

DEBRECENI EGYETEM
KERPELY KÁLMÁN NÖVÉNYTERMESZTÉSI ÉS KERTÉSZETI
TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:
Prof. Dr. Holb Imre
egyetemi tanár, az MTA doktora

Témavezető:
Dr. Virág Eszter Andrea PhD
tudományos főmunkatárs: Debreceni Egyetem, 'Egy Egészség' Intézet, Planetáris
Egészség Tanszék
tudományos igazgató: Gyógynövénykutató Intézet Kft., Budakalász

**LIPOSZÓMA FORMULÁLT GYÓGYNÖVÉNYKIVONATOK
BIOSTIMULÁNS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA JELENTŐS SZÁNTÓFÖLDI
KULTÚRÁKBAN**

Készítette:
Kutasy-Takács Barbara Júlia
doktorjelölt

**Debrecen
2025.**

LIPOSZÓMA FORMULÁLT GYÓGYNÖVÉNYKIVONATOK BIOSTIMULÁNS
HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA JELENTŐS SZÁNTÓFÖLDI KULTÚRÁKBAN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
növénytermesztési- és kertészeti tudományok tudományágban

Írta: Kutasy-Takács Barbara Júlia

Készült a Debreceni Egyetem Kerpely Kálmán doktori iskolája
Növénytermesztési- és kertészeti tudományok programja keretében

Témavezető: Dr. Virág Eszter Andrea PhD

Az értekezés bírálói:

.....
.....

A bírálóbizottság:

elnök:

tag:

titkár:

Az értekezés védésének időpontja: 2025.

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS.....	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. Az ökológiai mezőgazdaság jelentősége globálisan, az Európai Unióban és Magyarországon.....	8
2.2. Termésnövelő anyagok, növénykondicionáló szerek és növényvédelmi célú készítmények típusai, ökológiai használhatóságának szabályozása	9
2.3. Növényi biostimulátorok fajtái, növénykondicionáló szerekként történő használatuk.....	10
2.3.1. Növényi-alapú biostimulátorok	10
2.3.2. Növényi-alapú biostimulátor az EliceVakcina, fő összetevői közé tartozó gyógynövénykivonatok biostimuláns hatása	11
2.3.3. Növényi-alapú biostimulátor a fokhagymakivonat, leírt biostimuláns hatása	12
2.3.4. Növényi-alapú biostimulátorok hatása a növények védelmi rendszerére.....	14
2.3.5. A növényi-alapú biostimulátorok abiotikus és biotikus stressz elleni hatása, a folyamatok molekuláris háttere	14
2.4. Biopeszticidok.....	16
2.5. Nanorészecskék a biopeszticidok és biostimulátorok formulálásban	18
2.5.1. Nanobiopeszticidok.....	18
2.5.2. Nano méretű szállító-biopeszticidok.....	18
2.5.3. Liposzómák használata a növényi biopeszticidok és biostimulátorok formulálására.....	20
2.5.3.1. Liposzóma formulált növényi kivonatok növénypatogén vírusellenes hatása	22
2.5.3.2. Liposzóma formulált növényi kivonatok növénypatogén baktériumellenes hatása	22
2.5.3.3. Liposzóma formulált növényi kivonatok növénypatogén gombaellenes hatása	22
2.5.3.4. Liposzóma formulált növényi kivonatok rovarellenes hatása	23
2.6. A szuperkritikus extrakció	24
2.7. A növények veleszületett és indukálható védekezése.....	24
2.8. Célkitűzések.....	26
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	28
3.1. A vizsgált növényi-alapú biostimulátorok.....	28
3.1.1. A növényi-alapú biostimulátorok összetevői.....	28
3.1.2. A növényi-alapú biostimulátorok ABA és tiamin (B1 vitamin) tartalmának mérése HPLC-vel.....	29
3.1.3. A liposzómák stabilitásának és részecskeméretének meghatározása	29
3.2. Növényi-alapú biostimulátorok in vitro antifungális hatása.....	30
3.2.1. <i>Fusarium</i> fajok fenntartása	30
3.2.2. A minimális gátló koncentráció meghatározása <i>Fusarium</i> fajokban.....	31
3.2.3. Papírkorongos gátlási zóna meghatározás <i>Fusarium</i> fajokban.....	31
3.2.4. Csírázóképesség vizsgálat <i>F. oxysporum</i> inokullummal	31

