportlánc károsodik és fokozott ROS képződést mutat. Ennek a sejtalkotó károsodásnak kulcsszerepet tulajdonítanak a programozott sejthalál előidézésében (Jones 2001, Amirsadeghi és mtsai 2006). Növényi sejtekben ugyanakkor a mitokondriumok mellett a kloroplasztiszok programozott sejthalálban játszott szerepe is erős érvekkel bizonyított, amit alátámaszt egyebek mellett a megvilágítás fontossága programozott sejthalállal végződő különböző növény-kórokozó kölcsönhatásokban, mely általában a kloroplasztiszokban képződő ROS-ra vezethető vissza (Liu és mtsai 2007, Stael és mtsai 2015, Lv és mtsai 2019). A programozott sejthalált közvetlenül előidéző faktorként a kaszpázokhoz hasonló proteázokat, tehát a vakuólumban található VPE (Vacuolar Processing Enzyme) fehérjéket, a citoplazmában található metakaspázokat, fitaspázokat és a proteaszóma rendszer PBA1 alegységét, valamint az extracelluláris térben

elhelyezkedő katepszin B, szaszpáz, Rcr3 és Pip1 fehérjéket tartják számon (Bozhkov és Lam 2011, Pogány és mtsai 2015, Salguero-Linares és Coll 2019, Pitsili és mtsai 2020). A növényi sejtek elhalásában részt vevő egyik legjobban feltérképezett proteáz rendszer az *Arabidopsis thaliana*-ban leírt MCPA1 és MCPA2 metakaspáz páros, melyek közül az MCPA1 előidézi a növényi sejtek programozott sejthalálát, az MCPA2 pedig gátolja azt. A két fehérje lokális elrendeződése is izgalmas képet mutat, hiszen a szalicilsav-jázmonsav pároshoz hasonlóan az MCPA1 az elhaló sejtekben halmozódik fel, az MCPA2 pedig a környező túlélő sejtekben (Coll és mtsai 2010, Pogány és mtsai 2015). Az MCPA1-gyel kapcsolatban fény derült arra is, hogy öregedő sejtekben viszont megfordulhat a szerepe és maga is gátolhatja a sejthalál kialakulását (Coll és mtsai 2014). Fontos kiemelni, hogy a sejtek elhalásában a proteázok mellett a ROS is közvetlenül szerepet játszhatnak a biológiai membránok integritását károsító lipidperoxidációs folyamatok kiváltó faktoraként (O'Brien és mtsai 2012a).

2.6. A növényi programozott sejthalál két feltételezett típusa: autofágia és apoptózis

Érdeemes röviden áttekinteni Veloso és van Kan (2018) nekrotróf gombák kórfolyamataira felállított programozott sejthalál modelljét. Ez olyan korábbi munkákon alapul, melyekben széles gazdanövénykörű nekrotróf *S. sclerotiorum*-mal, *B. cinerea*-val és autofágia mutáns *A. thaliana* genotípusokkal dolgoztak (Williams és mtsai 2011, Kabbage és mtsai 2013, 2015, 2016, Lai és mtsai 2011, Li és Dickman 2016, Li és mtsai 2016, Hoeberichts és mtsai 2003, Sun és mtsai 2017). Modelljükben azt feltételezik, hogy ezek a kórokozók effektoraikkal (mely *S. sclerotiorum* esetében főként a nem-gazdanövény specifikus oxálsav toxint jelenti) két egymástól eltérő növényi programozott sejthalál típus gátlása és kiváltása között egyensúlyoznak. E két sejthalál típus egyike, az autofágia, amely egyebek mellett a kórokozó fertőzése során károsodó sejtalkotók lebontását végzi és elsősorban sejtvédő és a sejthalál továbbterjedését gátló hatású (Zhou és mtsai 2014a). A másik sejthalál típus az apoptózis, ami a sejtek gyors és továbbterjedő pusztulásával jellemezhető (Kabbage és mtsai 2013). Az autofágia a modell szerint alapvetően gátolja a nekrotróf gombakórokozók virulenciáját, az apoptózis pedig elősegíti. A modell szerint a nekrotróf gombák gazdanövényeik megbetegítése során e két növényi sejthalál típus kiváltását és gátlását szabályozzák összehangolt módon. A kórfolyamat nagyon korai látens szakaszában az autofágia

érvényesülését helyezve előtérbe, a kórfolyamat későbbi valódi nekrotróf szakaszában viszont az apoptózis egyértelmű kiváltásával (Veloso és Van Kahn 2018).

2.7. Az *Alternaria brassicicola* növényi kórokozó gomba

Az *Alternaria* nemzetség a tömlősgombák törzsének *Dothideomycetes* rendjébe tartozó, ivaros alakkal nem rendelkező gomba taxon. A nemzetségben számos növénykórokozó faj található, melyek nekrotróf életmódot folytatnak. Gazdanövényeik sejtjeit főleg toxikus anyagcseretermékeik segítségével károsítják, vagy közvetlen nekrozissal, vagy a növényi sejtek programozott sejthalál folyamatának kiváltásával (Thomma 2003, Cho és mtsai 2012). Az *Alternaria brassicicola* a *Brassica* növénynemzetség tagjait fertőző széles gazdanövénykörű nekrotróf kórokozó (Cho 2015). Csírázó *A. brassicicola* konídiumok fehérjetermészetű gazdanövény-specifikus AB-toxint és egyéb fitotoxikus fuzikokkán-szerű diterpenoidokat termelnek (Otani és mtsai 1998, MacKinnon és mtsai 1999). Pedras és munkatársai (2009) Brassicicolin A toxint és további fuzikokkán származékokat mutattak ki a gomba tenyésztésűrléteéből. A gomba örökítőanyagában gazdagon találunk extracelluláris szignálpeptid szekvenciát is kódoló lipáz (76 darab) és kutináz (9 darab) géneket, ami megerősíti azt a feltételezést, hogy a kórokozó által termelt kutinázoknak és lipázoknak is fontos szerepe van a fertőzési folyamat elindításában (Trail és Köller 1993, Berto és mtsai 1999, Ohm és mtsai 2012).

2.8. A *Botrytis cinerea* növényi kórokozó gomba

A *Botrytis cinerea* a természetben nagyon ritkán előforduló aszkospórás *Botryotinia fuckeliana* ivartalan (anamorf) alakja (Alur 2004). A *Helotiales* rend *Sclerotiniaceae* családjába tartozó fonalas gomba (Staats és mtsai 2005). A *B. cinerea* ivartalan szaporodását a gomba módosult hifáiból képződő konidiumtartókon található konídiumok biztosítják. Nagyon széles gazdanövénykörrel rendelkező nekrotróf kórokozó, több mint 500 növényfajt képes megbetegíteni (Elad és mtsai 2016). A gomba által termelt két legfontosabb gazdanövényre nem specifikus toxin a szeszkviterpenoid botrián vegyületekhez tartozó botridiál (Collado és mtsai 2007) és a poliketid botcininekhez sorolható botcinin sav (Tani és mtsai 2006). A botridiál

és botcinin sav, illetve a bioszintézisükben alapvető fontossággal bíró *BcBOT2* és *BcPKS6* gének virulenciában játszott szerepe lényegesnek tűnik (Reino és mtsai 2004, Dalmais és mtsai 2011). A *B. cinerea* fontos virulencia faktora még a szintén fitotoxikus hatású oxálsav is, ami csökkenti a pH-t az apoplasztban és segíti a sejtfalakban lévő pektin hidrolitikus bontását, továbbá aktiválja a programozott sejthalált a növényi sejtekben (Williamson és mtsai 2007, Kim és mtsai 2008).

2.9. Nekrotróf kórokozókkal szembeni növényi rezisztencia

A jázmonsav/etilén jelátviteli út mellett elsősorban a növényi sejtek mintázat-felismerő receptorai és az általános rezisztencia (PTI) különböző komponensei biztosítanak védelmet a növények számára nekrotróf gombakórokozók támadásával szemben (Mengiste 2012, Wang és mtsai 2014). Fontos szerep hárul a sejtfelszínen található PRR receptorokra, melyek érzékelik a gombák által kibocsátott kitin és endopoligalakturonáz mintázatokat és a növényi sejtek sérüléséből fakadó oligogalaturonidokat, peptideket és kutin monomereket (Miya és mtsai 2007, Wan és mtsai 2008, Zhang és mtsai 2014, Wang és mtsai 2014). A citoplazmában lokalizált BIK1 (BOTRYTIS-INDUCED KINASE 1) receptorszerű kináznak kiemelkedő jelentősége van a PRR receptorok felől érkező szignálok integrálásában (Veronese és mtsai 2006, Zhang és mtsai 2010). Egyre több adat lát napvilágot végül azzal kapcsolatban, hogy a nekrotróf kórokozókkal szembeni növényi védekezésnek van egy markáns epigenetikai iránya is. Ez egyrészt siRNS-ek által közvetített DNS metilációval, tehát transzkripciós géncsendesítéssel valósul meg (López és mtsai 2011), másrészt szintén a sejtmagban a hiszton fehérjék szerkezeti módosulásait előidéző deacetilációval, metileződéssel és ubikvitinációval (Zhou és mtsai 2005, Berr és mtsai 2010, Dhawan és mtsai 2009).

3. Anyag és Módszer

Értekezésemben ismertetett eredmények sokrétű és komplex molekuláris biológiai, analitikai, mikroszkópos, bioinformatikai és mikrobiológiai eszköztár elsajátításával és alkalmazásával valósultak meg, amik részletesen megtalálhatóak az értekezés alapjául szolgáló tudományos dolgozatokban. Ezért az anyag és módszer fejezet összeállításánál arra törekszem, hogy

egyrészt világosan bemutassam a fő eredményfejezetekben használt kísérleti rendszereket, tehát növényeket, kórokozókat és a kísérleti rendszer összeállításának koncepcióját. Másrészt felsorolom a vizsgálatokban használt kutatási módszereket és azok néhány kulcsfontosságú jellemzőjét. Nem mutatom be részletesen a módszerek technikai részleteit. Ezeknek megismeréséhez közleményeim Anyag és Módszer fejezeteit javaslom.

3.1. Az extracelluláris ROS szerepének vizsgálatához használt anyagok és módszerek

(Részletes módszer leírás: Pogány és mtsai (2009) *Plant Physiology* 151, 1459-1475; Kámán-Tóth és mtsai (2019) *Molecular Plant Pathology* 20, 485-499)

Növények: A vizsgálatokhoz 4-6 hetes, Columbia ökotípushoz (Col-0) tartozó *Arabidopsis thaliana* növényeket használtunk, melyeket tőzeg alapú, tápanyaggal dúsított természetes közegben, növénynevelő kamrákban neveltünk. *Arabidopsis* genotípusaink nagy része T-DNS mutagenézissel készült, az Európai *Arabidopsis* törzsgyűjtemény katalógusából rendelve. A PRX33/PRX34 sejtfa peroxidáz gének vizsgálatához T-DNS mutánsok mellett dohány rattle vírus (TRV) vektorba épített géncsendesítő konstrukciókat is használtunk (Mériai és mtsai 2005, Hayward és mtsai 2011). A géncsendesítés hatékonyságát RT-qPCR módszer alkalmazása mellett zöld fluoreszcensz fehérjét (GFP) termelő *Arabidopsis* vonal és GFP-t csendesítő szekvenciát tartalmazó kontroll vektorkonstrukciók felhasználásával végeztük.

Kórokozó: Két dolgozatunk kísérletei során az *Alternaria brassicicola* CBS125088 és MUCL20297 törzseit használtuk. A gombakórokozót burgonya-dextróz agar táptalajon tenyésztettük, 5×10^5 konídium/ml koncentrációban permeteztük a növények leveleire. Az inokulációt követően a fertőzött növényeket közel 100 % relatív páratartalmú közegben tartottuk a tünetek kifejlődéséig, illetve a kísérletek végéig.

Kísérleti rendszer összeállítása: Vad típusú és NADPH-oxidáz mutáns *Arabidopsis* genotípusokat fertőztünk *A. brassicicola* konídium szuszpenzióval. A fertőzött növények kontrollja desztillált vízzel permetezett növényeket jelentett. Megfigyeltük a kísérletekben használt növények tüneteit, az elhalt szövetek arányát, a növényeken táplálkozó *A. brassicicola* biomasza képzését (ez utóbbit qPCR módszerrel elemeztük). Fénymikroszkóppal megfigyeltük a nekrotrof 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 sejtfal peroxidáz gének fokozott transzkriptum szintjeit a gombával való fertőzést követően vad típusú növényekben és ugyanezen gének gátolt vagy csökkent kifejeződését a mutásokban 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, végül online fehérje-fehérje kölcsönhatás adatbázis és újabb T-DNS mutások segítségével vizsgáltuk az *Arabidopsis* NADPH-oxidáz és sejtfal peroxidáz fehérjék lehetséges kölcsönható partnereit.

Kutatási módszerek főbb jellemzőinek rövid bemutatása: Az *A. brassicicola* által előidézett sejthalál mértékét egyrészt makroszkópikus vizsgálatban tripánkék festéssel és a levéllemezek fotózását követő képelemző módszerrel végeztem Adobe Photoshop hisztogram alkalmazásának pixelszámláló funkciójával. Az elhalt sejtek mikroszkópikus mintázatát tripánkék és Evans-kék festést követően vizsgáltam fénymikroszkóppal. Az *A. brassicicola* gomba növekedését Zeiss Axioskop fénymikroszkóppal követtem nyomon, biomassza képzését a DNS fertőzött levélmintákból való kivonását követően (Bahnweg és mtsai 1998, Brouwer és mtsai 2003) az *A. brassicicola* riboszómális ITS régiójára tervezett primerpár segítségével, valós idejű PCR (qPCR) módszerrel vizsgáltuk (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR és Bio-Rad CFX96 Real Time PCR rendszerekben). A mintáinkban található templát DNS mennyiségének növekedését ABgene SYBR Green Low Rox Mix és Bioline SensiFAST SYBR No-ROX Kit valós idejű PCR reagensekkel vizsgáltuk. A levelekben felhalmozódó ROS mennyiségét többféle módszerrel követtük nyomon: mikroszkópos kimutatáshoz diklór-dihidrofluorescein-diacetátot (H₂DCFDA) és diaminobenzidint (DAB) használtunk, teljes levelek ROS tartalmának vizsgálatához pedig diklór-fluorescein-diacetát festést (DCFH-DA) alkalmaztunk (Bozsó és mtsai 2005) és ProteinSimple AlphaImager Mini géldokumentációs rendszerben UV fényel történő megvilágítás mellett átlagos pixel fluoreszcencia intenzitást számítottunk AlphaView program segítségével. Génexpressziós vizsgálatainkhoz a mintákban található RNS-t Invitrogen TRIzol reagenssel és Viogene Total RNA Extraction Miniprep Kit segítségével vontuk ki és tisztítottuk. A reverz transzkripciót Invitrogen SuperScript II RNase H⁻ reverz transzkriptáz és Thermo Scientific First Strand cDNA Synthesis

Kit segítségével végeztük. Valós idejű PCR-rel történő amplifikáció során a már korábban említett ABgene és Biorun Sybr Green termékeket használtuk. NADPH-oxidáz mutáns növényeink gombafertőzésre adott transzkripciós mintázat változását egy kb. 2500 Arabidopsis cDNS klónt tartalmazó, saját laboratóriumunkban nyomtatott microarray lemezzel vizsgáltuk (von Rad és mtsai 2005, Raacke és mtsai 2006). A lemezeket Axon GenePix 4000A szkennelvel olvastuk be, az eltérően kifejeződő géneket GenePix Pro 6.0, Acuity 4.0 és Rank Products számítógépes programcsomagokkal azonosítottuk. A levélminták szalicilsav és etilén termelését nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal és gázkromatográffal vizsgáltuk (Meuwly és Métraux 1993, Pogány és mtsai 2004). Szalicilsav és etilén *Arabidopsis* NADPH-oxidázok működésére gyakorolt hatását a szalicilsav analóg acibenzolar-S-metil (Bion 50 WG) és az etilén bioszintézis inhibitor amino-etoxi-vinil-glicin (AVG) oldatainak növényekre való permetezésével vizsgáltuk. Az RBOHD NADPH-oxidáz fehérje lehetséges kölcsönható partnereit a STRING adatbázis segítségével prediktáltuk (Geisler-Lee és mtsai 2007, Jones és mtsai 2014).

3.2. Anyagok és módszerek a hidegedzéssel, az oxidatív stresszel és a *Pyrenophora teres* kórokozóval szembeni kereszttolerancia viszonyok vizsgálatában

(Részletes módszer leírás: Pogány és mtsai (2016) Open Life Sciences 11, 78-85)

Növények: Többféle kalászos gabona fajtát használtunk ebben a munkánkban. A hidegedzés és az oxidatív stressz kapcsolatát Emese fajtájú őszi búza és Hardy őszi árpa növényekkel végeztük. A kórtani vizsgálatokat *P. teres* iránt kevésbé fogékony Hardy őszi árpával és a kórokozó iránt fogékony Himalaya tavaszi árpa növényekkel végeztük. A növények hidegedzése az alábbiak szerint történt: tőzeg alapú termesztő közegbe vetettük el a magokat, melyek kicsíráztak és 4 napig 20 °C-on fejlődtek. Ezt követően a növényeket 4 hétig 5 °C-ra hűtött növénynevelő kamrában inkubáltuk, végül a további kezelések megkezdése előtt 2 órán át ismét 20 °C-on tartottuk őket. A kontroll (nem hidegedzett) növények 7 napon keresztül fejlődtek 20 °C-os növénynevelő kamrában.

Kórokozó: A kórtani vizsgálatokhoz használt *Pyrenophora teres* f. *teres* Martonvásáron gyűjtött izolátum (Ficsor és mtsai 2014), melyet burgonya-dextróz folyékony táptalajban 4 napig

rázatva tenyésztettük a fertőzési kísérlethez. A képződött gomba biomasszát szűrést és mosást követően 0,2 g gombaképlet/ml csapvíz koncentrációban ecsettel juttatunk ki az árpanövények elsődleges leveleire. Az inokulált növényeket klímakarában tartottuk, az első 24 órában közel 100 % relatív páratartalmú közegben. A Himalaya fajta tüneteit 5 nappal a fertőzés után értékeltük, a Hardy fajtán megfigyelhető tüneteket pedig 7 nappal az inokuláció után.

Kísérleti rendszer: Hidegedzett és edzetlen kalászos gabona növények oxidatív stresszel (metil-viologén, hidrogén-peroxid) szembeni ellenállóságát vezetőképesség-mérési vizsgálatokkal elemeztük. Összehasonlítottuk a növények ellenálló képességét a nekrotróf *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.

Kutatási módszerek: Hidegedzett és edzetlen búza és árpa növények leveleit 1 cm hosszú darabokra vágtuk, majd 10 μ M metil-viologén és 100 mM hidrogén-peroxid oldatban áztattuk a levéldarabokat 48 órán keresztül. Ezután konduktométerrel megmértük a folyadékok vezetőképességét, ami tükrözi azt, hogy a két oxidatív stresszt okozó kezelés milyen mértékben károsítja a növényi sejteket határoló membránokat. A *P. teres f. teres* gomba biomassza képzését félkvantitatív PCR módszerrel, *P. teres* glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz szekvenciára specifikus primerpár segítségével vizsgáltuk. DNS kivonáshoz Viogene Plant Genomic DNA Mini kit-et használtunk, a mintákban lévő DNS amplifikálása KAPA Taq PCR reagenssel valósult meg, a PCR termékek kimutatása 1 %-os agaróz gélben, AlphaImager EP géldokumentációs rendszerrel történt. A növények génexpressziós mintázatának változását egy laboratóriumunkban nyomtatott kb. 1500 árpa cDNS részszekvencia klónt (EST-t) tartalmazó microarray lemez segítségével vizsgáltuk.

3.3. Furmint szőlő aszúsodásának transzkriptom szintű vizsgálatához használt anyagok és módszerek

(Részletes módszer leírás: Pogány és mtsai (2022) Plants 11, 864)

Növények: Ennek a dolgozatnak a kísérleteit érett, ép és aszúsodott Furmint (*Vitis vinifera* cv. Furmint) fajtájú szőlőfürtökkel végeztük. A fürtök a Szepsy pincészet ültetvényéből, Mád-Betsek dűlőből származtak. A transzkriptom szintű vizsgálatához használt szőlőbogyókat két időpontban, 2016 október végén és november elején gyűjtöttük. Négyféle típusú bogyót gyűjtöttünk külön-külön műanyagcsövekbe: (érett) ép bogyókat, továbbá az aszúsodás (vagy nemesrothadás) három egymást követő fázisának megfelelő bogyókat (**23. ábra**). Mind a négyféle szőlőbogyóból 5-5 biológiai ismétlést gyűjtöttünk mindkét mintavételi időpontban. Tehát minden egyes kezelést (aszúsodási fázist) 10 független párhuzamos minta képviselt. A bogyókat a helyszínen folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, szárazjégben szállítottuk laboratóriumunkba, és további feldolgozásig -70 °C-os mélyhűtőben tároltuk őket.

Kórokozó: Ebben a vizsgálat sorozatban nem alkalmaztunk kórokozó gombákkal folytatott mesterséges laboratóriumi fertőzést. Az ültetvényben gyűjtött szőlőbogyókat a *Botrytis cinerea* (ivaros alakja: *Botryotinia fuckeliana*) Mád környéki természetes populációja fertőzte.

Kísérleti rendszer: Az ültetvényben 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 szekvenáltattuk 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 és az abszcizinsav tartalom változását.

Kutatási módszerek: A -70 °C-on tárolt bogyókat Retsch golyós malommal folyékony nitrogénben porrá őröltük és belőlük Reid és munkatársai (2006) módszerével RNS-t vontunk ki. A mintákból izolált RNS minőségét Agilent Eukaryotic Total RNS Nano és Pico Kit segítségével elemeztük Agilent BioAnalyzer készüléken. RNS szekvenáló könyvtárakat készítettünk Illumina TruSeq RNS mintaelőkészítő kit felhasználásával. A szekvenálás Illumina NextSeq500 készüléken történt 75 bázispár hosszúságú szakaszok egyirányú

leolvasásával, mintánként 18-20 millió leolvasás detektálási mélységgel. A szekvenálás minőségellenőrzése FastQC v 0.11.7 szoftverrel történt, majd STAR v2.5.4b program segítségével illesztettük a leolvasott szekvenciákat a szőlő (*Vitis vinifera* IGGP 12x) (Jaillon és mtsai 2007) referencia cDNS adatbázisra. Az elkészült BAM fájlokat StrandNGS programcsomag (Agilent Technologies) segítségével elemeztük tovább. Nyers expressziós adatokat nyertünk ki a BAM fájlokból, ezeket DESeq algoritmus alapján normalizáltuk. Végül az egyes aszúsodási fázisok között eltérően kifejeződő gének listáját Tukey post-hoc próbával és Benjamin-Hochberg hamis találati arány korrekcióval (FDR) kiegészített ANOVA teszttel állítottuk össze. A nyers RNS szekvenciaadatokat az ArrayExpress és a European Nucleotide Archive adatbázisokban tettük hozzáférhetővé (E-MTAB-11205, PRJEB48949). RNS szekvenálással nyert adatainkat valós idejű RT-PCR módszerrel validáltuk (**1. melléklet**). A doktori műben tárgyalt szőlőgének különböző fázisokban mért transzkriptumszint változásai megtekinthetők a **2. mellékletben**.

Az aszúsodás (nemesrothadás) egymást követő fázisaiban eltérő kifejeződést mutató transzkriptumok funkcióit KEGG, PFAM, GO és TAIR adatbázisok segítségével vizsgáltuk (Kalapos és mtsai 2021). Szőlőfehérjék közötti lehetséges kölcsönhatásokat STRING v11 adatbázisban azonosítottunk.

A szőlőbogyó minták abszcizinsav, fazeinsav és dihidrofazeinsav tartalmát UPLC MS/MS módszerrel vizsgáltuk (**1. melléklet**) (Vrhovsek és mtsai 2012, Pál és mtsai 2019), a minták antioxidáns kapacitását Sigma-Aldrich Antioxidáns Assay Kit segítségével elemeztük, amivel Trolox egyenértékben kaptuk meg az össz antioxidáns értékeket.

3.4. Szürke- és nemesrothadás illatanyag vizsgálatához használt anyagok és módszerek

(Részletes módszer leírás: Dankó és mtsai (2021) *Physiological and Molecular Plant Pathology* 114, 101626)

Növények: Ez a kísérlet is Furmint szőlőfürtök felhasználásával valósult meg, melyeket az előző munkával azonos helyen gyűjtöttünk 2018 szeptember közepén. Ehhez a munkához csak ép bogyókat tartalmazó fürtöket gyűjtöttünk, hatvan darab fürtöt használtunk a vizsgálat során. A tőkéről való eltávolítást követően a fürtöket laboratóriumunkba szállítottuk.

Kórokozó: A *Botrytis cinerea* B05.10 referencia izolátumával permetezzük a leszüretelt Furmint fürtöket 10^5 konídium/ml koncentrációjú *Botrytis* inokulációs tápfolyadékban kijuttatva.

Kutatási módszerek: Az inokulált fürtöket 24 órán keresztül zárt, közel 100 % relatív páratartalmú műanyag dobozokban tartottuk. Ezután a fürtök felét 3 hétig őszi, Tokaj-hegyaljai időjárás modellező hőmérséklet és páratartalom viszonyokra állított növénynevelő kamrában inkubáltuk, nyitott, jól szellőző műanyag tálcákon. Az alkalmazott klímaprogram fő jellemzői a következők voltak: a fürtök 12 óra megvilágításban részesültek, nappal 20 °C hőmérséklet és 60 % relatív páratartalom értékeket állítottunk be, éjszaka 10 °C-ról 5 °C-ig csökkenő hőmérsékletet és 96 % relatív páratartalom értéket használtunk. Ezzel a klímaprogrammal kezelve idéztük elő a kamrákba helyezett fürtök nemesrothadását (31. ábra). A fürtök másik felét szürkerothadást okozó kezelésnek vetettük alá. Ezeket ugyanabban a növénynevelő kamrában helyeztük el, mint a nemesrothadásban részesülő fürtöket, de nem vettük ki őket a zárt műanyag dobozból, hanem a kísérlet teljes időtartama alatt közel 100 %-os relatív páratartalmú közegben voltak (31. ábra). 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. Szőlőbogyókból DNS-t vontunk ki az RNS izoláláshoz használt extrakciós módszer (Reid és mtsai 2006) optimalizálásával. A mintákban található *Botrytis* DNS relatív mennyiségét Bioline SensiFAST SYBR No-ROX mix real-time reagens segítségével Bio-Rad CFX96 valós idejű PCR készülékben, a *B. cinerea* RNS polimeráz II második nagy alegységét kódoló gén (*RBP2*) nukleotidsorrendjére specifikus primerpárral elemeztük. A szürke- és nemesrothadt fürtök által kibocsátott illatanyagokat poliészter sűrűzacskókban, dinamikus mintavétellel gyűjtöttük (Vuts és munkatársai 2018). Analitikai vizsgálatuk gázkromatográfhoz kapcsolt tömegspektrométerrel történt (HP Agilent 5890 GC és 5975 MS), Molnár és munkatársai (2017) módszere szerint.

3.5. A *C. nicotianae*-*N. benthamiana* kölcsönhatás jellemzése során használt módszerek

(Részletes módszer leírás: Fodor és mtsai (2018) Description of the *Nicotiana benthamiana*-*Cercospora nicotianae* pathosystem. *Phytopathology* 108, 149-155; Tóth és mtsai. (2015) Egy

molekuláris növénykórtani vizsgálatok céljára javasolható növény–gomba kölcsönhatás. Növényvédelem 51, 309-316)

Növények: *Nicotiana benthamiana* és *Nicotiana tabacum* 'Xanthi-nc' növényeket neveltünk üvegházban, tőzegalapú termesztőközegben, a nappalok hosszúságát 16 órára kiegészítő megvilágítás mellett. Azonos levélemelet számú növények fertőzésére törekedtünk, ezért a *N. benthamiana* növényeket 9 hetes korban vontuk be a kísérletekbe, a *N. tabacum* növényeket pedig 12 hetes korban (a *N. tabacum* lassabban fejlődik). A kísérletsorozatban *N. benthamiana* zöld fluoreszcenz fehérjét (GFP) termelő transzgenikus genotípusával dolgoztunk.

Kórokozó: A *Cercospora nicotianae* ATCC 18366 izolátumát használtuk ebben a munkában. A kórokozó fenntartása burgonya-dextróz táptalajon történt, fertőzéshez viszont V8 táptalajon tenyésztettük a gombát (Beckman és Payne 1983). V8 táptalajon növekedett tenyészetekből 0,2 %-os zselatin oldattal konídium szuszpenziót készítettünk, ami milliliterenként 5×10^4 konídiumot tartalmazott. Ezt permeteztük a kísérletekben használt dohány növényekre. Inokuláció után a növényekre átlátszó vékony műanyag zacskót húztunk és kevés csapvizet tartalmazó műanyag tálcákba helyeztük őket. Ezután 4 napig 27 °C-os növénynevelő kamrában tartottuk a bezacskózott növényeket (alattuk a bőséges nedvességet biztosító vizestálcákkal) 16 óra megvilágítás mellett. Négy nap után eltávolítottuk a műanyag zacskókat és a növényeket visszahelyeztük üvegházba, ekkor *N. benthamiana* alsó levelein már megfigyelhetőek voltak a kórokozó gomba által okozott korai nekrotikus tünetek.

Kísérleti rendszer: Ennek a vizsgálatorozatnak 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 gombakórokozóval, 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 fluoreszcenz mikroszkóp segítségével

kimutattuk a gomba által termelt gazdanövényre nem specifikus cercosporin toxinhoz köthető szingulett oxigén termelést *N. benthamiana* növényeken.

Kutatási módszerek: A *C. nicotianae* gomba dohánynövényeken tapasztalható növekedését Nucleon Phytopure DNS kivonó kit, majd KAPA SYBR Fast qPCR Kit felhasználásával, Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR rendszerben határoztuk meg. *C. nicotianae* aktin gén (GenBank JX143144.1) egy szakaszát amplifikáltuk a gén nukleotidsorrendjének ismeretében tervezett primerpár segítségével.

Az etilén és jázmonsav jelátvitel módosítását *N. benthamiana* növényekben dohány rattle vírus (TRV) alapú vírus-indukált géncsendesítő (VIGS) rendszer adaptálásával értük el. A TRV egy kétkomponensű genomból álló növényi vírus, melynek első RNS komponense kódolja a vírus replikáz és mozgási fehérjét, második komponense pedig a köpenyfehérjét. TRV-alapú VIGS rendszerben a második RNS-t kódoló cDNS molekulán található egy többszörös klónozó hely, ahová növényi eredetű DNS szakaszokat lehet beilleszteni (Hayward és mtsai 2011). A TRV rendszert az Arabidopsis Biological Resource Center katalógusából rendeltük pCAMBIA 3301 *Agrobacterium* plazmidban. A pTRV2 vektorba először egy GFP csendesítő szekvenciát építettünk be *EcoRI* restrikciós endonukleázzal, pGEM-TEasy köztesvektor segítségével. Ezt követően a jázmonsav jelátvitel egyik kulcsfehérjéjét a Coronatine Insensitive 1 (COI1) fehérjét kódoló *N. benthamiana* gén VIGS-szel történő csendesítését és hasonlóképpen az etilén jelátvitelben meghatározó Ethylene Insensitive 2 (EIN2) fehérje csendesítését idéztük elő. Ehhez Shibata és munkatársai (2010) által közölt primer szekvenciákat módosítottuk úgy, hogy *BamHI* és *NcoI* hasítóhelyeket illesztettünk rájuk. A primerekkel *N. benthamiana* cDNS-ből felszorzozott csendesítő szekvenciák *COI1* és *EIN2* specificitását, valamint a céltévesztő (off-target) csendesítések elkerülését a Sol Genomics Network *Nicotiana benthamiana* v1.0.1. adatbázisának segítségével ellenőriztük. A csendesítő szekvenciákat ezután *BamHI* és *NcoI* restrikciós enzimekkel beillesztettük TRV2-GFP vektorba, majd ezeket hősokk módszerrel *Escherichia coli* DH5 α sejtekbe juttatuk. Az *E. coli* sejtekben felszorzozódott VIGS plazmidokat Macherey-Nagel NucleoSpin Plasmid kit segítségével tisztítottuk és elektroporációval *Agrobacterium tumefaciens* MOG301 sejtekbe juttatuk. A pTRV1, pTRV2 és P14 (ez utóbbi növényi géncsendesítést szuppresszálo szekvenciát hordoz) tartalmazó három *A. tumefaciens* törzset felszaporítottuk, majd összekeverve őket GFP fehérjét kifejező transzgenikus *N. benthamiana* növények két alsó levelébe injektáltuk (Mérari és mtsai 2005). A

gécnsendesítés hatékonyságát UV fényvel való megvilágítással és real time RT-PCR vizsgálatokkal ellenőriztük. Ezeket a növényeket használtuk később a *C. nicotianae* fogékonysági vizsgálatokhoz.

A *C. nicotianae* szingulett oxigén termelését Molecular Probes Singlet Oxygen Sensor Green fluorofór segítségével vizsgáltuk Olympus BX51 típusú fluoreszcensz mikroszkóppal.

4. Eredmények

Az értekezés keretében ismertetett eredményeimet a kiválasztott öt téma esetében hasonló módon mutatom be. Először tárgyalom a nemzetközi szakirodalom segítségével azokat a témával kapcsolatos előzetes ismereteinket, amik a kutatásaim kezdetekor már birtokunkban voltak. Ez egyrészt segít az eredmények összefüggéseinek megértésében, másrészt magyarázatot nyújt arra, hogy milyen tudományos kérdések megválaszolásának a vágya vezérelte az elvégzett munkát. Következő lépésben bemutatom az elvégzett kísérletek kézzelfogható eredményeit. Végül az eredmények alapján következtetéseket levonva igyekszem választ adni arra, hogy az előzetesen feltett kérdésekre milyen válaszokat kaptunk a kísérletek eredményeinek köszönhetően. Az első két téma esetében, melyek már jelentős hatást gyakoroltak a hozzájuk köthető tudományterületekre, azt is bemutatom, hogy a témákból született közlemények milyen hatást váltottak ki a nemzetközi és hazai szakirodalomban. A harmadik téma esetében, melyben Furmint szőlő aszúsodásának transzkriptom szintű vizsgálatához kapcsolódó eredményeket ismertetek, összevonva tárgyalom az eredmények részletes bemutatását és az azokból levonható következtetéseket. Erre az alkalmazott fő kutatási módszer (teljes transzkriptom szekvenálás) óriási adatmennyiséget szolgáltató természete miatt van szükség.

4.1. Extracelluláris oxidatív robbanás szerepe nekrotróf gombakórokozó fertőzése során.

Az általános irodalmi áttekintésben hangsúlyoztam azt, hogy 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 2012a). 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, transzkripció változások előidézése, fehérjeműködés szabályozása poszttranszlációs redox változásokkal illetve direkt antimikrobiális hatás (Lamb és Dixon 1997, Pogány és mtsai 2006, Lehmann és mtsai 2015). Érdeemes megjegyezni, hogy a növényi sejtek oxidatív robbanása összekapcsolódik a sejtek calcium ion (Ca^{2+}) mennyiségének a változásával és a két folyamat egymást kölcsönösen szabályozza (Wrzaczek és mtsai 2013, Gilroy és mtsai 2014).

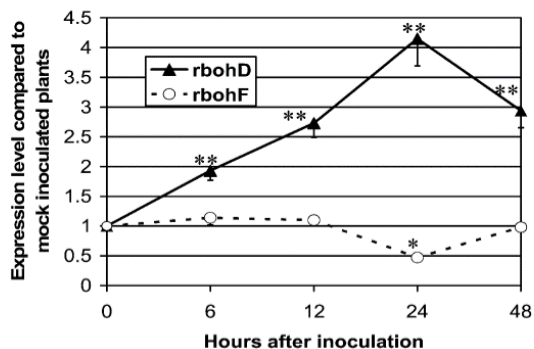
Az oxidatív robbanás során képződő ROS legfontosabb képviselői a gyöktermészetű szuperoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroxil szabadgyök ($\cdot\text{OH}$) és nitrogén-monoxid ($\cdot\text{NO}$), melyek külső elektronhéjukon párosítatlan elektront tartalmaznak, valamint a nem-gyöktermészetű hidrogén-peroxid (H_2O_2) és szingulett oxigén ($^1\text{O}_2$). A növényi sejtekben több enzimszisztéma vonatkozásában is igazolták azt, hogy külön-külön hozzájárulnak a sejt közötti járatok ROS felhalmozódásához. Ide tartoznak a sejtmembránba beágyazott NADPH-oxidáz fehérjék, az apoplastban lokalizált III. osztályú peroxidázok (sejt fal peroxidázok), amin- és poliamin oxidázok, oxalát oxidázok és kinon-reduktázok (Kärkonen és Kuchitsu 2015). Ennek a kutatásnak a központi kérdése az volt, hogy a NADPH-oxidázok, sejt fal peroxidázok és poliamin-oxidázok 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, mert ehhez a fajhoz kapcsolódóan álltak rendelkezésre azok a genetikai források és géntechnológiai eljárások, melyek segítségével egyes növényi gének (és az általuk kódolt fehérjék) funkcióját vizsgálhattuk nagy pontossággal. Saját munkánk két alapvető és több kisebb területen jelentett újdonságot a korábbiakhoz képest. Egyrészt a korábbi vizsgálatok nagy többsége az *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* modell kölcsönhatásra koncentrált, tehát kevés adat állt rendelkezésre növénykórokozó gombák által kiváltott oxidatív robbanás vonatkozásában (Torres és mtsai 2002, Torres és mtsai 2005). A másik hiánypótló elemet az jelentette munkánkban, hogy ugyanabban a növény-kórokozó rendszerben figyeltük meg egyszerre a NADPH-oxidázok, a sejt fal peroxidázok és a poliamin-oxidázok működését. Mások a saját kísérleti rendszereikben vagy csak az egyik, a másik, vagy a harmadik enzimszisztémával dolgoztak (Bindschedler és

mtsai 2006, Yoda és mtsai 2009, O'Brien és mtsai 2012b). Eredményeink ezért pontosabb és árnyaltabb képet nyújtanak az extracelluláris oxidatív robbanás növényi immunfolyamatokban megfigyelhető jelenségéről. További újdonságokat jelentett munkánk abból a szempontból is, hogy több új molekuláris faktor és kölcsönható partner szerepét összefüggésbe hoztuk az extracelluláris oxidatív robbanás folyamatával, valamint szemléletes mikroszkópos fotókkal mutattuk be a ROS különböző forrásainak közvetlen hatását az *Arabidopsis* levelében található sejtek oxidatív robbanására.

Ennek a kísérletsorozatnak a vizsgálatai a káposztafélék alternáriás betegségét előidéző, gazdasági szempontból jelentős *Alternaria brassicicola* toxintermelő, nekrotróf gombakórokozóval történtek (Thomma 2003, Lawrence és mtsai 2008). Az *Arabidopsis-A. brassicicola* növény-kórokozó kölcsönhatást gyakran használják növényi rezisztencia- és kórokozó gomba virulencia mechanizmusok vizsgálatára (Schenk és mtsai 2003, Su'udi és mtsai 2011). A kórokozóval szemben nem ismerünk hatékonyan működő növényi R fehérjéket (Glazebrook 2005). Az *A. brassicicola* MUCL20297 törzsének és az *A. thaliana* Col-0 ökotípusának a kölcsönhatását a szakirodalom inkompatibilis kapcsolatként tartja számon (Narusaka és mtsai 2005, Thomma és mtsai 1998). Saját fertőzéses kísérleteinket azonban olyan vizsgálati körülmények között végeztük (közel 100 % relatív páratartalom, magas konídium koncentrációjú inokulum), ami a kórokozó számára egyoldalúan kedvezett, és jelentős micélium növekedést, valamint konídiumképzést tett lehetővé az inokulált növényeken.

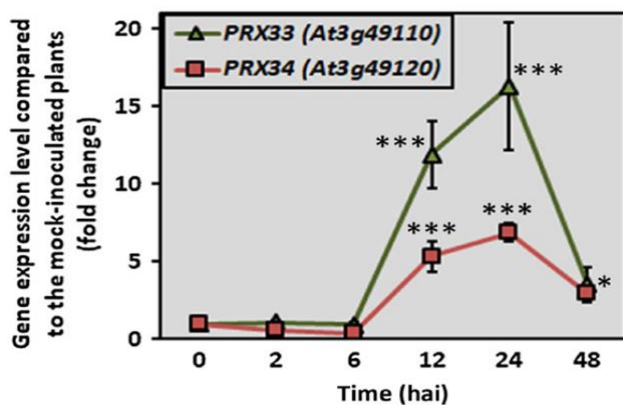
4.1.1. ROS-termelő enzimrendszerek transzkripciója

A növénykórokozó mikrobákkal kapcsolatba kerülő növények sejtközötti járataiban az extracelluláris ROS legfontosabb forrásaiként a NADPH-oxidázokat, a sejtfal peroxidázokat és a poliamin-oxidázokat jelölik meg. Az *Arabidopsis-Alternaria* kölcsönhatás vizsgálatának első lépéseiben ezeket a fehérjéket kódoló gének kifejeződését tártuk fel valós idejű RT (reverz-transzkripció) PCR módszerrel. NADPH-oxidázok esetében a két legmagasabb szinten átíródó izoforma vizsgálata arra világított rá, hogy *Alternaria* fertőzés során az *RbohD* NADPH-oxidáz izoforma transzkripciója markánsan megemelkedik, az *RbohF* izoforma mRNS expressziója viszont nem nő meg (1. ábra).



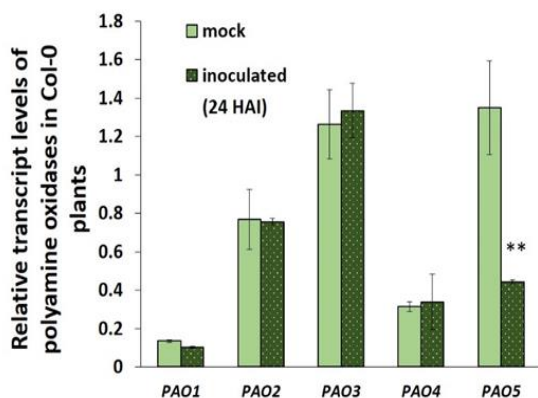
1. *ábra*: *Arabidopsis* *RbohD* és *RbohF* gének transzkriptum szintjeinek változása *A. brassicicola*-val történő fertőzés után vad típusú növényekben. A vizsgálatot valós idejű RT-PCR módszerrel végeztem. Az adatpontok 3 biológiai ismétlés átlagát és a standard hibát jelölik. Csillaggal jelöltem a vízzel kezelt kontroll eredményétől statisztikailag eltérő adatpontokat (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$).

Az *Arabidopsis* sejtfa peroxidázok közül a *PRX33* és *PRX34* izoformák génkifejeződését vizsgáltuk, itt mindkét izoforma transzkripciója nagymértékben fokozódott a gombával való inokulációt követően (2. *ábra*).