3.3. A vizsgált növény fajok	31
3.4. Kezelések és mintagyűjtés	32
3.4.1. Üvegházi kísérlet és mintagyűjtés	32
3.4.2. Kiszparcellás kísérletek és mintagyűjtések	32
3.5. Újgenerációs szevenálás, NGS könyvtár készítése.....	33
3.6. Az NGS leolvasások bioinformatikai adatfeldolgozása	34
3.6.1. A szekvenált leolvasások előfeldolgozása és összeszerelése	34
3.6.2. Transzkript abundancia meghatározás és annotálás	35
3.7. A kezelések közötti különbségek kimutatásra használt bioinformatikai elemzések	35
3.7.1. Páronkénti differenciális expresszió meghatározása (Pairwise DEG).....	35
3.7.2. Funkcionális annotáció	35
3.7.3. Útvonalelemzés (Pathway analysis)	36
3.7.4. Időbeli-változás elemzés (Time-course expression analysis).....	36
3.7.5. Kiválasztott útvonalhoz tartozó gének RPM elemzése.....	36
3.8. Valós idejű RT-qPCR elemzés	37
4. EREDMÉNYEK	39
4.1. Növényi-alapú biostimulátorok ABA és tiamin mennyiségének HPLC-DAD mérése	39
4.2. Az EliceVakcina és Garlic-lipo készítmények liposzóma stabilitás mérése és részecskeméret meghatározása	39
4.3. Növényi-alapú biostimulátorok antifungális hatása	42
4.3.1. Mikrodilúció toxicitási teszt és papírkorongos gátlási zóna meghatározása <i>Fusarium</i> fajokban.....	42
4.4. NGS szekvenálás feldolgozása	45
4.4.1. NGS könyvtár szekvenálása, előfeldolgozása és összeszerelése.....	45
4.4.2. Génszintű abundancia meghatározás és annotáció	46
4.4.3. Páronkénti differenciális expresszió elemzés (DEG)	47
4.5. Garlic-lipo kezelés hatásának kimutatása genomszintű transzkriptomikai profilozással	48
4.5.1. <i>T. aestivum</i> minták DEG összehasonlítása	48
4.5.2. Útvonalelemzés <i>T. aestivum</i> mintákban	50
4.5.3. Hormon szignáltranszdukció útvonalhoz tartozó gének RPM elemzése <i>T. aestivum</i> mintákban	51
4.5.4. <i>T. aestivum</i> minták időbeli-változás elemzése.....	52
4.5.5. <i>T. aestivum</i> klaszterek útvonalelemzése	54
4.5.6. <i>T. aestivum</i> minták in silico elemzésnek validálása RT-qPCR-rel.....	56
4.6. EliceVakcina kezelés hatásának kimutatása genomszintű transzkriptomikai profilozással	58
4.6.1. EliceVakcina kezelés hatásának kimutatása DEG összehasonlítással	58
4.6.1.1. <i>P. sativum</i> minták DEG összehasonlítása.....	58
4.6.1.2. <i>B. napus</i> minták DEG összehasonlítása.....	60
4.6.1.3. <i>G. max</i> minták DEG összehasonlítása	61
4.6.2. Útvonalelemzések.....	62
4.6.2.1. Útvonalelemzés <i>P. sativum</i> mintákban.....	62

4.6.2.2. Útvonalelemzés <i>B. napus</i> mintákban.....	66
4.6.2.3. Útvonalelemzés <i>G. max</i> mintákban	68
4.6.2.4. Útvonalelemzések összefoglalása a három kultúrában.....	69
4.6.3. Hormon szignáltranszdukció útvonalhoz tartozó gének RPM elemzése.....	72
4.6.3.1. Hormon szignáltranszdukció útvonalhoz tartozó gének RPM elemzése <i>P. sativum</i> mintákban.....	72
4.6.3.2. Hormon szignáltranszdukció útvonalhoz tartozó gének RPM elemzése <i>B. napus</i> mintákban.....	74
4.6.3.3. Hormon szignáltranszdukció útvonalhoz tartozó gének RPM elemzése <i>G. max</i> mintákban	75
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....	77
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	91
7. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK	93
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	95
9. SUMMARY	97
10. IRODALOMJEGYZÉK	99
11. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN.....	121
12. NYILATKOZATOK	121
13. MELLÉKLETEK.....	126
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	137

1. BEVEZETÉS

Napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt kap az élelmiszer-biztonság, annak érdekében, hogy egészséges és kiváló minőségű élelmiszer kerüljön a fogyasztók asztalára. A gazdasági növények termesztéstechnológiája során meghatározó a növényt károsítók elleni védekezésének módja, az abiotikus/biotikus stresszre adott növényi válasz, hogy a termés mennyiségét és minőségét megőrizze. A vegetáció során használt vegyületek felé támasztott fontos követelmény, hogy az élelmezésre felhasznált végtermék ne tartalmazzon az emberi egészségre ártalmas vegyületeket. A növényi-alapú biostimulátorok alkalmazása hatékonyan javíthatja a termés minőségét, mennyiségét vagy a tápanyagfelvétel/tápanyaghasznosulás hatékonyságát, a biotikus és abiotikus stresszekkel szembeni toleranciát, így hozzájárulhatnak a integrált növénytermesztés és növényvédelem e céljaihoz, mely a károsítók megjelenésének megelőzésére vagy azok mennyiségének gazdasági kárküszöbérték alá szorítására törekszik különböző agrotechnikai, biológiai, biotechnikai, mechanikai és kémiai eszközökkel.

A nanotechnológia új megközelítéssel szolgál a biopeszticidok ellenőrzött növénybe juttatásához, hogy növekedjen a termésmennyiség és csökkenjen a környezetszennyezés. Használatuk előnyt és kockázatot is jelenthet, mivel kevés ismeretünk van a működésükről.

Kísérleteinkben a Gyógynövénykutató Intézet Kft. (Budakalász) által fejlesztett Elice16[®] termékcsalád EliceVakcina és Garlic-lipo növénykondicionáló termékek, amelyek növényi eredetű lipidekből álló nanoméretű liposzómákba kapszulázott szuperkritikus szén-dioxid (SC-CO₂) gyógynövénykivonatok, biostimulátorként való alkalmazhatóságát vizsgáltuk üvegházi és kis parcellás kísérletek során. A liposzómázott készítmény levélre permetezését alkalmaztuk *Triticum aestivum* L., *Pisum sativum* L., *Glycine max* (L.) Merr. és *Brassica napus* L. nevelése során 1-3 alkalommal. Szakirodalmi adatok szerint a SC-CO₂ extrakció hatékonyan segíti megőrizni a bioaktív vegyületeket, a liposzóma formulázás pedig növeli a kivonat penetrációjának és transzlokációjának hatékonyságát. A készítmények jótékony hatását a felhasznált gyógynövénykivonatok nagy mennyiségű allelokémiai anyagainak köszönheti, mint például flavonoidok, szteroidok, terpenoidok, szaponinok, alkaloidok és fenolos vegyületek, amelyek igazoltan serkenthetik a növények fejlődését, tápanyag-felvételét és beépülését vagy a kórokozókkal szembeni ellenálló képességét. Vizsgálataink során elsősorban a biotikus és abiotikus stresszválaszban részt vevő enzimek, fehérjék működésével foglalkoztunk. A kezelések után két nappal friss

leveleket gyűjtünk és QuantSeq 3' mRNS szekvenálással (Illumina NextSeq 550 platform), a könyvtárak genomszintű transzkripció profilozásával vizsgáltuk a védekezési válaszvonalakkal kapcsolatos gének expresszió szintjét. A növénytermesztés során használt biostimulátorok felhasználásának tesztelése és validálása elősegíti a növényi immunrendszer működésének jobb megismerését.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az ökológiai mezőgazdaság jelentősége globálisan, az Európai Unióban és Magyarországon

Az ökológiai gazdálkodás önmagában nem nyújt megoldást korunk fenntartható mezőgazdaságának sürgető problémáira, de fontos szerepet játszhat a jelenlegi termelési rendszer átalakulásában. A biogazdaságokban agroökológiai elveken alapuló gazdálkodási rendszereket építenek fel, melyek a fogyasztók igényeit szolgálják (Eyhorn et al., 2019). A növénytermesztés ökológiai befolyásának erősödésekor célként jelenik meg a terméshozam növelése a biodiverzitás és a kapcsolódó ökoszisztéma-szolgáltatások fokozásával, úgy, hogy minimalizálja a szintetikus anyagok felhasználását (Garibaldi et al., 2019). Az ökológiai termőföldek aránya minden kontinensen növekszik. Az ökológiai gazdálkodásra vonatkozó legfrissebb globális, 190 ország összegyűjtött adatai (2021) szerint több mint 74,9 millió hektár termőföldön végeznek ökológiai gazdálkodást. Globálisan az elmúlt 20 évben hétszeresére nőtt az ökológiai gazdálkodás alá vont termőterületek nagysága, bár így is csak a teljes mezőgazdasági terület 1,6% -a. A globális biopiacok értékesítése is hétszeresére növekedett világszerte 20 év alatt, elérve a 120,6 billió eurót (Luttikholt and Mapusua, 2021).

Az Európai Unió Öko rendelete (2018/848) szerint az ökológiai termelés olyan élelmiszer-előállító gazdálkodási rendszer, mely tiszteletben tartja a természetes rendszerek állapotát (víz, talaj, levegő), valamint megőrzi és javítja a növények és az állatok egészségét. Önmagát korlátozza a külső források (növényvédőszer, műtrágyák, talajjavító szerek, hozamfokozók) felhasználásakor oly módon, hogy a biológiai folyamatok során természeti erőforrásokat alkalmaz (<http://data.europa.eu/eli/reg/2018/848/2022-01-01>). Magyarország az EU rendeletekkel összhangban hozta meg az ökológiai gazdálkodás szigorú szabályozását a mezőgazdasági termékek és élelmiszerek előállításáról és forgalmazásáról. A KSH adatok szerint hazánkban 2021-ban mintegy 263 000 hektáron végeztek ellenőrzött ökológiai gazdálkodást. Bár az elmúlt években jelentősen nőtt az ökológiai gazdálkodás alá vont területek kiterjesztése, mégis ez csak a mezőgazdasági területek 5,8 százalékát érinti (Ausztria 25,7%, Észtország és Svédország esetében több mint ötöde <https://ksh.hu/s/kiadvanyok/fenntarthato-fejlodes-indikatorai-2022/3-10-sdg-2>). Az Agrárminisztérium célkitűzései között szerepel az ökológiai művelés alá vont területek arányának duplájára emelése 2027-ig elérve a 10 % ökoterület-arányt, ilyen módon

támogatja az ökológiai gazdálkodást, a biológiai sokféleség megőrzését (<https://kap.gov.hu/news/2023-02-28/101521/hazai-okologiai-gazdalkodas-egy-evtizednyi-novekedesre-alapozza-jovojet>).