2. *ábra*: *Arabidopsis* *PRX33* és *PRX34* sejtfa peroxidáz gének transzkriptum szintjeinek változása *A. brassicicola*-val történő fertőzés után vad típusú növényekben. Öt-hat hetes növények teljes tőlevélrözsáit permeteztük *A. brassicicola* 5×10^5 konídium/ml koncentrációjú szuszpenziójával. A vizsgálatot valós idejű RT-PCR módszerrel végeztük. Az adatpontok 3 biológiai ismétlés átlagát és a standard hibát jelölik (minden biológiai ismétlés mintáját 3 technikai ismétlésben amplifikáltuk). Csillaggal jelöltük a vízzel kezelt kontroll eredményétől statisztikailag eltérő adatpontokat (* $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$).

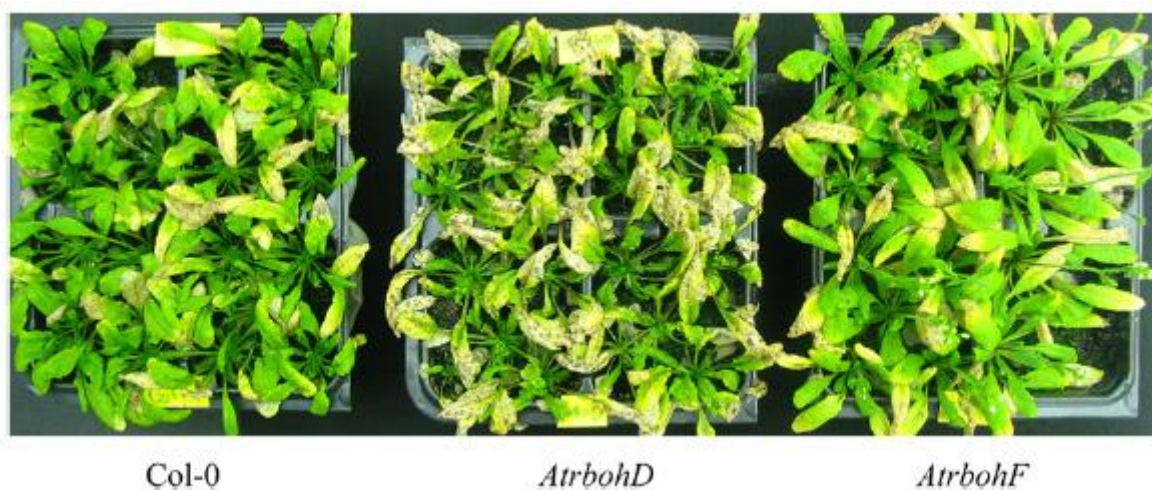
Poliamin-oxidázok (*PAO*) génexpressziójának mérése öt izoforma valós idejű RT-PCR elemzését ölelte fel. Huszonnégy órával az *Alternaria* fertőzés után a vizsgált *PAO* izoformák egyike sem mutatott magasabb transzkripció aktivitást, mint ami a fertőzetlen növényekben tapasztalható volt (3. *ábra*).



3. *ábra*: Öt különböző poliamin-oxidáz (*PAO*) izoformát kódoló gén transzkripciója *A. brassicicola*-val történő fertőzés után vad típusú (*Col-0*) növényekben. Öt-hat hetes növények teljes tőlevélrözsáit permeteztük *A. brassicicola* 5×10^5 konídium/ml koncentrációjú szuszpenziójával. A fertőzött növényeket 24 órával az inokuláció után vizsgáltuk, kontrollként desztillált vízzel permetezett növényeket használtunk. Az 5 *PAO* izoforma kifejeződése nem emelkedik meg a gombafertőzés után. Az adatpontok 3 biológiai ismétlés átlagát és a standard hibát jelölik (minden biológiai ismétlés mintáját 3 technikai ismétlésben amplifikáltuk). Csillagokkal jelöltük a vízzel kezelt kontroll eredményétől statisztikailag eltérő adatpontot (** $P \leq 0,01$).

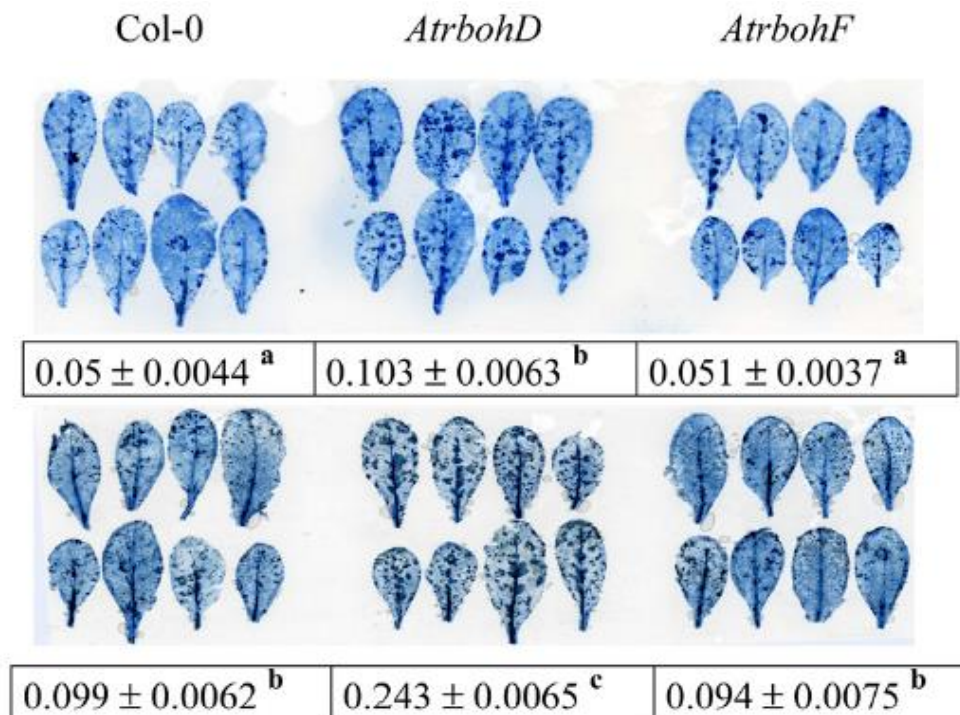
4.1.2. ROS termelő enzimrendszerek kiütésének vagy csendesítésének hatása az *Arabidopsis-Alternaria* kölcsönhatás tüneteire és a ROS felhalmozódására

Génexpressziós kísérleteink adataira támaszkodva a továbbiakban olyan *Arabidopsis* biológiai anyagok összegyűjtésére és előállítására törekedtünk, melyekben az extracelluláris ROS termeléséért felelős fehérjéket kódoló gének működése gátolt vagy részben gátolt. Azoknak a géneknek a növény-gomba kölcsönhatásra gyakorolt funkcióját tanulmányoztuk tovább, melyeknek a transzkripció aktivitása fokozódik az *A. brassicicola* gomba jelenlétében. Az *rbohD* NADPH-oxidáz működésében gátolt T-DNS inszerciós mutáns *Arabidopsis* genotípus a vad típusú növényekhez képest sokkal erősebb nekrotikus tüneteket mutatott *A. brassicicola* fertőzést követően, míg az *rbohF* T-DNS mutáns a vad típusú növényekkel egyező fenotípust adott a gomba fertőzésére (4. ábra). Ez a megfigyelés (a két gén transzkripció működésével összhangban) azt sugallta, hogy az *RbohD* izoformának lényeges szerepe van a növény-mikroba kölcsönhatásban, az *RbohF* izoformának pedig feltehetően nincs.



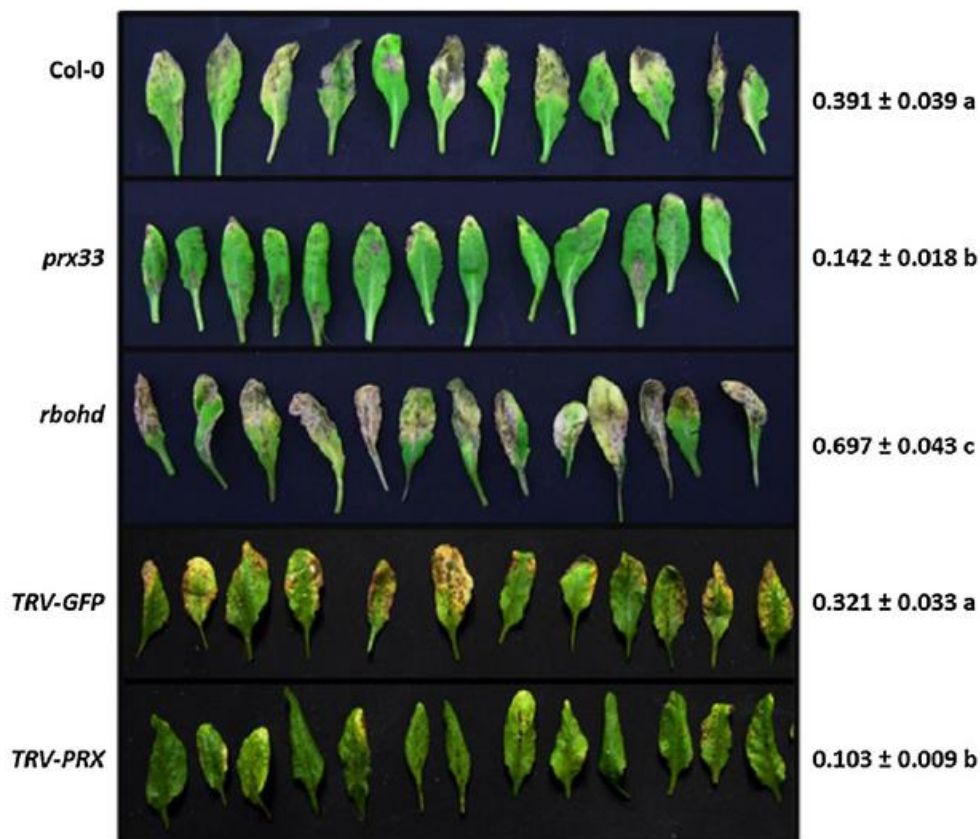
4. ábra: *A. brassicicola* CBS 125088 izolátum által okozott nekrotikus tünetek erősebbek az *rbohD* mutáns *Arabidopsis* genotípuson. A fotó 12 nappal az inokuláció után készült. Több mint 10 alkalommal megismételtük a kísérletet és a tüneti eltérés minden esetben jelentkezett.

Tripánkék festéssel láthatóvá tettük a gombafertőzött levéllemezek elhalt részeit a két NADPH-oxidáz mutáns esetében, ami a látható tünetekkel összhangban azt igazolta, hogy az *rbohD* mutáns leveleiben erősebb az *A. brassicicola* gomba által előidézett sejthalál, mint a vad típusú növényekben, vagy az *rbohF* mutáns egyedeiben (5. ábra).



5. *ábra*: Elhalt sejtek vad típusú (Col-0) és *rboh* mutáns *Arabidopsis* növények leveleiben *A. brassicicola*-val való inokuláció után 3 és 9 nappal. Az *rbohD* mutáns esetében a sejtelhalás terjedése sokkal hangsúlyosabb. A leveleket tripánkéssel festettem. Minden genotípus esetében 15 levélen számszerűsítettem az elhalt levélfelület arányát Adobe Photoshop program segítségével (a teljes levélfelület értéke 1). A vizsgálatot 3 független kísérletben ismételt meg. Tukey post-hoc próbával igazolt statisztikai különbséget eltérő betűkkel jelöltem ($P \leq 0,01$).

A PRX33 és PRX34 sejtfa peroxidázok *Arabidopsis*-*A. brassicicola* kölcsönhatás tüneteinek megnyilvánulásában megfigyelhető következményeit egy PRX33 T-DNS mutáns (*prx33*) és egy PRX33-PRX34 működését párhuzamosan gátló VIGS géncsendesítő konstrukció (*TRV-PRX*) segítségével vizsgáltuk. Ebben a kísérletben azt láttuk, hogy az *rbohD* mutánssal szemben (amelyben a kórokozó gomba által kiváltott nekrotikus tünetek erősebbek voltak), a PRX33/PRX34 gének transzkripciós aktivitásának csökkentése az *A. brassicicola* gomba nekrotikus tüneteit gátolja (6. ábra). Megjegyzem, hogy ebben a kísérletben egy virulensebb *A. brassicicola* izolátummal dolgoztunk (MUCL 20297) mint az első RBOHD kísérletben (CBS125088), ezért a tünetek ez utóbbi kísérletben minden genotípus esetében egyöntetűen erősebbek voltak.

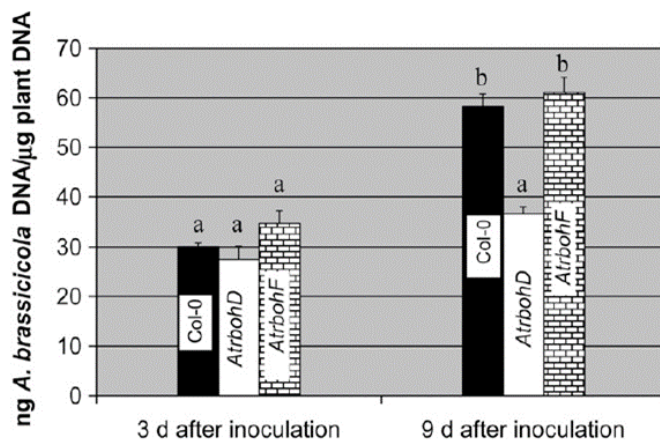


6. ábra: Az *Alternaria brassicicola* (MUCL20297 izolátum) fertőzés nekrotikus tünetei gyengébbek azokban az *Arabidopsis* növényekben, melyekben alacsonyabb a *PRX33/PRX34* sejtfa peroxidázok transzkriptum szintje. Vad típusú (Col-0), *prx33* alultermelő mutáns, *rbohD* knock-out mutáns (referenciaként szerepelt a kísérletben), GFP-csendesített kontroll növények (TRV-GFP) és *PRX33-PRX34* csendesített alultermelő növények tünetei láthatóak 10 nappal az inokuláció után. Öt-hat hetes növények teljes tőlevélrózsáit permeteztük *A. brassicicola* 5×10^5 konídium/ml koncentrációjú szuszpenziójával (desztillált vízben kijuttatva). Középső (5.-8.) levélemelethez tartozó leveleket vizsgáltunk. Hányadost képeztünk, amit a levelek klorotikus és nekrotikus tüneteket mutató területének és a teljes levélfelületnek az arányából számítottunk ki ImageJ programcsomaggal (a teljes levélfelület értéke 1). Két kísérlet átlagának adatait összegeztük (genotípusonként 30-30 levél alapján). Tukey post-hoc próbával igazolt statisztikai különbségeket eltérő betűkkel jelöltük. Az *rbohD* mutáns és a rajta tapasztalható erősebb tünetek referenciaként szerepeltek a kísérletben.

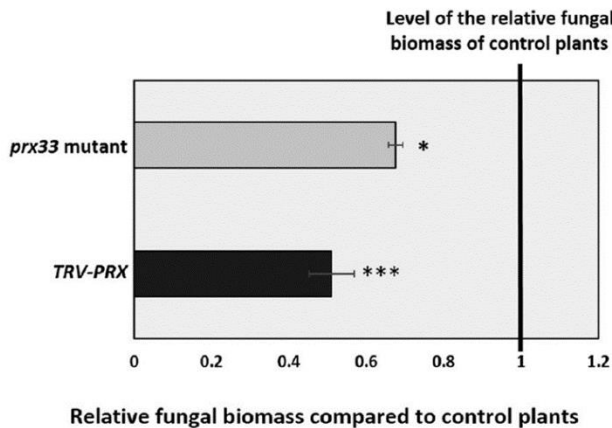
4.1.3. ROS termelő enzimrendszerek kiütésének vagy csendesítésének hatása az *A. brassicicola* gomba növekedésére

Tekintettel arra, hogy a növénykórokozó gombák által okozott tünetek és a gombák biomassza képzése (tehát a gazdanövényen való növekedésük mértéke) nincs mindig összhangban egymással, ezért fontosnak találtuk megállapítani, hogy az *Alternaria* biomassza képzése hogyan alakul a ROS-termelésükben gátolt *Arabidopsis* mintákban. Az *Alternaria* biomassza relatív mennyiségének megállapítása a fertőzött levélszövetek DNS kivonását követő qPCR elemzéssel történt. Ezekben az elemzésekben a gomba 5,8S riboszomális RNS-t kódoló gén ITS

szekenciájára tervezett primerpár segítségével hasonlítottuk össze az extracelluláris ROS termelésében korlátozott *Arabidopsis* mintáink és a vad típusú/üres géncsendesítő vektorral kezelt növények *Alternaria* biomassza értékeit. Kísérleteink eredményei itt egyöntetűen arra világítottak rá, hogy mind az *rbohD* NADPH-oxidáz mutáns, mind a *prx33/prx34* sejtfal peroxidáz hiányos *Arabidopsis* növényekben akadályozott a nekrotróf *A. brassicicola* gomba növekedése (kisebb a gomba által előállított biomassza), tehát vad típusú növényekben az *A. brassicicola* növekedését egyértelműen segítik a növény által termelt extracelluláris reaktív oxigén származékok (7. és 8. ábrák).

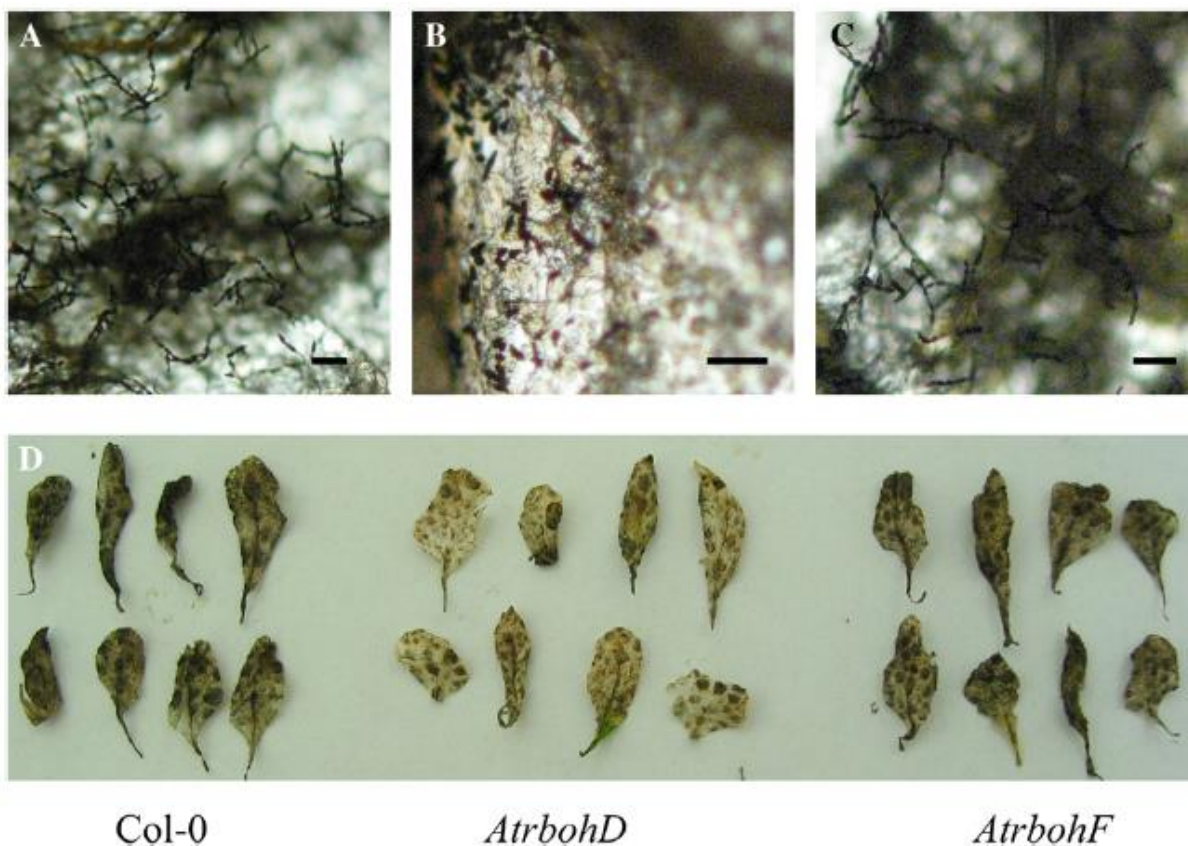


7. ábra: *A. brassicicola* biomassza változása vad típusú és *rboh* mutáns *Arabidopsis* növényekben 3 és 9 nappal a fertőzés után. Az ábra DNS kivantát követő qPCR vizsgálat eredményét mutatja, a gomba és a növényi DNS arányát szemlélítve. Tukey post-hoc próbával igazolt statisztikai különbségeket eltérő betűkkel jelöltem ($P \leq 0,01$).



8. ábra: *Alternaria brassicicola* biomassza vizsgálata *prx33* T-DNS mutáns és TRV-PRX csendesített alultermelő növényekben 10 nappal az inokuláció után. Csillagokkal jelöltük a PRX alultermelő növények statisztikailag igazolható csökkent gomba biomassza szintjeit a vad típusú, illetve üres vektor konstrukcióval kezelt növényekkel összehasonlítva. A statisztikai elemzés Student féle t-próbával történt (* $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$).

Az *rbohD* mutáns esetében makro- és mikroszkópikus fotókkal is dokumentáltuk az *Alternaria* gátolt növekedését (9. ábra)



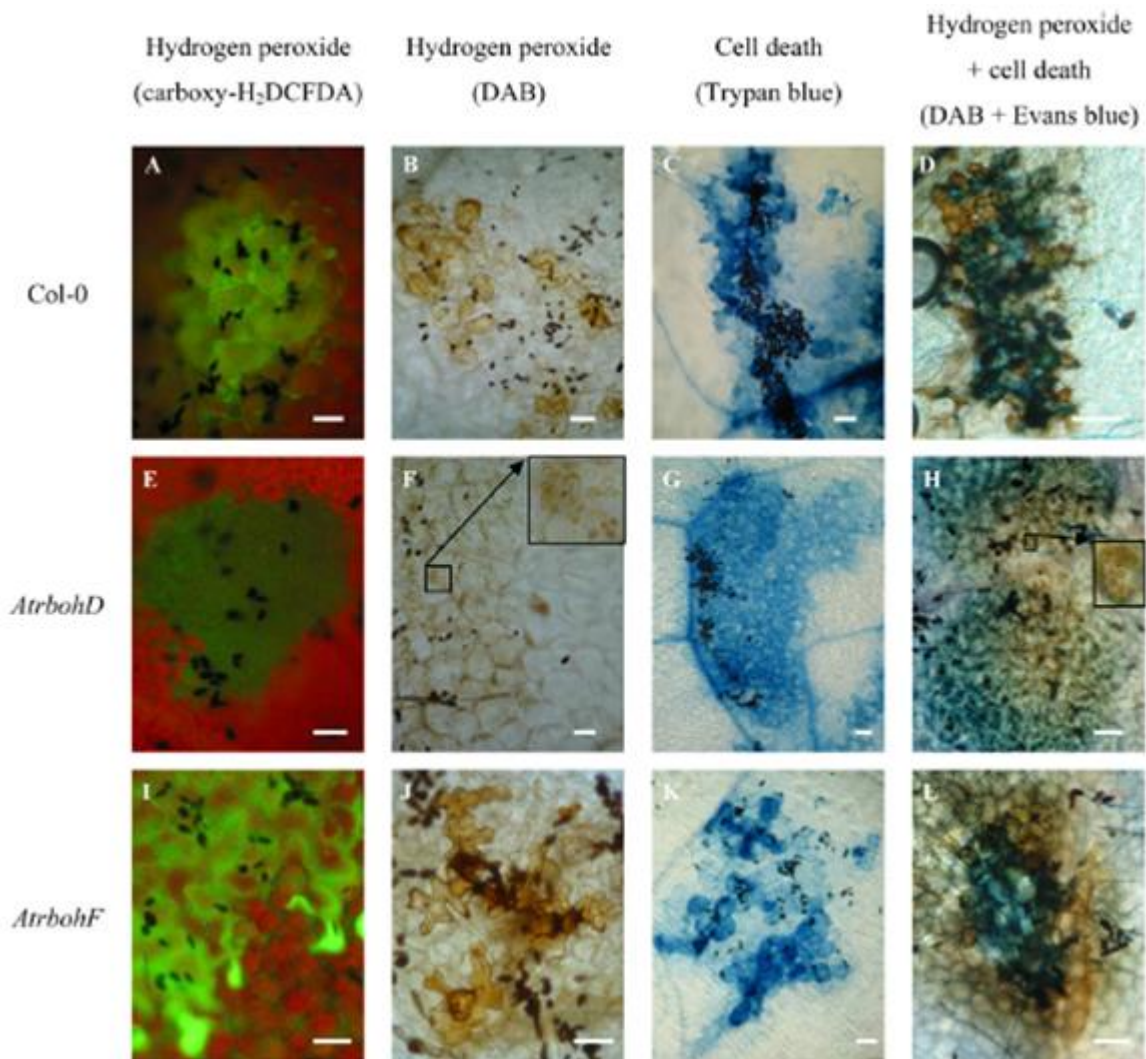
9. ábra: A-C, *A. brassicicola* konídiumképzése idősebb Col-0 (A), *rbohD* mutáns (B) és *rbohF* mutáns (C) *Arabidopsis* leveleken 12 nappal az inokuláció után. Az *rbohD* mutáns (B) nem figyelhető meg új konídiumok láncszerű képződése, a konídiumképzés gátolt. Mércse hossza = 100 μ m. D, Elpusztult öreg *Arabidopsis* levelek a fertőzés késői szakaszában (21 nappal az inokuláció után). Középen láthatóak az *rbohD* mutáns levelei, melyeken a sejtpusztulás eltérő makroszkópikus tünetekkel jár, és a gomba növekedése is gátolt a két szélén elhelyezkedő vad típusú (Col-0) és *rbohF* mutáns levelekhez képest.

4.1.4. Reaktív oxigén származékok (ROS) kimutatása a ROS termelésében sérült *Arabidopsis* mintákban

A növényi sejtek extracelluláris oxidatív robbanásának az *Arabidopsis-Alternaria* kölcsönhatásban játszott szerepét nehéz lenne tárgyilagosan megítélni anélkül, hogy megvizsgálnánk a ROS tényleges képződését a kölcsönhatás során. Korábbiakban már bemutatott kísérleti rendszereink ismeretében nyilvánvaló az is, hogy a ROS termelésében sérült *Arabidopsis* mintáink esetében szükségszerű volt annak megállapítása, hogy ezek a növényi minták ténylegesen kevesebb ROS-t halmoznak fel a kontroll növényekhez képest. A ROS kimutatására szolgáló elsődleges módszerünk a 3,3'-diaminobenzidin-nel (DAB) történő

szövetfestés és a sejtek fénymikroszkópos vizsgálata volt. A diaminobenzidin hidrogénperoxid (H_2O_2) kimutatására specifikus reagens. H_2O_2 -vel kémiai reakcióba lépve rozsdavörös polimert képez a szövetekben. Növénybiológiai kísérletekben NADPH-oxidázok és egyéb ROS-termelő anyagcsere-folyamatok vizsgálatára is használják (Sagi és mtsai 2004). Sejtmembránban lokalizált NADPH-oxidázok működése során (ilyen az RBOHD is) szuperoxid szabadgyökök képződnek, melyek a szuperoxid-dizmutáz enzim katalitikus működése nyomán H_2O_2 molekulákká alakulnak.

Az *rbohd* mutáns leveleinek epidermisz és mezofil sejtjei markánsan eltérő DAB-festődést mutattak, mint a vad típusú (Col-0) növények sejtjei (10.B és F ábrák). A vad típusú növények néhány sejtre kiterjedő intenzív H_2O_2 festődést mutattak a fertőző hifákat fejlesztő *A. brassicicola* konídiumok környezetében (10.B ábra). Ez a fajta néhány sejtre kiterjedő extracelluláris oxidatív robbanás az *rbohd* mutáns sejtjeiben teljesen elmaradt, helyette a kloroplasztiszok mutattak nagy sejtcsoportokra kiterjedő H_2O_2 felhalmozódást (10.F és H ábrák). A DAB festés eredményeit megerősítettük egy szintén H_2O_2 kimutatására alkalmas fluoreszcenz festési módszerrel is, ahol karboxi- H_2 DCFDA festéket és fluoreszcenz mikroszkópot használtunk (10.A és E ábrák). A H_2O_2 és a nekrotróf gomba által előidézett sejthalál kapcsolatának tisztázására a fertőzött levelek egy részét tripánkéék festésnek vetettük alá (10.C és G ábrák). Ez arra engedett következtetni, hogy míg a vad típusú növények fertőzött szövetrészein kisebb kiterjedésű a sejtek elhalása (10.C ábra), az *rbohd* mutáns szöveiteiben nagy kiterjedésű széthúzódó nekrozisok alakulnak ki, az RBOHD fehérje működésének hiányában tehát a növény nem képes a gomba által kiváltott sejthalál folyamatot a sejtek egy jól körülhatárolható, szűk csoportjára korlátozni (10.G ábra). Abban az esetben, amikor a H_2O_2 festést és az elhalt sejtek kimutatását kombináltuk egymással (10.D és H ábrák) jól megfigyelhető volt az, hogy a H_2O_2 felhalmozódása megelőzi a sejtek későbbi elhalását. Tekintettel arra, hogy a vad típusú növények (10.D ábra) és az *rbohd* mutáns (10.H ábra) közötti egyedüli különbség a működőképes RBOHD fehérje jelenléte vagy hiánya, ezért arra következtettem, hogy az RBOHD fehérjének és az általa termelt ROS-nak fontos szerepe van az *A. brassicicola* gomba fertőzése során kialakuló sejthalál folyamatok növényi szabályozásában, és a sejtről-sejtre való terjedés regulációjában. Az *rboh* mutáns ebben a kísérletben is ugyanolyan fenotípust mutatott, mint a vad típusú növények (10.I,J,K,L ábrák).



10. ábra: Hidrogén-peroxid (karboxi-H₂DCFDA, DAB) és sejthalál (tripánkék) kimutatása, továbbá kettős festés (H₂O₂ és sejthalál együtt, kombinált DAB és Evans-kék festéssel) vad típusú (Col-0) és *rboh* mutáns *Arabidopsis* növényekben *A. brassicicola* fertőzés után 3 nappal.

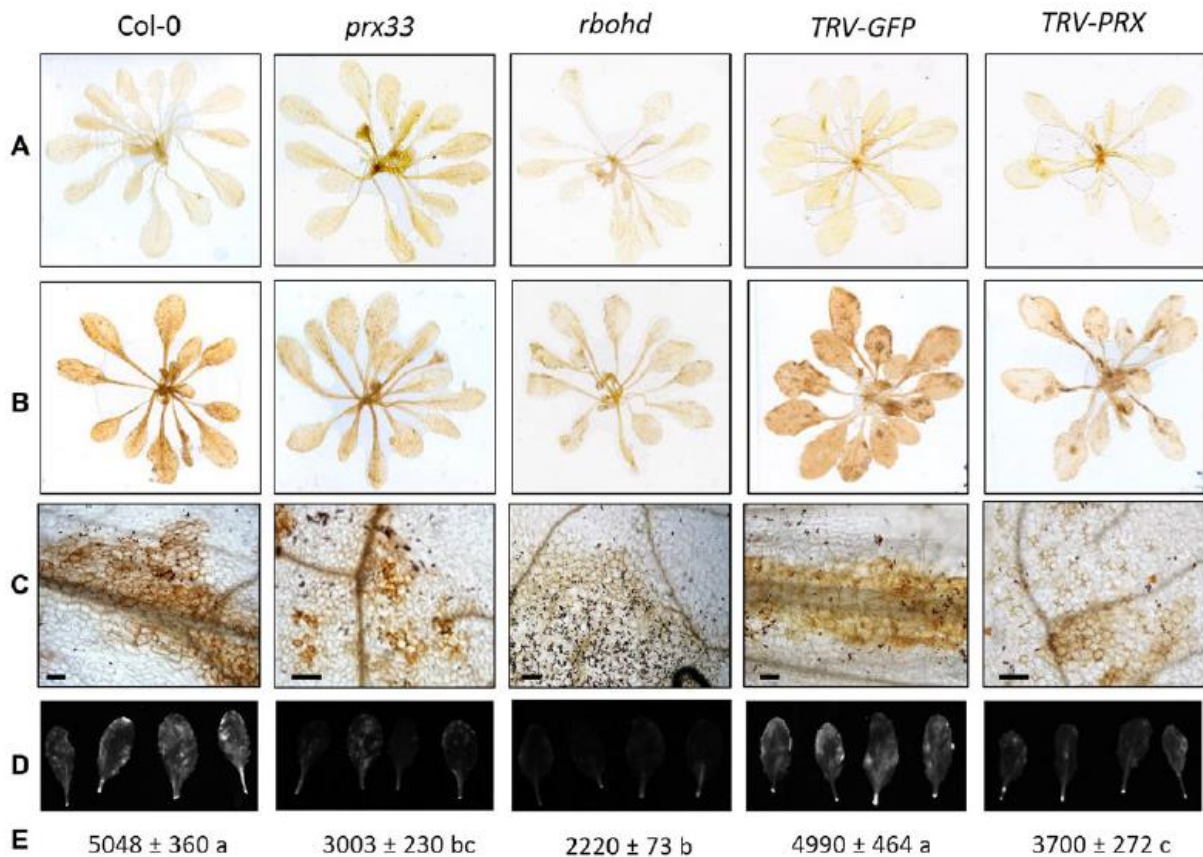
A, E és I, Hidrogén-peroxid kimutatása karboxi-H₂DFDA fluorofórral. Col-0 (A) és *rbohF* (I) növények leveleinek sejtjei H₂O₂-specifikus zöld fluoreszcenciát mutatnak, az *rbohD* levél sejtjei (E) viszont csupán az elhalt sejtekre jellemző sötétzöld autofluoreszcenciát mutatják.

B, F és J, Hidrogén-peroxid felhalmozódás kimutatása DAB festéssel. Col-0 (B) és *rbohF* (J) növények markáns, jól körülhatárolható H₂O₂ felhalmozódást mutatnak az egyes epidermisz vagy mezofil levélsejtjeikben. Az *rbohD* mutáns sejtjei (F) ugyanakkor csak a kloroplasztiszokban mutatnak H₂O₂ képződést (nagyított képrészlet), ez viszont sok egymás melletti sejtben szétterjedve jelentkezik.

C, G és K, Sejthalál kimutatása tripánkék festéssel. Az *A. brassicicola* fertőzése jól körülhatárolható, néhány sejtre kiterjedő sejthalált idéz elő Col-0 (C) és *rbohF* (K) növények leveleiben. Az *rbohD* (G) mutáns leveleiben ugyanakkor sok sejtre kiterjedő módon jelentkezik a sejtek elhalása.

D, H és L, Hidrogén-peroxid specifikus DAB festés és elhalt sejtek (Evans-kék) kombinált festése ugyanabban a levélmintában. H₂O₂ felhalmozódással járó oxidatív robbanás és a sejtek elhalása jól látható egymáshoz kapcsolt mintázatot mutat az *Arabidopsis* levelekben *A. brassicicola* fertőzést követően. A H₂O₂ termelődése megelőzi a sejtek elhalását. Az *rbohD* mutáns leveleinek sejtjei (H) csak a kloroplasztiszokban halmoznak fel H₂O₂-t (nagyított képrészlet). Mércé mérete = 50 µm.

A PRX33 és PRX34 sejtfa peroxidázok működésében akadályozott *prx33* mutáns és *TRV-PRX* géncsendesített *Arabidopsis* növények H_2O_2 termelésének vizsgálata arra mutatott rá, hogy a két PRX sejtfa peroxidáz működésének részleges gátlása csökkentette az extracelluláris H_2O_2 felhalmozódást mutató sejtek számát 2 nappal az *A. brassicicola* gombával történő fertőzés után (11. ábra). A korlátozott H_2O_2 képződést egy független módszerrel is megerősítettük. Diklórflorescein diacetát (DCFH-DA) festékekkel infiltráltuk a leveleket, majd géldokumentációs berendezéssel UV fény alatt fényképet készítettünk a levelekről, végül a fényképekről képelemző program segítségével átlagos pixel fluoreszcencia intenzitást számítottunk az egyes levelekhez (11. ábra).



11. ábra: Sejtfa peroxidáz és NADPH-oxidáz hiányos *Arabidopsis* növények csökkent hidrogén-peroxid (H_2O_2) termelése. A H_2O_2 képződését 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (A-C) és 2',7'-diklórflorescein-diacetát (DCFH-DA) (D,E) festéssel mutattuk ki vad típusú (Col-0), *prx33* és *rboh1* T-DNS inszerciós mutáns, továbbá *TRV-GFP* és *TRV-PRX* gén csendesített növényekben. Öt-hat hetes *Arabidopsis* növények tőlevélrózsáira permeteztünk 5×10^5 /ml koncentrációjú *Alternaria brassicicola* konídium szuszpenziót desztillált vízben kijuttatva. A festést kontroll (csak vízzel permetezett) (A sor) és *A. brassicicola*-val fertőzött növényeken (B-E sorok) végeztük el 2 nappal az inokuláció után. Mércse mérete = 50 μ m. DCFH-DA festett levelek fluoreszcenciájának mértékét (D és E sorok) UV fényvel való megvilágítással vizsgáltuk Alphamager Mini géldokumentációs rendszerben. Az adatokat átlagos pixel fluoreszcencia intenzitás mértékegységben adtuk meg. Mindegyik genotípus illetve kezelés esetében két független kísérlet összesen 30 levelének az átlagát számítottuk ki. Egytényezős varianciaelemzést (ANOVA) és Tukey post-hoc próbát használtunk a statisztikai vizsgálathoz. A sejtfa peroxidáz hiányos *prx33* és *TRV-PRX* növények kevesebb H_2O_2 -t termelnek, mint a kontrolljaik. A H_2O_2 felhalmozódás mintázatának mikroszkópos vizsgálata arra

utal, hogy a *prx33* és *TRV-PRX* növények esetében *A. brassicicola* fertőzés után alacsonyabb azoknak a sejteknek a száma, amelyek extracelluláris H₂O₂-t termelnek. Az *rbohD* NADPH-oxidáz mutáns növények leveleiről készült fotókat és pixel fluoreszcencia intenzitás értéket referenciaként illesztettük a kísérletbe. Fertőzeten vad típusú (*Col-0*) növények leveleinek átlagos pixel fluoreszcencia intenzitása 1240 ± 34 volt.

4.1.5. Az RBOHD NADPH-oxidáz molekuláris kölcsönható partnerei

Az RBOHD kölcsönható partnereinek tanulmányozása céljából cDNS microarray elemzést végeztünk egy helyben készített, kb. 2500 *Arabidopsis* transzkriptum kifejeződésének vizsgálatára alkalmas cDNS chip felhasználásával (1. táblázat).

1. táblázat: Eltérően kifejeződő gének listája *A. brassicicola* fertőzött *rbohD* mutáns növények leveleiben.

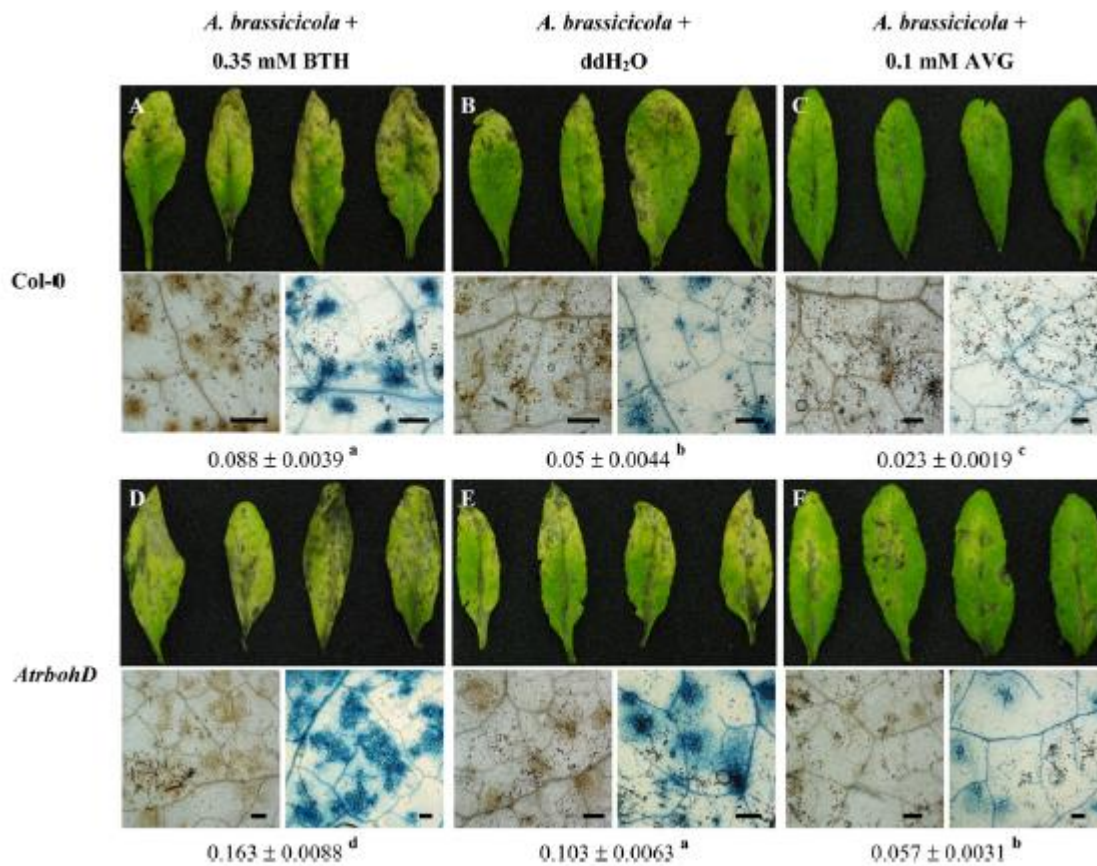
A gének transzkriptum szintjeit két módszerrel határoztuk meg: a felső adat microarray vizsgálat eredményét mutatja, az alsó adat zárójelben új biológiai mintákból származó RNS kivonásával nyert valós idejű RT-PCR vizsgálat eredményét. Az adatok a fertőzött növények transzkriptum szint változását mutatják a vízzel permetezett kontroll növényekhez viszonyítva log₂ értékben megadva.