2.2. Termésmnövelő anyagok, növénykondicionáló szerek és növényvédelmi célú készítmények típusai, ökológiai használhatóságának szabályozása

A termésmnövelő anyagok (szakmai angol kifejezés szerint fertilizing products) kísérletekkel bizonyítottan kedvező hatást fejtenek ki a talajra és a termesztett növényre úgy, hogy használatuk közben toxikus hatást a környezetre és a termesztett növényre nem jelentenek. Magyarországon a termésmnövelő anyagokat kategóriákba rendezte a 36/2006 FVM kibővített rendelet. Az előírás szerint lehet engedélyeztetni és forgalomba hozni termésmnövelő anyagként mű-, szerves és ásványi trágyákat, komposztot, gilisztahumuszt, talajjavító anyagokat, talajkondicionáló készítményeket, mikrobiológiai termékeket, amelyek nem biopeszticidek, természetközveket, növénykondicionálókat és annak kombinációit. A növénykondicionáló szer olyan szerves vagy szervesetlen anyagokból előállított készítmény, mely kedvezően hat a növények fejlődésére, terméshozamára, általános állapotára és az életfolyamatokra elsődlegesen a tápanyagforgalom befolyásolásán keresztül.

A 2019/1009/EK rendelet harmonizálta a korábbi jogszabályokat, így uniós szinten a termésmnövelő anyagok forgalmazásáról szóló szabályozás egységes piacot tudott létrehozni. Egységes biztonsági, minőségi és címkézési szabályokat írt elő, valamint ebben a rendeletben meghatározták a termésmnövelő anyagok toxikus szennyezőanyag-határértékeit. Ez az új EU rendelet funkció szerinti termékkategóriákat hozott létre úgy mint, trágya (szerves, szervesetlen), meszezőanyag, talajjavító anyag (szerves, szervesetlen), természetközveg inhibitor (nitrifikációt, denitrifikációt és ureázt gátló anyagok), növényi biostimulátor és termésmnövelő anyagkeverék.

1107/2009/EK rendeletben jelent meg a növényi biostimuláns kifejezés, ami olyan terméket jelöl, amely tápanyagtartalmától függetlenül stimulálja a növény tápanyagellátási folyamatait azzal a céllal, hogy a növénynek vagy a növény rhizoszférajának a tulajdonságai közül egyet vagy többet javít. A növényi biostimuláns javítja a tápanyag-felhasználási hatékonyságot, az abiotikus stressztoleranciát, a termés minőségét és a felvehető tápanyagok mennyiségét. Az ökológiai gazdálkodásban

növényvédelmi célokra használt növényi biostimulánsok szabályozása az 1107/2009/EK rendelet alapján történt. A rendelet jóvá hagyta a nem kimondottan növényvédelmi célokra fejlesztett növényi alapanyagok, kivonások és növényi hatóanyagot tartalmazó szerek használatát, ha azok hasznosak a kártétel visszaszorítására és nem toxikusak a termesztett növény számára (Matyjaszczyk, 2023). Jóllehet az EU rendeletek magyar fordításában biostimuláns szó szerepel, napjainkban elterjedtebbé vált a biostimulátor kifejezés, ezért a későbbiekben ezt a kifejezést használjuk.

2.3. Növényi biostimulátorok fajtái, növénykondicionáló szerekként történő használatuk

Du Jardin (2015) hét osztályba sorolta a növényi biostimulátorokat, melyek humin- és fulvosavak, fehérje-hidrolizátumok és egyéb N-tartalmú vegyületek, tengeri alga és növényi kivonatok, kitozán és egyéb biopolimerek, szervetlen vegyületek, hasznos gombák, hasznos baktériumok. A növényi biostimulátorok közé tartozó növényi-alapú kondicionálók potenciálisan új megközelítést kínálnak a fiziológiai és molekuláris folyamatok szabályozásában, a növekedés serkentésében, a tápanyagfelvétel fokozásában, a termés hozam növelésében és a stressz okozta korlátozások enyhítésében (Calvo et al., 2014; Du Jardin, 2015; Du Jardin et al., 2020). Más megfogalmazás szerint a biostimulátorok olyan biológiai eredetű formulált termékek, amelyek a jelenlévő komplex összetevők új vagy kialakulóban lévő tulajdonságai miatt javítják a növények termőképességét. Tehát a biológiai funkció pozitívan modulálható olyan molekulák keverékével, amelyeknek nincs egyértelmű hatáshelye és hatás mechanizmusa sem ismert minden esetben, bár törekedni kell legalább hatásmechanizmusuk megismerésére (Yakhin et al., 2017).

2.3.1. Növényi-alapú biostimulátorok

A növényi-alapú biostimulátoroknak két fő osztálya van, a tengeri algakivonatok (Chojnacka et al., 2014) és a különböző növényi részekből származó kivonatok, melyek felhasználása széleskörű a jobb növénytermesztés érdekében. A különböző növényi részek (gyökerek, hajtások, magvak) kivonatai eltérő reakciót mutatnak az alkalmazás módjától, koncentrációjától, valamint a növényfajtól függően, melyek különböző családok képviselői úgy mint, *Amaryllidaceae*, *Brassicaceae*, *Ericaceae*, *Fabaceae*,

Fagaceae, Moringaceae, Plantaginaceae, Poaceae, Rosaceae, Solanaceae, Theaceae, Vitaceae stb. (González-Morales et al., 2021; Yakhin et al., 2017). A különböző növényi részek eltérő kémiai összetételűek, külsőleg alkalmazva megváltoztatják a növény növekedését, stressztűrését. Tartalmazhatnak fitohormonokat, tápanyagokat, valamint gomba- és mikrobaellenes vegyületeket, amelyek megvédik a növényt a biotikus és abiotikus stressztől. A növények különböző bioaktív vegyületek és másodlagos metabolitok forrásai, beleértve a nitrileket, flavonoidokat, alkaloidokat és antioxidánsokat. A különféle növények fitokivonatai szerves és szervetlen vegyületeket tartalmaznak, beleértve az ásványi elemeket (kálium, kalcium, kén, magnézium, foszfor), vitaminokat, aminosavakat, valamint különféle fitohormonokat (Makkar et al., 2007; Šernaitė, 2017; Yakhin et al., 2017).

2.3.2. Növényi-alapú biostimulátor az EliceVakcina, fő összetevői közé tartozó gyógynövénykivonatok biostimuláns hatása

Az EliceVakcina összetevői humán gyógyászatban széleskörűen alkalmazott kivonatok, azonban a készítményben lévő 11 gyógynövénykivonat növényi biostimulátorként való felhasználásáról kevés adat van.

A biostimulátorként használt gyömbérkivonat (*Zingiber officinale* Roscoe) pozitívan befolyásolta a *Rosa damascena* Mill. növények fejlődési folyamatait, a virágszámot, a virághozamot, a relatív víztartalmat és a teljes klorofilltartalmat, valamint a rózsá illóolaj-tartalmát és az olajhozamát (Ali et al., 2022).

Kakukkfű vizes kivonatával (*Thymus capitatus*) kezelték *in vitro* gyökeresedési fázisban szármóca (*Fragaria x ananassa* Dutch.) hajtást, melynek eredményeképpen a hajtás- és gyökérrészek szignifikáns növekedése volt megfigyelhető, valamint a fenol tartalom, peroxidáz és antioxidáns aktivitás is nőtt (Chaouch et al., 2023). A magvak biostimulátorokkal való bevonása a növénytermesztés egyik ígéretes lehetősége a biotikus és abiotikus stresszel szembeni tűrőképesség növelésére. A kakukkfű vizes kivonattal (*Thymus capitatus*) végzett durum búza (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum* (Desf) Husn.) magbevonat növelte a csírázási sebességet és a palántanövekedést és aktiválta a növényi jelátvitelt az abszcizinsav (ABA) jelátviteli útvonal beindításával. Továbbá cserepes kísérletben a kakukkfűkivonattal történő öntözés növelte a gyökér- és hajtásfejlődést, nitrogén egyensúlyi indexet, a klorofill, az ABA, az antocianinok és a

flavonoidok tartalmát a levelekben. A nevelés második szakaszában a növényeket szárazság stressz alatt vizsgálták. A kakukkfűkivonattal történő öntözés javította a növény védekező stratégiát azáltal, hogy indukálta a gyökerek megnyúlását, csökkentette a hajtások és a gyökerek szárazanyag- és klorofillvesztését, fenntartotta a kiegyensúlyozott nitrogén egyensúlyt (Ben-Jabeur et al., 2019).

2.3.3. Növényi-alapú biostimulátor a fokhagymakivonat, leírt biostimuláns hatása

A fokhagyma (*Allium sativum* L., *Amaryllidaceae*) egy jól ismert gyógynövény, mely számos jótékony bioaktív vegyületet, többek között poliszacharidokat, szerves szulfidokat, fenolos vegyületeket és szaponinokat tartalmaz (Diretto et al., 2017; Divya et al., 2017; Lawson, 1998). A fő szerves kén összetevői a diallil-tioszulfonát (allicin), diallil-szulfid (DAS), diallil-diszulfid (DADS), diallil-triszulfid (DATS), E/Z-ajoén, S-allil-cisztein (SAC) és a S-allil-cisztein-szulfoxid (alliin) (Shang et al., 2019; Yoo et al., 2014).