Description (<i>Arabidopsis</i> Genome Initiative Code)	<i>Col-0</i>	FDR	<i>AtbohD</i>	FDR	<i>AtbohF</i>	FDR	P
ACC synthase 6 (<i>ACS6</i> ; <i>At4g11280</i>)	0.511 ± 0.184 (2.160 ± 0.062) a	0.465	1.695 ± 0.217 (4.053 ± 0.219) b	0.002	0.289 ± 0.161 (2.362 ± 0.086) a	0.690	<0.0001
Glutathione S-transferase 2 (<i>At4g02520</i>)	2.654 ± 0.082	0	3.350 ± 0.146	0	2.772 ± 0.158	0	0.0029
Glutathione S-transferase 6 (<i>At1g02930</i>)	2.313 ± 0.101	0	4.162 ± 0.225	0	3.416 ± 0.177	0	<0.0001
Glutathione S-transferase 7 (<i>At1g02920</i>)	3.381 ± 0.109 (4.398 ± 0.090) a	0	4.097 ± 0.125 (5.133 ± 0.201) b	0	3.522 ± 0.086 (3.987 ± 0.129) a	0	0.0004
WRKY40 transcription factor (<i>At1g80840</i>)	-0.460 ± 0.177 (2.358 ± 0.221) a	0.121	1.317 ± 0.280 (3.918 ± 0.140) b	0.013	-0.170 ± 0.262 (2.773 ± 0.134) a	0.723	<0.0001
WRKY6 transcription factor (<i>At1g62300</i>)	0.001 ± 0.176 (3.208 ± 0.030) b	0.872	1.362 ± 0.269 (4.063 ± 0.244) c	0.006	-0.272 ± 0.263 (2.370 ± 0.068) a	0.602	0.0002
Copper/zinc superoxide dismutase (<i>At1g08830</i>)	0.553 ± 0.234 (1.120 ± 0.061) a	0.228	1.920 ± 0.164 (2.502 ± 0.049) b	0.002	0.460 ± 0.285 (0.982 ± 0.072) a	0.635	0.0003
Anthranilate phosphoribosyl transferase (<i>At5g17990</i>)	0.386 ± 0.266 (2.135 ± 0.080) b	0.617	1.618 ± 0.196 (3.020 ± 0.082) c	0.002	0.211 ± 0.205 (1.555 ± 0.089) a	0.211	0.0004
Pathogenesis-related protein 1 (<i>PR1</i> ; <i>At2g14610</i>)	0.362 ± 0.293 (1.233 ± 0.143) a	0.703	2.075 ± 0.190 (2.774 ± 0.211) b*	0.003	0.465 ± 0.246 (0.627 ± 0.497) a	0.623	<0.0001
Tryptophan synthase (<i>At5g54810</i>)	1.712 ± 0.145 (3.397 ± 0.072) b*	0.002	3.135 ± 0.145 (4.183 ± 0.242) c	0	2.183 ± 0.261 (2.657 ± 0.093) a	0.007	0.0001
Response regulator 4 (<i>ARR4</i> ; <i>At1g10470</i>)	-1.070 ± 0.282 (-2.057 ± 0.220) a	0.003	-2.552 ± 0.565 (-3.002 ± 0.147) b	0	-1.336 ± 0.260 (-1.913 ± 0.071) a	0.036	0.033
Expansin 5 (<i>At3g29030</i>)	-0.181 ± 0.128 (-2.790 ± 0.037) a	0.724	-1.226 ± 0.210 (-3.690 ± 0.167) b	0.058	-0.052 ± 0.378 (-2.882 ± 0.100) a	0.771	0.0051

A. brassicicola fertőzés hatására 55 *Arabidopsis* gén fokozott expresszióját és 38 másik gén represszióját mutattuk ki. Az *rbohD* mutánsban 12 gén transzkripciója tért el szignifikánsan a vad típusú növényekben tapasztalt értéktől (1. táblázat). Ezek között egyebek mellett szerepelt két WRKY transzkripciós faktor (*WRKY6*, *WRKY40*), több glutation S-transferáz és az etilén bioszintézisében kulcsszerepet játszó *ACS6* ACC-szintáz. Fontos hangsúlyozni, hogy az *rbohD* mutáns esetében egyáltalán nem tapasztaltuk kulcsgének transzkripciós aktiválódásának a kiesését. Inkább az ellenkezője volt megfigyelhető, tehát a gomba fertőzésére vad típusú növényekben csekély génexpresszió változást mutató gének működésének intenzívebb

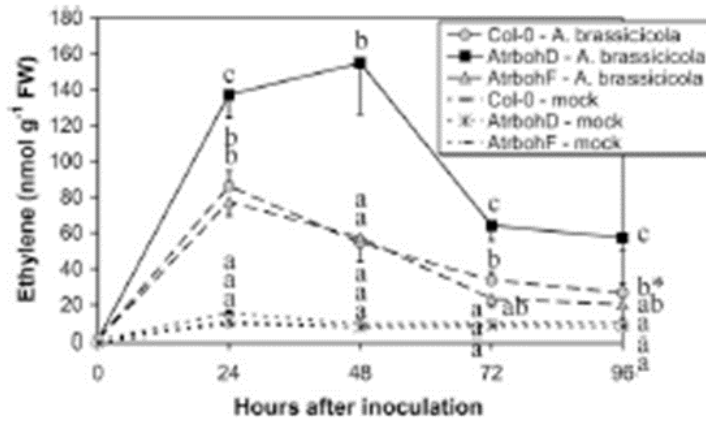
változása következett be az *rboh*d mutánsban. Ez arra utal, hogy az RBOHD fehérje által termelt extracelluláris ROS valószínűleg nem tölt be számottevő transzkripció aktivátor szerepet, inkább részleges negatív szabályozó hatással bír az *Arabidopsis* gének egy részére nézve.

Torres és munkatársai (2005) korábbi munkájukban rávilágítottak arra, hogy az RBOHD gátolja a szalicilsav által indukált sejthalál kialakulását. Saját transzkriptom szintű elemzésünkben pedig arra derült fény, hogy az RBOHD fehérje működésének kiesése fokozza az etilén szintézisében kulcs szerepet játszó ACS6 ACC-szintáz génkifejeződését. Feltételeztük ezért azt, hogy a szalicilsav mellett az etilén, ami szintén nagyon jelentős stressz-szignál molekula, szintén (közvetett) kölcsönható partnere lehet az RBOHD-nek az *A. brassicicola* fertőzésére adott sejtszintű növényi válaszbán. A feltételezett kölcsönhatások kísérletekkel történő alátámasztása érdekében először egy kémiai kezelésekre épülő vizsgálsorozatot indítottunk, amiben az acibenzolar-S-metil (Bion 50 WG növényi immun aktivátor hatóanyaga) szalicilsav-analóg vegyület és az amino-etoxi-vinil-glicin etilén bioszintézist gátló vegyület hatását vizsgáltuk az RBOHD működésére és a sejthalál kialakulására *A. brassicicola*-val fertőzött *Arabidopsis* levelekben (12. ábra). A szalicilsav-analóg acibenzolar-S-metillel történő kezelés fokozta az RBOHD-re jellemző extracelluláris oxidatív robbanás mértékét és a gomba által előidézett sejthalállal járó tüneteket mind a vad típusú, mind az *rboh*d mutáns növényekben. Az amino-etoxi-vinil-glicin etilén bioszintézis inhibitor pedig gátolta az említett két folyamatot (12. ábra). Mindez arra utalt, hogy a szalicilsav és az etilén egyaránt fokozza az RBOHD működését és az RBOHD által szabályozott sejthalál folyamatot *A. brassicicola*-fertőzött *Arabidopsis* levelekben.



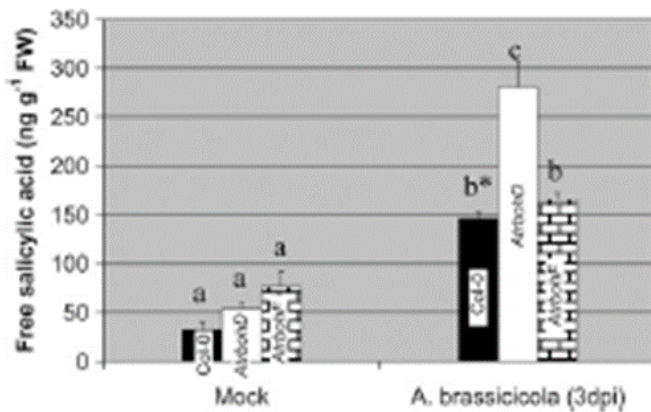
12. ábra: A szalicilsav analóg BTH vagy acibenzolar-S-metil (0,35 mM) erősíti, az etilén bioszintézis inhibitor AVG (aminoetoxi-vinil-glicin) (0,1 mM) gátolja az *A. brassicicola* gomba fertőzése által okozott sejtelhalást vad típusú (Col-0) és *rbohD* mutáns *Arabidopsis* növényekben. A tüneteket ábrázoló levelekről készült fotók 9 nappal az inokuláció utáni állapotot szemléltetik. A mikroszkópos felvételek (a levelekről készült fotók alatti kisebb képek) ugyanezeknek a kezeléseknél a hatásukat mutatják a levelek hidrogén-peroxid felhalmozására (DAB festéssel kimutatva) és a sejtek elhalására (tripánkék festéssel kimutatva) 3 nappal az inokuláció után. Mércse mérete = 200 µm. A mikroszkópos fotók alatti számszerű értékek az egyes kezeléseknél gyakorolt hatásukat mutatják az 5. ábra magyarázatában leírt módszerrel egyező módon számítva. Az értékeket kezelésként 15 levél átlaga alapján számítottam. Eltérő betűk a varianciaelemzéssel és Tukey post-hoc próbával számított statisztikai vizsgálat alapján egymástól szignifikánsan eltérő átlagokat jelölik ($P \leq 0,01$).

Az etilén és a szalicilsav RBOHD-vel fennálló funkcionális kapcsolatát erősítette meg az a tény is, hogy az *rbohD* mutáns a gombával való fertőződés után túlermeli mind a két stressz hormont a vad típusú növényekhez képest (13. és 14. ábrák).



($P \leq 0,01$, kivéve *-gal jelölt, ahol $P \leq 0,05$). A statisztikai elemzést minden időpontra egymástól függetlenül végeztük el (a különböző időpontok átlagait egymással nem hasonlítottuk össze). FW: friss levéltömeg.

13. ábra: *A. brassicicola* gombával fertőzött Col-0, *rbohD* és *rbohF* *Arabidopsis* növények etilén termelése gázkromatográffal vizsgálva. A kórokozó fertőzése fokozza a növények etilén termelését mind a három genotípusban, azonban az *rbohD* hiányos növények több etilént termelnek, mint a másik két genotípus. Két kísérlet átlaga látható, mindkét kísérletben genotípusonként és kezelésként 4-4 párhuzamos biológiai mintából történt a mintavétel. Az eltérő betűk (ANOVA és Tukey post-hoc próbával számított) statisztikailag eltérő átlagokat jelölnek



növény tölevélrözsáját tartalmazta. A statisztikai vizsgálat ANOVA és Tukey post-hoc próba segítségével történt ($P \leq 0,01$, kivéve *-gal jelölt, ahol "a" és "b" között $P \leq 0,05$). FW: friss levéltömeg.

14. ábra: Szabad szalicilsav mennyiségének vizsgálata HPLC módszerrel *A. brassicicola* gombával fertőzött *Arabidopsis* növényekben. A gombafertőzés hatására megnő a levelek szabad szalicilsav szintje mindegyik genotípusban, azonban az *rbohD* mutáns esetében markánsabb a növekedés. Az elemzés 3 nappal az inokuláció után történt. Kezelésként két független kísérlet 3-3 mintájának az átlagából számítottuk a szalicilsav értékeket. Minden egyes minta 5 *Arabidopsis*

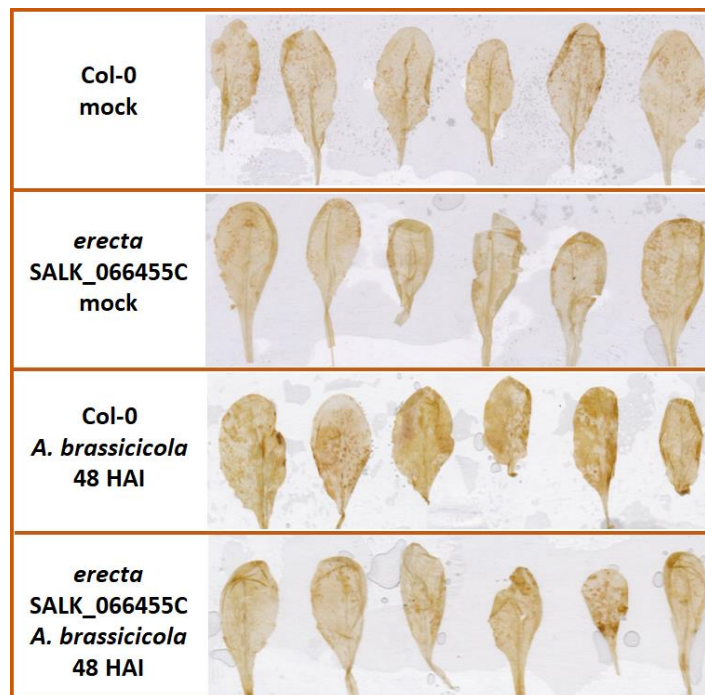
Az RBOHD további kölcsönható partnereinek a kimutatásában segítségünkre volt a torontói egyetem által fenntartott *Arabidopsis* Interactions Viewer alkalmazás (Geisler-Lee és mtsai 2007) és az alkalmazásba integrált *Arabidopsis* membránfehérjék élesztő két hibrid vizsgálatával nyert fehérje kölcsönhatás adatbázis (Jones és mtsai 2014). Ebből az adatbázisból választottunk ki 11 perspektivikus RBOHD-kölcsönható fehérjét, melyek a következők voltak: UDP-Galactose Transporter 3 (*At1g14360*), Annexin 1 (*At1g35720*), Thioredoxin H-type 7 (*At1g59730*), Calmodulin 4 (*At1g66410*), Glutathione S-Transferase TAU 19 (*At1g78380*), Quantitative Resistance to Plectosphaerella 1 (*At2g26330*), Cell Elongation Protein (*At3g19820*), ADP-Ribosylation Factor C1 (*At3g22950*), Membrane-Associated Progesterone Binding Protein 3 (*At3g48890*), ismeretlen funkciójú AT4G37445 fehérje és NDR1/HIN1-like 3 (*At5g06320*). Ezeknek a fehérjéknek az esetében olyan T-DNS mutánsokat kerestünk és

rendeltünk, amelyek a vizsgálni kívánt lókusokban hordoznak mutációt. Miután a mutánsokat *Alternaria*-val megfertőztük, összesen két olyan *Arabidopsis* vonalat találtunk, melyeknek a kórokozó fertőzésére adott fenotípusa eltért a vad típusú növényekétől. Mindkét mutáns az *rbohD* mutánsra emlékeztető fokozott sejtelhalással járó tüneteket mutatott és a T-DNS inszerciót is ugyanazt a fehérjét kódoló lókusban tartalmazta. Az érintett fehérje egy Ser/Thr protein kináz, a Quantitative Resistance to *Plectosphaerella* 1 vagy Erecta (15. ábra).



15. ábra: *Alternaria brassicicola* gombával fertőzött Col-0 (vad típusú), *rbohD*, *erecta* SALK_04410 és *erecta* SALK_06455C mutáns *Arabidopsis* növények 7 nappal az inokuláció után. A kísérletben az *RbohD* (*At5g47910*) és az *ERECTA* (*At2g26330*) lókusok genomi nukleinsav szekvenciáiban T-DNS inszerciót hordozó *A. thaliana* genotípusokat használtunk. Hasonlóan az *rbohD* növényekhez, az *erecta* mutáns *Arabidopsis* vonalak esetében is erősebb nekrotikus tünetek figyelhetők meg a gomba fertőzését követően (a vad típusú növényekhez képest). Öt-hat hetes növények teljes tölevélrózsáit fertőztük 5×10^5 *A. brassicicola* konídium/ml koncentrációban. A kórokozót desztillált vízben juttattuk ki a levelekre permetezve.

Kimutattuk azt is a SALK_066455C *erecta* mutánsval kapcsolatban, hogy *A. brassicicola* fertőzést követően jelentősen gátolt a H_2O_2 termelése, ami további megerősítést jelent arra vonatkozóan, hogy az *ERECTA* fehérje működése szükséges az *RBOHD* extracelluláris ROS termeléséhez (16. ábra).

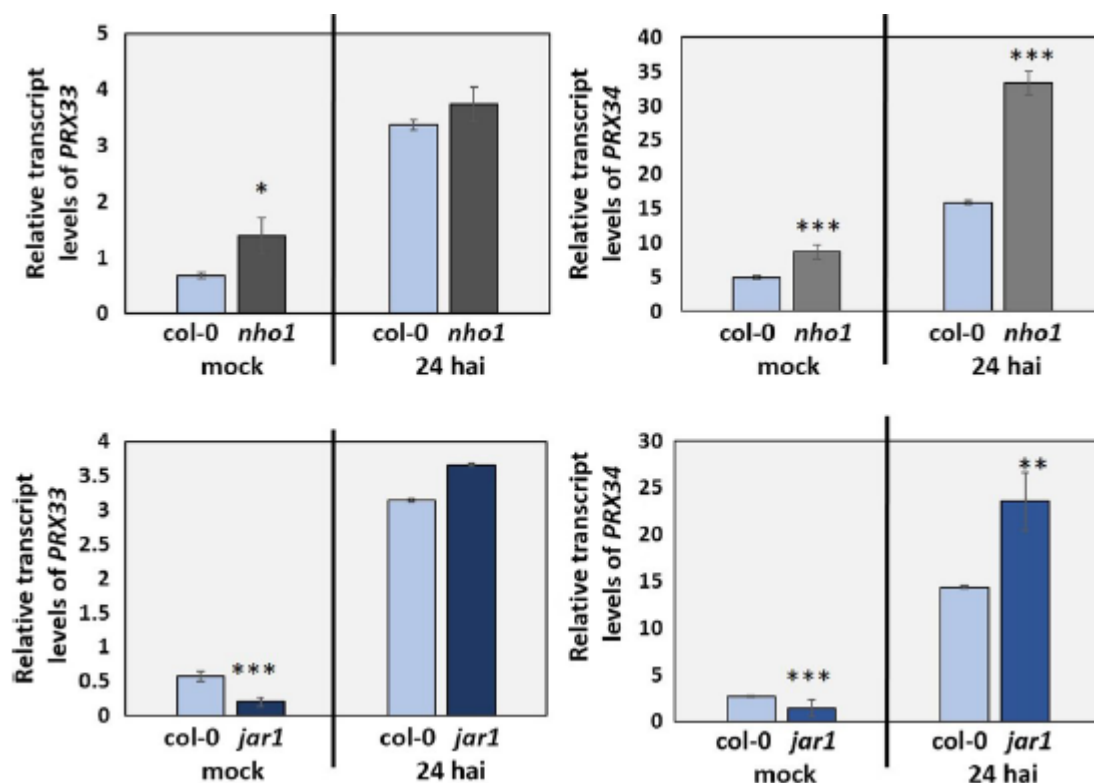


16. ábra: Vad típusú (Col-0) és *erecta* T-DNS mutáns *Arabidopsis* növények hidrogén-peroxid termelése. A H_2O_2 képződését 3,3'-diaminobenzidin (DAB) festéssel mutattuk ki. Öt-hat hetes növények teljes tőlevélrózsáit fertőztük 5×10^5 *A. brassicicola* konídium/ml koncentrációban. A kórokozót desztillált vízben juttattuk ki a levelekre permetezve. Vízzel permetezett (kontroll) és *A. brassicicola* gombával fertőzött növényeket vizsgáltunk 48 órával az inokuláció után. Az *erecta* mutáns növények levelei csökkent H_2O_2 felhalmozódást mutatnak. Két független kísérlet kezelésenként 15-15 növényegységét vizsgáltuk.

4.1.6. PRX33 és PRX34 sejtfa peroxidázok lehetséges kölcsönható partnerei

A PRX33-PRX34 peroxidázok molekuláris kölcsönható partnereinek feltárásához olyan kulcsgének felé irányítottuk a figyelmünket, melyekkel kapcsolatban már ismert volt az, hogy fontos szabályozó szerepet játszanak a növények jelátviteli folyamataiban kórokozó mikrobák támadását követően (Sato és mtsai 2010). A kérdéses fehérjék jelentőségét szintén T-DNS mutáns *Arabidopsis* genotípusok segítségével vettük górcső alá. Voltak olyan vizsgált jelöltek, például az acil-hidroláz aktivitású SAG101 (Senescence-Associated Gene 101, *At5g14930*), a CPK5 (Calmodulin-domain protein kinase 5, *At4g35310*), vagy a növények általános rezisztenciájában (PTI) alapvető fontosságú EFR mintázat-felismerő (PRR) receptor (*At5g20480*), melyek működésének sérülése nem befolyásolta a növények *Alternaria* fertőzésre adott tüneteit. Találtunk ugyanakkor a vizsgált mutánsok segítségével 6 olyan gént, amiknek a mutációja lényegesen megváltoztatta a növényeken kialakuló *Alternaria* tüneteket. Ezek a következők voltak: NPR1 (*Arabidopsis* Nonexpresser of PR genes 1, *At1g64280*), MPK6 (MAP Kinase 6, *At2g43790*), NIA2 (*Arabidopsis* Nitrate Reductase 2, *At1g37130*), EIN2 (Ethylene

Insensitive 2, *At5g03280*), JAR1 (Jasmonate resistant 1) és NHO1 (Nonhost resistance to *P.s. phaseolicola* 1, *At1g80460*). Meghatároztuk ezekben a növényekben a *PRX33* és *PRX34* sejtfa peroxidáz gének mRNS kifejeződését, ami rámutatott arra, hogy a *jar1* és az *nho1* mutáns genotípusokban fertőzetlen állapotban mind a két peroxidáz gén transzkripciója eltérést mutat a vad típusú növényekhez képest, *A. brassicicola*-val történő inokuláció után pedig a *PRX34* gén expressziója továbbra is különbözik a vad típusú *Arabidopsis* növényekben megfigyelhető értéktől (17. ábra). (Érdekes módon az *RbohD* gén expressziója egyik mutánsban sem mutatott eltérést a Col-0 növényekkel összehasonlítva). Ezek alapján feltételezem, hogy a JAR1 és az NHO1 fehérjék kölcsönható partnerként részt vehetnek a *PRX33* és *PRX34* sejtfa peroxidázok működésének megvalósulásában *Alternaria*-val fertőzött *Arabidopsis* növényekben.



17. ábra: *PRX33* és *PRX34* sejtfa peroxidáz gének kifejeződése *nho1* és *jar1* T-DNS inszerciós *Arabidopsis* vonalakban, valós idejű RT-PCR módszerrel vizsgálva. A növények transzkriptum szintjeit *Alternaria brassicicola* gombával való fertőzés előtt és 24 órával utána vizsgáltuk. Az *NHO1* és *JAR1* gének hibás működése módosítja a növények *PRX33* és *PRX34* mRNS szintjeit. Öt-hat hetes növények teljes tölevélrözsáit fertőztük 5×10^5 *A. brassicicola* konídium/ml koncentrációban. A kórokozót desztillált vízben juttattuk ki a levelekre permetezve. Az ábra két független kísérlet, kísérletenként 3-3 párhuzamos biológiai mintájának az átlagait mutatja. Minden minta 3-3 növény tölevélrözsáját tartalmazta, minden egyes cDNS mintát 3 párhuzamos valós idejű PCR amplifikációban vizsgáltunk. Az átlagok statisztikailag igazolható eltéréseit Student féle t-próbával vizsgáltuk, a szignifikáns különbségeket csillagokkal jelöltük (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$).

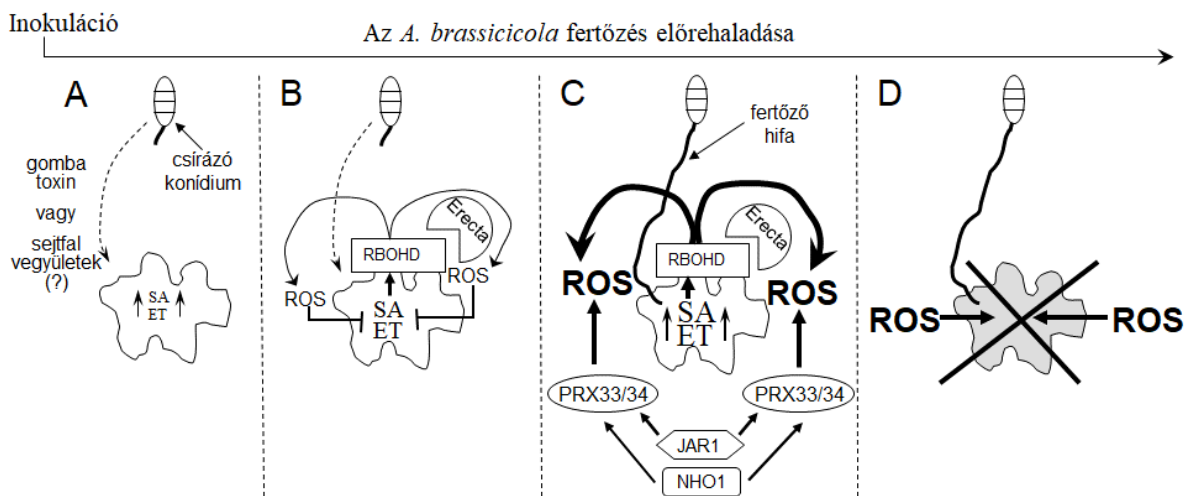
4.1.7. Az RBOHD és a PRX33/PRX34 fehérjék kórélettani szerepe és az eredményeim hatása a munka tárgyát felölelő tudományterületre

4.1.7.1. Az extracelluláris oxidatív robbanás szerepe a beteg növények sejthalál folyamataiban

Kórokozókkal fertőzött növényi sejtek oxidatív robbanásának és a sejtek elhalásának összefüggésével kapcsolatban sokáig az volt a kutatók álláspontja, hogy a keletkező ROS inkább elősegíti a sejtek elhalásának folyamatát, mintsem gátolja azt (Lamb és Dixon 1997). Ezt főként a ROS erős oxidáló hatású kémiai tulajdonságára vezették vissza. Ennek fényében meglepetést keltett Torres és munkatársainak (2005) közleménye, melyben kimutatták azt, hogy az RBOHD NADPH-oxidáz gátolja a sejthalál terjedését *P. syringae* pv. *tomato* inkompatibilis törzsével és *Botrytis cinerea*-val fertőzött *Arabidopsis* növényekben.

Saját vizsgálataink arra világítottak rá, hogy az extracelluláris oxidatív robbanás két legjelentősebb növényi sejtekben aktív forrása a sejtmembránban lokalizált RBOHD NADPH-oxidáz és a sejt közötti járatokban található PRX33 és PRX34 sejtfa peroxidázok makroszkópikus szinten ellentétes módon befolyásolják az *A. brassicicola* gomba által kiváltott sejthalál folyamatot *Arabidopsis*-ban. Az *rboh*d mutáns növényekben intenzívebb a sejtek elhalása, mint a vad típusú növényekben, a *prx33/34* hiányos növényekben viszont enyhébbek a gomba által okozott nekrotikus tünetek. Az RBOHD által termelt ROS tehát inkább visszaszorítja a fertőzött növények sejtelhalását, a PRX33/34 peroxidázok által termelt ROS pedig nyilvánvalóan elősegíti a sejtek elhalását. Az RBOHD-vel kapcsolatban kimutattuk továbbá azt is, hogy mind az etilén, mind a szalicilsav növényi hormonokkal kölcsönhatásban fejt ki a hatását. Összeállítottunk végül egy modellt az RBOHD és a PRX33/34 fehérjék lehetséges sejthalál szabályozó szerepéről. Ennek lényege az, hogy az RBOHD két ellentétes szereppel is rendelkezhet az *Arabidopsis* levél sejteiben, az egyik szerepét a gomba által közvetlenül károsított sejtekben fejt ki, a másikat viszont a távolabbi környező sejtekben. A nekrotróf kórokozó gomba fertőző hifáitól távolabb eső növényi sejtekben (melyek érzékelik a gomba által termelt MAMP-okat és alacsony koncentrációjú toxikus anyagcseretermékeket) az etilén és a szalicilsav mennyisége kissé megnő, ami finoman aktiválja az RBOHD működését. Az RBOHD által kis mennyiségben kibocsátott ROS gátolja az etilén és a szalicilsav túltermelődését és ezzel az RBOHD működése a gomba fertőzési helyétől távolabb

eső sejtek túlélését (a sejthalál gátlását) szolgálja. A fertőző hifák által közvetlenül roncsolt sejtekben azonban az RBOHD már nem képes ellensúlyozni a sejtek által termelt etilén és szalicilsav túlermelődését, ami az RBOHD drasztikus aktivitás növekedéséhez vezet. A PRX33/34 fehérjék ekkor szintén aktiválódnak. Az extracelluláris ROS e két legfontosabb forrásának fokozott működése markáns oxidatív robbanáshoz vezet a levelet alkotó epidermisz és mezofil sejtek sejtközötti járataiban, ami a gombafertőzés által közvetlenül károsított sejtek pusztulásához vezet (18. ábra). Eredményeinkre támaszkodva az RBOHD NADPH-oxidáz fehérje funkciójával kapcsolatban azt a hipotézist fogalmazzuk meg, hogy a növények leveleiben kórokozók fertőzése során a sejthalál precíziós faktoraként működhet, melyben kulcsszerepe van az általa termelt ROS koncentráció függő kettős hatásának. Ezek alacsonyabb koncentrációban a sejt túlélését szolgálják, magasabb koncentrációban azonban a növényi sejt elhalását (Barna és mtsai 2012a).



18. ábra: Az RBOHD és PRX33/PRX34 extracelluláris ROS-termelő rendszerek működését és lehetséges kölcsönhatásait szemléltető modell *Alternaria brassicicola* nekrotrof gombakórokozóval fertőzött *Arabidopsis thaliana* növényekben.

A, Csírázó *A. brassicicola* konídium toxikus anyagcseretermékeket és sejtfelszíni MAMP vegyületeket, például oligoszacharid kitin fragmentumokat (Miya és mtsai 2007, Wan és mtsai 2008), ergoszterolt bocsát ki. A levélen távolabb található *Arabidopsis* sejt receptorai segítségével érzékeli a kórokozó jelenlétét, amire megnövekedett szalicilsav (SA) és etilén (ET) termeléssel válaszol. B, Az emelkedő SA és ET szint mérsékelten aktiválja a növényi sejt sejtmembránjában található RBOHD fehérje működését (Devadas és mtsai 2002, Bouchez és mtsai 2007). Ez a sejt által termelt ROS mérsékelt emelkedését eredményezi, ami visszacsatolva gátolja a sejtben a SA és az ET további képződését, és a programozott sejthalál kialakulását (tehát segíti a sejt életben maradását).

C és D, Abban az esetben, amikor a fertőző hifa fejlődése során megközelíti a növényi sejtet és a gomba toxikus anyagcseretermékei komolyabb károsodást idéznek elő a gazdanövényben, az RBOHD fehérje mérsékelt működése már nem elégséges a SA és ET nagyobb mértékű képződésének megállításához. A hormonháztartásnak ez a markáns eltolódása az RBOHD és az extracelluláris térben található PRX33 és PRX34 fehérjék aktivitásának

ugrásszerű növekedéséhez és a sejtközötti térben megfigyelhető oxidatív robbanáshoz vezet, ami többnyire a sejt elhalását eredményezi. Az RBOHD működése az ERECTA szerin/treonin protein kinázzal kölcsönhatásban valósul meg, a JAR1 és NHO1 fehérjék pedig feltehetőleg részt vesznek a PRX33/PRX34 sejtfal peroxidázok működésének megnyilvánulásában. Az *A. brassicicola* nekrotróf gombával fertőzött *Arabidopsis* levél sejtjeiben ez a négyféle állapot (A-D) a levéllemez különböző részeiben gyakran egyszerre figyelhető meg.

4.1.7.2. Az extracelluláris oxidatív robbanás hatása a nekrotróf *A. brassicicola* gombakórokozó iránti fogékonyságra

Érdekes számomra az extracelluláris ROS kórélettani szerepét kutató munkánk következő tapasztalata: függetlenül attól, hogy makroszkópikus szinten az RBOHD gátolja, a PRX33/34 peroxidázok pedig elősegítik a nekrotróf gomba-növény kölcsönhatás során fellépő sejthalál folyamatot, a növény *A. brassicicola* iránti fogékonyságát mindkét ROS termelő enzimrendszer egyöntetűen támogatja. Ez árnyalja azt a Govrin és Levine (2000) által először megfogalmazott hipotézist, mely szerint (szemben a biotróf életmódú kórokozókkal) a nekrotróf növényi kórokozók stratégiájának részét képezi a növényi sejthalál folyamatok aktiválása, hiszen jellemzően az elhalt növényi szövetekkel táplálkoznak. Az RBOHD NADPH-oxidázzal kapcsolatos eredményeink ezt annyiban finomítják, hogy úgy tűnik a nekrotróf kórokozók kolonizációját nem elsősorban a növényi sejtek elhalása támogatja, hanem az azt megelőző oxidatív robbanás. Tehát az oxidatív robbanás során a növényi sejtközötti járatokban felhalmozódó ROS váltja ki az *A. brassicicola* (és feltehetőleg más nekrotróf gombák) (lásd Torres és mtsai 2005) gyorsabb növekedését.

4.1.7.3. Az RBOHD NADPH-oxidáz feltehetőleg nem transzkripciós aktivátor

Az *rboh*d mutáns *Arabidopsis* növényekkel tapasztalt eredményeink arra utalnak, hogy az RBOHD nem játszik számottevő szerepet a növényi immunfolyamatokat szabályzó gének transzkripciójának aktiválásában. Az RBOHD fehérje működésének gátlása nem idézte elő az *A. brassicicola* fertőzésre aktiválódó növényi stresszválasz gének fokozott kifejeződésének az elmaradását. Inkább a fordítottja volt megfigyelhető, tehát a gének egy csoportja még jobban aktiválódott az *rboh*d mutánsban. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az RBOHD működéséből származó extracelluláris ROS nem tölt be transzkripciós aktivátor szerepet. Figyelemre méltó ugyanakkor, hogy emlős fagocita fehérvérsejtekben a NADPH-oxidázok elsődleges szerepét nem az általuk termelt ROS felhalmozódásában látják, hanem a neutrofil fagoszóma pH értékének lúgos irányba történő eltolásában. Elképzelhető, hogy a növényi

sejtmembránban lokalizált NADPH-oxidázok (pl. RBOHD) is hasonló szerepet töltenek be, amelynek következménye az apoplaszt pH értékének a megemelése és ez által a magasabb pH értéken aktiválódó peroxidázok (pl. PRX33 és PRX34) működésének bekapcsolása (Bolwell és mtsai 2002, Segal 2005, Mur és mtsai 2008).

4.1.7.4. Milyen hatást gyakoroltak a növényi sejtek extracelluláris oxidatív robbanásának kutatása során elért eredményeim a témához köthető tudományterületre?

A kutatási témából született két nemzetközi D1-es publikációnkra a Web of Science és az MTMT adatbázisok alapján az értekezés összeállításakor 147/146 illetve 13/18 független hivatkozás érkezett. A NADPH-oxidázok extracelluláris oxidatív robbanásban játszott szerepét tárgyaló meghatározó szemleciikk (Marino és mtsai 2012) 5 alkalommal hivatkozik munkánkra, kiemelve az RBOHD növényi sejthalálra és nekrotróf kórokozókval szembeni fogékonyság növekedésre gyakorolt hatását. Az általános és specifikus növényi betegségrezisztencia (PTI és ETI) összefüggéseit vizsgáló alapvető szemleciikk pedig az RBOHD és a szalicilsav kölcsönhatása kapcsán hivatkozik munkánkra (Yuan és mtsai 2021b). Hasonló összefüggésben említik eredményeinket Siddique és munkatársai (2014) is a Science Signaling folyóiratban publikált közleményükben, továbbá Hyodo és munkatársai (2017) a PNAS folyóiratban közölt dolgozatukban.

4.2. 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. Fagypon alatti külső hőmérséklet túlélésében segítségükre van a hidegedződés jelensége, ami előzetes alacsony (de fagypon feletti) lehűlésekkel járó hőmérsékleti viszonyok között alakul ki szervezetükben (Kalberer és mtsai 2006). Különböző növényfajok és genotípusok hidegedződésre való képessége jelentősen eltér egymástól.

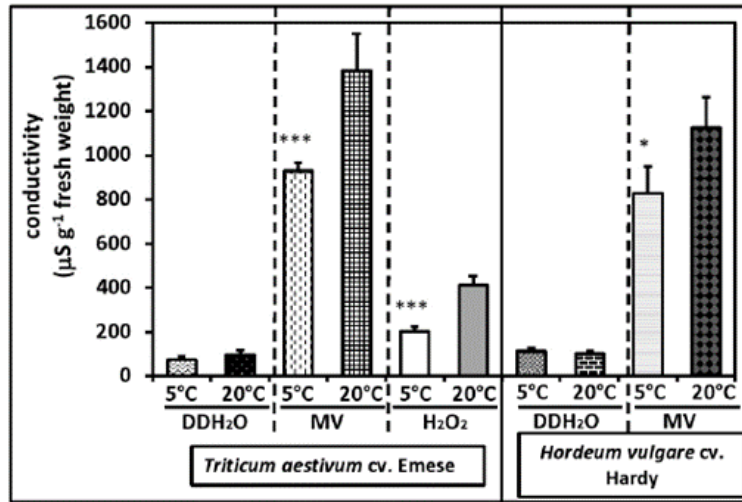
Hidegedződés következtében nem csupán egy későbbi fagyveszély kedvezőtlen hatásaitól lesznek részben védettek az alkalmazkodásra képes növények, hanem kereszttolerancia alakulhat ki más kedvezőtlen külső környezeti feltételekkel szemben is. A szakirodalomban

találunk példát hidegedzett növények kén-dioxid, szárazság és fotooxidatív károsodás, nehézfém stressz, továbbá kórokozók fertőzésével szembeni kereszttoleranciájára (Norman és mtsai 2001, Zhou és mtsai 2014b, Streb és mtsai 2008, Kuwabara és Imai 2009).

A növényi sejtek által termelt reaktív oxigén származékok (ROS) fokozott képződése nem csupán kórokozó mikrobák támadását követően figyelhető meg a növényekben, hanem abiotikus stresszek esetén is (You és Chan 2015). Fontos szerepet tulajdonítanak nekik redox jelátviteli hálózatok működésében, szabályozott felhalmozódásuk és lebomlásuk révén összekötő kapocsként szolgálhatnak, melyek összehangolják a növény külső környezetéből érkező jelzéseket és a sejtek anyagcseréjét. Közvetlen szabályozó szerepüket fehérjék tiol csoportjainak poszttranszlációs redox változásain keresztül fejthetik ki (Akter és mtsai 2015). A ROS felhalmozódásának alapvető szerepet tulajdonítanak a kereszttolerancia jelenségében is (Vranová és mtsai 2002, Pastori és Foyer 2002, Bowler és Fluhr 2000). 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).

4.2.1. Hidegedzés hatása búza és árpa növények oxidatív stresszel szembeni toleranciájára

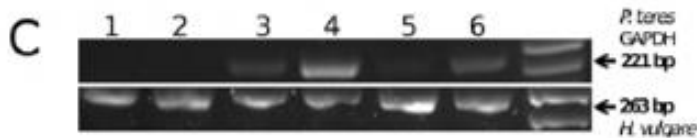
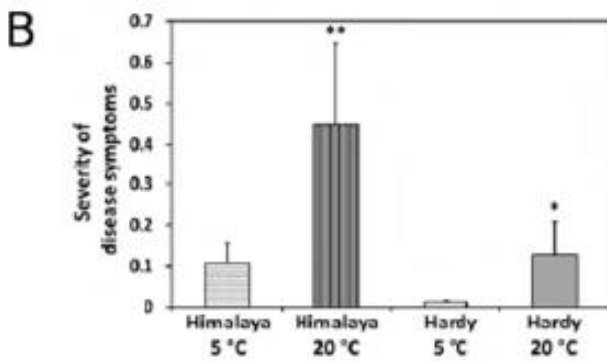
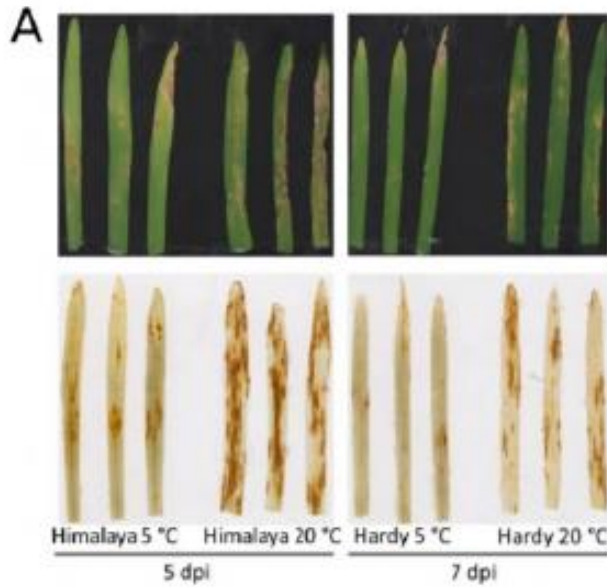
Búza és árpanövényeket hidegedzésnek vetettünk alá, melynek során a kicsírázott fiatal (4 napos) növényeket 4 hétig 5 °C hőmérsékleten tartottuk. A kontroll növényeket 7 napig neveltük szobahőmérsékleten (20 °C-on). A növények leveleit ekkor levágtuk és 1 cm-es darabokra aprítottuk, majd 48 órán át metil-viologén herbicid hatóanyagot tartalmazó oldatban vagy H₂O₂ oldatban áztattuk őket. A metil-viologén szuperoxid szabadgyök képződést okoz a kloroplasztiszokban, tehát mindkét kezelés oxidatív stresszt okoz a növényi szövetekben. A kezelések károsító hatását a leveleket tartalmazó oldat vezetőképességének mérésével állapítottuk meg, ez a paraméter azt jelzi, hogy az oxidatív stressz mennyire károsítja a növényi sejtmembránokat, tehát azokon keresztül milyen mértékű a sejtekben található elektrolitok kiáramlása az áztató folyadékba. Kísérletünkben azt tapasztaltuk, hogy a hidegedzés búza esetében mindkét oxidatív stresszt okozó kezeléssel szemben toleránsabbá tette a növényeket, árpa esetében pedig a paraquat kezeléssel szemben tette ellenállóbbá a növényeket (18. ábra).



19. ábra: Hidegedzés hatása búza és árpa levelek oxidatív stresszt okozó kezeléssel szembeni toleranciájára. A leveleket metil-viologénnel (MV) (paraquat gyomirtó szer hatóanyaga) és hidrogén-peroxiddal (H₂O₂) kezeltük. Kezelések rövidítései: 5 °C DDH₂O – hidegedzett, desztillált vízben úsztatott levélminták; 20 °C DDH₂O – kontroll (nem-hidegedzett), desztillált vízben úsztatott levélminták; 5 °C MV – hidegedzett, paraquat oldaton úsztatott levélminták; 20 °C MV – kontroll (nem-hidegedzett), paraquat oldaton úsztatott levélminták; 5 °C H₂O₂ – hidegedzett, hidrogén-peroxid oldaton úsztatott levélminták; 20 °C H₂O₂ – kontroll (nem-hidegedzett), hidrogén-peroxid oldaton úsztatott levélminták. Hús (1 cm hosszú) búza vagy árpa levéldarabot úsztatunk kétszer desztillált vízben, vagy 10 µM paraquat, vagy 100 mM H₂O₂ oldatban 48 órán át. Ezután megmértük az inkubáló oldatok vezetőképességét konduktométerrel. Az ábrán két kísérlet kísérletenként 3-3 biológiai ismétlésének átlagai láthatóak. Az átlagok közötti szignifikáns különbségeket Student féle t-próbával vizsgáltuk (**P ≤ 0,001, *P ≤ 0,05).

4.2.2. Hidegedzés hatása a nekrotróf *Pyrenophora teres* f. *teres* tüneteire és virulenciájára árpa gazdanövényen

Felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon a hidegedzésnek lehet-e hatása a növények nekrotróf kórokozókval szembeni fogékonyságára is, tehát megfigyelhető-e kereszt tolerancia jelenség egy abiotikus (kémiai) és egy biotikus stresszel szemben ebben a kísérleti rendszerben? Arra is kíváncsiak voltunk, hogy van-e kimutatható különbség a fertőzés nyomán képződő ROS mennyiségében a hidegedzett és a kontroll növények között. Ehhez a kísérlethez a *Pyrenophora teres* f. *teres* nekrotróf fonális gombakórokozót használtuk két eltérő fogékonyságú árpafajta bevonásával. A vizsgálat eredményei arra mutattak rá, hogy a hidegedzés látványosan csökkenti a kórokozó által előidézett nekrotikus tüneteket és a levelekben felhalmozódó ROS mennyiségét is mind a rezisztens, mind a fogékony fajtában (20. ábra).



Minták sorrendje: 1) egészséges *H. vulgare* cv. Himalaya növények 2) egészséges *H. vulgare* cv. Hardy növények 3) hidegedzett és *P. teres* f. *teres* gombával fertőzött *H. vulgare* cv. Himalaya növények 4) kontroll (nem-hidegedzett) *P. teres* f. *teres* gombával fertőzött *H. vulgare* cv. Himalaya növények 5) hidegedzett és *P. teres* f. *teres* gombával fertőzött *H. vulgare* cv. Hardy növények 6) kontroll (nem-hidegedzett) *P. teres* f. *teres* gombával fertőzött *H. vulgare* cv. Hardy növények.

Szemikvantitatív PCR vizsgálat segítségével kimutattuk azt is, hogy a gomba biomassza termelése is gátolt a hidegedzett növényekben, tehát a hidegedzett növények nem csupán a nekrotikus tünetek kialakulásával szemben ellenállóbbak, hanem a gomba gazdanövényen való növekedésével szemben is rezisztensebbek (20. ábra).

20. ábra: Két árpaajtában az előzetes hidegedzés rezisztenciát okoz a nekrotrof *Pyrenophora teres* f. *teres* fertőzésével szemben.

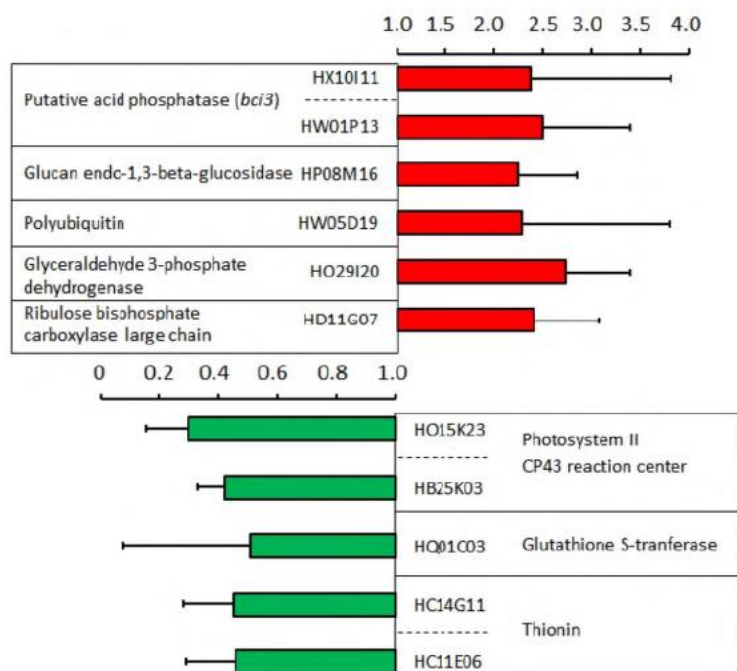
A) Hidegedzett árpanövények (5 °C) enyhébb tüneteket mutatnak *P. teres* fertőzése után (felső 2 fotó) mint a kontroll (20 °C) növények. A levelek hidrogén-peroxid felhalmozása is kisebb mértékű a hidegedzett növényekben (alsó 2 fotó). Két fajtát vizsgáltunk a kísérletben: a Himalaya tavaszi árpa erősen fogékony a kórokozó iránt, a Hardy őszi árpa fajta közepes fogékonyságot mutat. A hidrogén-peroxid jelenlétét DAB festéssel mutattuk ki.

B) *P. teres* f. *teres* makroszkópikus tüneteinek értékelése. Minden kezelés esetében 10 inokulált primer levél tüneteit számszerűsítettük. Az elhalt levélfelületek nagyságát jelző hányadost képeztünk a levelek teljes felületének arányában kifejezve.

C) Félkvantitatív PCR vizsgálattal igazoltuk, hogy a *P. teres* f. *teres* gomba növekedése is részben gátolt a hidegedzett növényekben. A gomba biomassza képzését *P. teres* glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*GAPDH*) gén szekvenciájára specifikus primerpár segítségével vizsgáltuk. Az agaróz gél zsebeibe pipettázott PCR termékek mintafelvitelét árpa *ubikvitin* szekvenciát amplifikáló primerpár alkalmazásával egységesítettük.

4.2.3. Hidegedzés hatása árpagének transzkripciójára

Árparamintáink hidegedzést követő génexpressziós változásait egy laboratóriumunkban készített, mintegy 1500 árpa EST-t (kifejeződött szekvenciadarabot) reprezentáló microarray (gén-chip) segítségével vizsgáltuk. Tekintettel arra, hogy a hidegedzés jelentősen fokozta a növények oxidatív stresszel szembeni toleranciáját, ezért a redox folyamatokhoz köthető transzkripciós változások megfigyelése különösen hangsúlyos volt számunkra. Az elemzés a reálisan elvárhatónál sokkal kevesebb eltérően kifejeződő transzkriptum kimutatását tette csupán lehetővé, és ezek között sem találtunk olyan aktivált géneket, amelyek az árparsejtek antioxidáns folyamataiban vettek részt (21. ábra).



21. ábra: Hidegedzés hatása Hardy fajtájú őszi árpa transzkriptum szintjeire microarray módszerrel vizsgálva. Az eltérően kifejeződő árpa transzkriptumokat EST GenBank azonosítóikkal és feltételezett biológiai szerepük megnevezésével jelöltem. Rank Products módszerrel számolt 0,1 hamis találati aránynál (FDR) kisebb értékkel rendelkező transzkriptumokat vettem figyelembe. A piros színű sávok jelölik az aktivált géneket, a zöld színű sávok a represszált mRNS szintet mutató géneket. A microarray lemezek felületére hidegedzett és edzetlen árpanövények RNS frakciójából készült cDNS mintákat vittem fel, melyeket két különböző fluorofórral jelöltem. Minden transzkriptumszint érték 8 hibridizáció átlagát mutatja: kezelésenként (hidegedzett árpanövények és edzetlen növények) 2 független biológiai RNS minta, mintánként 2 külön lemezre kijuttatva, egy-egy EST klón minden lemezre 2x rányomtatva.

Két eltérően kifejeződő gén a fotoszintetikus működésben játszik szerepet, a RUBISCO fehérje nagy alegységét kódoló gén aktiválódik, a II. fotokémiai rendszer (PSII) CP43 reakciócentrumát kódoló gén represszálódik hidegedzett növényekben. Két háztartási gén, a *glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenázt* és a *poliubikvitint* kódoló gének transzkriptum szintjei

megemelkedtek, míg egy *glutathion-S-transzferáz* izoforma kifejeződése visszaszorult. Két antimikrobiális fehérjét kódoló gén expressziója fordítottan változott hidegedzés hatására árpában: egy *1,3-béta-glükózidáz* gén aktiválódott, egy *tionin* fehérjét kódoló gén viszont represszállódott. Szintén aktiválódott még egy savas-foszfátzént prediktált fehérjét kódoló gén is (21. ábra).

4.2.4. Kereszttolerancia vizsgálataim fő következtetései és az eredmények hatása a munka tárgyát felölelő tudományterületre

Búza és árpanövények hidegedzésével vissza tudtuk szorítani az oxidatív stresszt okozó paraquat és hidrogén-peroxid kezelések szövetkárosító hatását a növények leveleiben. Hidegedzéssel korábban már idéztek elő paraquattal szembeni toleranciát különböző növényfajokban (Bridger és mtsai 1994, Streb és mtsai 1999). A metil-viologén, tehát a paraquat gyomirtószer hatóanyaga erős elektron akceptor, ami a kloroplasztizok I. fotokémiai rendszerében fejt ki hatását. Jelenléte szuperoxid szabadgyök képződést eredményez, ami membránkárosodáshoz és sejthalálhoz vezet (Dodge 1994, Váradi és mtsai 2000). Hidrogén-peroxid kezelés hatására szintén oxidatív stressz és nekrotikus sejthalál következik be a növényi szövetekben. Ennek kiváltásához a hidrogén-peroxid néhány millimól koncentrációjú oldata is elegendő (Halliwell és Gutteridge 2006). Mindkét kémiai kezelés drasztikus következményekkel jár a növényi sejtek redox egyensúlyára nézve.

Nekrotróf gombakórokozók fertőzése együttjár a megbetegített növényi szövetekben fellépő oxidatív stresszel (Able 2003). Tekintettel arra, hogy a hidegedzés fokozta kísérleteinkben kalászos gabona növények oxidatív stresszel szembeni toleranciáját, megvizsgáltuk, hogy előzetes hidegedzéssel lehet-e befolyásolni két árpafajta ellenállóságát a nekrotróf *Pyrenophora teres* f. *teres* kórokozóval szemben. Eredményeink rávilágítottak arra, hogy hidegedzéssel javítható a gombakórokozó iránti ellenállóság mind a rezisztens, mind a fogékony árpa genotípusban, és ez megnyilvánult mind az enyhébb betegségi tünetekben, mind a gomba gyengébb növekedésében. Hidegedzéssel korábban idéztek már elő betegség-ellenállóságot más növény-kórokozó kölcsönhatásokban (Golebiowska és Wedzony 2009, Szechynska-Hebda és mtsai 2015, Plazek és Zur 2003, Seo és mtsai 2010, Pocięcha és mtsai 2013). 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.

Hidegedzett árpanövényekben eltérően kifejeződő transzkriptumok között egyrészt két fotoszintézisben részt vevő gén emelhető ki. A fotoszintetikus gének működésének változása az alacsony hőmérsékletre való alkalmazkodás fontos génexpressziós szinten megfigyelhető jelensége (Winfield és mtsai 2010, In és mtsai 2005, Nguyen és mtsai 2009). Aktiválódott egy *endo-1,3-béta-glükánáz* gén is, melyeknek ismert az áttelelés folyamatában betöltött szerepe, azonban antifungális hatása is feltételezhető (Balasubramanian és mtsai 2012). Egy *savas foszfatáz* is fokozott génátíródást mutatott, ami vegetatív raktározó fehérjékkel mutat szekvencia hasonlóságot (Besser és mtsai 2000).

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.

Agathokleous és munkatársai (2019) D1-es folyóiratban megjelent dolgozatukban idézik kutatásunk eredményeit, mint a hidegedzéssel kiváltott prekondicionálás példáját más környezeti stresszekkel szembeni tolerancia előidézésére. Dyda és munkatársai (2019) a *Physiologia Plantarum* folyóiratban közölt kutatási cikkükben a kereszttolerancia jelenségét és ezen belül az oxidatív robbanás fontos szerepét emelik ki munkánkra hivatkozva. Juurakko és munkatársai (2021) a hidegedzés és a betegségellenállóság kapcsolatát, tehát a kereszttoleranciának ezt a különleges megnyilvánulását hangsúlyozzák eredményeinken keresztül.

4.3. Furmint szőlő aszúsodásának transzkriptom szintű vizsgálata

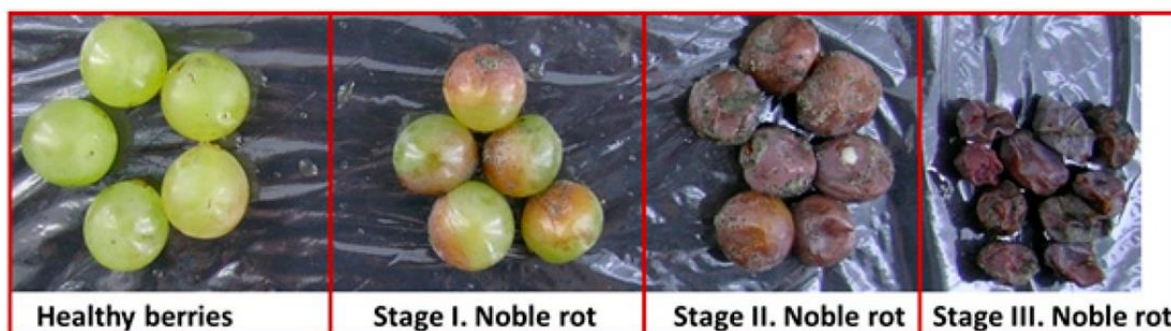
A *Botrytis cinerea* (szürkepenész) az egyik legfontosabb növénykórokozó fonalas gomba faj (Dean és mtsai 2012), éves kártétele világviszonylatban 10 és 100 milliárd dollár közötti összegre becsülhető (Weiberg és mtsai 2013). Gazdasági szempontból a legfontosabb gazdanövénye a szőlő (*Vitis vinifera* L.). A szőlőbogyók *Botrytis* iránti fogékonysága az érés

során drasztikusan megemelkedik (Kelloniemi és mtsai 2015). 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 (22. ábra). Abban az esetben, ha az érésben lévő szőlő tartósan hűvös, csapadékos időjárást kap, szürkerothadás alakul ki. Nemesrothadás kialakulásához viszont egy rövid (néhány napos) párás, esős időt követő hosszú száraz őszi időjárás szükséges, melynek során a csapadékmentes, száraz, napsütötte, olykor szeles nappalokat hűvös párás éjszakák váltják (Ribéreau-Gayon és mtsai 2006, Vannini és Chilosi 2013). Tokaj-Hegyalján a Tisza és a Bodrog folyók közelsége segíti az éjszakai pára kialakulását, ezen kívül a vulkanikus alapkőzet (andezit, riolit és ezek tufái), továbbá az aszúsodásra hajlamos Furmint és Hárslevelű fehérszőlő fajták termesztése mind kedvez a kiváló minőségű nemesrothadt szőlőből készült borok előállításának. Nemesrothadás során a bogyók színe csokoládébarnára változik, töppednek, mazsolásodnak (22. és 23. ábrák). Közben a szőlőbogyókban értékes illat és aromakomponensek termelődnek, szürkerothadás során viszont érzékszervi szempontból kedvezőtlen vegyületek keletkeznek az érintett bogyókban (Steel és mtsai 2013, Dankó és mtsai 2021). Kísérleteinkben a tokaji borvidék zászlóshajójának tekinthető Furmint szőlőfajta transzkriptom szintű vizsgálatát végeztük el RNS szekvenálás segítségével, melynek eredményeit a nemzetközi szakirodalomban közölt más nemesrothadt és szürkerothadt szőlőminták transzkripciós mintázat eredményeivel vetettünk össze. Eddig a nemesrothadt mintáink szőlősejtjeinek hormonanyagcserével és jelátvitellel, valamint redoxfolyamatokkal kapcsolatos génexpressziós változásait dolgoztuk fel és értelmeztük, a szőlő transzkriptom egyéb aspektusai és a kölcsönhatásban résztvevő másik partner, tehát a *B. cinerea* fonális gomba gén kifejeződésének adatai még további elemzésekre várnak. Tekintettel arra, hogy ennek a nagy adatmennyiséget szolgáltató elemzésnek az eredményeként a kiértékelt anyagcsere-útvonalakban és funkcionális csoportokban nagyszámú eltérően kifejeződő gén feltételezhető szerepét tárgyalom, ezért ebben a fejezetben az áttekinthetőség érdekében az adatokból levonható következtetéseket is beleszövöm az eredmények ismertetésébe.



22. **ábra:** A szőlőbogyó – *Botrytis cinerea* kölcsönhatás két eltérő tünetekkel járó megnyilvánulása Furmint fajtájú szőlőn. A) Nemesrothadt (aszúsodott) bogyókat tartalmazó fürt. B) Szürkerothadt fürt. A fotók a Tokaj-hegyaljai Mád község Betsek és Szent Tamás dűlőiben készültek.

A Furmint aszúsodása során bekövetkező molekuláris szintű változások feltárásához a szőlőbogyókat négy fázisba soroltuk: kezdve az ép epidermisszel rendelkező, *Botrytis* tüneteket nem mutató bogyókkal, majd folytatva az aszúsodás korai, középső és végső fázisában lévő bogyókkal (23. ábra).

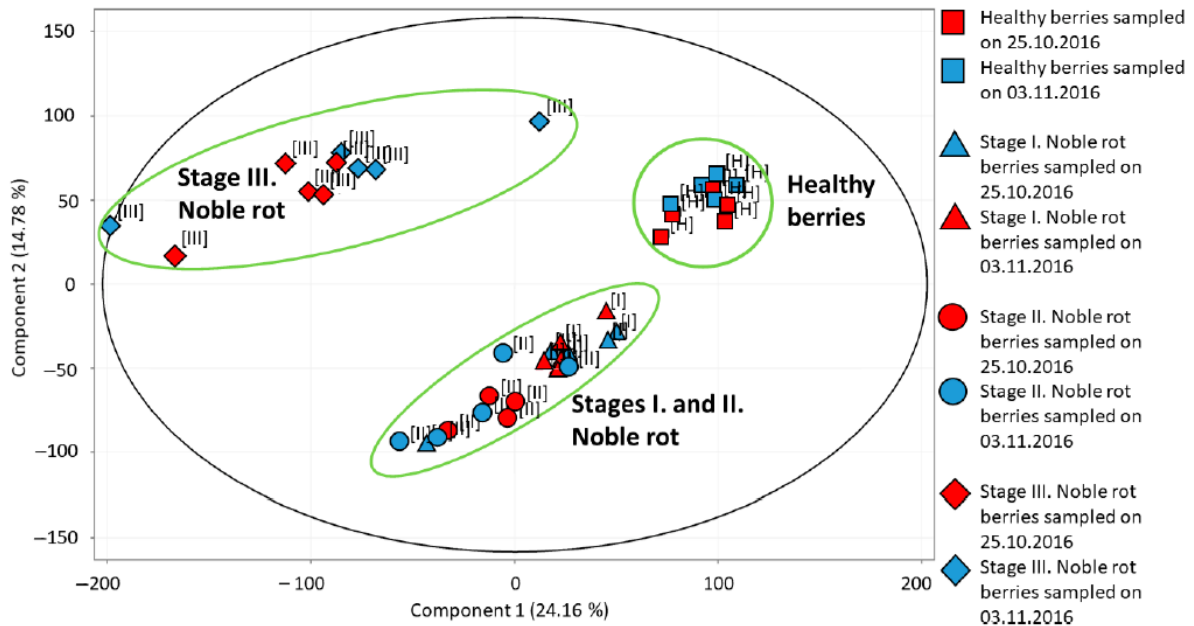


23. **ábra:** Az ábra a vizsgálatokhoz használt botritzált szőlőbogyó minták jellegzetes tüneteit mutatja. Négy különböző típusú *Vitis vinifera* cv. Furmint bogyót gyűjtöttünk, melyek jól képviselték az aszúsodás egymást követő fázisait: egészséges bogyókat és a töppedéssel járó aszúsodás három egymást követő szintjét reprezentáló bogyókat használtunk a kísérletekben.

4.3.1. Furmint és Semillon szőlőfajták nemesrothadása során hasonló transzkripciós mintázatok figyelhetőek meg

Szőlőmintáink egymást követő fázisainak a szárazanyag-tartalma (mg/g) a következőképpen alakult: Egészséges, ép bogyók – $0,228 \pm 0,028$ SD (szórás), I. fázisú aszúsodott bogyók – $0,255 \pm 0,008$ SD, II. fázisú aszúsodott bogyók – $0,285 \pm 0,065$ SD, III. fázisú aszúsodott bogyók – $0,603 \pm 0,065$.

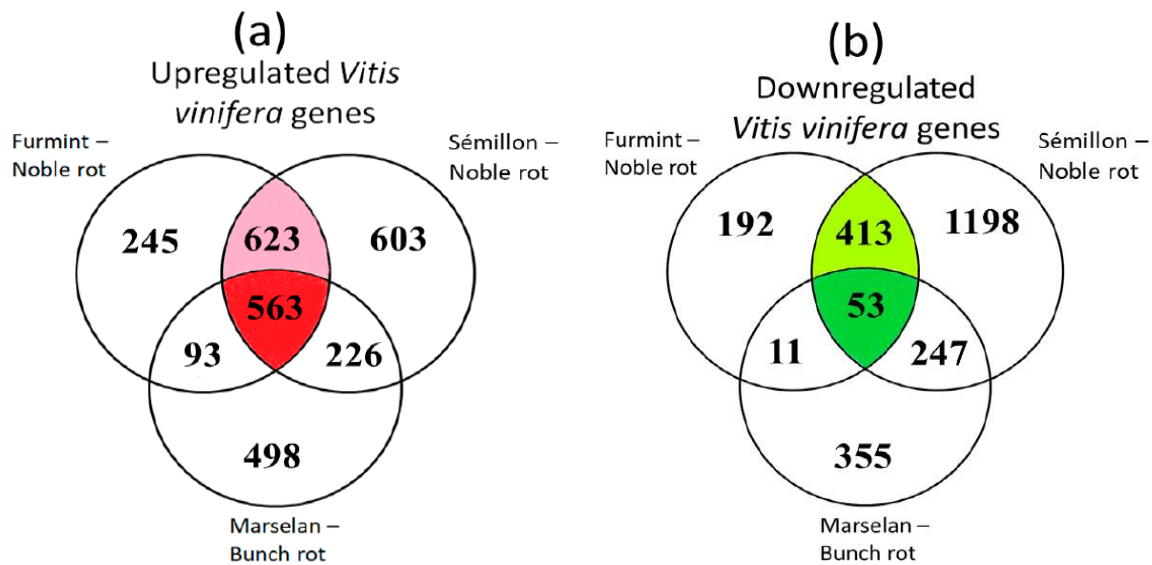
Furmint szőlőbogyó mintáink transzkriptom adatsorának felhasználásával főkomponens elemzést (PCA) végeztünk (24. ábra). Ábránkra tekintve látható az, hogy a PCA külön csoportokba foglalja az egészséges bogyókat és a III. fázisú aszúsodott bogyókat (transzkriptom mintázatuk alapján), azonban a két korábbi aszúsodási fázist (aszú I. és II.) nem választja szét egymástól. Az elemzés által nyert első főkomponens (PC1) részesedése a teljes varianciából 24,16 %, a második főkomponens (PC2) részesedése pedig 14,78 %. Ez utóbbi főként a korábbi aszúsodott fázisokat különíti el az ép bogyók transzkriptom mintázatától és a kész aszúbogyók (III. fázis) génexpressziós mintázatától. Eredményeink megvitatása során az ép bogyók transzkriptom mintázatának és a korábbi (I.-II.) aszúsodott fázisok összehasonlítására helyezem a hangsúlyt. A III. aszúsodási fázis mintázatának adatait azért nem tárgyalom, mert a szőlőbogyó sejtek életképességét vizsgáló kísérleteink tapasztalata szerint a kész aszúbogyók esetében a héj és bogyóhús (exo- és mezokarp) sejtjei döntő többségükben elhalnak.



24. ábra: Aszúsodás egymást követő fázisainak transzkriptom mintázat adatsorából készült főkomponens elemzés. Egészséges, I., II. és III. aszúsodási fázisban lévő *Vitis vinifera* cv. Furmint bogyók mintáit elemeztük, melyeket 2016 október végén és november elején gyűjtöttünk.

A Furmint szőlőbogyókban aszúsodás során bekövetkező génexpressziós változások ismertetését olyan módon vezetem be, hogy ismertetem az elemzésünk során kimutatott aktivált és represszált gének számát, összehasonlítva egyúttal ezek átfedéseit két korábbi szőlő-*Botrytis* transzkriptom kísérlet adataival. Az első tanulmányban Blanco-Ulate és munkatársai (2015) Semillon szőlőfajta természetes nemesrothadásának transzkripció mintázatát elemezték ültetvényből gyűjtött szőlőbogyó minták RNS szekvenálásával. A másik kísérletben Kelloniemi és munkatársai (2015) Marselan fajta bogyóit fertőzték *B. cinerea*-val és a bogyókat laboratóriumi körülmények között szürkerothadást eredményező feltételek között inkubálták, majd a bogyók génexpressziós mintázatát microarray vizsgálattal elemezték. A Furmint és a Semillon fehérszőlő fajták, a Marselan pedig kékszőlő. Furmint esetében az aszúsodás I. fázisában lévő bogyók (23. ábra) eredményeit hasonlítottam össze a Semillon kísérlet II. fázisú nemesrothadt mintáinak eredményeivel, mert a két kísérlet bogyóinak vizuális értékelése alapján ezek feleltethetőek meg leginkább egymásnak (Blanco-Ulate és mtsai 2015).

A szürkerothadt minták elemzésénél az inokulációt követően 2 nappal gyűjtött minták eredményeit hasonlítom a nemesrothadt adatokkal (Kelloniemi és munkatársai 2015). Az aktivált szőlőgéneket szemügyre véve megállapítható, hogy 1524 gén mRNS szintjének növekedését tudtuk kimutatni Furmint fajtában az aszúsodás I. fázisában. Ezeknek 78 százaléka (1186 gén) aktiválódott Semillon nemesrothadása során is. Marselan szürkerothadásakor aktiválódott 1380 génnek ugyanakkor csak 57 százaléka (789 transzkriptum) található meg a Semillon nemesrothadása során indukálódott gének között (25/a. ábra). A represszáladott gének listáját szemügyre véve a Furmint-Semillon összehasonlítás 70 %-os átfedést mutat, a Marselan-Semillon összehasonlítás pedig 45 %-os átfedést (25/b. ábra).



25. **ábra:** Eltérően kifejeződő gének számának és átfedésének összehasonlítása Furmint és Sémillon szőlőfajták nemesrothadása, valamint Marselan fajta szürkerothadása során. Furmint I. aszúsodási fázisának transzkripciós mintázat adatait hasonlítottuk Sémillon II. nemesrothadási fázisának adataihoz (Blanco-Ulate és mtsai 2015), mert morfológiai szempontból ezek feleltethetők meg leginkább egymásnak. A szürkerothadt minták Marselan szőlő *B. cinerea* gombával történő mesterséges fertőzése után, laboratóriumi körülmények között folytatott vizsgálatból származtak 48 órával az inokuláció utáni állapotot tükrözve (Kelloniemi és mtsai 2015). a) Aktivált szőlőgének (botritizált és ép szőlőbogyó minták transzkriptum szintjeinek összehasonlítása alapján). b) Represszált szőlőgének.

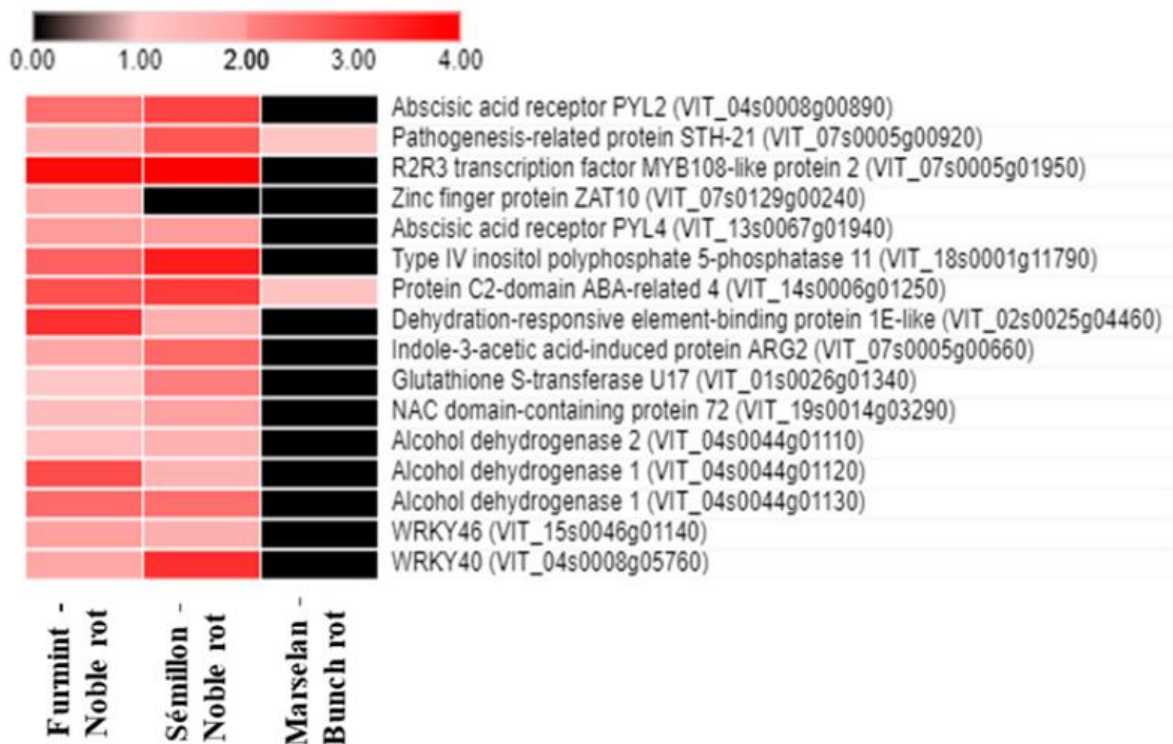
Ezek alapján leszögezhetjük azt, hogy a nemesrothadt Furmint és Sémillon fajták transzkripciós mintázata lényegesen jobban hasonlít egymásra, mint a szürkerothadt Marselan és a nemesrothadt Sémillon (vagy Furmint) mRNS mintázata.

A növény-kórokozó kölcsönhatások kialakulásában nagyon fontos szerepet játszik a sejtek redox állapota és a növényi hormonok anyagcseréje (González-Bosch 2018, Coelho és mtsai 2019). A saját nemesrothadt Furmint RNS szekvencia adatbázisunk birtokában megvizsgáltam azt, hogy a szőlőbogyóban kimutatható transzkripciós változásokkal meg lehet-e részben magyarázni az aszúsodás során a növényi sejtekben bekövetkező molekuláris folyamatokat? Segítségül hívtam más publikált szürke- és nemesrothadt szőlőminták génexpressziós változásait tartalmazó adatsorokat is, melyeket felhasználva arra a kérdésre kerestem választ, hogy a redox és hormonanyagcsere változások segítenek-e megérteni az aszúsodás és a szürkerothadás hátterében álló eltérő molekuláris változásokat?

4.3.2. Növényi hormonok anyagcsere-változásaira utaló folyamatok aszúsodott Furmint szőlőbogyó transzkriptomban

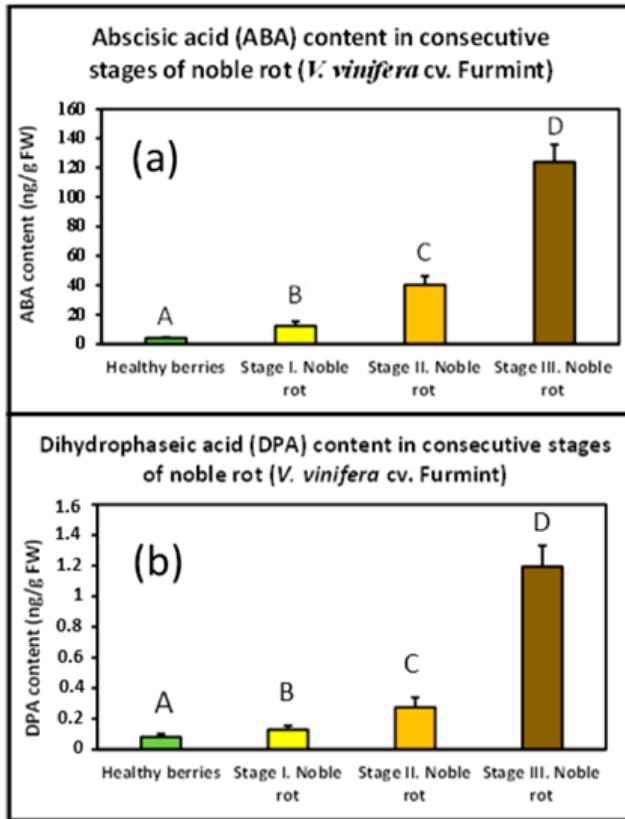
4.3.2.1. Abszizinsavhoz köthető génexpressziós változások

Nemesrothadt Furmint szőlőmintáinkban az abszizinsavhoz (ABA) köthető gének markáns aktiválódását tapasztaltuk (25. ábra). Mindenek előtt kiemelem a *PYL2* és *PYL4* abszizinsav receptor gének megnövekedett transzkripció aktivitását. A *PYL2* és *PYL4* receptorfehérjéket a patogenezishez köthető fehérjék PR10 csoportjába sorolják (Jain és Kumar 2015), feltételezik továbbá, hogy a *PYL* receptorok integráló szerepet töltenek be az ABA, a jázmonsav (JA) és az antocianin vegyületek felhalmozódása között (Loreti és mtsai 2008, Lackman és mtsai 2011). Kimutattuk még az ABA-függő és szárazságstresszel szembeni toleranciához köthető több transzkripció faktor aktiválódását (*Dehydration-responsive element-binding protein 1E-like*, *NAC domain-containing protein 72*, *Abscisic acid-insensitive 5*), és több ozmotikus stresszhez köthető *Late Embryogenesis Abundant* (LEA) szőlő gén indukcióját (*VIT_14s0006g01250*, *VIT_07s0005g00660*). A LEA fehérjék fokozott jelenlétét szoros összefüggésbe hozzák a sejtek kiszáradással szembeni toleranciájával (Hundertmark és Hinch 2008, Lim és mtsai 2018). Egy másik ABA jelátvitelhez köthető génexpressziós változás két *Hypersensitive to ABA1* (*HAB1*) szőlőgén repressziója (*VIT_04s0008g01420* és *VIT_11s0016g01780*). Az *Arabidopsis* *HAB1* fehérje 2C protein foszfatáz aktivitással bír, ami az ABA jelátvitel fontos negatív regulátora (Leonhardt és mtsai 2004). A *PYL2* és *PYL4* ABA receptorokkal kapcsolatban kimutatták, hogy fizikai kölcsönhatást létesítenek a *HAB1* foszfatázzal (Lackman és mtsai 2011, West és mtsai 2013). A fenti nemesrothadt Furmintban tapasztalt eltérésekhez hasonló génműködésbeli változások figyelhetők meg a Semillon fajta nemesrothadása során is. Ezzel szemben Marselan szőlőfajtában előidézett szürkerothadás nem jár együtt az ABA anyagcseréhez és jelátvitelhez kapcsolódó gének transzkripciójának markáns áthangolódásával (26. ábra).



26. *ábra*: ABA jelátvitelhez köthető szőlőgének (Log₂ értékben kifejezve) Furmint és Sémillon szőlőfajták nemesrothadása során, valamint Marselan szőlő szürkerothadása során. A nemesrothadás erősen aktiválja az ABA jelátvitelhez köthető gének kifejeződését, a szürkerothadás viszont nem. Furmint I. aszúsodási fázisának transzkripció mintázat adatait hasonlítottuk Sémillon II. nemesrothadási fázisának adataihoz (Blanco-Ulate és mtsai 2015), mert morfológiai szempontból ezek feleltethetők meg leginkább egymásnak. A szürkerothadt minták Marselan szőlő *B. cinerea* gombával történő mesterséges fertőzése után, laboratóriumi körülmények között folytatott vizsgálatból származtak 48 órával az inokuláció utáni állapotot tükrözve (Kelloniemi és mtsai 2015).

Az ABA-hoz köthető gének transzkripció mintázatának nemesrothadás során tapasztalható látványos átrendeződése felvetette annak kérdését, hogy vajon a bogyók ABA tartalmában történik-e változás Furmint aszúsodása során. Ezt UHPLC-MS/MS vizsgálattal ellenőriztük, melynek során kimutattuk, hogy mind az ABA, mind az egyik fő metabolitja a dihidrofazeinsav (DPA) mennyisége ugrásszerűen megemelkedik már aszúsodás korai szakaszában (27. *ábra*). Érett szőlőbogyók szürkerothadása során ugyanakkor, vagy kivi termések *Botrytis* fertőzése nyomán nem emelkedik meg a szövetek ABA koncentrációja számottevően (Coelho és mtsai 2019, Li és mtsai 2020).



27. *ábra*: Aszúsodás hatása az abszcizinsav (ABA) és dihidrofazeinsav (DPA) tartalomra Furmint fajtájú szőlőbogyókban. Az egyes aszúsodási fázisok átlagait 6 független biológiai minta analitikai elemzése alapján számítottuk ki. A mérési adatokat varianciaelemzés előtt log2 transzformációval korrigáltuk. Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jelölnek ($P \leq 0,01$). a) Furmint szőlőbogyók ABA tartalma az egymást követő aszúsodási fázisokban. b) Furmint szőlőbogyók DPA tartalma az egymást követő aszúsodási fázisokban.

Ezek az eredmények összegezve arra utalnak, hogy az ABA az aszúsodás kialakulásában kulcsszerepet játszó szignál molekula lehet, ami részben magyarázattal szolgálhat arra is, hogy milyen molekuláris változások állhatnak annak hátterében, hogy a szőlőbogyó - *B. cinerea* kölcsönhatás aszúsodást, vagy szürkerothadást eredményez-e végül.

4.3.2.2. ERF transzkripciós faktorok

Aszúsodás során a legtöbb etilénhez köthető szőlőgén, ami eltérő transzkripciós aktivitást mutat, az *ERF* (*Ethylene Response Factor*) transzkripciós faktorok csoportjába tartozik. Furmint aszúsodása során számos ERF transzkriptum szintje jelentősen emelkedett: *ERF109* (VIT_03s0063g00460), *ERF17* (VIT_04s0008g02230), *ERF98* (VIT_05s0049g00500), *ERF71* (VIT_07s0005g00820), *ERF11* (VIT_07s0141g00690), *ERF12* (VIT_10s0003g00130), *ERF16* (VIT_11s0016g00670), *ERF54* (VIT_12s0059g00280), *ERF3* (VIT_12s0059g01460 és VIT_19s0090g01080), *ERF2* (VIT_16s0013g00890), *ERF10* (VIT_18s0001g10150) és *ERF23* (VIT_18s0089g01030). Szürkerothadás során a felsorolt ERF transzkripciós faktorok nem aktiválódnak (Kelloniemi és mtsai 2015, Agudelo-Romero és mtsai 2015). Az *ERF109* a

transzkripciós faktorok APETALA2/etilén-válasz csoportjába tartozik, mely sóstressznek kitett *Arabidopsis* növényekben aktiválja a programozott sejthalál inhibitorait és részt vesz a jázmonsav által közvetített jelátvitelben sebzésnek kitett szövetekben (Bahieldin és mtsai 2018, Zhang és mtsai 2019). Az ERF109 transzkripciós faktorra RRTF1-ként is hivatkoznak (Redox Responsive Transcription Factor 1), amelyet az *Arabidopsis* redox jelátviteli hálózat egyik kulcsmolekulájaként tartanak számon (Matsuo és mtsai 2015). Kiemelem még az ERF71 transzkripciós faktort, amit *Arabidopsis*-ban az oxigén-hiányos állapotra adott növényi válasz egyik meghatározó szabályozó faktoraként tartanak számon (Park és mtsai 2011, Eysholdt-Derzsó és Sauter 2017). Aszúsodott Furmint mintáinkban nem csupán az ERF71 szőlő ortológja, hanem annak String adatbázis alapján prediktált kölcsönható partnereit kódoló gének is aktiváltak, tehát az oxigén szenzor *cysteine oxidase 2* izoformák (*VIT_08s0056g01300*, *VIT_14s0108g00090*, *VIT_17s0000g05790*), a nitrogén-oxid felhalmozódását ellensúlyozó *non-symbiotic hemoglobin 1* (*VIT_03s0063g01960*) és a későbbiekben még tárgyalt *alcohol dehydrogenase 1*. Ezek az ERF71 kölcsönható fehérjék a nemzetközi szakirodalomban a növények hipoxia stressz iránti adaptációjának fontos szereplőiként jelennek meg (Hebelstrup és mtsai 2012, Weits és mtsai 2014, Dolferus és mtsai 1994).

4.3.2.3. Auxinhoz köthető transzkripciós folyamatok

Számos auxin anyagcseréhez és jelátvitelhez kapcsolható génexpressziós változás tetten érhető Furmint nemesrothadása során. Ilyenek egyebek mellett két auxin-responsive protein transzkriptum (*VIT_08s0058g01160*, *VIT_09s0002g00650*), egy *ARG7-like* gén, egy *SAUR50* gén, egy *IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 6* gén (*VIT_18s0001g02570*) és egy *type IV inositol polyphosphate 5-phosphatase 11* gén (*VIT_18s0001g11790*). Ezek a nemesrothadásra aktiválódó gének azonban hasonlóan megemelkedett transzkriptum szinteket mutatnak Marselan szürkerothadása során is (Kelloniemi és mtsai 2015). A valóban csak aszúsodásra jellemző auxinhoz köthető génexpressziós változások főként represszált gének körét foglalják magukba. Ilyenek például az auxin által indukált *ubiquitin superfamily protein 22D* (*VIT_14s0030g02310*), az *auxin transporter-like protein 2* (*VIT_03s0038g02140*), vagy az *auxin response factor 18* (*VIT_13s0019g04380*). Ez a tapasztalat összecseng Lovato és munkatársai (2019) megfigyelésével, akik Garganega szőlőbogyók mesterségesen indukált nemesrothadása

során az auxin anyagcsere-útvonal gátlásáról számoltak be RNS szekvenálással végzett transzkriptom szintű vizsgálatuk alapján.

4.3.2.4. Citokininekhez köthető génexpresszió

Furmint aszúsodása csak néhány specifikus (szürkerothadás során nem tapasztalható) citokininekhez köthető transzkripció változást idézett elő a szőlőbogyó sejtekben. A legfontosabb ezek közül a *histidine kinase 4* citokinin receptor gén (*VIT_01s0011g06190*) gátolt működése.