Számos tanulmány létezik különböző növényi-alapú biostimulátorokkal történt kezelésekről, de a fokhagymakivonat biostimulátorként való felhasználásáról csak kevés szakirodalom áll rendelkezésre. A fokhagyma antimikrobiális hatásáról *in vitro* kísérletekben számoltak be, hatékony számos növénypatogén gomba és baktérium ellen (Mougou and Boughalleb-M'hamdi, 2018; Olusanmi and Amadi, 2010; Perello et al., 2013; Sarfraz et al., 2020). Az allicin az alliin aminosavból (S-allilcisztein-szulfoxid) szövetkárosodáskor termelődik az alliináz enzim által katalizált reakció során. Dózisfüggő módon az allicin gátolhatja mind a baktériumok, mind a gombák szaporodását (Borlinghaus et al., 2014; Kuettner et al., 2002). Az allicin gyors membránpermeabilitást mutat, a tiol-diszulfid reakcióba lép a fehérjék szabad tiolcsoportjaival (Miron et al., 2000). Az allicin által szabályozott hatás kimutatható volt a *Phytophthora infestans* fertőzött burgonyagumó és paradicsom, az *Alternaria brassicicola* fertőzött sárgarépa, a *Hyaloperonospora parasitica* fertőzött *Arabidopsis thaliana* és a *Magnaporthe grisea* fertőzött rizs esetében (Slusarenko et al., 2008). Ezenkívül kimutatták, hogy az allicin képes gátolni a növénypatogén *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* és *Xanthomonas* baktériumokat, a *Botrytis*, *Plectosphaerella* és *Phytophthora* gombákat (Curtis et al., 2004).

Parcella kísérletben a fokhagyma vizes kivonat (aqueous garlic extracts - AGE) alkalmazása javította a veteménybab (*Phaseolus vulgaris* L.) és lóbab (*Vicia faba* L.) növények növekedését és fiziológiai állapotát. Valamint megfigyelték a fenolok, a szénhidrát-összetevők, a szabad aminosavak, prolintartalom növekedését, valamint az endogén fitohormonok, különösen az auxinok (AUX), gibberellinek (GA) és szalicilátok szintjének emelkedését a kezelt növényekben (Elzaawely et al., 2018; Mohamed et al., 2020).

Hayat et al. (2016) táptalajon 28 különböző allicin tartalmú fokhagymafajta vizes kivonatát vizsgálta *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* és *Phytophthora capsici* fitopatogén gombával szemben és mikrodilúciós kísérletben meghatározta azt a minimális koncentrációt (minimum inhibitory concentration), amely teljesen gátolta a gomba növekedését (MIC₅₀ 1% kivonat, ami 39 µg/ml allicint tartalmaz; MIC₉₀ 10%). A *P. capsici* és *V. dahliae* elleni padlizsán és paprika levélkorong vizsgálat a fertőzés jelentős csökkenését mutatta 100 mg/ml dózisonál (allicin tartalom 3.9 mg/g), a betegség súlyossága 85%-ról 12-14%-ra csökkent. Valamint az AGE bioaktivitását tanulmányozták uborka palánták (*Cucumis sativus*) levélre permetezve, mely megváltoztatta a növény védekező mechanizmusát megemelve a kataláz (catalase - CAT), szuperoxid-diszmutázt (superoxide dismutase - SOD) és peroxidáz (peroxidase - POD) aktivitását.

Továbbá üvegházi kísérletben paradicsom palánták (*Solanum lycopersicum*) AGE levélpermetezése a növény magasságát, levélfelületét, szárátmérőjét és friss/száraz tömegét szignifikánsan növelte. A SOD és CAT túltermelése stressztűrő képességet vált ki és a SOD génnek túlzott expressziója növekedést eredményez stressz alatt, így aktiválja a növény indukált védekezőképességet. Az AGE alacsony koncentrációban az antioxidáns enzimeket aktiválta, magasabb koncentrációban azonban fokozott malondialdehid (MDA) felhalmozódást eredményezett, lipidperoxidációt és membránkárosodást okozott (Hayat et al., 2018a).

Az AGE biostimulátorként való alkalmazása javította a paprika és padlizsán termés minőségét, megváltoztatta a kezelt növény fiziológiai potenciálját, beindította védekező válaszait a *Phytophthora capsici* patogén gombás fertőzésekkel szemben. Ezenkívül szignifikáns növekedés mutatkozott a kezelt növény metabolit tartalmában, mint pl. a klorofill, a karotinoidok és az oldható cukrok tartalmában. Az AGE alkalmazása paprikanövényeken is primer hatást fejtett ki, védekezési reakciókat indukált a *P. capsici* oltás előtt. Így a kezelt növények sikeresen ellenálltak a fertőzésnek az aktivált

antioxidáns rendszerük, karotinoidok és egyéb védő metabolitok segítségével. A stressz okozta H₂O₂-tartalom rendkívül alacsony volt a kezelt növényekben, ami a patogén fertőzésekkel szembeni sikeres rezisztenciát jelzi (Hayat et al., 2018b).