4.3.2.5. Szalicilsavhoz köthető transzkripció változások

Két szőlő *salicylic acid-binding protein 2* izoforma (*VIT_00s0253g00140*, *VIT_00s0253g00150*) transzkripció aktivitása megemelkedett aszúsodott Furmint szőlőbogyókban. A második izoforma (*VIT_00s0253g00150*) *Arabidopsis* ortológja (*AtMES1*) metil-szalicilát-észteráz aktivitású fehérjét kódol, azonban rendelkezik bizonyos fokú metil-jázmonát iránti szubsztrát specificitással is. Az *AtMES1* fehérje kifejeztetése *salicylic acid binding protein 2*-csendesített dohány növényekben komplementálta a csendesített növényekben sérült szisztemikus szerzett rezisztencia kialakítására való képességet (Vlot és mtsai 2008). Ide tartozik még, hogy két *salicylate 1-O-methyltransferase* izoforma (*VIT_12s0057g01060*, *VIT_12s0057g01070*) kifejeződése visszaszorult Furmint aszúsodása során.

4.3.2.6. Jázmonsavhoz köthető génexpressziós folyamatok

A jázmonsav anyagcserében szerepet játszó gének közül két *jasmonate O-methyltransferase* izoforma (*VIT_18s0001g12890*, *VIT_18s0001g12900*) transzkripció aktivitása nőtt meg számottevően Furmint aszúsodása során. Ez a transzkripció válasz nem nemesrothadás specifikus, hiszen Marselan szőlőbogyók szürkerothadása során szintén erősen kifejeződnek ezek a gének (Kelloniemi és mtsai 2015). A *jasmonate O-methyltransferase*-ok katalizálják a metil-jázmonát képződését jázmonsavból. A metil-jázmonát illékony vegyület, ami a növények fejlődésében és a kórokozókkal szembeni védekezésükben egyaránt fontos szerepet játszik.

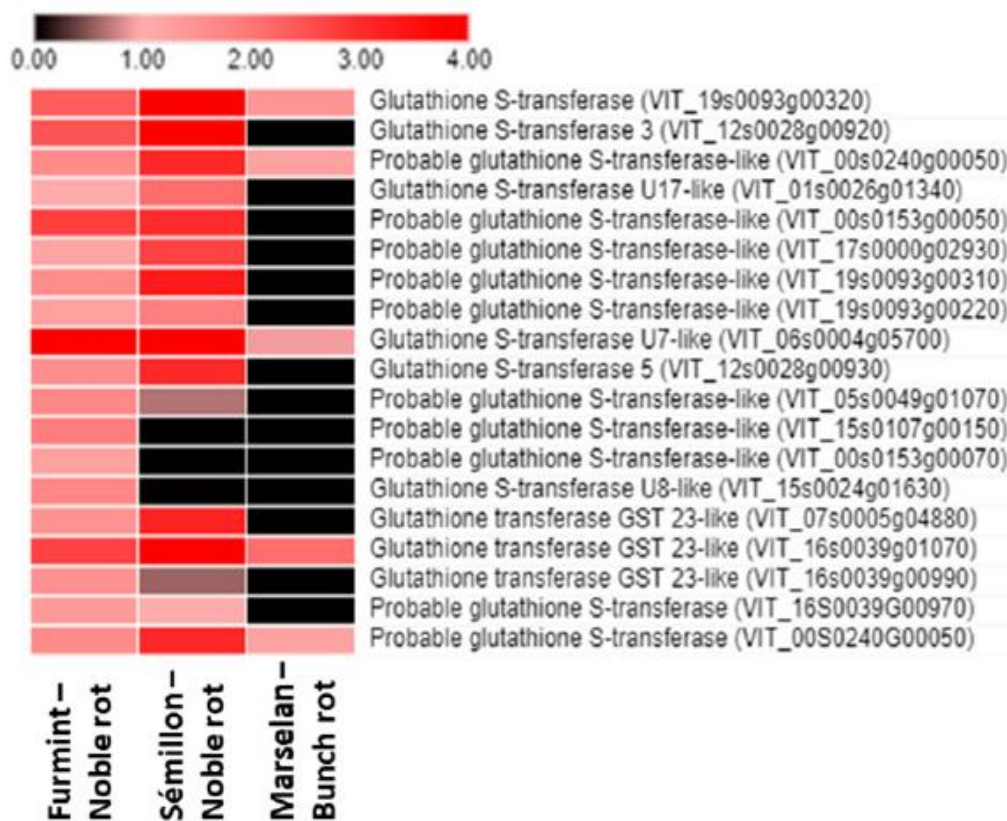
Megemlítem még, hogy egy hydroxyjasmonate sulfotransferase gén működése (*VIT_13s0084g00240*) erősen gátolt Furmint aszúsodása során, ami specifikus szőlőbogyók nemesrothadására nézve. A szulfonálódási reakció inaktív állapotúvá alakítja a biológiailag aktív jázmonsavat, és ennek a reakciónak a gátlása azt jelenti, hogy aszúsodás közben a szőlőbogyó biológiailag aktív jázmonsav szintje változatlanul magas szinten marad (Klein és Papenbrock 2004).

4.3.3. Redox folyamatok nyomon követése aszúsodott Furmint transzkriptomban

Furmint transzkriptom adatsorunkból kiválasztottunk egy másik szeletet is, azoknak a géneknek a körét, melyek kapcsolatban állnak a szőlősejtek redox állapotával, illetve részt vesznek a sejtek redox szabályozásában. Korábbi nagyléptékű génexpressziós vizsgálatok már jeleztek fontos redox folyamatokhoz köthető növényi mRNS válaszokat szőlőbogyók nemesrothadása során (Blanco-Ulate és mtsai 2015, Lovato és mtsai 2019).

4.3.3.1. Glutation S-transzferázok

Az egyik legmarkánsabb redox folyamatokhoz köthető transzkripciós változás nemesrothadt Furmint szőlőbogyókban a *glutation S-transzferáz (GST)* gének szinte egyöntetű aktiválódása. Transzkriptom szintű elemzésünk során nagyon sok GST fehérjét kódoló gén expressziója növekedett drasztikusan (27. ábra). Tizenkilenc *GST* izoforma indukcióját tapasztaltuk mintáinkban, szemben a Marselan szőlőbogyók szürkerothadása során kimutatott 5 *GST* gén megemelkedett transzkriptum szintjével (Kelloniemi és mtsai 2015). Semillon nemesrothadása során is a Furminthoz hasonló mérvű *GST* mRNS válasz figyelhető meg (28. ábra).



28. *ábra*: Glutathion-S-transzferáz (GST) szőlőgének transzkriptum szintjei (Log₂ értékben kifejezve) Furmint és Sémillon szőlőfajták nemesrothadása során, valamint Marselan szőlő szürkerothadása során. A nemesrothadás erősen aktiválja a GST gének kifejeződését, a szürkerothadás viszont nem. Furmint I. aszúsodási fázisának transzkripció mintázat adatait hasonlítottuk Sémillon II. nemesrothadási fázisának adataihoz (Blanco-Ulate és mtsai 2015), mert morfológiai szempontból ezek feleltethetőek meg leginkább egymásnak. A szürkerothadt minták Marselan szőlő *B. cinerea* gombával történő mesterséges fertőzése után, laboratóriumi körülmények között folytatott vizsgálatból származtak 48 órával az inokuláció utáni állapotot tükrözve (Kelloniemi és mtsai 2015).

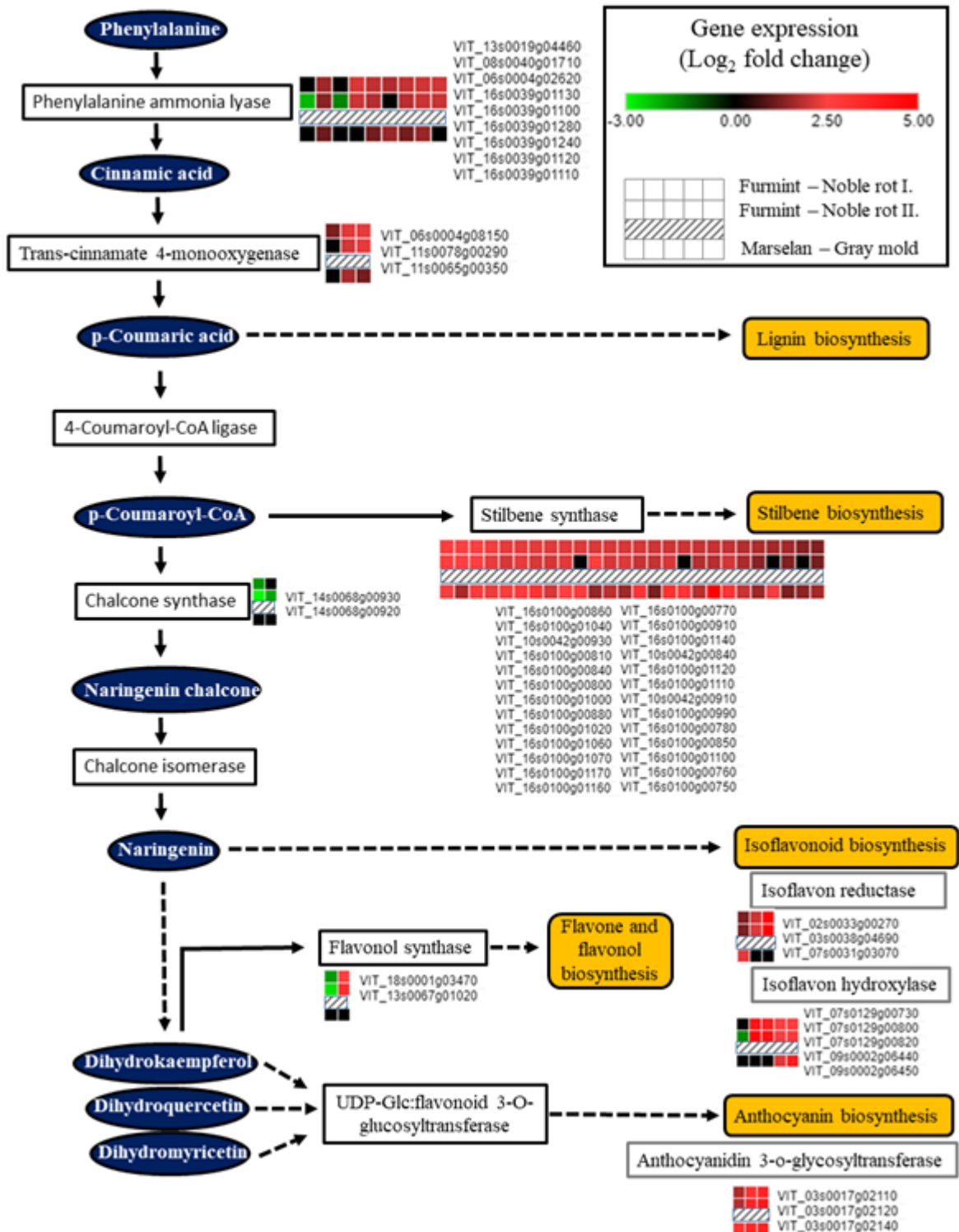
A GST fehérjéknek tulajdonított hagyományos biológiai szerep az endogén és külső forrásból származó toxikus hatású anyagok méregtelenítése glutathion konjugátumok képzésével. A GST gének tau osztályát (GSTU gének) abiotikus stressz faktorok és mikrobák fertőzése egyaránt aktiválhatja (Wagner és mtsai 2002, Gullner és munkatársai 2018). Fontos szerepet játszanak a növényi sejtek oxidatív stressz elleni küzdelmében (Kilili és mtsai 2004). A tau osztályba sorolt GSTU10 kapcsán fény derült arra, hogy részt vesz a transz-rezveratrol szőlősejtekből való kijutásában (Martínez-Márquez és mtsai 2017). Több phi osztályba tartozó szőlő GST gén (*VvGST2*, *VvGST3*, *VvGST4*) expressziója megemlekedik a bogyók héjában az érés során (kék szőlőfajta esetében), azzal egy időben, ahogy bekövetkezik az antocianinok felhalmozódása (Conn és mtsai 2008). Ezekről a GST fehérjéről kiderült, hogy antocianinok és proantocianidinek (tanninok) szállító molekuláiként működnek a citoplazma és a vakuólum

között (Conn és mtsai 2008, Pérez-Díaz és mtsai 2016). Az antocianidinek a többnyire glikozilált antocianinok cukormentes párjai (Khoo és mtsai 2017).

4.3.3.2. Transzkripció változások a fenilpropanoid anyagcsere-útvonal tagjait kódoló génekben

A fenilpropanoid anyagcsere-útvonal aktiválódása és benne a flavonoidok felhalmozódása jellemző biokémiai folyamat kórokozókkal kölcsönhatásba lépő növényi sejtekben (Agati és mtsai 2012). Fenilpropanoid vegyületek, mint a nem-flavonoid sztilbének, lignánok és fenolsavak, vagy a flavonoid flavonok, flavonolok, flavanonok, flavanolok, antocianinok és kalkanok fontos alkotói a növényi sejtek nem-enzimatikus antioxidáns készletének (Atanasova-Penichon és mtsai 2016, Sharma és mtsai 2019).

Nemesrothadás folyamata erősen indukálta a fenilpropanoid anyagcsere korai lépéseit felelős fehérjéket kódoló szőlőgének transzkripcióját (29. ábra). Számos *fenilalanin ammónia-liáz* és *transzfahéjsav 4-monooxigenáz* izoforma aktiválódását figyeltük meg, melyek olyan kulcsfenolvegületek bioszintézisében vesznek részt, mint a fahéjsav, vagy a p-kumársav. Ezeknek az enzimeknek az mRNS-szintű aktiválódása nem csupán az aszúsodás sajátja, hanem inkább a növényi sejtek általános válasza a *B. cinerea* fertőzésére (hiszen szürkerothadás hatására is erősen fokozódik ezeknek a géneknek a kifejeződése) (Kelloniemi és mtsai 2015, Agudelo-Romero és mtsai 2015). Nincs ez másként a *sztilbén-szintáz* (*STS*) izoformák bekapcsolódásával sem, amik két nagy gén klaszterbe szerveződve helyezkednek el a 10. és 16. szőlőkromoszómákon. Az itt kódolt *STS* izoformák közül 26 gén transzkripciója emelkedik meg jelentősen Furmint aszúsodása és Marselan szürkerothadása során (29. ábra).



29. *ábra*: Furmint szőlő nemesrothadása és Marselan fajtájú szőlőbogyók szürkerothadása hasonlóan befolyásolják a fenilpropanoid anyagcsere-útvonal elemeit kódoló gének mRNS szintű kifejeződését.

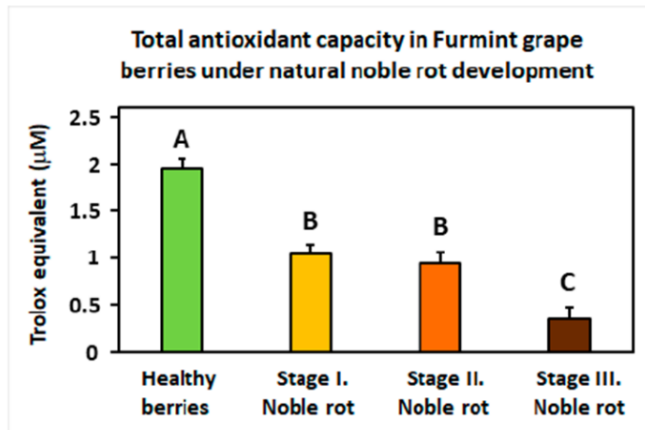
Két *kalkon-szintáz* (*CHS*) izoforma kifejeződése (*VIT_14s0068g00920* és *VIT_14s0068g00930*) ugyanakkor ellentétes irányba módosul, Furmint nemesrothadásakor represszálódnak, Trincadeira fajta szürkerothadása során pedig aktiválódnak (Agudelo-Romero és mtsai 2015). Elképzelhető, hogy a fenilpropanoid útvonal STS és CHS által katalizált ágai versengenek egymással szőlő nemesrothadása során, hasonlóan ahhoz, ahogy ezt peronoszpóra fertőzött szőlőlevelek esetében leírták (Vannozzi és mtsai 2012). Feltételezik egyébként azt is, hogy a kalkon-szintázok gátlása összefügghet a szőlő legfontosabb *flavonol-szintáz* izoformájának az *FLS1* génnek a transzkripció szintű repressziójával (ami a 29. ábrán a *VIT_18s0001g03470* Ensembl azonosítóval szerepel). Az *FLS1* flavonol-szintáznak meghatározó szerepe van a szőlőbogyók flavonolszintjének kialakításában (Owens és mtsai 2008). Blanco-Ulate és munkatársai (2015) csökkent flavonol-szintáz aktivitást mértek Semillon nemesrothadása során.

Fehérszőlő fajták bogyóira nem jellemző az antocianinok felhalmozódása, ez a jelenség kékszőlő fajták bogyóinak az érése és színváltozása során következik be. Semillon fehérszőlő nemesrothadása során azonban markáns antocianin képződés megy végbe (Blanco-Ulate és mtsai 2015) és ezzel összhangban mi is az antocianinok bioszintézisében fontos szerepet játszó *antocianidin 3-O-glikoziltranszferáz* gének fokozott aktivitását tapasztaltuk fehér bogyójú Furmint aszúsodása során. Kimutattuk végül az izoflavonoid anyagcserét befolyásoló *izoflavon-reduktáz* és *izoflavon-hidroxiláz* gének indukcióját Furmint nemesrothadása során. Ezen gének által kódolt fehérjék a pterokarpán fitoalexinek szintézisével hozhatók összefüggésbe pillangósvirágú növényekben (Deavours és Dixon 2005).

4.3.3.3. A szőlőbogyó antioxidáns rendszerének egyéb komponenseit kódoló gének

Furmint aszúsodása együtt jár a szőlőbogyó antioxidáns rendszeréhez tartozó egyes komponensek transzkripció aktivitásának csökkenésével. Megfigyelhető egyrészt a peroxiszómában lokalizált katalázokat kódoló gének (*VIT_00s0698g00010* és *VIT_04s0044g00020*) repressziója, továbbá a kloroplasztisban lokalizált karotinoid bioszintézisben részt vevő fehérjéket kódoló gének (pl. *VIT_05s0062g01110*) gátlása. Ezek az mRNS szintű antioxidáns változások szürkerothadt szőlőbogyókban nem mutathatóak ki.

Furmint nemesrothadása szintén együtt jár a Trolox ekvivalens mértékegységben kifejezett totál antioxidáns kapacitás jelentős csökkenésével (30. ábra).



30. ábra: Trolox egyenértékben kifejezett össz antioxidáns kapacitás egészséges és nemesrothadt (I., II. és III. fázisú) Furmint szőlőbogyókban. Az értékek 5 független biológiai minta átlagait mutatják. Az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jelölnek ($P \leq 0,01$).

Az aszkorbát-glutation ciklus enzimei ugyanakkor mRNS szinten nem mutatnak változást Furmint aszúsodása közben. Kézenfekvő felvetni azt a kérdést, hogy miért csökken bizonyos antioxidáns hatású fehérjéket kódoló gének transzkripciója nemesrothadás során? Elképzelhető, hogy az antocianin fenil-propanoidok felhalmozódása az egyik oka az egyéb antioxidánsok mRNS szintű gátlásának. Az antocianinok optikai szűrőként működnek, amik védik a kloroplasztiszokat a nagy fényintenzitás által okozott fotoinhibíciótól (Feild és mtsai 2001, Schaberg és mtsai 2003, Neill és Gould 2003). A szőlőbogyókkal kapcsolatban ugyanis érdemes szem előtt tartanunk, hogy a növény aktív fotoszintézist folytató szervéről van szó (Pandey és Farmahan 1977, Martínez-Esteso és mtsai 2013). Az antocianinok felhalmozódása hasonló élettani következményekkel járhat a növényi szövetek számára, mint a hosszabb ideig tartó sötétben való inkubálás *Arabidopsis* növények esetében, aminek jól ismert hatása a kloroplasztiszokban lokalizált antioxidáns hatású fehérjéket kódoló gének transzkripciójának, vagy a peroxiszómákban lokalizált kataláz 2 izoformának a gátlása (Rosenwasser és mtsai 2011).

Az antocianinok egyúttal gyökfogyó hatású vegyületek is (Gould 2004), amelyek helyettesíthetnek más antioxidáns rendszereket a nemesrothadt szőlőbogyókban. Ezzel hozzá is járulhatnak a Trolox ekvivalens totál antioxidáns kapacitásban mért csökkenéshez.

4.3.4. Redox-szabályozott és redox jelátvitelhez köthető gének transzkripciója nemesrothadás során

4.3.4.1. NPR1 kölcsönható *NIMIN-1* és *NIMIN-2* gének

A Non-expressor of PR Genes 1 (NPR1 vagy NIM1) fehérje a növény kórokozókkal szembeni védekezése során kulcsszerepet játszó redox szenzor fehérje. Jóllehet a szőlőben jelenlévő *NPR1/NIM1* izoformák nem aktiválódtak Furmint szőlőbogyók aszúsodása során, az NPR1 fehérjével kölcsönható *NIMIN-1* és *NIMIN-2* fehérjéket kódoló gének (*VIT_07s0005g02070*, *VIT_01s0011g03430*) a mintáinkban kimutatható egyik legnagyobb pozitív irányú expressziós változást mutató transzkriptumokat kódolják. Ez a génkifejeződés változás nemesrothadásra specifikus, hiszen szürkerothadás során a *NIMIN* gének aktiválódása egyáltalán nem következik be (Kelloniemi és mtsai 2015, Agudelo-Romero és mtsai 2015).

Az NPR1 fehérje meghatározó szerepet játszik a növény kórokozók támadása esetén adott védelmi válaszban azáltal, hogy összekötő kapcsot képez a redox- és szalicilsav által közvetített jelátvitelben (González-Bosch 2018). A *NIMIN* fehérjék az NPR1 negatív regulátorai, melyek gátolják a szalicilsav által kiváltott sejtszintű növényi válaszokat, valamint a szisztémikus szerzett rezisztencia jelenségét is (Chern és mtsai 2008, Zwicker és mtsai 2007). A *NIMIN-1* és *NIMIN-2* gének aktiválódása segítheti a Furmint szőlőbogyók *B. cinerea*-val szembeni ellenállóságát aszúsodás során, mert a szalicilsav jelátviteli út jellemzően gátolja a nekrotróf kórokozókkal szembeni védekezés szempontjából meghatározó jázmonsav jelátviteli utat (Glazebrook 2005). A szalicilsav által közvetített anyagcsere-folyamatok *NIMIN* fehérjékkel történő gátlása tehát kedvezhet a szőlőbogyónak a *Botrytis* iránti küzdelemben. Ide tartozik még a *TGA9* (*TGACG MOTIF-BINDING PROTEIN 9*) redox-szenzitív bZIP transzkripció faktor (*VIT_06s0080g00360*) és ennek sejtmagi kölcsönható partnerét kódoló gén, a *ROXY1* CC-típusú glutaredoxin (*VIT_01s0146g00220*) esete, melyek szintén markánsan aktiválódnak mRNS szinten aszúsodás során (szürkerothadás közben viszont nem). A *TGA9*-nek fontos szerepet tulajdonítanak a ROS által közvetített növényi sejtválaszban általános rezisztencia (PTI) esetében (Noshi és mtsai 2016), a *ROXY1* pedig hozzájárul *Arabidopsis* sejtek hidrogén-peroxid felhalmozódásához és a *B. cinerea* iránti fogékonysághoz (Wang és mtsai 2009). A *TGA* transzkripció faktorokkal kapcsolatban korábban bebizonyosodott, hogy az NPR1 fehérje aktivitását ezek is szabályozzák (Herrera-Vásquez és mtsai 2015).

4.3.4.2. MCP1 metakaspáz

A Lesion Simulating Disease 1 (LSD1) fehérje egyszerre tölt be fontos szabályozó szerepet a növények redox- és hormonháztartásában (Czarnocka és Karpiński 2018). Az LSD1 fehérjével képez fizikai kölcsönhatást az MCP1 metakaspáz, ami juvenilis növényi szövetekben a szuperoxid szabadgyökök által elindított programozott sejthalál jelenségének lényeges faktora, öregedő sejtek esetében viszont gátolja a sejthalál folyamatát az autofágia és a vakuólumok szétesésének szabályozása által (Coll és mtsai 2010, 2014). Furmint szőlőbogyók nemesrothadása az MCP1 izoformák (*VIT_16s0013g00210* és *VIT_16s0013g00220*) génkifejeződésének fokozódásával jár együtt, szürkerothadás során azonban ezek a gének nem aktiválódnak (Kelloniemi és mtsai 2015, Agudelo-Romero és mtsai 2015). Tekintettel arra, hogy az aszúsodás érett szőlőbogyókban következik be, ezért itt az MCP1 fehérje második, *Botrytis* által kiváltott nekrozist gátló funkciója (Coll és mtsai 2014) a valószínűbb. A VvMCP1 tehát olyan redox folyamatokhoz köthető metakaspáz fehérje, ami a programozott sejthalál terjedését és a gomba tüneteinek megnyilvánulását szabályozza nemesrothadás során.

4.3.4.3. Redox folyamatokhoz köthető kloroplasztisz fehérjéket kódoló gének gátlása

Furmint nemesrothadásával együtt járó markáns génexpressziós változás figyelhető meg számos kloroplasztiszban lokalizált, redox folyamatokhoz köthető fehérje transzkriptum szintjében. Ezek a gének egyöntetűen represszálódnak. Olyan redox-szabályozott fehérjék találhatóak ebben a csoportban (2. táblázat), melyek jelentős része a keményítő anyagcsere szabályozásában vesz részt (Glaring és mtsai 2012, Ströher és Dietz 2008). A redox-szabályozott kloroplasztisz fehérjék transzkripció szintű gátlása csak a nemesrothadásra jellemző folyamat, ami szürkerothadás során egyáltalán nem jelentkezik. Ez a transzkripció változás összefügghet az aszúsodás közben tapasztalt színváltozással és antocianin felhalmozódással, aminek jelentős hatása lehet a kloroplasztiszok redox folyamataira, amint ezt a 4.3.3.3. alfejezet végén tárgyaltam.

dc_2039_22

2. táblázat: Számos kloroplasztiszban lokalizált redox fehérjét kódoló szőlő gén represszálódik Furmint aszúsodása során. A gének különböző fázisokban mért transzkriptumszint változásai megtekinthetők a **2. mellékletben**.

<i>A. thaliana</i> AGI Code	Corresponding <i>V. vinifera</i> Ensembl ID	Function	Reference
<i>At3g50820</i>	<i>VIT_18s0001g11710</i>	Oxygen-evolving enhancer protein 1	Ströher és Dietz 2008
<i>At3g54050</i>	<i>VIT_08s0007g01570</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase	Ströher és Dietz 2008
<i>At1g32060</i>	<i>VIT_02s0109g00080</i>	Phosphoribulokinase	Ströher és Dietz 2008
<i>At3g55800</i>	<i>VIT_13s0019g03350</i>	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	Ströher és Dietz 2008
<i>At2g39730</i>	<i>VIT_06s0004g05180</i>	Ribulose bisphosphate carboxylase	Ströher és Dietz 2008
<i>At1g09340</i>	<i>VIT_14s0060g00820</i>	Chloroplast stem-loop binding protein	Ströher és Dietz 2008
<i>At1g07320</i>	<i>VIT_06s0004g06140</i>	50S ribosomal protein	Lindahl és Kieselbach 2009
<i>At4g20360</i>	<i>VIT_17s0000g09370</i>	Elongation factor TuB	Lindahl és Kieselbach 2009
<i>At3g29320</i>	<i>VIT_14s0108g01560</i>	Alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme	Glaring és mtsai 2012
<i>At2g39930</i>	<i>VIT_11s0007g00310</i>	Isoamylase 1	Glaring és mtsai 2012
<i>At1g03310</i>	<i>VIT_07s0104g00370</i>	Isoamylase 2	Glaring és mtsai 2012
<i>At4g09020</i>	<i>VIT_18s0001g06520</i>	Isoamylase 3	Glaring és mtsai 2012
<i>At5g64860</i>	<i>VIT_07s0031g01540</i>	4-alpha-glucanotransferase	Glaring és mtsai 2012
<i>At1g11720</i>	<i>VIT_10s0116g01730</i>	Starch synthase 3	Glaring és mtsai 2012
<i>At4g18240</i>	<i>VIT_11s0065g00150</i>	Starch synthase 6	Glaring és mtsai 2012
<i>At3g20440</i>	<i>VIT_19s0090g00920</i>	1,4-alpha-glucan-branching enzyme 1	Glaring és mtsai 2012
<i>At5g03650</i>	<i>VIT_08s0007g03750</i>	1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2	Glaring és mtsai 2012
<i>At1g44575</i>	<i>VIT_18s0001g02740</i>	Photosystem II 22 kDa protein	Muthuramalingam és mtsai 2009
<i>At1g12900</i>	<i>VIT_14s0068g00680</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	Muthuramalingam és mtsai 2009
<i>At1g69830</i>	<i>VIT_14s0068g00420</i>	Alpha-amylase-like 3	Seung és mtsai 2013
<i>At5g04140</i>	<i>VIT_08s0007g05260</i>	Ferredoxin-dependent glutamate synthase	Muthuramalingam és mtsai 2013
<i>At1g68830</i>	<i>VIT_01s0011g03010</i>	Serine/threonine-protein kinase STN7	Muthuramalingam és mtsai 2013
<i>At1g20020</i>	<i>VIT_04s0023g03510</i>	Ferredoxin-NADP-oxidoreductase 2	Hall és mtsai 2010
<i>At5g38430</i>	<i>VIT_17s0000g03690</i>	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	Marchand és mtsai 2006

4.3.4.4. Alkohol-dehidrogenáz 1

Az *Arabidopsis Alkohol-Dehidrogenáz 1 (AtADH1)* szőlő ortológjai (*VIT_04s0044g01110*, *VIT_04s0044g01120*, *VIT_04s0044g01130*) markánsan aktiválódnak Furmint aszúsodása során. Ez a jelenség a nemesrothadás jellegzetessége, szürkerothadásakor nem következik be. Az alkoholos erjedés utolsó lépését (az acetaldehid etanollá alakítását) az alkohol-dehidrogenázok katalizálják. Ezt a kémiai reakciót oxigénhiányos helyzetekben (hipoxia stressz) használják a növények energiaszükségletük fedezésére. Az *AtADH1* redox-szabályozott fehérje (Dumont és mtsai 2018, Wang és mtsai 2012).

Az *AtADH1* nem csupán redox-szabályozott, hanem hozzájárul a növények abszcizinsav érzékenységéhez, és az abiotikus (szárazság, sóstressz), valamint biotikus (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* DC3000) stresszel szemben mutatott ellenállóságához. Túltermeltetve az *AtADH1* fokozza az oldható cukrok felhalmozódását *Arabidopsis* levelekben (Shi és mtsai 2017). Az *AtADH1* fehérje kölcsönható partnereinek szőlő ortológjai, így a *Piruvát-Dekarboxiláz 2 (VIT_08s0217g00100)* és két *aldehid-dehidrogenáz (VIT_06s0004g02060, VIT_14s0066g01550)* szintén eltérően fejeződnek ki Furmint aszúsodása során ép szőlőbogyókkal összehasonlítva (szürkerothadás hatására nem változik a transzkripciójuk). A fehérje-fehérje kölcsönhatások predikcióját a STRING v11 adatbázis segítségével végeztük (Szklarczyk és mtsai 2019). Transzkriptom szintű vizsgálatunkban kimutatott *VvADH1* izoformák részt vehetnek az aszúsodás során bekövetkező cukor felhalmozódásban (Magyar 2011), és működésüket redox szignálok és abszcizinsav is szabályozhatja.

4.3.4.5. WRKY transzkripció faktorok

Két WRKY transzkripció faktor, a WRKY40 és a WRKY46 mRNS szintű kifejeződése nemesrothadásra specifikus módon megemelkedik Furmint aszúsodásakor. Az *AtWRKY46* szőlő ortológja, melyet a *VIT_15s0046g01140* lókuszt kódol, és az *AtWRKY40* ortológja, amit pedig a *VIT_04s0008g05760* lókuszt kódol fokozott transzkriptum szinteket mutat aszúsodó Furmint szőlőbogyókban. Szürkerothadás során nem figyelhető meg e két szőlőgén transzkripció aktiválódása. Az *AtWRKY46* és *AtWRKY40* génekkel kapcsolatban ismert az, hogy redox-szabályozottak (Mehterov és mtsai 2012, Scarpeci és mtsai 2008), tehát oxidatív

stressz esetén fokozódik az átíródásuk. *Arabidopsis thaliana*-ban a WRKY40 fehérje kölcsönhatásba lép a már korábban tárgyalt ERF109/RRTF1 transzkripció faktorral oly módon, hogy az *ERF109* promóter régiójának W box szekvenciájához kötődik (Matsuo és mtsai 2015, Pandey és mtsai 2010).

Nekrotróf gombakórokozó fertőzésére fellépő ROS termelődés fokozza az ERF109 transzkripció aktivitását, biotróf kórokozók és mutualista kölcsönhatást létesítő gombaszervezetek viszont visszaszorítják az ERF109 transzkripcióját (Matsuo és mtsai 2015). WRKY46 és WRKY40 fontos szabályozói az ABA jelátvitelnek és az ozmotikus stresszre adott növényi válaszoknak (Ding és mtsai 2014a, Ding és mtsai 2015, Chen és mtsai 2009). Meg kell jegyeznünk, hogy a tárgyalt két WRKY transzkripció faktoron kívül számos további WRKY TF gén aktiválódik nemesrothadás során (szürkerothadásakor viszont nem változik a kifejeződésük). Ide tartozik a WRKY7 (*VIT_07s0031g00080*, *VIT_18s0001g10030*), WRKY9 (*VIT_12s0055g00340*), a WRKY22 (*VIT_15s0046g02190*) és a WRKY70 (*VIT_08s0058g01390*, *VIT_13s0067g03140*) is. Ezek tárgyalásától azért tekintünk most el, mert nem ismert velük kapcsolatban, hogy redoxszabályozás alatt állnának, vagy részt vennének az ABA (és egyéb hormonok) jelátvitelében.

4.4. Nemesrothadás modellezése klímakamrában, szürkerothadás és nemesrothadás illatanyag markerei

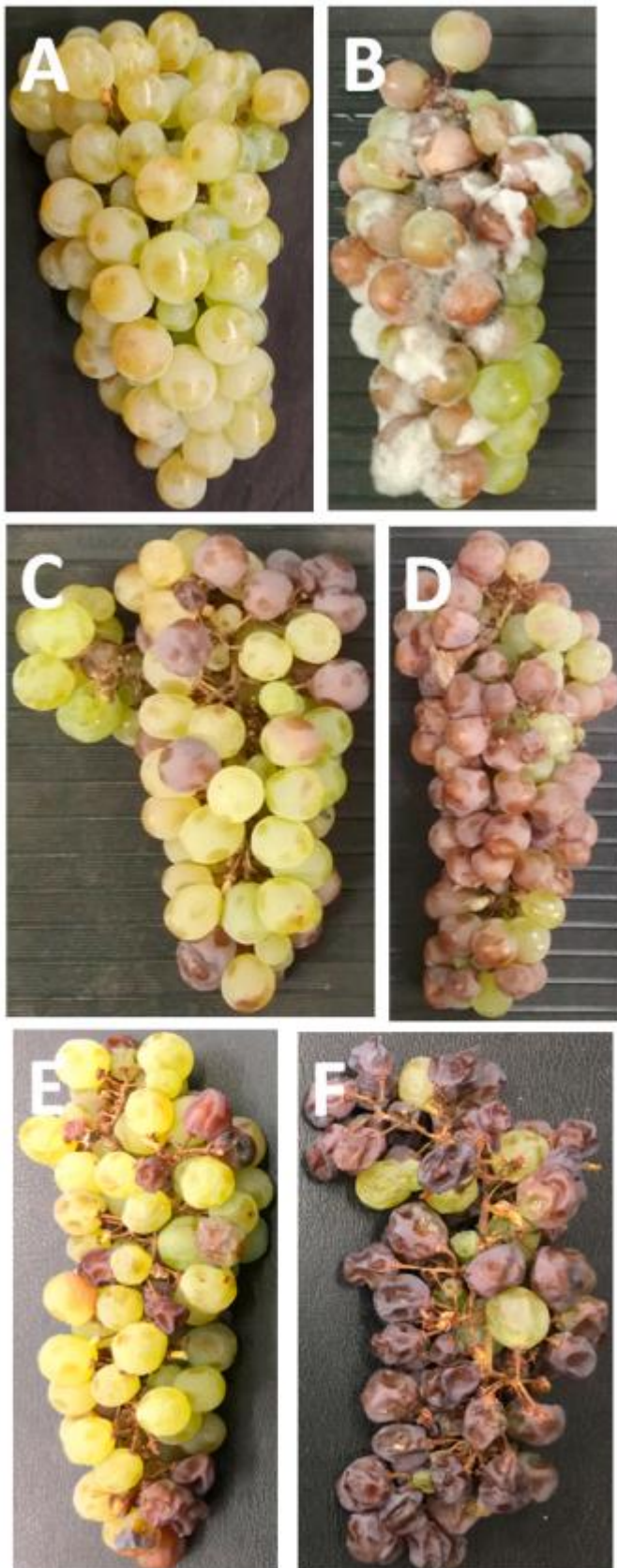
Ebben a fejezetben ismertetett kísérletsorozattal az volt a szándékunk, hogy a Furmint szőlő nemes- és szürkerothadását megpróbáljuk szabályozható hőmérsékletű, páratartalmú és megvilágítású növénynevelő kamrákban modellezni. Másrészt összehasonlítottuk a különböző szőlőbogyó-*Botrytis* kölcsönhatások illatanyag mintázatainak eltéréseit. Jelen vizsgálataink 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 vizsgálatokban azonban összetört bogyóminták, és kipréselt must illatanyag mintázatait kutatták, szemben az általunk végzett ép szőlőfürtök illatanyag termelését célzó dinamikus (nem-invazív) mintavétellel megvalósított vizsgálattal (Vuts és munkatársai 2018). Másrészt munkánk további újdonsága volt a korábbi kutatásokkal szemben, hogy egyszerre, ugyanabban a kísérleti rendszerben tudtuk vizsgálni a szürke- és nemesrothadás illatanyag termelésre és a *Botrytis cinerea* gomba növekedésére, kolonizációjára gyakorolt hatásait.

4.4.1. A nemesrothadás és szürkerothadás párhuzamos előidézése növénynevelő kamrában

Érett, egészséges Furmint fürtöket gyűjtöttünk a Tokaji borvidék egy olyan dűlőjében, ami ismert arról, hogy csúcs minőségű aszúsodott szőlő termeszhető ott. A fürtöket innen klímakamrába szállítottuk, melyet az aszúsodás kialakulásához szükséges hőmérsékleti és páratartalom programra állítottunk be. A fürtök felét tápoldatban kijuttatott *B. cinerea* konídium szuszpenzióval kezeltük, a fürtök másik felét üres tápoldattal permeteztük be. A fürtök mindkét csoportját 24 órán keresztül zárt műanyagdobozban tartottuk, ahol magas páratartalom jelenlétében a *B. cinerea* fertőzése megindulhatott. A gombával kezelt és a gombával nem kezelt fürtöket ezután kétfelé osztottuk, és a fürtök felét nyitott műanyag tálcákon az aszúsodás klimatikus paramétereit szimuláló klímakamrában inkubáltuk tovább, a fürtök másik felét pedig szintén ebben a kamrában, de továbbra is a zárt műanyag dobozban tartottuk. Ez utóbbi kezelésben részesített fürtökön kívántuk a szürkerothadás jelenségét kiváltani. Egy héttel a kísérlet kezdetét követően a nemesrothadás feltételeit modellező paraméterek mellett inkubált fürtök bogyói sötét pirossá változtak és elkezdtek töppedni. A szürkerothadás feltételeit szimuláló dobozban tartott fürtökön ugyanakkor nem tapasztaltunk töppedést, viszont erős *B. cinerea* micélium növekedést láttunk a bogyók felületén (31. ábra).



31. *ábra:* Növénynevelő kamrában mesterségesen botritizált Furmint fajtájú szőlőfürtök. A) Egészséges fürt. B) *Botrytis cinerea* konídium szuszpenzióval (10^5 kon./ml) permetezett fürt, 1 hétig SZÜRKEROTHADÁST eredményező időjárási viszonyokat modellező körülmények között inkubálva. C) Kontroll (*B. cinerea* konídium szuszpenzióval NEM kezelt) fürt, 1 hétig NEMESROTHADÁST eredményező időjárási viszonyokat modellező körülmények között inkubálva. D) *Botrytis cinerea* konídium szuszpenzióval (10^5 kon./ml) permetezett fürt, 1 hétig nemesrothadást modellező körülmények között inkubálva. E) Kontroll (*B. cinerea* konídium szuszpenzióval NEM kezelt) fürt, 3 hétig nemesrothadást modellező körülmények között inkubálva. F) *Botrytis cinerea* konídium szuszpenzióval (10^5 kon./ml) permetezett fürt, 3 hétig nemesrothadást modellező körülmények között inkubálva.

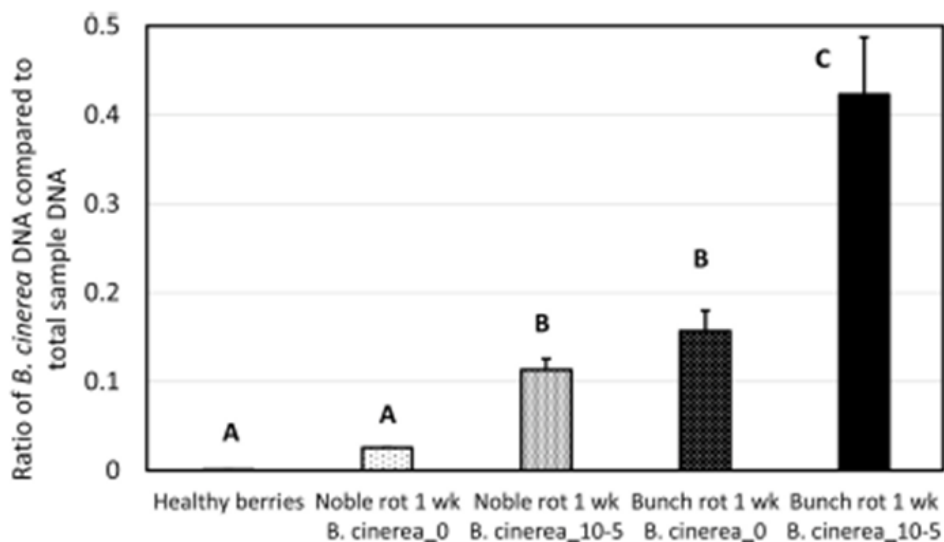
4.4.2. A szürke- és nemesrothadás eltérő módon befolyásolja a szőlőbogyók cukortartalmát és a *B. cinerea* biomassza mennyiségét

A szőlőbogyók oldható szárazanyag-tartalma, amit BRIX-fokban vagy cukorfokban mérünk, megbízhatóan mutatja az összes cukortartalmát, mert az oldható szárazanyagok döntő hányadát az egyszerű cukrok teszik ki szőlőbogyókban (Jayasena és Cameron 2008). Shiraz szőlőfajta bogyóiban a BRIX-fok értékek jó korrelációt mutattak a bogyókban mérhető redukáló cukrok mennyiségével (Davies és Robinson 1996). Szürkerothadást modellező körülmények között a Furmint szőlőbogyók BRIX-fokban kifejezett cukortartalma csökkent. Nemesrothadást-kiváltó klimatikus körülmények mellett a bogyók cukortartalma ugyanakkor emelkedett (3. táblázat). A BRIX-fok értékeket 8 nappal a fürtök szüretelése után mértük (ebből 24 órán át közel 100 %-os relatív páratartalmú közegben inkubáltuk a fürtöket, majd 7 napon keresztül szürke- vagy nemesrothadást előidéző hőmérséklet és páratartalom mellett).