2.3.4. Növényi-alapú biostimulátorok hatása a növények védelmi rendszerére

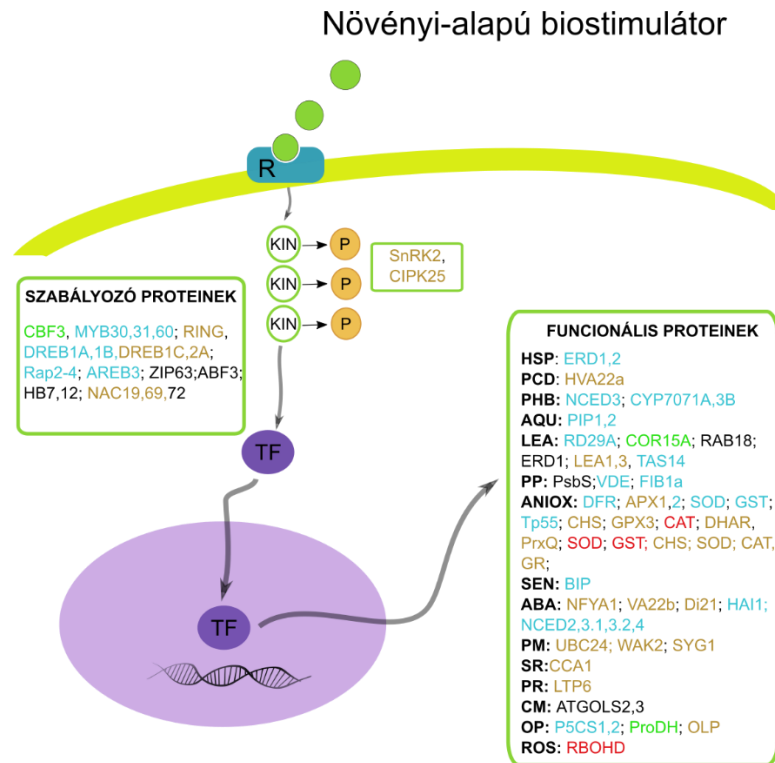
A növényi kivonatok, mint növényi-alapú biostimulátorok a mezőgazdaságban peszticidként használhatók, melyek hatása a kezelt növényben morfológiai, fiziológiai, biokémiai, proteomikai és transzkriptomikus változásokat eredményez. A növényi-alapú biostimulátorok javítják a kezelt növény anyagcsere és adaptív teljesítményét abiotikus és biotikus stressz körülmény között (González-Morales et al., 2021). A különböző környezeti korlátok, az abiotikus és biotikus stresszek korlátozzák a kultúrnövények termésmennyiségét és minőségét, mely hatások ellensúlyozására a növények bizonyos biokémiai változásokkal alkalmazkodnak, hogy fenntartsák a megfelelő növekedést. Ezek közé tartozik bizonyos ozmolitok és ozmoprotektánsok, köztük a prolin, glicinbetain, összes szabad aminosav, oldható fehérje és oldható cukor felhalmozódása (Abdel Latef and Tran, 2016; Ahmad et al., 2016).

Az abiotikus stressz növényekre gyakorolt negatív hatásainak mérséklésére szolgáló különféle stratégiák közül a környezetbarát biostimulátorok alkalmazása az egyik legígéretesebb (Rouphael and Colla, 2020; Sible et al., 2021). A környezeti változásokat a növények olyan kifinomult észlelési mechanizmusok, jelző- és akklimatizációs stratégiák segítségével próbálják leküzdeni, mint az antioxidáns metabolitok (pl. flavonoidok, prolin, enzimek) fokozott termelése, amelyek segítenek a reaktív oxigénfajták (ROS) szabályozásában, hogy elkerüljék az oxidatív stresszt és a fitohormonok (például ABA és JA) szintjének változását (Dias et al., 2018; Ma et al., 2020; Zandalinas et al., 2020).

2.3.5. A növényi-alapú biostimulátorok abiotikus és biotikus stressz elleni hatása, a folyamatok molekuláris háttere

Számos növényi-alapú biostimulátorokkal végzett kísérletekről szóló tanulmány készült, azonban kevés transzkriptomikai elemzést végeztek a kezelések eredményeinek alátámasztására (González-Morales et al., 2021). Jelenleg az EliceVakcina összetevőinek biostimulátorként való kezeléséről nincs transzkriptomikai adat, ezért más növényi-alapú

biostimulátorok transzkriptomikai elemzését tekintjük át abiotikus stressz alatt. Biotikus stressz hatásának enyhítésére használt növényi-alapú biostimulátorokkal végzett kezelésekről nincs transzkriptomikai elemzés (1. ábra).