3. táblázat: Oldható szárazanyag-tartalom növénynevelő kamrában botritizált Furmint szőlőbogyókban. Szürke- és nemesrothadt bogyókat vizsgáltunk, melyeknek egy részét előzetesen *B. cinerea* konídium szuszpenzióval kezeltük, a fürtök másik részére (kontroll) pedig az üres tápfolyadékot permeteztük. A táblázatban szereplő értékek 6 biológiai minta átlagát mutatják (mindegyik minta 2 bogyó présnedvét tartalmazta). Az eltérő betűkkel jelölt értékek varianciaelemzéssel és Tukey post-hoc próbával számított szignifikáns különbségeket jelölnek ($P \leq 0,01$).

Healthy berries	Gray mold – uninoculated (1 week)	Gray mold – <i>B. cinerea</i> 10 ⁵ (1 week)	Noble rot – uninoculated (1 week)	Noble rot – <i>B. cinerea</i> 10 ⁵ (1 week)
22.52 ± 0.89 ^a	20.67 ± 0.65 ^b	17.77 ± 0.15 ^c	24.3 ± 0.38 ^d	24.67 ± 0.27 ^d

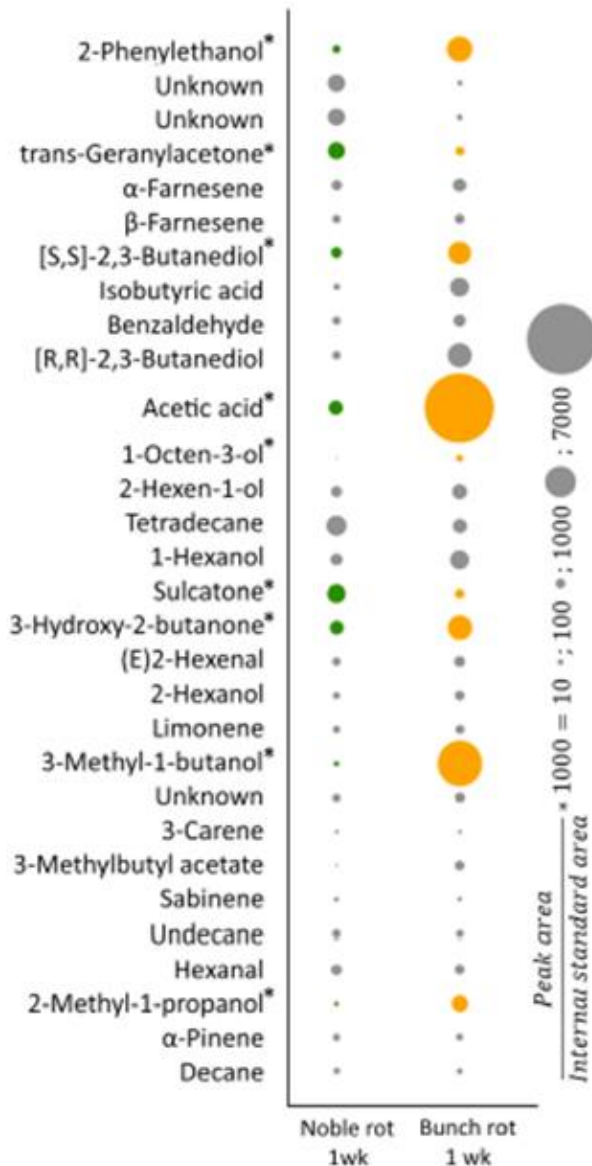
Valós-idejű PCR módszerrel meghatároztuk a *B. cinerea* gomba biomassza mennyiségét is egészséges és botritizált Furmint szőlőbogyókban. A bogyókban kimutatható *B. cinerea* DNS és a minták összes DNS tartalmának arányából hányadost képeztünk. Egészséges bogyókban a gomba elhanyagolható mennyiségben volt jelen. Egy héttel a gombával történő inokuláció után mind a szürkerothadt, mind a nemesrothadt mintákban megnőtt a *B. cinerea* biomassza mennyisége, azonban a szürkerothadt mintákban a növekedés kifejezettebb volt (32. ábra). A gomba fertőzésének bekövetkezése a nem inokulált szőlőfürtökben is kimutatható volt, ám az inokulált fürtökben a gombabiomassza mennyisége magasabb értékeket ért el.



32. *ábra*: *Botrytis cinerea* gomba biomassza képzése növénynevelő kamrában, szürke- és nemesrothadt Furmint szőlőbogyókban. A fürtök egy része előzetesen *B. cinerea* konídium szuszpenzióval lett kezelve, másik részüket csupán az üres tápoldattal permetezték.

4.4.3. A nemesrothadás és a szürkerothadás illatanyag markerei

A szürkerothadás és nemesrothadás tüneteit mutató Furmint szőlőfürt mintáknak megvizsgáltuk az illatanyag kibocsátását egy héttel a kísérlet kezdete után. Harminc illékony komponenst tudtunk kvantitatív módon meghatározni. Ezekből két komponens mennyisége volt szignifikánsan magasabb a nemesrothadt mintákban, a transz-geranilaceton és a szulkaton. Szürkerothadt mintákban 7 komponens mennyisége volt szignifikánsan nagyobb, mint a nemesrothadással érintett bogyókban: a fenetil-alkohol (2-feniletanol), az izobutil-alkohol (2-metil-1-propanol), az izoamil-alkohol (3-metil-1-butanol), az 1-oktén-3-ol, az ecetsav, az acetoin (3-hidroxi-2-butanon) és az [S,S]-2,3-butándiol (33. *ábra*).



33. ábra: Nemesrothadást és szürkerothadást előidéző páratartalmú és hőmérsékletű növénynevelő kamrákban inkubáltunk érett, ép, tünetmentes bogyókat tartalmazó Furmint szőlőfürtöket. Egy héttel a kísérlet kezdete után dinamikus mintavétellel összegyűjtöttük a fürtök által kibocsátott illékony szerves vegyületeket, és GC-MS analitikai módszerrel összehasonlítottuk a szürke- és nemesrothadt fürtök illatanyag mintázatát. Azokat a komponenseket, amelyek kibocsátása szignifikánsan eltért a két különböző típusú szőlőfürt esetében ($P \leq 0,05$), csillaggal (*) jelöltük. Négy-négy független biológiai mintából gyűjtöttünk illatanyag komponenseket, minden egyes minta 2 azonosan kezelt szőlőfürtöt tartalmazott. Az egyes illatanyag komponensek mennyiségét mutató körök átmérője koncentráció tartományt jelöl, amit az ábrán található képlet szerint számítottunk ki.

4.4.4. Nemesrothadás modellezése és illatanyag vizsgálataim fő következtetései és az eredmények hatása

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. Vizsgálataink tapasztalatai megnyitották az utat az előtt is, hogy a nemesrothadás és a szürkerothadás tanulmányozása párhuzamosan lehetővé vált. Erre ültetvényben botritizálódott és gyűjtött szőlőminták esetében nincs lehetőség, mert ott egy adott időben csak a kölcsönhatás egyik vagy másik típusa figyelhető meg (a kettő egyszerre nincs jelen az ültetvényben).

A szürkerothadt bogyókban jelentősen csökkent a Brix-fokban mért cukortartalom. Nemesrothadt bogyók esetében ennek az ellenkezője következett be: emelkedett a szőlőbogyók cukortartalma. Ismert az, hogy a *B. cinerea* gomba táplálkozása során oxidálja a szőlőbogyókban felhalmozódott egyszerű cukrok egy részét (ezt igazolja a szürkerothadt bogyók esetében megfigyelt cukortartalom csökkenés is). Nemesrothadaskor viszont a szőlőbogyón táplálkozó fonalas gomba cukorfelhasználását elfedi és látszólag ellensúlyozza a bogyókban bekövetkező töppedés, dehidratáció, ami a bogyókban található oldott kémiai komponensek koncentrációjának markáns töményedését eredményezi (Magyar 2011, Ribéreau-Gayon és mtsai 2006, Donéche 1993).

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. Ezek közül az első 5 vegyület fokozott termelődését észlelték *B. cinerea*-val fertőzött szőlőből préselt mustban (Lopez Pinar és mtsai 2016). 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

gombasejteken. 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).

4.5. *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 és Mysore 2015). Kiugró fogékonyságot mutat számos növényvírus fertőzése iránt, ami a növény génkészletében található kulcsfontosságú RNS-függő RNS polimeráz mutációjára, az ebből fakadó sérült géncsendesítő képességére és a fertőző vírus RNS molekulák csökkent lebontására vezethető vissza (Yang és mtsai 2004). A *N. benthamiana* a kísérletes növénybiológia területén is kitűnő szereppel rendelkezik, mint növényi modell szervezet. Ennek az okai az alábbiakban keresendőek: (i) ideális gazda szervezete különböző rekombináns növényvírus-alapú vektorrendszerek által működtetett heterológ fehérje expressziós feladatoknak (Klimyuk és mtsai 2014, Moon és mtsai 2014), (ii) hatékonyan alkalmazható sejtjeiben a vírus-indukált géncsendesítés (VIGS) mechanizmusa, ezért kifejezetten alkalmas növényi gének funkciójának vizsgálatára (Bubici és mtsai 2015, Senthil-Kumar és Mysore 2015), (iii) a *N. benthamiana* szintén hasznos eszköze az *Agrobacterium tumefaciens* (jelenleg érvényes tudományos neve *Rhizobium radiobacter*) által közvetített tranziens fehérje expresszióknak, mely jól használható rekombináns fehérjék biológiai

szerepének és sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálatára, vagy akár fehérjék nagyobb mennyiségben való előállítására is (Ding és mtsai 2014b, Goodin és mtsai 2008).

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 igyekeztünk betölteni a következőkben bemutatott vizsgálatainkkal.

A *Cercospora nicotianae* Ellis & Everhart a közönséges dohány (*Nicotiana tabacum* L.) jól ismert kórokozója trópusi és szubtrópusi éghajlatú területeken (a mérsékelt éghajlati övezetben kevésbé jellemző a károsítása), a dohány cercospórák levélfoltosságát (békaszem betegség) okozza (Alasoadura és Fajola 1970, Holliday 1980, Jahagirdar és Hundekar 2010, Shew és Lucas 1991). Konídiumok segítségével szaporodó (anamorf) gomba, az ivaros alakja nem ismert, de valószínűleg tömlősgomba. Egyes *Cercospora* fajok teleomorf alakja a *Mycosphaerella* nemzetséghez tartozik (Sivanesan 1984, von Arx 1983). Hemibiotróf életmódú gombakórokozó, kezdetben élő növényi szöveteket kolonizál, majd a kolonizáció előrehaladtával sejthalált indukál és nekrotrof kórokozóvá válik (Daub és mtsai 2013). A cercospórák levélfoltosság kialakulása szorosan összefügg a gomba cercosporin toxintermelésével, ami egy gazdanövényre nem specifikus toxin (Upchurch és mtsai 1991). A *Cercospora* fajok által termelt cercosporin fény hatására gerjesztődik, és a levegő oxigénjével reagálva reaktív oxigén származékok, elsősorban szingulett oxigén termelődését váltja ki (Daub és Ehrenshaft 2000).

A nemzetközi szakirodalomban mindössze egy korábbi utalás fordult elő arra vonatkozóan, hogy a *N. benthamiana*–*C. nicotianae* kölcsönhatást kísérletes körülmények között alkalmazták (Nielsen és mtsai 1993). Egy cukorrépából származó kitináz hatását vizsgálták transzgenikus *N. benthamiana* növényekben, tesztelve azok cercospórák levélfoltossággal szembeni

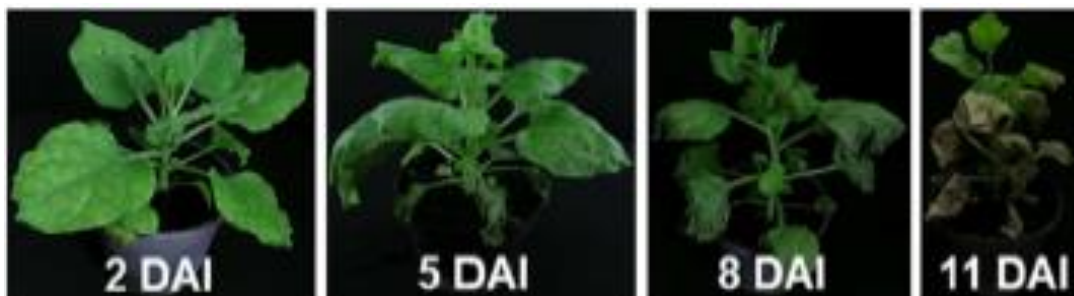
ellenállóságát. Tekintettel arra, hogy a kitináz gén beépítése nem befolyásolta a növények ellenállóságát cercospórával szemben, az észlelt tünetek és a kölcsönhatás egyéb részleteinek bemutatása nem szerepelt a fenti közleményben. A *N. benthamiana* – *C. nicotianae* növény-kórokozó kölcsönhatás jellemzése tehát korábban nem valósult meg, illetve a növény-gomba kölcsönhatás növénybiológiai területen egyáltalán nem hasznosult eddig.

4.5.1. A *N. benthamiana* növény a *C. nicotianae* gombafaj gazdanövénye

A *C. nicotiana* tünetei 3-4 nappal az inokuláció után jelennek meg 9-hetes *N. benthamiana* növényeken. Az első tünetek 2-3 mm-es nekrotikus léziók formájában jelentkeznek, melyek gyorsan nagyobbodnak, majd összeolvadnak kiterjedt, teljes levélrészeket érintő nekrozisokká (34. ábra). A *Cercospora* tünetek a következő 4-5 napban megjelennek a felső fiatal leveleken is, az alsó idősebb levelek pedig teljesen elhalnak (34. és 35. ábrák).



34. ábra: A és B, *Cercospora nicotianae* fonalas gomba által előidézett tünetek *Nicotiana benthamiana* növények levelein 8 (A) és 10 (B) nappal az inokuláció után. C, A gomba konídiumtartói és konídiumai *N. benthamiana* levél felszínén 11 nappal az inokuláció után (a levelet a fertőzés után levágtuk, 3 napig 20 °C-on nedves kamrában inkubáltuk). A növényeket a *C. nicotianae* ATCC 18366 törzsének 5×10^4 konídium/ml koncentrációjú inokulumával fertőztük.

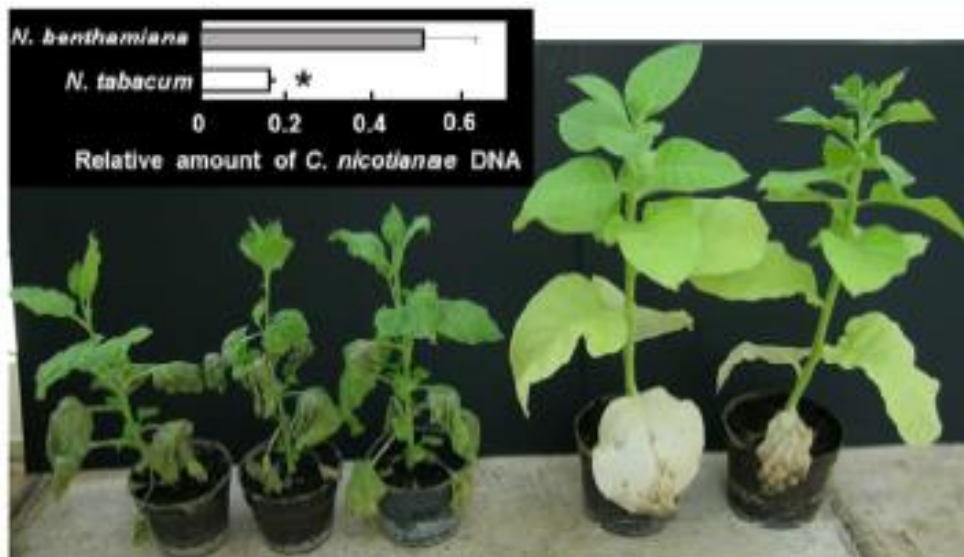


35. ábra: *C. nicotianae* tüneteinek kifejlődése *N. benthamiana* növények levelein 2, 5, 8 és 11 nappal az inokuláció után. A növényeket a *C. nicotianae* ATCC 18366 törzsének 5×10^4 konídium/ml koncentrációjú inokulumával fertőztük.

A betegség tüneteit mutató *N. benthamiana* levelek egy részét levágtuk és 3 napig nedves kamrában tartottuk, melynek hatására sűrű, szürke micéliumtömeg jelent meg a levelek színi és fonáki részén (34. ábra). Ezekből a gombaképletekből lamináris-boxban steril V8 táptalajt tartalmazó Petri-csészékbe vittünk át micélium darabokat, mely tenyészetekből a *C. nicotianae* telepeivel megegyező morfológiájú gombatelepek nőttek ki. Ezekről a V8 táptalajt tartalmazó tenyészetekről konídiumokat mostunk le és a szuszpenziójukkal egészséges *N. benthamiana* növényeket fertőztünk. A növényeket magas páratartalom mellett, 27 °C-on négy napig inkubáltuk, és ekkorra megjelentek rajtuk a *C. nicotianae* feljebb bemutatott nekrotikus tünetei.

4.5.2. A *N. benthamiana* lényegesen fogékonyabb a *C. nicotianae* fertőzése iránt, mint a *N. tabacum*

Összehasonlítottuk a *N. benthamiana* és a *N. tabacum* fogékonyságát a *C. nicotianae* fonalassgomba iránt, hiszen a *N. tabacum* a kórokozó gazdasági szempontból egyik legfontosabb ismert természetes gazdanövénye. Kilenc hetes *N. benthamiana* növényeket és 12 hetes *N. tabacum* növényeket használtunk a kísérlethez, mert erre a korokra fejlesztenek hasonló számú kifejlett levelet (a *N. tabacum* fejlődése lassabb). A gomba fertőzésének makroszkópikus tünetei 3-4 nap után jelentek meg a *N. benthamiana* növényeken. *N. tabacum*-on ugyanakkor 7-12 nap kellett az első látható tünetek kialakulásához. A kórokozó nekrotikus tünetei sokkal kifejezettebbek voltak a *N. benthamiana*-n, mint a *N. tabacum*-on (36. ábra). A *C. nicotianae* biomasszájának felhalmozódását valós-idejű PCR módszer segítségével követtük nyomon. Vizsgálatunk eredménye rávilágított, hogy a gomba genomi DNS készlete nagyobb mértékben mutatható ki a fertőzött *N. benthamiana* levelekben, mint a *N. tabacum* leveleiben (36. ábra). Tapasztalatainkat összegezve arra következtettünk, hogy a *N. benthamiana* lényegesen fogékonyabb a *C. nicotianae* fertőzése iránt, mint a kórokozó legismertebb gazdanövénye, a *N. tabacum*.



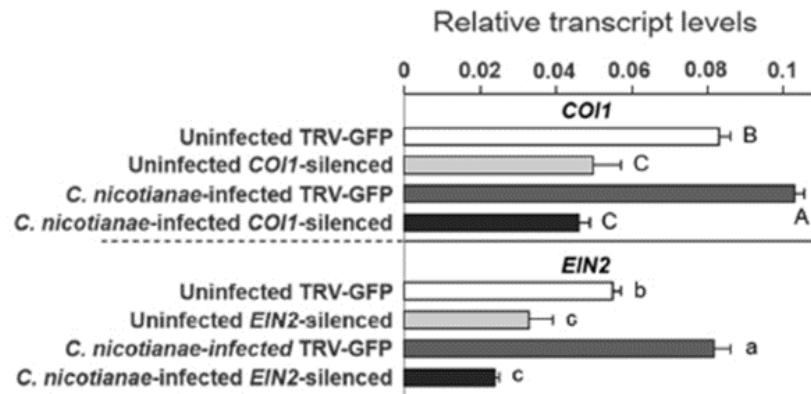
36. ábra: Cerkospórási levélfoltosság tünetei 9 hetes *N. benthamiana* növényeken (bal oldali 3 növény) és 12 hetes *N. tabacum* növényeken (jobb oldali 2 növény) kilenc nappal a gombával való inokuláció után. A növényeket a *C. nicotianae* ATCC 18366 törzsének 5×10^4 konídium/ml koncentrációjú inokulumával fertőztük.

Beillesztett ábra a bal felső sarokban: A *C. nicotianae* relatív biomassza mennyisége *N. tabacum* és *N. benthamiana* növények levelein 9 nappal a fertőzés után. A kórokozó gomba által termelt DNS relatív mennyiségét valós-idejű PCR módszerrel vizsgáltuk, amihez *C. nicotianae* és *N. tabacum* aktin gén szekvenciákra tervezett specifikus primereket használtunk. A vízszintes oszlopok mindkét dohányfaj esetében 4 biológiai minta 3-3 technikai ismétlésének (12 amplifikáció) átlagait és a standard hibát jelölik. Minden egyes minta 3 növény középső helyzetben lévő leveleit tartalmazta. A *N. tabacum* növények szignifikánsan kevesebb *C. nicotianae* DNS-t tartalmaztak ($P \leq 0,01$) Student-féle t-próbával számítva, amit csillaggal (*) jelöltünk.

4.5.3. Növényi stresszhormonok jelátvitelének gátlása tovább fokozza a *N. benthamiana* fogékonyságát *C. nicotianae* iránt

RNS interferencia jelenségén alapuló VIGS módszerrel csendesítettük az etilén jelátvitelében fontos szerepet játszó *EIN2* gén és a jázmonsav jelátvitelében kulcsszerepet játszó *COI1* gén transzkriptum szintjeit *N. benthamiana*-ban. A vizsgálathoz dohány rattle vírus (TRV) vektorba épített géncsenedesítő konstrukciókat használtunk. Mind a jázmonsavval, mind az etilénnel kapcsolatban jól ismert az, hogy jelentős funkcióval bírnak a növények nekrotróf kórokozókval szembeni ellenállóságában. A géncsenedesítés hatását kétféleképpen is nyomon követtük. Egyrészt zöld fluoreszcensz fehérjét (GFP) termelő *N. benthamiana* növényekkel dolgoztunk, a géncsenedesítő konstrukcióink pedig GFP mRNS-t csenedesítő szekvenciát is tartalmaztak. Ennek segítségével láthatóvá tettük a GFP fluoreszcencia visszaszorulását a géncsenedesítő konstrukciókkal kezelt növényekben. Másrészt a *COI1* és az *EIN2* transzkriptumok szintjeit RT-qPCR módszerrel figyeltük és kimutattuk a csenedesítő

konstrukciók gátló hatását mind a fertőzetlen, mind a *C. nicotianae*-vel inokulált növényekben (37. ábra). A transzkriptum szinteket 2 héttel a TRV-konstrukciókkal történő kezelés után elemeztük.

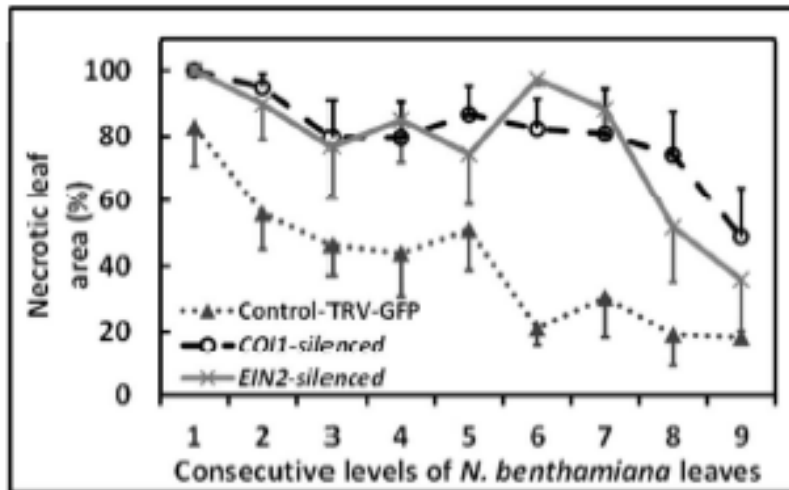


37. ábra: Coronatine-insensitive 1 (*COI1*) és ethylene-insensitive 2 (*EIN2*) gének transzkriptum szintjeinek csökkentése VIGS módszerrel *N. benthamiana* növényekben. A vizsgált gének kifejeződését valós-idejű RT PCR módszerrel határoztuk meg. A kontroll növényeket csak a zöld fluoreszcens fehérjét csendesítő szekvenciát tartalmazó VIGS konstrukcióval (TRV-GFP) kezeltük, ez nem tartalmazott *COI1* vagy *EIN2* csendesítő szekvenciákat. A vízszintes oszlopok minden kezelés esetében 3 biológiai minta 3-3 technikai ismétlésének (9 amplifikáció) átlagait és a standard hibát jelölik. Minden egyes minta 3 növény középső helyzetben lévő leveleit tartalmazta. A különböző VIGS konstrukciókkal kezelt növények leveleiből össz RNS-t vontunk ki 72 órával a *C. nicotianae* fertőzés után. Eltérő betűk Tukey post-hoc próbával számított szignifikáns különbséget jelölnek ($P \leq 0,01$).

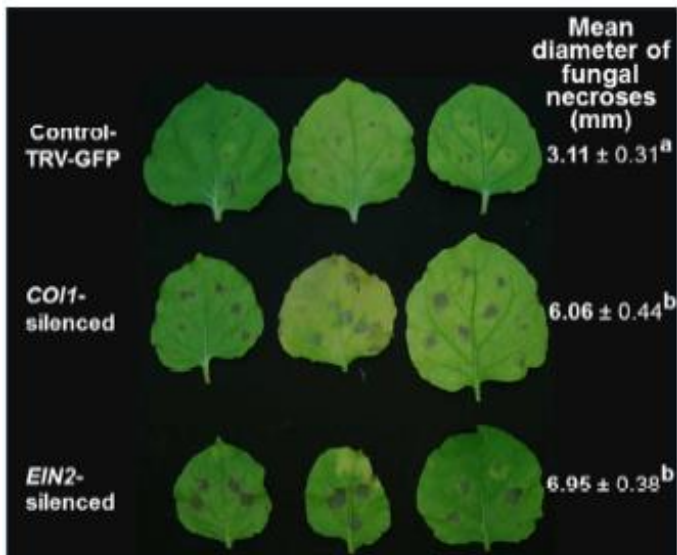
A VIGS kezelések *C. nicotianae* iránti fogékonyságra gyakorolt hatását egész növényeken és levágott leveleken is vizsgáltuk. A *COI1* és *EIN2* transzkriptum szintek csillapítása egyaránt markánsan fokozta a gomba által kiváltott nekrotikus tünetek megnyilvánulását mind a teljes növények fertőzésére irányuló kísérletekben (38. és 39. ábrák), mind a levágott *N. benthamiana* leveleket tartalmazó kísérletekben (40. ábra).



38. *ábra*: *COI1* és *EIN2* gének kifejeződésének csendesítése VIGS módszerrel fokozza a *C. nicotianae* kórokozó gomba által okozott nekrotikus tüneteket *N. benthamiana* növényekben. Üres *GFP*-csendesítő konstrukcióval kezelt növényeket (TRV-GFP, középső 4 növény) használtunk kontrollként. A növényeket a *C. nicotianae* ATCC 18366 törzsének 5×10^4 konídium/ml koncentrációjú inokulumával fertőztük, a fotó 7 nappal az inokulációt követően készült.



39. *ábra*: Cerkospóras levélfoltosság tünetei kontroll (üres TRV-GFP VIGS konstrukcióval kezelt), továbbá *COI1*-csendesítő és *EIN2*-csendesítő VIGS konstrukciókkal kezelt *N. benthamiana* növényeken. Kezelésenként 4-4 növény kilenc levélemeletén számítottuk ki az elhalt levélfelület százalékát GIMP képelemző számítógépes program segítségével 7 nappal a fertőzés után. Az ábrán bemutatott értékek két kísérlet (kísérletenként 4 növény) adatainak összesített átlagát és a standard hibát mutatják. A növényeket a *C. nicotianae* ATCC 18366 törzsének 5×10^4 konídium/ml koncentrációjú inokulumával fertőztük.

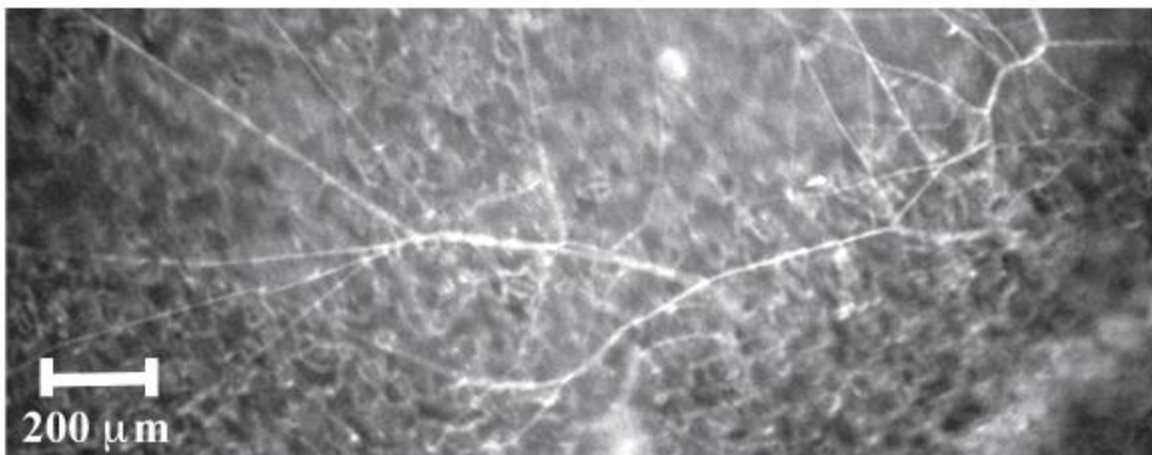


40. ábra: Levágott *N. benthamiana* levelek *C. nicotianae* gomba konídium szuszpenziójával való csepp inokuláció után. A levelek kontroll (üres TRV-GFP VIGS konstrukcióval kezelt), továbbá *COI1*-csendesítő és *EIN2*-csendesítő VIGS konstrukciókkal kezelt *N. benthamiana* növényekről származtak. A növényeket a *C. nicotianae* ATCC 18366 törzsének 5×10^4 konídium/ml koncentrációjú inokulumával fertőztük, 10 µl-es cseppeket kijuttatva a levágott levelek fonákjára. Az ábra jobb oldalán feltüntetett folt átmérőket két független kísérletben, mindegyik kísérletben kezelésként 10-10 levél fertőzésével számítottuk ki. Az átlagokat és a standard hibát tüntettem fel. Eltérő betűkkel jelöltem az egymástól szignifikánsan különböző átlagokat ($P \leq 0,001$), amit Tukey post-hoc próbával

számítottunk ki. A *COI1* és *EIN2* gének VIGS csendesítése fokozza a gomba által okozott nekrotikus foltok átmérőjét.

4.5.4. A *C. nicotianae* szingulett oxigén termelése

A *C. nicotianae* gomba termel egy nemgazda-specifikus poliketid toxint, a cercosporint. Ezzel a toxinnal kapcsolatban ismert az, hogy fény jelenlétében szingulett oxigén ROS képződéséhez vezet a megbetegített növényi szövetekben. Szingulett oxigén kimutatására kifejlesztett fluoreszkáló reagens (szenzor) segítségével mi is láthatóvá tudtuk tenni a szingulett oxigén felhalmozódását *N. benthamiana* leveleken fejlődő *C. nicotianae* hifákban (41. ábra).



41. ábra: Szingulett oxigén kimutatása nekrotikus *N. benthamiana* levélszövetben lévő *C. nicotianae* hifákban. A vizsgálat Singlet Oxygen Sensor Green fluoreszkáló reagens és fluoreszcensz mikroszkóp segítségével történt.

4.5.5. A *Cercospora nicotianae* - *Nicotiana benthamiana* növény-gomba kölcsönhatással elért eredményeim fő következtetései

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 *C. nicotianae*, egy főként *Solanaceae* családkhoz tartozó növényfajokat fertőző konídiumos gomba vizsgálatainkban megbízható kórokozónak bizonyult a funkcionális növénybiológiában alapvető modell szervezetként használt *Nicotiana benthamiana* immunfolyamatainak tanulmányozásához. Nemrég látott ugyanakkor napvilágot az a megfigyelés, hogy a kórokozó a közönséges dohány mellett egy másik gazdasági szempontból fontos növény fajt, a szóját is képes megbetegíteni (Sautua és mtsai 2020). Ebben a munkában hivatkoznak az általunk közölt eredményekre is.

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 cercospórák levélfoltosság betegségével szemben a jázmosav- és etilén jelátvitelnek nagy jelentősége van a vizsgált növényben (Thomma és mtsai 1999, Liu és mtsai 2004, Guo és 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 cercospórák 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 már korábban említett sérült RNS-függő RNS polimeráz működés állhat a *Nicotiana benthamiana* fokozott gombafogékonysága mögött (Yang és mtsai 2004, Ellendorf és mtsai 2009, López és mtsai 2011, Staiger és mtsai 2013, Yang és Huang 2014).

A *C. nicotianae* gyors és látványos nekrotikus tüneteket idéz elő *N. benthamiana* növényeken és a gomba növekedése is jól kvantifikálható az általunk bemutatott qPCR módszerrel. Ezért ígéretes választási lehetőséget jelent *N. benthamiana* gazdanövényen végzett kóréletani és

molekuláris növénykórtani kísérletekhez. A jellemzett növény-gomba kölcsönhatás szintén hasznos lehet még gazda-eredetű géncsendesítéses vizsgálatokban a gomba által kibocsátott virulencia faktorok szerepének feltérképezésében (Andrade és mtsai 2016, Koch és Kogel 2014). Továbbá a szingulett oxigén biológiai szerepének tanulmányozását is szolgálhatja, mivel a *C. nicotianae* által termelt cerkosporin toxin jelenléte szingulett oxigén ROS képződését eredményezheti a megbetegített növényi szövetekben, mint ez látható volt saját és mások munkáiban is (Leisman és Daub 1992, Daub és Ehrenshaft 2000, Tóth és mtsai 2015).

5. Összefoglalás, tézispontok

A reaktív oxigén származékok (ROS) kórélettani szerepének kutatása óriási hagyományokkal bír a Növényvédelmi Kutatóintézetben (Király és El-Zahaby 2000, Barna és mtsai 2003, Ádám és mtsai 1989, Fodor és mtsai 1997). (Intézetünk jelenlegi neve Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet.) Redoxbiológiai irányú kutatásaimban számos új felfedezés született a beteg növények sejtközötti járataiban fellépő oxidatív robbanás jelenségével kapcsolatban. *Arabidopsis thaliana* modell segítségével kimutattam, hogy a nekrotróf növénykórokozó *Alternaria brassicicola* gomba fertőzése során az RBOHD NADPH-oxidáz és a PRX 33-PRX34 sejtfal peroxidáz fehérjék egyaránt hozzájárulnak a kórfolyamat közben megfigyelhető extracelluláris oxidatív robbanáshoz. Ezeknek a kísérleteknek a legfontosabb tudományos újdonsága abban ragadható meg, hogy egy nekrotróf gombanövény kölcsönhatásban, több egyedi növényi gén párhuzamos vizsgálatával jellemeztem az intercelluláris térben felhalmozódó ROS kórélettani szerepét. Igazoltam, hogy az extracelluláris ROS legfontosabb forrásaiként számon tartott növényi fehérjék működése segíti a nekrotróf *A. brassicicola* gomba növekedését, tehát fogékonysági faktoroknak tekinthetők ebben a növény-kórokozó kölcsönhatásban. Eredményeim megerősítik azt a növénykórtani elméletet, mely szerint a kórokozó által megtámadott növényi sejtek oxidatív robbanása nekrotróf kórokozók fertőzését inkább segíti, biotróf (és hemibiotróf) kórokozók fertőzését viszont inkább gátolja (Govrin és Levine 2000, von Tiedemann 1997, Yoshioka és mtsai 2003, Asai és Yoshioka 2009, Proels és mtsai 2010, Mengiste 2012, Barna és mtsai 2012a). A fertőzött növényi szövetek sejtjeinek elhalását ugyanakkor az RBOHD NADPH-oxidáz és a PRX33/PRX34 sejtfal peroxidázok ellentétes módon szabályozzák. A PRX33/PRX34 fehérjék

által termelt ROS támogatják az *Alternaria* fertőzött levelek elhalását, az RBOHD által termelt ROS viszont gátolják a gomba által előidézett sejthalál folyamatot. Az RBOHD sejthalál-szabályozó szerepével és az etilén, valamint a szalicilsav növényi hormonok feltételezett kölcsönhatásával kapcsolatban megalkottam egy modellt (18. ábra). Ennek lényege, hogy az RBOHD a növény kórokozók által megtámadott leveleiben a sejthalál precíziós faktoraként szolgálhat. Az általa termelt ROS alacsonyabb koncentrációban a sejt túlélését szolgálják, magasabb koncentrációban azonban a növényi sejt elhalását idézik elő.

Redoxbiológiai kutatásaimhoz szorosan köthetőek még azok az eredményeim, melyeket aszúsodott Furmint szőlőbogyó minták transzkriptom szintű vizsgálatával értem el. Aszúsodás vonatkozásában (mely a szőlőbogyó és a nekrotróf *Botrytis cinerea* fonalas gomba kedvező kimenetelű kölcsönhatása) ez az első nagyléptékű transzkriptom szintű 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-transzferáz* gének transzkriptum mintázata (génexpresszió növekedés) és a kloroplasztiszbán található redox fehérjéket kódoló gének kifejeződése (génexpresszió csökkenés). Ezt a két molekuláris jelenséget az aszúsodás során bekövetkező színváltozáshoz és antocianin felhalmozódáshoz kötöttem.

A kórokozók által megtámadott növényi sejtek redoxfolyamatainak tanulmányozása mellett kutatói pályám számos állomása kapcsolódik növényi hormonok kórélettani szerepének a vizsgálatához (Pogány 1999, Pogány és mtsai 2004, Pogány és munkatársai 2007, Harrach és mtsai 2008, Barna és mtsai 2012b). Posztdoktori kutatásaim során rávilágítottam a szalicilsav

és az etilén hormonok RBOHD NADPH-oxidázzal fennálló kölcsönhatására (18. ábra), melyek fokozzák az RBOHD működését és az általa termelt ROS mennyiségét (12. ábrán bemutatott farmakológiai kísérlet). Az RBOHD ugyanakkor negatív visszacsatolással gátolja a szalicilsav és az etilén képződését, hiszen RBOHD hiányos növényekben túlermelődik az etilén és a szalicilsav (13. és 14. ábrák), illetve magasabb az etilén bioszintéziséért felelős *ACC-szintáz 6* gén és a szalicilsav jelátviteli út egyik fő markerét kódoló gén, a *PR1* transzkriptum szintje (1. táblázat).

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 transzkripció 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) transzkripció 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).

A növényi hormonok témaköréhez tartozik még szorosán az a megfigyelésem is, hogy a *Nicotiana benthamiana* modellszervezet új kórokozójaként leírt *Cercospora nicotianae* fonalas gomba tüneteit az etilén jelátvitelében kulcsszerepet játszó növényi *EIN2* gén csendesítésével és a jázmosavreceptor komplex fontos tagját kódoló *COI1* gén vírusindukált csendesítésével markánsan vissza lehet szorítani. Ezzel azt bizonyítottam, hogy a *N. benthamiana*-*C. nicotianae* kölcsönhatás a molekuláris növénykórtani vizsgálatok hasznos eszköze lehet a kutatók kezében.

Kidolgoztam végül egy technológiát, amivel a szőlő nemesrothadását ki lehet váltani szabályozott páratartalmú és hőmérsékletű növénynevelő kamrában. Ez a felfedezés egyúttal lehetőséget teremt a nemesrothadás ültetvényben való elősegítésére olyan mezoklimatikus körülmények között is, ami egyébként nem támogatná a nemesrothadás kialakulását. Ugyanebben a kísérletsorozatban kimutattam a szürke- és nemesrothadás jelenségeire külön-külön jellemző több illékony szerves komponens képződését Furmint fajtájú szőlőfürtök segítségével.

Tézis pontok:

- 1) Az RBOHD NADPH-oxidáz és PRX33 és PRX34 sejtfal peroxidázok egyaránt hozzájárulnak a nekrotróf *Alternaria brassicicola* fertőzése nyomán fellépő oxidatív robbanáshoz *Arabidopsis* növények leveleinek sejtközi járataiban.
- 2) Az *Arabidopsis* sejtek extracelluláris oxidatív robbanásának két legfontosabb növényi faktora, az RBOHD NADPH-oxidáz és a PRX33/34 sejtfal peroxidázok működése segíti a nekrotróf *A. brassicicola* kolonizációját *Arabidopsis* gazdanövényen.
- 3) Az RBOHD által termelt reaktív oxigén származékok (ROS) gátolják, a PRX33/34 peroxidázok által termelt ROS viszont fokozzák a gomba által okozott sejthalál folyamatot.
- 4) Az RBOHD az etilénnel, a szalicilsavval és az ERECTA Ser/Thr protein kinázzal kölcsönhatásban fejt ki a sejthalál szabályozásában betöltött szerepét.
- 5) Hidegedzés fokozza a gabonafélék ellenállóságát különböző oxidatív stresszt okozó kémiai kezelésekkel szemben és a nekrotróf *Pyrenophora teres f. teres* gombakórokozóval szemben.

6) A *Nicotiana benthamiana* a hemibiotróf gombakórokozó *Cercospora nicotianae* gazdanövénye és ez a növény-gomba kölcsönhatás molekuláris növénykórtani kutatások céljára használható új modell rendszer.

7) Több szürke- és nemesrothadás elkülönítésére alkalmas illékony szerves komponens képződését azonosítottam Furmint szőlőbogyókból.

8) Furmint szőlő aszúsodása során az abszcizinsav mennyisége és az abszcizinsavhoz köthető növényi gének transzkripciója már a nemesrothadás korai szakaszában jelentősen megemelkedik, ezért az abszcizinsav feltehetőleg fontos szereppel bír az aszúsodás kialakulásában.

9) Azonosítottam több redox állapothoz köthető, illetve redox szabályozott szőlőgén aktiválódását Furmint aszúsodása során.

Köszönetnyilvánítás

MTA doktora értekezésem és a forrásként felhasznált közleményeim nem készülhettek volna el munkatársaim segítségével nélkül. Hálás vagyok ezért Jörg Durner-nek, Páldi Emilnek, Janda Tibornak, Veisz Ottónak és Vida Gyulának, akikkel közös pályázatokat írtunk és vezettünk. Köszönöm Váczy Kálmánnak és Kiss Leventének, hogy meghívtak az általuk indított szőlészeti és borászati projekt kutatói közösségébe. Nagyra értékelem közvetlen munkatársaim, Fodor József, Bozsó Zoltán, Gullner Gábor, Uta von Rad, Harrach Borbála és Oláh Csilla együttműködését, akikkel számos közös kísérletet terveztünk és valósítottunk meg, melyeknek eredményei az értekezés lapjain újra és újra visszaköszönnek. PhD és MSc hallgatóimnak, Kámán-Tóth Evelinnek, Dankó Tamásnak, Nagy Tamásnak és Szám Dórinak nem tudok eléggé hálás lenni, nem csupán a munkájukért, hanem azokért a közös élményekért is, amikor az ötleteikkel és a kérdéseikkel hozzájárultak egy-egy kísérlet vagy

elemzés sikeréhez. Köszönöm Szalai Gabriellának a fitotron kísérletekhez és metabolomikai vizsgálatokhoz nyújtott értékes támogatását, Hamow Kamirának az analitikai, Kalapos Baláznak a bioinformatikai munkához nyújtott pótolhatatlan és gyümölcsöző hozzájárulását. Köszönöm végül Barna Balázs korábbi témavezetőmnek, osztályvezetőmnek és igazgatómnak a személyem felé végzett mentori munkáját és Ádám Attilának a doktori értekezésemhez fűzött építő, hasznos észrevételeit. Nem szeretnék elsiklani amellett, hogy megköszönjem szeretett családom támogatását, szüleim, feleségem és gyermekeim személyében. Posztdoktori és szenior kutatói időszakom tudományos munkáját a DAAD Modern Applications in Biotechnology ösztöndíja, a Bolyai János kutatási ösztöndíj, az NKFIH-OTKA pályázatai (K46548, K104730) és a Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program (2.3.2-15-2016-00061) támogatta.

Irodalmi hivatkozások

- Able AJ (2003) Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma* 221, 137-143.
- Ádám A, Farkas T, Somlyai G, Hevesi M and Király Z (1989) Consequence of O₂- generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34, 13-26.
- 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.
- Agathokleous E, Belz RG, Calatayud V, De Marco A, Hoshika Y, Kitao M, Saitanis CJ, Sicard P, Paoletti E and Calabrese EJ (2019) Predicting the effect of ozone on vegetation via linear non-threshold (LNT), threshold and hormetic dose-response models. *Science of the Total Environment* 649, 61-74.
- Agati G, Azzarello E, Pollastri S and Tattini M (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 196, 67-76.
- 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.
- Akter S, Huang J, Waszczak C, Jacques S, Gevaert K, Van Breusegem F and Messens J (2015) Cysteines under ROS attack in plants: a proteomics view. *Journal of Experimental Botany* 66, 2935-2944.
- Alasoadura SO and Fajola AO (1970) Studies on the 'frog eye' disease of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Nigeria. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 42, 177-185.
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S and Ecker JR (1999) EIN2 a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284, 2148-2152.
- Alur MD (2004) *Botrytis*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*, Academic Press, New York pp. 279-283.

- Amirsadeghi S, Robson CA, McDonald AE and Vanlerberghe GC (2006) Changes in plant mitochondrial electron transport alter cellular levels of reactive oxygen species and susceptibility to cell death signaling molecules. *Plant and Cell Physiology* 47, 1509–1519.
- Andrade CM, Tinoco MLP, Rieth AF, Maia FCO and Aragão FJL (2016) Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 65, 626–632.
- 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.
- Atanasova-Penichon V, Barreau C and Richard-Forget F (2016) Antioxidant secondary metabolites in cereals: Potential involvement in resistance to *Fusarium* and mycotoxin accumulation. *Frontiers in Microbiology* 7, 566.
- Bahieldin A, Atef A, Edris S, Gadalla NO, Ramadan AM, Hassan SM, Al Attas SG, Al-Kordy MA, Al-Hajar AS, Sabir JS, Nasr ME, Osman GH and El-Domyati FM (2018) Multifunctional activities of ERF109 as affected by salt stress in *Arabidopsis*. *Scientific Reports* 8, 6403.
- Bahnweg G, Schulze S, Möller EM, Rosenbrock H, Langebartels C and Sandermann H (1998) DNA isolation from recalcitrant materials such as tree roots bark and forest soil for the detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 262, 79–82.
- Baker CJ and Orlandi EW (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33, 299–321.
- Balasubramanian V, Vashisht D, Cletus J and Sakthivel N (2012) Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters* 34, 1983–1990.
- Barna B (1998) A kórokozó és a növény kölcsönhatása. In: Érsek T - Gáborjányi R (szerk) *Növénykórokozó Mikroorganizmusok*, ELTE Eötvös Kiadó, Budapest pp. 17–44.
- Barna B, Fodor J, Harrach BD, Pogány M and Király Z (2012a) 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.
- Barna B, Fodor J, Pogány M and Király Z (2003) Role of reactive oxygen species and antioxidants in plant disease resistance. *Pest Management Science* 59, 459–464.
- Barna B, Pogány M, Koehl J, Heiser I and Elstner EF (2012b) Induction of ethylene synthesis and lipid peroxidation in damaged or TMV infected tobacco leaf tissues by light. *Acta Physiologiae Plantarum* 34, 1905–1914.
- Beckman PM and Payne GA (1983) Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zeae-maydis* and lesion development in corn. *Phytopathology* 73, 286–289.
- Berr A, McCallum EJ, Alioua A, Heintz D, Heitz T and Shen W-H (2010) *Arabidopsis* histone methyltransferase SET DOMAIN GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant Physiology* 154, 1403–1414.
- Berto P, Comménil P, Belingheri L and Dehorter B (1999) Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiology Letters* 180, 183–189.
- Besser K, Jarosch B, Langen G and Kogel K-H (2000) Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Molecular Plant Pathology* 1, 277–286.
- 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.
- Bindschedler LV, Dewdney J, Blee KA, Stone JM, Asai T, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish C, Davies DR, Ausubel FM and Bolwell GP (2006) Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *The Plant Journal* 47, 851-863.
- 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.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C and Minibayeva F (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three component system. *Journal of Experimental Botany* 53, 1367-1376.
- Bouchez O, Huard C, Lorrain S, Roby D and Balague' C (2007) Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the *Arabidopsis* lesion mimic mutant *vad1*. *Plant Physiol* 145, 465-477.
- Boutrot F and Zipfel C (2017) Function discovery and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 55, 257-286.
- 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.
- Bozhkov P V and Lam E (2011) Green death: revealing programmed cell death in plants. *Cell Death and Differentiation* 18, 1239-1240.
- Bozsó Z, Ott PG, Sztatmári Á, Czelleng A, Varga G, Besenyei É, Sárdi É, Bányai É and Klement Z (2005) Early detection of bacterium-induced basal resistance in tobacco leaves with diaminobenzidine and dichlorofluorescein diacetate. *Journal of Phytopathology* 153, 596-607.
- Bridger GM, Yang W, Falk DE and McKersie BD (1994) Cold acclimation increases tolerance of activated oxygen in winter cereals. *Journal of Plant Physiology* 144, 235-240.
- Brouwer M, Lievens B, Van Hemelrijck W, Van den Ackerveken G, Cammue BPA and Thomma BPHJ (2003) Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. *FEMS Microbiology Letters* 228, 241-248.
- Brutus A, Sicilia F, Maccone A, Cervone F and De Lorenzo G (2010) A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 9452-9457.
- Bubici G, Carluccio AV, Cillo F and Stabolone L (2015) Virus-induced gene silencing of pectin methylesterase protects *Nicotiana benthamiana* from lethal symptoms caused by Tobacco mosaic virus. *European Journal of Plant Pathology* 141, 339-347.
- 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 H, Lai Z, Shi J, Xiao Y, Chen Z and Xu X (2010) Roles of *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC Plant Biology* 10, 281.
- Chen XL, Shi T, Yang J, Shi W, Gao X, Chen D, Xu X, Xu JR, Talbot NJ and Peng YL (2014) N-glycosylation of effector proteins by an α -1,3-mannosyltransferase is required for the rice blast fungus to evade host innate immunity. *The Plant Cell* 26, 1360-1376.

- 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.
- Chern M, Canlas PE and Ronald PC Strong (2008) Suppression of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* by NRR is dependent on its ability to interact with NPR1 and its putative repression domain. *Molecular Plant* 1, 552-559.
- Cho Y (2015) How the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* kills plant cells remains an enigma. *Eukaryotic Cell* 14, 335-344.
- Cho Y, Srivastava A, Ohm RA, Lawrence CB, Wang KH, Grigoriev IV and Marahatta SP (2012) Transcription factor Amr1 induces melanin biosynthesis and suppresses virulence in *Alternaria brassicicola*. *PLoS Pathogens* 8, e1002974.
- 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.
- Coll NS, Smidler A, Puigvert M, Popa C, Valls M and Dangl JL (2014) The plant metacaspase AtMC1 in pathogen-triggered programmed cell death and aging: functional linkage with autophagy. *Cell Death and Differentiation* 21, 1399-1408.
- Coll NS, Vercammen D, Smidler A, Clover C, Van Breusegem F, Dangl JL and Epple P (2010) *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death. *Science* 330, 1393-1397.
- Collado IG, Macias-Sánchez AJ and Hanson JR (2007) Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Natural Product Reports* 24, 674-686.
- 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.
- Conn S, Curtin C, Bézier A, Franco C and Zhang W (2008) Purification molecular cloning and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. *Journal of Experimental Botany* 59, 3621-3634.
- Czarnocka W and Karpiński S (2018) Friend or foe? Reactive oxygen species production scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine* 122, 4-20.
- 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.
- Dalmats B, Schumacher J, Moraga J, Le Pecheur P, Tudzynski B, Collado IG and 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, 564-579.
- 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.
- Daub ME and Ehrenshaft M (2000) The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. *Annual Review of Phytopathology* 38, 461-490.
- Daub ME, Herrero S and Chung KR (2013) Reactive oxygen species in plant pathogenesis: The role of perylenequinone photosensitizers. *Antioxidants and Redox Signaling* 19, 970-989.
- Davies C and Robinson SP (1996) Sugar accumulation in grape berries (Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues). *Plant Physiology* 111, 275-283.

- De Jonge RP, van Esse H, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, Van Der Krol S, Shibuya N, Joosten MH and Thomma BP (2010) Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329, 953-955.
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J and Foster GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13, 414-430.
- Deavours BE and Dixon RA (2005) Metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. *Plant Physiology* 138, 2245-2259.
- Desmond OJ, Manners JM, Stephens AE, Maclean DJ, Schenk PM, Gardiner DM, Munn AL and Kazan K (2008) The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular Plant Pathology* 9, 435-445.
- Devadas SK, Enyedi A and Raina R (2002) The *Arabidopsis hrl1* mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *The Plant Journal* 30, 467-480.
- Dhawan R, Luo H, Foerster AM, Abuqamar S, Du H-N, Briggs SD, Mittelsten Scheid O and Mengiste T (2009) HISTONE MONOUBIQUITINATION1 interacts with a subunit of the mediator complex and regulates defense against necrotrophic fungal pathogens in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21, 1000-1019.
- Ding ZJ, Yan JY, Xu XY, Yu DQ, Li GX, Zhang SQ and Zheng SJ (2014a) Transcription factor WRKY 46 regulates osmotic stress responses and stomatal movement independently in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 79, 13-27.
- Ding BJ, Hofvander P, Wang HL, Durrett TP, Stymne S and Lofstedt C (2014b) A plant factory for moth pheromone production. *Nature Communications* 5, 3353.
- Ding ZJ, Yan JY, Li CX, Li GX, Wu YR and Zheng SJ (2015) Transcription factor WRKY 46 modulates the development of *Arabidopsis* lateral roots in osmotic/salt stress conditions via regulation of ABA signaling and auxin homeostasis. *The Plant Journal* 84, 56-69.
- Dodds PN and Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11, 539-548.
- Dodge AD (1994) Herbicide action and effects on detoxification processes. In: Foyer CH and Mullineaux PM (eds.) *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton FL pp. 219-236.
- Dolferus R, Jacobs M, Peacock WJ and Dennis ES (1994) Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Physiology* 105, 1075-1087.
- Donèche B (1993) Botrytized wines. In: Fleet GH (ed.) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur Switzerland pp. 327-352.
- Dumont S, Bykova NV, Khaou A, Besserour Y, Dorval M and Rivoal J (2018) *Arabidopsis thaliana* alcohol dehydrogenase is differently affected by several redox modifications. *PLoS ONE* 13, e0204530.
- Dyda M, Wąsek I, Tyrka M, Wędzony M and Szechyńska-Hebda M (2019) Local and systemic regulation of PSII efficiency in triticale infected by the hemibiotrophic pathogen *Microdochium nivale*. *Physiologia Plantarum* 165, 711-727.
- Elad Y, Pertot I, Prado AMC and Stewart A (2016) Plant hosts of *Botrytis* spp. In: Fillinger S and Elad Y (eds.) *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer, Cham pp. 413-486.
- 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.

- Eysholdt-Derzsó E and Sauter M (2017) Root bending is antagonistically affected by hypoxia and ERF-mediated transcription via auxin signaling. *Plant Physiology* 175, 412–423.
- 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.
- Feild TS, Lee DW and Holbrook NM (2001) Why leaves turn red in autumn? The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiology* 127, 566–574.
- Ficsor A, Tóth B, Varga J, Csósz M, Tomcsányi A, Mészáros K, Kótai É and Bakonyi J (2014) Variability of *Pyrenophora teres* f. *teres* in Hungary as revealed by mating type and RAPD analyses. *Journal of Plant Pathology* 96, 515-523.
- Flor HH (1946) Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Journal of Agricultural Research* 73, 335-357.
- Fodor J, Gullner G, Ádám AL, Barna B, Kómióvics T and Király Z (1997) Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco (role in systemic acquired resistance). *Plant Physiology* 114, 1443-1451.
- 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.
- 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.
- García-Guzmán G and Heil M (2014) Life histories of hosts and pathogens predict patterns in tropical fungal plant diseases. *New Phytologist* 201, 1106-1120.
- Geisler-Lee J, O'Toole N, Ammar R, Provart NJ, Millar AH and Geisler M (2007) A predicted interactome for *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 145, 317–329.
- Geoghegan I, Steinberg G and Gurr S (2017) The role of the fungal cell wall in the infection of plants. *Trends in Microbiology* 25, 957-967.
- Gilroy S, Suzuki N, Miller G, Choi WG, Toyota M, Devireddy AR and Mittler R (2014) A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science* 19, 623-630.
- Glaring MA, Skryhan K, Kötting O, Zeeman SC and Blennow A (2012) Comprehensive survey of redox sensitive starch metabolising enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 58, 89–97.
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 205-227.
- Golebiowska G and Wedzony M (2009) Cold-hardening of winter triticale (*x Triticosecale* Wittm.) results in increased resistance to pink snow mould *Microdochium nivale* (Fr., Samuels and Hallett) and genotype-dependent chlorophyll fluorescence modulations. *Acta Physiologiae Plantarum* 31, 1219-1227.
- González-Bosch C (2018) Priming plant resistance by activation of redox-sensitive genes. *Free Radical Biology and Medicine* 122, 171–180.
- Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA and Lommel SA (2008) *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 1015-1026.
- 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.

- Gould KS (2004) Nature's Swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5, 314–320.
- Govrin EM and Levine A (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10, 751-757.
- Gullner G, Kórmíves T, Király L and Schröder P (2018) Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* 9, 1836.
- 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.
- Gust AA, Pruitt R and Nürnberger T (2017) Sensing danger: key to activating plant immunity. *Trends in Plant Science* 22, 779-791.
- Hall G (1989) *Peronospora hyoscyami f. sp. tabacina*. In: IMI Descriptions of Fungi and Bacteria. CAB International, Wallingford UK 98, 975.
- Hall M, Mata-Cabana A, Åkerlund HE, Florencio FJ, Schröder WP, Lindahl M and Kieselbach T (2010) Thioredoxin targets of the plant chloroplast lumen and their implications for plastid function. *Proteomics* 10, 987–1001.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (2006) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Hammond-Kosack KE and Kanyuka K (2007) Resistance genes (R genes) in plants. *eLS Encyclopedia of Life Sciences* 1-21.
- Hane JK, Paxman J, Jones DA, Oliver RP and De Wit P (2020) “CATASTrophy” a genome-informed trophic classification of filamentous plant pathogens—how many different types of filamentous plant pathogens are there? *Frontiers in Microbiology* 10, 3088.
- Harrach BD, Fodor J, Pogány M, Preuss J and Barna B (2008) Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *European Journal of Plant Pathology* 121, 21-33.
- Hayward A, Padmanabhan M and Dinesh-Kumar SP (2011) Virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other plant species. *Methods in Molecular Biology* 678, 55-63.
- Hebelstrup KH, van Zanten M, Mandon J, Voesenek LA, Harren FJ, Cristescu SM, Møller IM and Mur LA (2012) Haemoglobin modulates NO emission and hyponasty under hypoxia-related stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 63, 5581–5591.
- Hemetsberger C, Herrberger C, Zechmann B, Hillmer M and Doehlemann G (2012) The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathogens* 8, e1002684.
- Herrera-Vásquez A, Salinas P and Holuigue L (2015) Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in Plant Science* 6, 171.
- 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.
- Hoerberichts FA, Ten Have A and Woltering EJ (2003) A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta* 217, 517-522.
- Holliday P (1980) *Fungus Diseases of Tropical Crops*. Cambridge University Press, Cambridge UK pp. 72-73.
- Horbach R, Navarro-Quesada AR, Knogge W and Deising HB (2011) When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* 168, 51-62.
- Hornok L (2004) Kölcsönhatás növények és kórokozó gombák között. *Magyar Tudomány* 2004/10, 1095.

- Hundertmark M and Hinch DK (2008) LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9, 118.
- Hyodo K, Hashimoto K, Kuchitsu K, Suzuki N and Okuno T (2017) Harnessing host ROS-generating machinery for the robust genome replication of a plant RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E1282-E1290.
- In O, Berberich T, Romdhane S and Feierabend J (2005) Changes in gene expression during dehardening of cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves and potential role of a peptide methionine sulfoxide reductase in cold-acclimation. *Planta* 220, 941-950.
- Jahagirdar S and Hundekar AR (2010) Management strategies against frog eye leaf spot pathogen (*Cercospora nicotianae*) in India. *Indian Phytopathology* 63, 63-65.
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Cassagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C and Vezzi A (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449, 463-467.
- Jain S and Kumar A (2015) The pathogenesis related class 10 proteins in plant defense against biotic and abiotic stresses. *Advances in Plants and Agriculture Research* 2, 305-314.
- Jayasena V and Cameron I (2008) °Brix/acid ratio as a predictor of consumer acceptability of crimson seedless table grapes. *Journal of Food Quality* 31, 736-750.
- Jones AM (2001) Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology* 125, 94-97.
- 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
- Jones MA, Xuan Y, Xu M, Wang S-R, Ho H-C, Lalonde S, You HC, Sardi IM, Parsa AS, Smith-Valley E, Su T, Frazer AK, Pilot G, Pratelli R, Grossmann G, Acsaraya RB, Hu C-H, Engineer C, Villers F, Ju C, Takeda K, Su Z, Dong Q, Assmann MS, Chen J, Kwak MJ, Schroeder IJ, Albert R, Rhee YS and Frommer BF (2014) Border control—a membrane-linked interactome of *Arabidopsis*. *Science* 344, 711-716.
- Ju C, Yoon GM, Shemansky JM, Lin DY, Ying ZI, Chang J, Garrett WM, Kessenbrock M, Groth G, Tucker ML and Cooper B (2012) CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 19486-19491.
- Juurakko CL, Bredow M, Nakayama T, Imai H, Kawamura Y, diCenzo GC, Uemura M and Walker VK (2021) The *Brachypodium distachyon* cold-acclimated plasma membrane proteome is primed for stress resistance. *G3* 11, pjkab198.
- Kabbage M, Kessens R and Dickman MB (2016) A plant Bcl-2-associated athanogene is proteolytically activated to confer fungal resistance. *Microbial Cell* 3, 224.
- Kabbage M, Williams B and Dickman MB (2013) Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS Pathogens* 9, e1003287.
- Kabbage M, Yarden O and Dickman MB (2015) Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. *Plant Science* 233, 53-60.
- Kalapos B, Juhász C, Balogh E, Kocsy G, Tóbiás I and Gullner G (2021) Transcriptome profiling of pepper leaves by RNA-Seq during an incompatible and a compatible pepper-tobamovirus interaction. *Scientific Reports* 11, 1-19.
- 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.
- Kars I, Krooshof GH, Wagemakers L, Joosten R, Benen JA and Van Kan JA (2005) Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *The Plant Journal* 43, 213-225.
- 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, Rasle 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.
- Khoo HE, Azlan A, Tang ST and Lim SM (2017) Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research* 61, 1361779.
- Kilili KG, Atanassova N, Vardanyan A, Clatot N, Al-Sabarna K, Kanellopoulos PN, Makris AM and Kampranis SC (2004) Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 279, 24540-24551.
- Kim KS, Min JY and Dickman MB (2008) Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 605-612.
- Király Z and El-Zahaby HM (2000) Effect of reactive oxygen species on rust and powdery mildew pathogens and on symptoms. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 35, 239-240.
- Klein M and Papenbrock J (2004) The multi-protein family of *Arabidopsis* sulphotransferases and their relatives in other plant species. *Journal of Experimental Botany* 55, 1809-1820.
- Klimyuk V, Pogue G, Herz S, Butler J and Haydon H (2014) Production of recombinant antigens and antibodies in *Nicotiana benthamiana* using 'Magniflection' technology: GMP-compliant facilities for small- and largescale manufacturing. In: Palmer KE and Gleba Y (eds.) *Plant Viral Vectors Book Series: Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg pp. 127-154.
- Koch A and Kogel KH (2014) New wind in the sails: Improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnology Journal* 12, 821-831.
- 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.
- Lackman P, González-Guzmán M, Tilleman S, Carqueijeiro I, Pérez AC, Moses T, Seo M, Kanno Y, Häkkinen ST, Van Montagu MCE, Thevelein JM, Maaheimo H, Oksman-Caldentey K-M, Rodriguez PL, Rischer H and Goossens A (2011) Jasmonate signaling involves the abscisic acid receptor PYL4 to regulate metabolic reprogramming in *Arabidopsis* and tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 5891-5896.
- Lai Z, Wang F, Zheng Z, Fan B and Chen Z (2011) A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal* 66, 953-968.
- Lamb C and Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Biology* 48, 251-275.
- Laugé R, Goodwin PH, De Wit PJ and Joosten MH (2000) Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. *The Plant Journal* 23, 735-745.

- Laurie-Berry N, Joardar V, Street IH and Kunkel BN (2006) The *Arabidopsis thaliana* *JASMONATE INSENSITIVE 1* gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 789-800.
- Lawrence CB, Mitchell TK, Craven KD, Cho Y, Cramer RA and Kim KH (2008) At death's door: *Alternaria* pathogenicity mechanisms. *Plant Pathology Journal* 24, 101-111.
- 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.
- Leisman GB and Daub ME (1992) Singlet oxygen yields optical properties and phototoxicity of reduced derivatives of the photosensitizer cercosporin. *Photochemistry and Photobiology* 55, 373-379.
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G and Schroeder JI (2004) Microarray expression analyses of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *The Plant Cell* 16, 596-615.
- 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.
- Li Y and Dickman M (2016) Processing of AtBAG6 triggers autophagy and fungal resistance. *Plant Signaling and Behavior* 11, 233-47.
- Li Y, Kabbage M, Liu W and Dickman MB (2016) Aspartyl protease-mediated cleavage of BAG6 is necessary for autophagy and fungal resistance in plants. *The Plant Cell* 28, 233-247.
- Li ZX, Lan JB, Liu YQ, Qi LW and Tang JM (2020) Investigation of the role of AcTPR2 in kiwifruit and its response to *Botrytis cinerea* infection. *BMC Plant Biology* 20, 557.
- Lightfoot DJ and Able AJ (2010) Growth of *Pyrenophora teres* in planta during barley net blotch disease. *Australasian Plant Pathology* 39, 499-507.
- Lim J, Lim CW and Lee SC (2018) The pepper Late Embryogenesis Abundant protein CaDIL1 positively regulates drought tolerance and ABA signaling. *Frontiers in Plant Science* 9, 1301.
- Lindahl M and Kieselbach T (2009) Disulphide proteomes and interactions with thioredoxin on the track towards understanding redox regulation in chloroplasts and cyanobacteria. *Journal of Proteomics* 72, 416-438.
- Liu T, Song T, Zhang X, Yuan H, Su L, Li W, Xu J, Liu S, Chen L, Chen T and Zhang M (2014) Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nature Communications* 5, 1-10.
- Liu Y, Ren D, Pike S, Pallardy S, Gassmann W and Zhang S (2007) Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *The Plant Journal* 51, 941-954.
- 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.
- Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S and Kahmann R (2015) Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* 66, 513-545.
- 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, Rühl 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.

- Lorang J (2019) Necrotrophic exploitation and subversion of plant defense: a lifestyle or just a phase and implications in breeding resistance. *Phytopathology* 109, 332-346.
- Lorang J, Kidarsa T, Bradford CS, Gilbert B, Curtis M, Tzeng SC, Maier CS and Wolpert TJ (2012) Tricking the guard: exploiting plant defense for disease susceptibility. *Science* 338, 659-662.
- Loreti E, Povero G, Novi G, Solfanelli C, Alpi A and Perata P (2008) Gibberellins, jasmonate and abscisic acid modulate the sucrose-induced expression of anthocyanin biosynthetic genes in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 179, 1004-1016.
- Lovato A, Zenoni S, Tornielli GB, Colombo T, Vandelle E and Polverari A (2019) Specific molecular interactions between *Vitis vinifera* and *Botrytis cinerea* are required for noble rot development in grape berries. *Postharvest Biology and Technology* 156, 110924.
- Lv R, Li Z, Li M, Dogra V, Lv S, Liu R, Lee KP and Kim C (2019) Uncoupled expression of nuclear and plastid photosynthesis-associated genes contributes to cell death in a lesion mimic mutant. *The Plant Cell* 31, 210-230.
- MacKinnon SL, Keifer P and Ayer WA (1999) Components from the phytotoxic extract of *Alternaria brassicicola*, a black spot pathogen of canola. *Phytochemistry* 51, 215-221.
- Magyar I (2011) Botrytized wines. Jackson RS (ed.) In: *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, Burlington NJ pp. 147-206.
- Marchand C, Le Maréchal P, Meyer Y and Decottignies P (2006) Comparative proteomic approaches for the isolation of proteins interacting with thioredoxin. *Proteomics* 6, 6528-6537.
- Marino D, Dunand C, Puppo A and Pauly N (2012) A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in Plant Science* 17, 9-15.
- Marshall R, Kombrink A, Motteram J, Loza-Reyes E, Lucas J, Hammond-Kosack KE, Thomma BP and Rudd JJ (2011) Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant Physiology* 156, 756-769.
- Martínez-Esteso MJ, Vilella-Antón MT, Pedreño MÁ, Valero ML and Bru-Martínez R (2013) iTRAQ-based protein profiling provides insights into the central metabolism changes driving grape berry development and ripening. *BMC Plant Biology* 13, 167.
- Martínez-Márquez A, Martínez-Esteso MJ, Vilella-Antón MT, Sellés-Marchart S, Morante-Cariel JA, Hurtado E, Palazon J and Bru-Martínez R (2017) A tau class glutathione-S-transferase is involved in trans-resveratrol transport out of grapevine cells. *Frontiers in Plant Science* 8, 1457.
- Matsuo M, Johnson JM, Hieno A, Tokizawa M, Nomoto M, Tada Y, Godfrey R, Obokata J, Sherameti I, Yamamoto YY, Böhmer F-D and Oelmüller R (2015) High REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR1 levels result in accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* shoots and roots. *Molecular Plant* 8, 1253-1273.
- Mehterov N, Balazadeh S, Hille J, Toneva V, Mueller-Roeber B and Gechev T (2012) Oxidative stress provokes distinct transcriptional responses in the stress-tolerant *atr7* and stress-sensitive *loh2* *Arabidopsis thaliana* mutants as revealed by multi-parallel quantitative real-time PCR analysis of ROS marker and antioxidant genes. *Plant Physiology and Biochemistry* 59, 20-29.
- Mengiste T (2012) Plant immunity to necrotrophs. *Annual Review of Phytopathology* 50, 267-294.
- Mentlak TA, Kombrink A, Shinya T, Ryder LS, Otomo I, Saitoh H, Terauchi R, Nishizawa Y, Shibuya N, Thomma BP and Talbot NJ (2012) Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *The Plant Cell* 24, 322-335.

- Mérai Z, Kerényi Z, Molnár A, Barta E, Válóczy A, Bisztray G, Havelda Z, Burgyán J and Silhavy D (2005) Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *Journal of Virology* 79, 7217-7226.
- Meuwly P and Métraux JP (1993) Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Analytical Biochemistry* 214, 500-505.
- 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.
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H and Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 19613-19618.
- 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.
- Moon KB, Lee J, Kang S, Kim M, Mason HS, Jeon JH and Kim HS (2014) Overexpression and self-assembly of virus-like particles in *Nicotiana benthamiana* by a single-vector DNA replicon system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 8281-8290.
- Mou Z, Fan W and Dong X (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113, 935-944.
- Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O and Wasternack C (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* 140, 249-262.
- 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.
- Muthuramalingam M, Matros A, Scheibe R, Mock HP and Dietz KJ (2013) The hydrogen peroxide-sensitive proteome of the chloroplast *in vitro* and *in vivo*. *Frontiers in Plant Science* 4, 54.
- Muthuramalingam M, Seidel T, Laxa M, De Miranda SM, Gärtner F, Ströher E, Kandlbinder A and Dietz KJ (2009) Multiple redox and non-redox interactions define 2-Cys peroxiredoxin as a regulatory hub in the chloroplast. *Molecular Plant* 2, 1273-1288.
- Narusaka Y, Narusaka M, Seki M, Ishida J, Shinozaki K, Nan Y, Park P, Shiraishi T and Kobayashi M (2005) Cytological and molecular analyses of non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Alternaria alternata*. *Molecular Plant Pathology* 6, 615-627.
- Neill SO and Gould KS (2003) Anthocyanins in leaves: Light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology* 30, 865-873.
- Newman TE and Derbyshire MC (2020) The evolutionary and molecular features of broad host-range necrotrophy in plant pathogenic fungi. *Frontiers in Plant Science* 11, 591733.
- 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.
- Nguyen HT, Leipner J, Stamp P and Guerra-Peraza O (2009) Low temperature stress in maize (*Zea mays* L.) induces genes involved in photosynthesis and signal transduction as studied by suppression subtractive hybridization. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 116-122.

- Nielsen KK, Mikkelsen JD, Kragh KM and Bojsen K (1993) An acidic class-III chitinase in sugar-beet-induction by *Cercospora beticola* characterization and expression in transgenic tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6, 495-506.
- 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.
- Noshi M, Mori D, Tanabe N, Maruta T and Shigeoka S (2016) Arabidopsis clade IV TGA transcription factors TGA10 and TGA9 are involved in ROS-mediated responses to bacterial PAMP flg22. *Plant Science* 252, 12–21.
- O'Brien JA, Daudi A, Butt VS and Bolwell GP (2012a) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236, 765-779.
- O'Brien JA, Daudi A, Finch P, Butt VS, Whitelegge JP, Souda P, Ausubel FM and Bolwell GP (2012b) A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured *Arabidopsis* cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiology* 158, 2013-2027.
- Obrepalska-Stepulowska 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.
- Ohm RA, Feau N, Henrissat B, Schoch CL, Horwitz BA, Barry KW, Condon BJ, Copeland AC, Dhillon B, Glaser F and Hesse CN (2012) Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen *Dothideomycetes* fungi. *PLoS Pathogens* 8, e1003037.
- Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG and Valent B (2000) A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *The Plant Cell* 12, 2019-2032.
- Otani H, Kohnobe A, Kodama M and Kohmoto K (1998) Production of a host-specific toxin by germinating spores of *Alternaria brassicicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52, 285-295.
- Owens DK, Alerding AB, Crosby KC, Bandara AB, Westwood JH and Winkel BS (2008) Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 147, 1046–1061.
- Pál M, Ivanovska B, Oláh T, Tajti J, Hamow KÁ, Szalai G, Khalil R, Vanková R, Dobrev P, Misheva SP and Janda T (2019) Role of polyamines in plant growth regulation of *Rht* wheat mutants. *Plant Physiology and Biochemistry* 137, 189–202.
- Pandey RM and Farmahan HL (1977) Changes in the rate of photosynthesis and respiration in leaves and berries of *Vitis vinifera* grapevines at various stages of berry development. *Vitis* 16, 106–111.
- Pandey SP, Roccaro M, Schön M, Logemann E and Somssich IE (2010) Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 64, 912–923.
- Park HY, Seok HY, Woo DH, Lee SY, Tarte VN, Lee EH, Lee CH and Moon YH (2011) AtERF71/HRE2 transcription factor mediates osmotic stress response as well as hypoxia response in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 414, 135–141.
- 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.
- Pedras MSC, Chumala PB, Jin W, Islam MS and Hauck DW (2009) The phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*: phytotoxin production and phytoalexin elicitation. *Phytochemistry* 70, 394–402.
- Pérez-Díaz R, Madrid-Espinoza J, Salinas-Cornejo J, González-Villanueva E and Ruiz-Lara S (2016) Differential roles for VviGST1, VviGST3 and VviGST4 in proanthocyanidin and anthocyanin transport in *Vitis vinifera*. *Frontiers in Plant Science* 7, 1166.

- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S and Van Wees SC (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5, 308-316.
- Pitsili E, Phukan UJ and Coll NS (2020) Cell death in plant immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 12, a036483.
- Plazek A and Zur I (2003) Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. *Plant Science* 164, 1019-1028.
- 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.
- Pociecha E, Janowiak F, Dubas E, Zur I, Tokarz K, Kolasinska I and Plazek A (2013) Progress of snow mould infection in crowns of winter rye (*Secale cereale* L.) is related to photosynthetic activity during cold acclimation. *Plant Physiology and Biochemistry* 70, 360-367.
- Pogány M (1999) Növényi vírusbetegségek és növekedést szabályozó anyagok. In: Horváth J és Gáborjányi R (Szerk.) Növényvírusok és Virologiai Vizsgáló Módszerek. Mezőgazda Kiadó, Budapest pp. 284-316.
- 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 grape (*Vitis vinifera*) berries during natural noble rot development. *Plants* 11, 864.
- Pogány M, Dankó T, Kámán-Tóth E, Schwarczinger I and Bozsó Z (2015) Regulatory proteolysis in *Arabidopsis*-pathogen interactions. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 23177-23194.
- Pogány M, Harrach B, Bozsó Z, Künstler A, Janda T, von Rad U, Vida G and Veisz O (2016) Cold hardening protects cereals from oxidative stress and necrotrophic fungal pathogenesis. *Open Life Sciences* 11, 78-85.
- Pogány M, Harrach BD és Barna B (2007) A növényi növekedésszabályozó anyagok szerepe a növény-kórokozó kölcsönhatásokban. In: Gáborjányi R és Király Z (Szerk.) Molekuláris Növénykórtan. Agroinform, pp. 305-312.
- 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, Koehl J, Heiser I, Elstner EF and Barna B (2004) Juvenility of tobacco induced by cytokinin gene introduction decreases susceptibility to tobacco necrosis virus and confers tolerance to oxidative stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65, 39-47.
- 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.
- Pradhan A, Ghosh S, Sahoo D and Jha G (2021) Fungal effectors the double edge sword of phytopathogens. *Current Genetics* 67, 27-40.
- Prasad L, Katoch S and Shahid S (2022) Microbial interaction mediated programmed cell death in plants. *3 Biotech* 12, 1-18.
- Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CM and Memelink J (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology* 147, 1347-1357.
- Proels RK, Oberhollenzer K, Pathuri IP, Hensel G, Kumlehn J and Hüchelhoven R (2010) RBOHF2 of barley is required for normal development of penetration resistance to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 1143-1150.

- Qiao H, Shen Z, Huang SS, C Schmitz RJ, Urich MA, Briggs SP and Ecker JR (2012) Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science* 338, 390-393.
- Raacke IC, von Rad U, Mueller MJ and Berger S (2006) Yeast increases resistance in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by salicylic acid-dependent as well as -independent mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 1138-1146.
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F and Lund ST (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, 1-11.
- Reino JL, Hernández-Galán R, Durán-Patrón R, Collado IG (2004) Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 152, 563-566.
- 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.
- Rosenwasser S, Rot I, Sollner E, Meyer AJ, Smith Y, Leviatan N, Fluhr R and Friedman H (2011) Organelles contribute differentially to reactive oxygen species-related events during extended darkness. *Plant Physiology* 156, 185-201.
- Rossi FR, Gárriz A, Marina M, Romero FM, Gonzalez ME, Collado IG and Pieckenstein FL (2011) The sesquiterpene botrydial produced by *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response on plant tissues and its action is modulated by salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24, 888-896.
- Sagi M, Davydov O, Orazova S, Yesbergenova Z, Ophir R, Stratmann JW, Fluhr R (2004) Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *The Plant Cell* 16, 616-628.
- Salguero-Linares J and Coll NS (2019) Plant proteases in the control of the hypersensitive response. *Journal of Experimental Botany* 70, 2087-2095.
- Sánchez-Vallet A, McDonald MC, Solomon PS and McDonald BA (2015) Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biology* 79, 29-32.
- Sato M, Tsuda K, Wang L, Collier J, Watanabe Y, Glazebrook J and Katagiri F (2010) Network modeling reveals prevalent negative regulatory relationships between signaling sectors in *Arabidopsis* immune signaling. *PLoS Pathogens* 6, e1001011.
- Sautua FJ, Searight J, Doyle VP, Scandiani MM and Carmona MA (2020) *Cercospora* cf. *nicotianae* is a causal agent of Cercospora leaf blight of soybean. *European Journal of Plant Pathology* 156, 1227-1231.
- Scarpeci TE, Zanol MI, Carrillo N, Mueller-Roeber B and Valle EM (2008) Generation of superoxide anion in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* during active photosynthesis: A focus on rapidly induced genes. *Plant Molecular Biology* 66, 361-378.
- Schaberg PG, Van den Berg AK, Murakami PF, Shane JB and Donnelly JR (2003) Factors influencing red expression in autumn foliage of sugar maple trees. *Tree Physiology* 23, 325-333.
- Schellenberger R, Touchard M, Clément C, Baillieux F, Cordelier S, Crouzet J and Dorey S (2019) Apoplastic invasion patterns triggering plant immunity: plasma membrane sensing at the frontline. *Molecular Plant Pathology* 20, 1602-1616.
- Schenk PM, Kazan K, Manners JM, Anderson JP, Simpson RS, Wilson IW, Somerville SC and Maclean DJ (2003) Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology* 132, 999-1010.
- Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology* 23, 197-223.

- 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.
- Seo PJ, Kim MJ, Park J-Y, Kim S-Y, Jeon J, Lee Y-H, Kim J and Park C-M (2010) Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 61, 661-671.
- Seung D, Thalmann M, Sparla F, Abou Hachem M, Lee SK, Issakidis-Bourguet E, Svensson B, Zeeman SC and Santelia D (2013) *Arabidopsis thaliana* AMY3 is a unique redox-regulated chloroplastic α -amylase. *Journal of Biological Chemistry* 288, 33620-33633.
- Shao D, Smith DL, Kabbage M and Roth MG (2021) Effectors of plant necrotrophic fungi. *Frontiers in Plant Science* 12, 687713.
- Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M and Zheng B (2019) Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* 24, 2452.
- Sharpee WC and Dean RA (2016) Form and function of fungal and oomycete effectors. *Fungal Biology Reviews* 30, 62-73.
- Shew HD and Lucas GB (1991) In: *Compendium of Tobacco Diseases*. American Phytopathological Society, St Paul MN pp. 20-21.
- Shi H, Liu W, Yao Y, Wei Y and Chan Z (2017) Alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) confers both abiotic and biotic stress resistance in *Arabidopsis*. *Plant Science* 262, 24-31.
- Shibata Y, Kawakita K and Takemoto D (2010) Age-related resistance of *Nicotiana benthamiana* against hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* requires both ethylene- and salicylic acid-mediated signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 1130-1142.
- Siddique S, Matera C, Radakovic ZS, Shamim Hasan M, Gutbrod P, Rozanska E, Sobczak M, Torres MA and Grundler FM (2014) Parasitic worms stimulate host NADPH oxidases to produce reactive oxygen species that limit plant cell death and promote infection. *Science Signaling* 7, ra33.
- Sivanesan A (1984) *The Bitunicate Ascomycetes and their Anamorphs*. J Cramer, Vaduz, Liechtenstein.
- Spoel SH and Dong X (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host and Microbe* 3, 348-351.
- Spoel SH, Johnson JS and Dong X (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 18842-18847.
- Staats M, van Baarlen P and van Kan JAL (2005) Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22, 333-346.
- Stael S, Kmiecik P, Willems P, Van Der Kelen K, Coll NS, Teige M and Van Breusegem F (2015) Plant innate immunity—sunny side up? *Trends in Plant Science* 20, 3-11.
- 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 photoinhibitor in leaves of *Pisum sativum* acclimated to low temperature. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 14, 185-193.
- Streb P, Shang W and Feierabend J (1999) Resistance of cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) to photooxidative stress. *Plant Cell and Environment* 22, 1211-1223.
- Ströher E and Dietz KJ (2008) The dynamic thiol–disulphide redox proteome of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast as revealed by differential electrophoretic mobility. *Physiologia Plantarum* 133, 566–583.
- Su'udi M, Kim MG, Park SR, Hwang DJ, Bae SC and Ahn IP (2011) *Arabidopsis* cell death in compatible and incompatible interactions with *Alternaria brassicicola*. *Molecules and Cells* 31, 593-601.
- Sun K, van Tuinen A, van Kan JA, Wolters AMA, Jacobsen E, Visser RG and Bai Y (2017) Silencing of *DND1* in potato and tomato impedes conidial germination attachment and hyphal growth of *Botrytis cinerea*. *BMC Plant Biology* 17, 1-12.
- Szechynska-Hebda M, Waseka I, Golebiowska-Pikania G, Dubasa E, Zur I and Wedzony M (2015) Photosynthesis-dependent physiological and genetic crosstalk between cold acclimation and cold-induced resistance to fungal pathogens in triticale (*Triticosecale* Wittm.) *Journal of Plant Physiology* 177, 30-43.
- Szkłarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ and von Mering C (2019) STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research* 47, D607–D613.
- Tani H, Koshino H, Sakuno E, Cutler HG and Nakajima H (2006) Botcinins E and F and Botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. *Journal of Natural Products* 69, 722–725.
- 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.
- Thomma BPHJ (2003) Pathogen profile *Alternaria* spp: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4, 225–235.
- Torres MA, Dangl JL and Jones JD (2002) *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 517-522.
- Torres MA, Jones JD and Dangl JL (2005) Pathogen-induced NADPH oxidase–derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 37, 1130-1134.
- 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.
- Trail F and Köller W (1993) Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: purification and characterization of two cutinases from *Alternaria brassicicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42, 205-220.
- 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.
- Upchurch RG, Walker DC, Rollins JA, Ehrenschaft M and Daub ME (1991) Mutants of *Cercospora kikuchii* altered in cercosporin synthesis and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2940-2945.
- 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.
- van Esse HP, Van't Klooster JW, Bolton MD, Yadeta KA, van Baarlen P, Boeren S, Vervoort J, de Wit PJ and Thomma BP (2008) The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *The Plant Cell* 20, 1948-1963.
- van Kan JA (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11, 247-253.
- Vannini A and Chilosi G (2013) *Botrytis* infection: grey mould and noble rot. In: Mencarelli F and Tonutti P (eds.) Sweet, Reinforced and Fortified Wines: Grape Biochemistry Technology and Vinification. Wiley, Chichester pp. 159-170.
- Vannozzi A, Dry IB, Fasoli M, Zenoni S and Lucchin M (2012) Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: Genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *BMC Plant Biology* 12, 130.
- Váradi G, Darkó É and Lehoczki E (2000) Changes in the xanthophyll cycle and fluorescence quenching indicate light-dependent early events in the action of paraquat and the mechanism of resistance to paraquat in *Erigeron canadensis* (L.) Cronq. *Plant Physiology* 123, 1459-1469.
- Veloso J and van Kan JA (2018) Many shades of grey in *Botrytis*-host plant interactions. *Trends in Plant Science* 23, 613-622.
- 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.
- Veronese P, Nakagami H, Bluhm B, Abuqamar S, Chen X, Salmeron J, Dietrich RA, Hirt H and Mengiste T. (2006) The membrane-anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 plays distinct roles in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell* 18, 257-73.
- Videira SIR, Groenewald JZ, Nakashima C, Braun U, Barreto RW, de Wit PJ and Crous PW (2017) *Mycosphaerellaceae*-chaos or clarity? *Studies in Mycology* 87, 257-421.
- Vleeshouwers VG and Oliver RP (2014) Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic hemibiotrophic and necrotrophic plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27, 196-206.
- Vlot AC, Liu PP, Cameron RK, Park SW, Yang Y, Kumar D, Zhou F, Padukkavidana T, Gustafsson C, Pichersky E and Klessig DF (2008) Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 56, 445-456.
- von Arx JA (1983) *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen / C* 86, 15-54.
- von Rad U, Müller MJ and Durner J (2005) Evaluation of natural and synthetic stimulants of plant immunity by microarray technology. *New Phytologist* 165, 191-202.
- von Tiedemann A (1997) Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50, 151-166.
- Vranová E, Inzé D and van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53, 1227-1236.

- Vrhovsek U, Masuero D, Gasperotti M, Franceschi P, Caputi L, Viola R and Mattivi F (2012) A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 8831-8840.
- 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.
- Wagner U, Edwards R, Dixon DP and Mauch F (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Molecular Biology* 49, 515–532.
- Wan J, Zhang XC, Neece D, Ramonell KM, Clough S, Kim SY, Stacey MG and Stacey G (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20, 471–481.
- Wang H, Wang S, Lu Y, Alvarez S, Hicks LM, Ge X and Xia Y (2012) Proteomic analysis of early-responsive redox-sensitive proteins in *Arabidopsis*. *Journal of Proteome Research* 11, 412–424.
- Wang X, Jiang N, Liu J, Liu W, and Wang GL (2014) The role of effectors and host immunity in plant–necrotrophic fungal interactions. *Virulence* 5, 722-732.
- Wang Z, Xing S, Birkenbihl RP and Zachgo S (2009) Conserved functions of *Arabidopsis* and rice cc-type glutaredoxins in flower development and pathogen response. *Molecular Plant* 2, 323–335.
- Weiberg A, Wang M, Lin FM, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, Huang H-D and Jin H (2013) Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* 342, 118–123.
- Weigel RR, Bäuscher C, Pfitzner AJ and Pfitzner UM (2001) NIMIN-1 NIMIN-2 and NIMIN-3 members of a novel family of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1 a key regulator of systemic acquired resistance in plants. *Plant Molecular Biology* 46, 143-160.
- Weigel RR, Pfitzner UM and Gatz C (2005) Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates *PR* gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17, 1279-1291.
- Weits DA, Giuntoli B, Kosmacz M, Parlanti S, Hubberten HM, Riegler H, Hoefgen R, Perata P, Van Dongen JT and Licausi F (2014) Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nature Communications* 5, 3425.
- West GM, Pascal BD, Ng LM, Soon FF, Melcher K, Xu HE, Chalmers MJ and Griffin (2013) PR Protein conformation ensembles monitored by HDX reveal a structural rationale for abscisic acid signaling protein affinities and activities. *Structure* 21, 229–235.
- 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.
- Williams B, Kabbage M, Kim HJ, Britt R and Dickman MB (2011) Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathogens* 7, e1002107.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P and van Kan JAL (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of gray mold disease. *Molecular Plant Pathology* 8, 561– 580.
- Winfield MO, Lu C, Wilson ID, Coghill JA and Edwards KJ (2010) Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnology Journal* 8, 749-771.
- Wolpert TJ, Dunkle LD and Ciuffetti LM (2002) Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? *Annual Review of Phytopathology* 40, 251-285.
- Wrzaczek M, Brosché M and Kangasjärvi J (2013) ROS signaling loops—production, perception, regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 16, 575-582.

- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V and Després C (2012) The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Reports* 1, 639-647.
- 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.
- Yoda H, Fujimura K, Takahashi H, Munemura I, Uchimiya H and Sano H (2009) Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host-and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. *Plant Molecular Biology* 70, 103-112.
- Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JD and Doke N (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91 phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell* 15, 706-718.
- You J and Chan Z (2015) ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in Plant Science* 6, 1092.
- 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 (2021a) Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature* 592, 105-109.
- Yuan M, Ngou BPM, Ding P and Xin XF (2021b) PTI-ETI crosstalk: An integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 62, 102030.
- Zhang G, Zhao F, Chen L, Pan Y, Sun L, Bao N, Zhang T, Cui CX, Qiu Z, Zhang Y and Yang L (2019) Jasmonate-mediated wound signalling promotes plant regeneration. *Nature Plants* 5, 491-497.
- Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, Zou Y, Gao M, Zhang X, Chen S and Mengiste T (2010) Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host and Microbe* 7, 290-301.
- Zhang L, Kars I, Essenstam B, Liebrand TW, Wagemakers L, Elberse J, Tagkalaki P, Tjoitang D, van den Ackerveken G and van Kan JA (2014) Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the *Arabidopsis* receptor-like protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASES1. *Plant Physiology* 164, 352-64.
- Zhou C, Zhang L, Duan J, Miki B and Wu K (2005) HISTONE DEACETYLASE19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 17, 1196-1204.
- Zhou J, Xia X-J, Zhou Y-H, Shi K, Chen Z and Yu J-Q (2014b) 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.
- Zhou J, Yu JQ and Chen Z (2014a) The perplexing role of autophagy in plant innate immune responses. *Molecular Plant Pathology* 15, 637-645.
- Zwicker S, Mast S, Stos V, Pfitzner AJ and Pfitzner UM (2007) Tobacco NIMIN2 proteins control PR gene induction through transient repression early in systemic acquired resistance. *Molecular Plant Pathology* 8, 385-400.

1. melléklet:

RNS-szekvenálás validálása: primer szekvenciák és valós idejű RT-PCR paraméterek.

Gene Ensembl ID	Primer sequence	Real-time RT-PCR parameter		
<i>Bcin08g00340</i>	Forward 5' - CGGTTCCCTCAGTTTTGTGT	Denaturation: 95 °C 10 sec	Number of cycles used: 40	
	Reverse 5' - CGAGACTGAATAACGCGACA			
<i>Bcin13g02250</i>	Forward 5' - TAGGTGACGGCATTGTGTA			
	Reverse 5' - CGAATACTCCCCGAAACAAA			
<i>Bcin13g02210</i>	Forward 5' - CAGTGCTACCCTTACACCGT			Annealing and extention: 60 °C 30 sec
	Reverse 5' - AGAGTAAGGTTGGGGTTCGGT			
<i>Bcin14g03170</i>	Forward 5' - CATTGCCAATATGGATGCTG			
	Reverse 5' - TTGAAGTGCGTTGCTACACC			
<i>Bcin04g00060</i>	Forward 5' - CCTCAGAAGGCACCTCACAA			
	Reverse 5' - GCCCAAGGTTCCGCATTAGA			
<i>VIT_07s0151g00130</i>	Forward 5' - AGCAGCAGTCACAAATTGGC			
	Reverse 5' - GGGCTGAGAAGTTGAGGGAT			
<i>VIT_07s0005g00740</i>	Forward 5' - TCATCACTGCCCTCAATTGC			
	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			

RNS-szekvenálás eredményeinek megerősítése valós idejű RT-PCR módszerrel. Transzkriptum szintek hányadosainak változása egészséges és aszúsodott Furmint szőlőbogyó mintákban Log₂ értékben kifejezve.

	Consecutive stages of noble rot					
	I.		II.		III.	
	RNA-Seq	Real-time RT-PCR	RNA-Seq	Real-time RT-PCR	RNA-Seq	Real-time RT-PCR
<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
<i>BCIN_08g00340</i>	4.43	3.74	4.85	4.86	1.56	3.11
<i>BCIN_13g02250</i>	4.16	4.64	4.05	4.65	2.74	4.49
<i>BCIN_13g02210</i>	2.84	1.64	3.47	2.19	2.24	1.86
<i>BCIN_14g03170</i>	3.54	3.91	3.27	3.54	2.33	2.85
<i>BCIN_04g00060</i>	0.61	-1.91	1.93	0.17	4.67	3.38
Correlation	0.93		0.90		0.85	

Abszcizinsav, fazeinsav és dihidrofazeinsav analitikai vizsgálatának módszertani részletei (UPLC-MS/MS módszer) - Vrhovsek és mtsai 2012. és Pál és mtsai 2019

UPLC:		Waters Acquity I-class						
Column:	Waters HSS T3 column (1.8 µm, 100 mm × 2.1 mm) at 40°C							
inj vol.:	2 µl	Autosampler temperature:		10 °C				
Gradient conditions								
A: Water (0.1 v/v% formic acid)		B: Acetonitrile (0.1 v/v% formic acid)						
Time (min)	Flow rate (ml/min)	A%	B%					
0	0.4	95	5					
3	0.4	80	20					
4.3	0.4	80	20					
9	0.4	55	45					
11	0.4	0	100					
13	0.4	0	100					
13.01	0.4	95	5					
15	0.4	95	5					
Detector:		Xevo TQ-XS with Unispray source						
Resolution:		Unit mass (+/- 0.8 Da)						
Impactor voltage:		2 kV						
Desolvation temperature:		550°C						
Nebulizer gas:		6.5 bar N ₂						
Desolvation gas flow:		1000 L/h N ₂						
Cone gas flow:		450 L/h N ₂						
Collision gas flow:		0.15 ml/min Argon 5.0						
Component name	Unispray Impactor voltage polarity	quant. MS/MS transition	Pred.RT (min)	RT found (min)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Calibrated to	QC
[2H6](+)-cis,trans-abscisic acid Internal standard	negative	269.1 > 159.1	7.13	7.13	20	10	external	spike recovery
abscisic acid	negative	263.1 > 153	7.18	7.16	20	10	external	IS recovery and spike recovery
phaseic acid	negative	279.12 > 139	5.24	5.18	25	12	external	spike recovery
dihydrophaseic acid	negative	281.14 > 237.2	3.56	3.52	25	12	external	spike recovery

Felhasznált irodalmak:

Vrhovsek U, Masuero D, Gasperotti M, Franceschi P, Caputi L, Viola R, és mtsai (2012) A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 8831–8840.

Pál M, Ivanovska B, Oláh T, Tajti J, Hamow KÁ, Szalai G, és mtsai (2019) Role of polyamines in plant growth regulation of *Rht* wheat mutants. *Plant Physiology and Biochemistry* 137, 189–202.

2. melléklet: Transzkriptum szintek hányadosainak változása egészséges és aszúsodott Furmint szőlőbogyó mintákban.

Gene ID	Function	P (ANOVA) Corrected	FC (Noble rot stage II vs [Healthy])		FC (Noble rot stage III vs [Healthy])		FC (Noble rot stage III vs [Healthy])		
			P (II) vs (HI)	F (II) vs (HI)	P (III) vs (HI)	F (III) vs (HI)	P (III) vs (HI)	F (III) vs (HI)	
<i>Transcriptional changes associated with plant hormones</i>									
<i>Abscisic acid</i>									
VIT_04s0008g00890	abscisic acid receptor FYL2	4,51E-07	1,79E-06	5,08	2,11E-04	9,32	1,60E-04	3,98	6,95E-04
VIT_07s0005g00920	pathogenesis-related protein STH-21	1,19E-11	1,36E-10	2,94	1,65E-04	6,72	1,60E-04	1,26	
VIT_07s0005g01950	R2R3 transcription factor MYB108-like protein 2	1,93E-18	1,92E-16	13,12	1,60E-04	21,20	1,60E-04	26,94	1,60E-04
VIT_07s0129g00240	zinc finger protein ZAT10	4,23E-06	1,38E-05	3,44	5,25E-04	4,39	1,98E-04	1,25	
VIT_13s0067g01940	abscisic acid receptor FYL4	4,50E-08	2,20E-07	3,93	1,63E-04	4,70	1,60E-04	1,36	
VIT_16s0001g11790	type IV inositol polyphosphate 5-phosphatase 11	8,65E-10	6,18E-09	5,74	1,60E-04	8,65	1,60E-04	4,41	1,61E-04
VIT_14s0006g01250	protein C2-domain ABA-related 4	9,09E-11	8,19E-10	6,80	1,60E-04	6,90	1,60E-04	3,02	2,07E-04
VIT_02s0025g04460	dehydration-responsive element-binding protein 1E-like	9,23E-19	1,05E-16	9,32	1,60E-04	15,08	1,60E-04	8,10	1,60E-04
VIT_07s0005g00660	late embryogenesis abundant 3 (LEA3)	9,25E-14	1,93E-12	3,45	1,60E-04	4,42	1,60E-04	5,53	1,60E-04
VIT_01s0026g01340	glutathione S-transferase U17	2,98E-11	3,03E-10	2,06	1,66E-04	4,00	1,60E-04	2,14	1,62E-04
VIT_19s0014g03290	NAC domain-containing protein 72	1,78E-14	4,55E-13	2,46	1,60E-04	3,17	1,60E-04	1,73	1,60E-04
VIT_04s0044g01110	alcohol dehydrogenase 2	2,80E-18	2,52E-16	2,31	1,60E-04	2,90	1,60E-04	1,46	1,61E-04
VIT_04s0044g01120	alcohol dehydrogenase 1	1,49E-21	6,83E-19	7,12	1,60E-04	10,34	1,60E-04	5,16	1,60E-04
VIT_04s0044g01130	alcohol dehydrogenase 1	3,13E-19	4,46E-17	5,24	1,60E-04	7,22	1,60E-04	3,67	1,60E-04
VIT_15s0046g01140	WRKY46	6,65E-07	2,55E-06	3,70	1,69E-04	4,38	1,61E-04	1,84	
VIT_04s0008g05760	WRKY40	1,25E-11	1,42E-10	3,37	1,60E-04	4,52	1,60E-04	3,74	1,60E-04
VIT_06s0007g03420	abscisic acid-insensitive 5 (ABIS)	2,72E-08	1,40E-07	1,61	0,003615745	2,49	0,003615745	6,49	1,60E-04
VIT_13s0067g01240	late embryogenesis abundant 6 (LEA6)	7,16E-14	1,54E-12	1,77	0,00907045	2,34	0,00907045	21,02	1,60E-04
VIT_13s0067g01250	late embryogenesis abundant 6 (LEA6)	4,36E-13	7,44E-12	2,05	0,00785133	2,61	0,00785133	25,15	1,60E-04
VIT_04s0008g01420	hypersensitive to ABA1 (HAB1)	6,23E-06	1,95E-05	-1,58	0,014348649	-2,29	1,68E-04	-1,11	
VIT_11s0016g01780	hypersensitive to ABA1 (HAB1)	2,78E-05	7,69E-05	-1,69	0,03186996	-2,92	1,66E-04	-1,57	
<i>Ethylene response TFs and their interacting partners</i>									
VIT_03s0063g00460	ERF109/RRTF1	3,79E-11	3,77E-10	9,65	1,60E-04	16,53	1,60E-04	11,39	1,60E-04
VIT_04s0008g02230	ERF17	4,14E-05	1,11E-04	4,87	9,42E-04	7,01	2,22E-04	4,72	0,001162236
VIT_05s0049g00500	ERF98	2,72E-04	6,24E-04	3,72	0,001451211	4,39	5,63E-04	2,44	0,042043183

VIT_07s0005g00820	ERF71	5,31E-18	10,53	1,60E-04	15,82	1,60E-04	5,90	1,60E-04	
VIT_07s0141g00690	ERF11	1,05E-17	33,75	1,60E-04	64,09	1,60E-04	39,58	1,60E-04	
VIT_10s0003g00130	ERF12	1,71E-08	3,50	1,69E-04	4,56	1,60E-04	6,70	1,60E-04	
VIT_11s0016g00670	ERF16	2,31E-10	2,28	0,03931255	3,93	5,16E-04	22,44	1,60E-04	
VIT_12s0059g00280	ERF54	1,08E-08	2,58	1,65E-04	4,58	1,60E-04	2,13	3,96E-04	
VIT_12s0059g01460	ERF3	1,80E-12	2,08	1,66E-04	2,78	1,60E-04	5,32	1,60E-04	
VIT_19s0090g01080	ERF3	1,74E-11	1,80	1,61E-04	2,53	1,60E-04	2,88	1,60E-04	
VIT_16s0013g00890	ERF2	1,15E-14	4,38	1,60E-04	5,27	1,60E-04	10,52	1,60E-04	
VIT_18s0001g10150	ERF10	1,17E-12	1,81	0,002181734	2,59	1,61E-04	5,96	1,60E-04	
VIT_18s0089g01030	ERF23	3,92E-15	4,53	1,60E-04	5,32	1,60E-04	3,40	1,60E-04	
VIT_13s0019g00480	zinc finger protein ZAT12	4,29E-17	7,45	1,60E-04	12,73	1,60E-04	10,07	1,60E-04	
VIT_08s0056g01300	plant cysteine oxidase 2	8,34E-20	13,90	1,60E-04	21,98	1,60E-04	6,66	1,60E-04	
VIT_14s0108g00090	plant cysteine oxidase 2	4,60E-21	4,92	1,60E-04	6,59	1,60E-04	2,04	1,60E-04	
VIT_17s0000g05790	plant cysteine oxidase 2	3,54E-18	6,44	1,60E-04	7,75	1,60E-04	4,95	1,60E-04	
VIT_03s0063g01960	non-symbiotic hemoglobin-1	2,35E-13	4,89	1,60E-04	6,99	1,60E-04	3,15	1,60E-04	
<i>Auxin</i>									
VIT_08s0058g01160	ARG7-like	6,73E-21	16,08	1,60E-04	25,98	1,60E-04	11,20	1,60E-04	
VIT_09s0002g00650	SAUR50	8,15E-19	10,58	1,60E-04	18,99	1,60E-04	20,54	1,60E-04	
VIT_18s0001g02570	IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 6	1,23E-16	4,72	1,60E-04	6,64	1,60E-04	3,43	1,60E-04	
VIT_18s0001g11790	type IV inositol polyphosphate 5-phosphatase 11	8,65E-10	5,74	1,60E-04	8,65	1,60E-04	4,41	1,61E-04	
VIT_14s0030g02310	auxin-induced ubiquitin superfamily protein 22D	2,54E-07	-5,25	2,58E-04	-11,30	1,60E-04	-5,84	1,98E-04	
VIT_03s0038g02140	auxin transporter-like protein 2	4,45E-08	-3,25	0,02466511	-10,00	1,67E-04	-18,97	1,60E-04	
VIT_13s0019g04380	auxin response factor 18	5,78E-09	-2,06	0,004983829	-4,67	1,60E-04	1,01		
<i>Cytokinin</i>									
VIT_01s0011g06190	histidine kinase 4	5,48E-04	0,001187779	-2,97	0,02545474	-4,51	0,001709225	-4,47	0,001361158
<i>Salicylic acid</i>									
VIT_00s0253g00140	salicylic acid-binding protein 2	1,05E-05	3,24	4,68E-04	4,24	1,76E-04	3,35	3,68E-04	
VIT_00s0253g00150	salicylic acid-binding protein 2	2,65E-16	4,94	1,60E-04	9,07	1,60E-04	7,11	1,60E-04	
VIT_12s0057g01060	salicylate 1-O-methyltransferase	0,001855196	-1,40	0,003606032	-4,32	0,00145878	-2,06		
VIT_12s0057g01070	salicylate 1-O-methyltransferase	1,17E-04	-1,08	2,89E-04	-2,77	0,002277722	1,33		
<i>Jasmonic acid</i>									
VIT_18s0001g12890	jasmonate O-methyltransferase	2,11E-05	4,53	2,46E-04	4,20	4,27E-04	1,66		

VII_18s0001g12900	jasmonate O-methyltransferase	3,09E-06	1,03E-05	5,02	1,80E-04	4,21	3,69E-04	1,37
VII_13s0084g00240	hydroxyasmonate sulfotransferase	0,006068539	0,010632731	-2,32		-5,86	0,002853788	-2,37
<i>Genes connected to cellular redox state</i>								
<i>Glutathione S-transferases</i>								
VII_00s0153g00050	probable glutathione S-transferase-like	2,34E-21	9,93E-19	6,61	1,60E-04	9,25	1,60E-04	5,85
VII_00s0153g00070	probable glutathione S-transferase-like	3,90E-05	1,05E-04	2,37	0,001191939	2,26	0,00286444	-1,00
VII_00s0240g00050	probable glutathione S-transferase-like	4,37E-10	3,34E-09	3,14	2,50E-04	3,42	2,04E-04	9,39
VII_01s0026g01340	glutathione S-transferase UI7-like	2,98E-11	3,03E-10	2,06	1,66E-04	4,00	1,60E-04	2,14
VII_05s0049g01070	probable glutathione S-transferase-like	0,00108466	0,002213474	3,23	0,003610136	2,80	0,014913372	1,27
VII_06s0004g05700	glutathione S-transferase U7-like	1,78E-20	4,61E-18	16,73	1,60E-04	24,55	1,60E-04	28,86
VII_07s0005g04880	glutathione transferase GST 23-like	1,15E-07	5,15E-07	2,77	1,60E-04	2,73	1,61E-04	1,50
VII_12s0028g00920	glutathione S-transferase 3	1,29E-18	1,34E-16	5,42	1,60E-04	8,12	1,60E-04	4,04
VII_12s0028g00930	glutathione S-transferase 5	2,40E-15	7,96E-14	2,97	1,60E-04	3,67	1,60E-04	1,99
VII_15s0024g01630	glutathione S-transferase U8-like	1,62E-04	3,86E-04	3,26	0,004310435	5,14	2,53E-04	2,59
VII_15s0107g00150	probable glutathione S-transferase-like	2,04E-08	1,08E-07	3,69	1,61E-04	5,19	1,60E-04	3,12
VII_16s0039g00970	probable glutathione S-transferase	9,40E-05	2,36E-04	2,56	0,023302892	1,74	2,04E-04	5,06
VII_16s0039g00990	glutathione transferase GST 23-like	2,90E-08	1,48E-07	2,88	2,00E-04	4,67	1,60E-04	3,73
VII_16s0039g01070	glutathione transferase GST 23-like	1,39E-15	5,00E-14	6,37	1,60E-04	9,34	1,60E-04	5,55
VII_17s0000g02930	probable glutathione S-transferase-like	1,34E-12	1,98E-11	2,26	1,61E-04	2,10	1,70E-04	-1,71
VII_19s0093g00220	probable glutathione S-transferase-like	6,73E-09	3,93E-08	2,33	2,17E-04	2,69	1,65E-04	4,07
VII_19s0093g00310	probable glutathione S-transferase-like	1,85E-15	6,39E-14	3,02	1,60E-04	4,61	1,60E-04	10,51
VII_19s0093g00320	glutathione S-transferase	7,86E-15	2,24E-13	5,06	1,60E-04	7,39	1,60E-04	4,64
<i>Crocin glucosyltransferases</i>								
VII_05s0062g00270	crocin glucosyltransferase	1,28E-21	6,44E-19	48,80	1,60E-04	75,53	1,60E-04	67,67
VII_05s0062g00300	crocin glucosyltransferase	1,76E-24	6,23E-21	82,53	1,60E-04	126,35	1,60E-04	90,29
VII_05s0062g00310	crocin glucosyltransferase	1,37E-25	7,28E-22	110,52	1,60E-04	183,11	1,60E-04	107,95
VII_05s0062g00700	crocin glucosyltransferase	7,44E-15	2,13E-13	17,88	1,60E-04	19,16	1,60E-04	5,81
VII_05s0062g00710	crocin glucosyltransferase	5,61E-14	1,25E-12	30,15	1,60E-04	43,46	1,60E-04	10,25
<i>Genes encoding components of the phenylpropanoid pathway</i>								
VII_13s0019g04460	phenylalanine ammonia-lyase	3,40E-09	2,13E-08	-1,71		-4,52	1,60E-04	-4,74
VII_08s0040g01710	phenylalanine ammonia-lyase	1,49E-11	1,65E-10	2,97	1,60E-04	2,55	1,60E-04	-1,16
VII_06s0004g02620	phenylalanine ammonia-lyase	3,95E-06	1,29E-05	-1,38		-2,98	1,71E-04	-2,50

VIT_16s0039g01100	phenylalanine ammonia-lyase	4.43E-11	4.32E-10	3.69	1.60E-04	3.43	1.60E-04	-1.17
VIT_16s0039g01110	phenylalanine ammonia-lyase	3.75E-11	3.73E-10	4.20	1.60E-04	3.92	1.60E-04	-1.36
VIT_16s0039g01120	phenylalanine ammonia-lyase	1.78E-11	1.92E-10	4.14	1.60E-04	3.96	1.60E-04	-1.17
VIT_16s0039g01130	phenylalanine ammonia-lyase	4.29E-09	2.63E-08	4.38	7.55E-04	4.01	0.001902501	-3.11 0.010309413
VIT_16s0039g01240	phenylalanine ammonia-lyase	1.59E-16	7.64E-15	3.84	1.60E-04	3.53	1.60E-04	-3.19 1.60E-04
VIT_16s0039g01280	phenylalanine ammonia-lyase	2.15E-11	2.28E-10	3.36	0.00163517	2.73	0.01272511	-5.73 1.65E-04
VIT_06s0004g08150	trans-cinnamate 4-monoxygenase	2.74E-11	2.84E-10	2.35	2.32E-04	1.96	0.002568486	-2.25 3.17E-04
VIT_11s0078g00290	trans-cinnamate 4-monoxygenase	1.44E-13	2.85E-12	4.68	1.60E-04	4.23	1.60E-04	1.28
VIT_11s0065g00350	trans-cinnamate 4-monoxygenase	1.22E-11	1.38E-10	4.80	1.60E-04	4.76	1.60E-04	1.01
VIT_10s0042g00840	stilbene synthase 2	3.28E-09	2.06E-08	4.07	0.001575097	3.27	0.010561258	-3.98 0.001849041
VIT_10s0042g00910	stilbene synthase 2-like	3.19E-11	3.23E-10	3.80	8.84E-04	4.19	5.63E-04	-4.60 2.73E-04
VIT_10s0042g00930	stilbene synthase 2	1.14E-08	6.36E-08	5.52	1.64E-04	5.95	1.63E-04	-1.08
VIT_16s0100g00750	stilbene synthase 2	1.09E-13	2.22E-12	2.45	1.64E-04	2.23	2.21E-04	-2.44 1.64E-04
VIT_16s0100g00760	stilbene synthase 6	1.08E-12	1.64E-11	2.48	0.008166129	2.12	0.043314606	-7.22 1.60E-04
VIT_16s0100g00770	stilbene synthase 5-like	3.54E-13	6.24E-12	4.34	1.60E-04	3.88	1.60E-04	-1.09
VIT_16s0100g00780	stilbene synthase 5	2.79E-09	1.78E-08	3.26	1.62E-04	2.56	3.91E-04	-1.40
VIT_16s0100g00800	stilbene synthase 4-like	4.47E-11	4.36E-10	4.83	1.60E-04	4.85	1.60E-04	-1.51
VIT_16s0100g00810	stilbene synthase 4-like	6.77E-11	6.27E-10	5.18	1.60E-04	4.86	1.62E-04	-1.71
VIT_16s0100g00840	stilbene synthase 4-like	1.87E-08	9.92E-08	4.85	0.002708771	4.37	0.006872942	-4.10 0.008044319
VIT_16s0100g00850	stilbene synthase 4-like	4.26E-08	2.10E-07	3.04	0.00887524	2.51	0.04563618	-3.52 0.002685166
VIT_16s0100g00860	stilbene synthase 4-like	5.88E-11	5.53E-10	6.14	1.60E-04	6.15	1.60E-04	-1.18
VIT_16s0100g00880	stilbene synthase 4-like	5.44E-10	4.07E-09	4.68	1.62E-04	4.25	1.71E-04	-1.56
VIT_16s0100g00910	stilbene synthase 5	3.55E-11	3.55E-10	4.13	1.60E-04	3.81	1.60E-04	-1.35
VIT_16s0100g00990	stilbene synthase 2	9.34E-12	1.09E-10	3.42	1.93E-04	3.21	2.87E-04	-2.88 4.98E-04
VIT_16s0100g01000	stilbene synthase 4-like	9.04E-11	8.15E-10	4.78	1.60E-04	4.34	1.61E-04	-1.34
VIT_16s0100g01020	stilbene synthase 4-like	1.27E-10	1.11E-09	4.66	1.60E-04	4.61	1.60E-04	-1.20
VIT_16s0100g01040	stilbene synthase 4	4.16E-11	4.09E-10	5.58	1.60E-04	5.56	1.60E-04	2.12 0.001962208
VIT_16s0100g01060	stilbene synthase 3-like	4.92E-05	1.30E-04	4.58	2.67E-04	2.36	0.04998197	1.13
VIT_16s0100g01070	stilbene synthase 1	4.37E-13	7.44E-12	4.45	1.60E-04	5.89	1.60E-04	2.86 1.60E-04
VIT_16s0100g01100	stilbene synthase 1	4.51E-09	2.74E-08	3.02	1.60E-04	2.41	1.61E-04	1.52 0.02024898
VIT_16s0100g01110	stilbene synthase 1-like	1.93E-10	1.61E-09	3.86	1.60E-04	3.47	1.60E-04	1.12
VIT_16s0100g01120	stilbene synthase 5	4.23E-15	1.29E-13	3.91	1.60E-04	3.40	1.60E-04	-1.58 0.02020304
VIT_16s0100g01140	stilbene synthase 1	4.50E-11	4.38E-10	4.07	1.60E-04	4.33	1.60E-04	1.05

VIT_16s0100g01160	stilbene synthase 1	9,34E-09	5,29E-08	4,39	1,60E-04	4,54	1,60E-04	1,30	
VIT_16s0100g01170	stilbene synthase 3	1,92E-12	2,71E-11	4,42	1,60E-04	4,32	1,60E-04	1,04	
VIT_14s0066g00920	chalcone synthase	3,70E-08	1,85E-07	-1,86	0,009132298	-3,92	1,60E-04	-1,10	
VIT_14s0066g00930	chalcone synthase	1,10E-08	6,15E-08	-3,43	8,43E-04	-9,41	1,60E-04	-1,25	
VIT_18s0001g03470	flavonol synthase (FLS1)	6,89E-05	1,77E-04	-3,56	0,003954791	-6,25	2,05E-04	-2,06	
VIT_13s0067g01020	flavonol synthase	7,54E-08	3,51E-07	5,84	1,67E-04	9,39	1,60E-04	2,12	
VIT_02s0033g00270	isoflavone reductase homolog-like	1,50E-04	3,61E-04	2,36	5,00E-04	2,33	7,60E-04	1,58	
VIT_03s0038g04690	isoflavone reductase-like protein	8,10E-06	2,49E-05	4,12	0,001262888	4,53	8,41E-04	-1,12	
VIT_07s0031g03070	isoflavone reductase-like protein 3	3,08E-14	7,42E-13	26,14	1,60E-04	39,92	1,60E-04	12,16	
VIT_07s0129g00730	isoflavone 2'-hydroxylase	0,005509876	0,009739026	-2,27		-3,20	0,003857092	-1,74	
VIT_07s0129g00800	isoflavone 3'-hydroxylase	8,80E-16	3,33E-14	18,24	1,60E-04	26,59	1,60E-04	21,95	
VIT_07s0129g00820	isoflavone 2'-hydroxylase	2,42E-19	3,62E-17	13,78	1,60E-04	20,34	1,60E-04	4,24	
VIT_09s0002g06440	isoflavone 3'-hydroxylase-like	8,46E-09	4,83E-08	5,50	1,60E-04	5,38	1,60E-04	1,54	
VIT_09s0002g06450	isoflavone 3'-hydroxylase-like	1,33E-08	7,32E-08	6,37	1,62E-04	7,03	1,61E-04	1,15	
VIT_03s0017g02110	anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 6-like	3,18E-05	8,70E-05	2,59	0,002483428	2,69	0,002232419	-1,08	
VIT_03s0017g02120	anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 2-like	9,62E-14	1,99E-12	6,25	1,60E-04	10,43	1,60E-04	2,97	
VIT_03s0017g02140	anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 6-like	2,50E-10	2,02E-09	9,35	1,60E-04	14,60	1,60E-04	2,38	
<i>Genes encoding further components of the antioxidative system</i>									
VIT_00s0698g00010	catalase	2,73E-11	2,82E-10	-2,29	1,60E-04	-2,37	1,60E-04	1,10	
VIT_04s0044g00020	catalase	1,25E-12	1,87E-11	-2,41	1,60E-04	-2,40	1,60E-04	1,50	
<i>Carotenoid biosynthesis</i>									
VIT_06s0004g00820	phytoene synthase 2, chloroplastic	7,06E-04	0,001494268	-1,50		-3,24	0,008490656	-3,87	
VIT_04s0079g00680	phytoene synthase 2, chloroplastic	1,18E-04	2,90E-04	-3,48	0,002472001	-4,08	9,44E-04	-1,29	
VIT_09s0002g00100	phytoene desaturase	1,49E-04	3,58E-04	-1,90	0,008696383	-2,59	2,64E-04	-2,01	
VIT_05s0062g01110	15-cis-zeta-carotene isomerase, chloroplastic	5,01E-06	1,60E-05	-1,82	0,006181987	-2,47	2,07E-04	-2,66	
VIT_14s0030g01740	zeta-carotene desaturase, chloroplastic/chromoplastic	4,19E-06	1,37E-05	-1,66	0,002506936	-2,36	1,61E-04	-1,61	
VIT_08s0032g00800	prolycopene isomerase, chloroplastic	3,72E-08	1,85E-07	-2,57	1,73E-04	-3,78	1,60E-04	-2,74	
VIT_11s0016g01880	lycopene epsilon cyclase, chloroplastic-like	2,17E-04	5,07E-04	-2,13	0,04078185	-3,66	4,00E-04	-1,27	
VIT_08s0007g05690	lycopene beta cyclase, chloroplastic	7,16E-07	2,73E-06	-2,24	2,03E-04	-2,71	1,61E-04	-1,39	
VIT_07s0031g00620	zeaxanthin epoxidase	1,07E-06	3,92E-06	-2,17	0,003529504	-2,68	4,03E-04	1,28	
VIT_02s0087g00910	probable carotenoid cleavage dioxygenase 4, chloroplastic	7,46E-07	2,83E-06	-4,08	2,66E-04	-4,07	3,20E-04	-6,77	
VIT_05s0051g00670	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, chloroplastic	1,14E-07	5,12E-07	-1,61		-3,07	8,67E-04	2,27	

*Redox signaling and redox-regulated genes
NPR1 interactors*

VIT_07s0005g02070	NIMIN-1	2,65E-27	2,81E-23	62,84	1,60E-04	106,55	1,60E-04	64,18	1,60E-04	
VIT_01s0011g03430	NIMIN-2	1,13E-19	1,94E-17	14,97	1,60E-04	31,80	1,60E-04	61,69	1,60E-04	
VIT_06s0080g00360	IGACG motif-binding protein 9 (IGA9)	2,87E-14	6,97E-13	2,32	1,60E-04	3,02	1,60E-04	1,37	0,004609198	
VIT_01s0146g00220	ROXY1 glutaredoxin	8,28E-08	3,82E-07	3,75	2,18E-04	5,38	1,61E-04	1,16		
<i>MCP1 metacaspase</i>										
VIT_16s0013g00210	MCP1 metacaspase	5,96E-04	0,001281675	2,85	0,006342896	3,62	0,00105673	1,59		
VIT_16s0013g00220	MCP1 metacaspase	6,37E-17	3,48E-15	2,59	1,60E-04	4,15	1,60E-04	1,79	1,60E-04	
<i>Genes encoding redox-associated chloroplastic proteins</i>										
VIT_18s0001g11710	oxygen-evolving enhancer protein 1	3,91E-04	8,69E-04	-3,38	0,006793856	-3,53	0,006374238	-1,06		
VIT_08s0007g01570	fructose-1,6-bisphosphatase	3,81E-05	1,03E-04	-2,18		-4,38	0,001432295	1,49		
VIT_02s0109g00080	phosphoribulokinase	2,60E-10	2,09E-09	-2,79	5,66E-04	-2,56	0,001838598	2,66	9,08E-04	
VIT_13s0019g03350	sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	4,89E-07	1,93E-06	-2,36	0,004399078	-4,86	1,60E-04	-1,26		
VIT_06s0004g05180	ribulose biphosphate carboxylase	1,88E-11	2,02E-10	-2,51	2,25E-04	-3,21	1,61E-04	1,86	0,008525603	
VIT_14s0060g00820	chloroplast stem-loop binding protein	1,17E-08	6,52E-08	-1,54		-2,86	3,18E-04	2,13	0,00601966	
VIT_06s0004g06140	50S ribosomal protein	0,009364339	0,01584068	-2,47		-3,53	0,00656639	-2,03		
VIT_17s0000g09370	elongation factor TuB	3,84E-08	1,91E-07	-2,69	0,002953606	-1,77		2,71	0,002756773	
VIT_14s0108g01560	alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme	8,10E-07	3,05E-06	-1,95	2,15E-04	-2,44	1,60E-04	-1,62	0,004286464	
VIT_11s0078g00310	isoamylase 1	0,006932921	0,01202394	-1,55		-2,10	0,049394686	1,21		
VIT_07s0104g00370	isoamylase 2	0,008800422	0,014963115	-1,99		-3,03	0,008686468	-2,48	0,033366315	
VIT_18s0001g06520	isoamylase 3	1,89E-06	6,63E-06	-1,70	2,10E-04	-1,89	1,62E-04	-1,31		
VIT_07s0031g01540	4-alpha-glucanotransferase	5,77E-11	5,44E-10	-1,90	2,00E-04	-2,16	1,62E-04	-3,62	1,60E-04	
VIT_10s0116g01730	starch synthase 3	1,44E-05	4,21E-05	-1,86	0,005492747	-2,50	2,15E-04	-2,48	2,02E-04	
VIT_11s0065g00150	starch synthase 6	2,78E-06	9,39E-06	-1,73	0,003822164	-2,16	2,30E-04	-2,48	1,61E-04	
VIT_19s0090g00920	1,4-alpha-glucan-branching enzyme 1	0,018333497	0,02914894	-1,95	0,045092218	-2,14	0,02173385	-1,67		
VIT_08s0007g03750	1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2	9,96E-13	1,53E-11	-1,86	1,60E-04	-2,10	1,60E-04	-1,29	0,002722347	
VIT_18s0001g02740	photosystem II 22 kDa protein	9,83E-06	2,97E-05	-3,30	0,011717692	-6,01	3,05E-04	1,13		
VIT_14s0068g00680	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	4,77E-11	4,61E-10	-1,92	0,001278204	-2,36	1,87E-04	1,96	9,02E-04	
VIT_14s0068g00420	alpha-amylase-like 3	1,07E-05	3,21E-05	-2,40	5,20E-04	-2,73	2,34E-04	-1,23		
VIT_08s0007g05260	ferredoxin-dependent glutamate synthase	1,47E-04	3,54E-04	-1,68	0,04451795	-2,45	4,22E-04	-2,26	8,05E-04	
VIT_01s0011g03010	serine/threonine-protein kinase STN7	1,71E-07	7,39E-07	-2,13	1,61E-04	-2,09	1,63E-04	-1,28		

VIT_04s0023g03510	ferredoxin-NADP-oxidoreductase 2	4,47E-13	7,61E-12	-1,67	4,23E-04	-2,03	1,61E-04	1,81	1,88E-04
VIT_17s0000g03690	ribose biphosphate carboxylase small chain	1,88E-14	4,81E-13	-2,16	1,70E-04	-2,01	2,47E-04	2,53	1,60E-04
<i>Alcohol dehydrogenase 1 and their cellular interactors</i>									
VIT_04s0044g01110	alcohol dehydrogenase 1 (ADH1)	2,80E-18	2,52E-16	2,31	1,60E-04	2,90	1,60E-04	1,46	1,61E-04
VIT_04s0044g01120	alcohol dehydrogenase 1 (ADH1)	1,49E-21	6,83E-19	7,12	1,60E-04	10,34	1,60E-04	5,16	1,60E-04
VIT_04s0044g01130	alcohol dehydrogenase 1 (ADH1)	3,13E-19	4,46E-17	5,24	1,60E-04	7,22	1,60E-04	3,67	1,60E-04
VIT_08s0217g00100	pyruvate decarboxylase-2	5,42E-20	1,05E-17	3,91	1,60E-04	6,67	1,60E-04	2,44	1,60E-04
VIT_06s0004g02060	aldehyde dehydrogenase	0,001666804	0,003273435	-2,31		-4,30	0,001098822	-2,71	0,027846674
VIT_14s0066g01550	aldehyde dehydrogenase	1,05E-10	9,36E-10	-2,08	1,61E-04	-3,38	1,60E-04	-2,28	1,60E-04
<i>WRKY transcription factors</i>									
VIT_15s0046g01140	WRKY46	6,65E-07	2,55E-06	3,70	1,69E-04	4,38	1,61E-04	1,84	
VIT_04s0008g05760	WRKY40	1,25E-11	1,42E-10	3,37	1,60E-04	4,52	1,60E-04	3,74	1,60E-04
VIT_07s0031g00080	WRKY7	1,04E-09	7,33E-09	1,94	1,61E-04	2,18	1,60E-04	2,58	1,60E-04
VIT_18s0001g10030	WRKY7	9,13E-13	1,42E-11	1,75	1,60E-04	2,57	1,60E-04	1,17	
VIT_12s0055g00340	WRKY9	3,21E-14	7,66E-13	3,86	1,60E-04	7,75	1,60E-04	3,93	1,60E-04
VIT_15s0046g02190	WRKY22	3,50E-15	1,10E-13	4,94	1,60E-04	8,81	1,60E-04	7,76	1,60E-04
VIT_08s0058g01390	WRKY70	3,50E-15	1,10E-13	4,94	1,60E-04	8,81	1,60E-04	7,76	1,60E-04
VIT_13s0067g03140	WRKY70	1,02E-05	3,06E-05	2,31	0,01358154	4,73	1,64E-04	1,48	