1. ábra. A növényi-alapú biostimulátorok alkalmazásakor a kezelt növényben eltérően expresszálódó gének funkcionális kategóriáinak sejtes reprezentációja. A felsorolt gének részt vesznek a különböző típusú abiotikus stressz toleranciában: **szárazság**, **hő**, **só** és **hideg** tűrés. Rövidítések: R: receptor, kin: kináz, P: foszfor csoport, TF: transzkripciós faktor, HSP: hőshock protein, PCD: programozott sejt halál, PHB: fitohormon bioszintézis, AQU: aquaporin, LEA: late embryogenesis abundant fehérje, PP: fényvédelem, ANTIOX: antioxidáns metabolizmus, SEN: szenescencia, ABA: ABA bioszintézis és jelátvitel, PM: fenilpropanoid metabolizmus, SR: sztóma szabályozás, PR: PR protein, CM: karbohidrát metabolizmus, OP: oszmozoprotektáns, ROS: reaktív oxigén formák (Forrás: Gonzalez-Morales et al. 2021).

Desoky et al. (2019) sóstressz alatt álló borsónövényeket (150 mM NaCl 2 hétig) használva tanulmányozták az édesgyökér (*Glycyrrhiza glabra*) gyökérkivonat borsómagokra való kijuttatásának hatását. A sóstressz csökkenti a palánta növekedését és növeli az oxidatív stresszt, de az előkezelt palántáknál ezek a hatások mérséklődését figyelték meg. A kivonattal végzett kezelés növelte a SOD, a CAT, aszorbát-peroxidáz (L-ascorbate peroxidase - APX) és glutation-reduktáz (glutathione reductase - GR), dehidroaszorbát-reduktáz (glutathione-dependent dehydroascorbate reductase - DHAR) és peroxiredoxin (PrxQ) gének transzkripcióját, csökkentve az oxidatív stresszt. Ezek a

gének részt vesznek a sejt antioxidáns rendszerében, amely fenntartja a ROS homeosztázist az oxidatív károsodások mérséklése érdekében (Ahmad et al., 2010; Suzuki et al., 2012).

Egy másik sóstressz vizsgálatban (200 mM NaCl 24 órán keresztül) rukkola (*Diplotaxis tenuifolia* L.) növényeket kezeltek borágó (*Borago officinalis*) vizes kivonat lombzatra történő kijuttatásával és a transzkripciós faktorok (TF) expresszióját tanulmányozták. Többek között DREB2A, MYB30, NAC019, NAC72, NAC19, NAC69, ZIP63, ABA-érzékeny elemet kötő faktor 3 (ABA-responsive element binding factor - ABF3), HB12 és HB7 mutattak pozitív szabályozást (Franzoni et al., 2019), melyek ABA-függő TF-ek. A TF-ek közül a MYB30 a csírázás és a stresszre adott válasz folyamataiban vesz részt, valamint az ABA jelátvitelben (Zheng et al., 2012). A NAC család tagjai a növények fejlődéséhez és stresszválaszaihoz kapcsolódnak és reagálnak az ABA-ra, elősegítik az antioxidáns rendszer működését (Xu et al., 2015). Továbbá a ZIP63 alacsony energiájú válaszon keresztül szabályozza a cirkadián ciklust és kinázokat (SNF1-related protein kinase - SnRK1) (Mair et al., 2015), az ABF3, ami egy ABA és ozmotikus stressz által indukált TF (Fujita et al., 2011), a HB12 és HB7 pedig ugyancsak ABA-függő TF-ek, a sóstresszre adott növekedési válasz közvetítésével hatnak (Peng et al., 2022).

Moringa oleifera etanolos levélkivonat hatását vizsgálták sóstresszelt (1000 mg/l) bazsalikom (*Ocimum basilicum*) növényeken (Alkuwayti et al., 2020), mely megváltoztatta az ozmotin-szerű fehérje (osmotin-like protein - OLP) gén expresszióját és pozitív korrelációt mutatott a növény növekedésével, termésnövekedésével. Az OLP egy patogenezishez kapcsolódó fehérje 5 (PR-5) tagja, amely különböző abiotikus és biotikus stresszhatások hatására termelődik növényekben (Weber et al., 2014). Sótartalom és aszályos stressz esetén az OLP tartja fenn a celluláris ozmolaritást az oldott anyagok kompartmentalizációjával vagy szerkezeti és metabolikus változásokkal (Chowdhury et al., 2017).

2.4. Biopeszticidok

Bár az EU rendeletek nem foglalkoznak a biotrágyák (biofertilizers), a biopeszticidok (biopesticides) fogalmával és témakörével, a kutatási irányvonalak központi témái. Az 1960-as évektől elterjedő kémiai növényvédelem sokat segített a mezőgazdasági termelékenység növelésében, bár az eljárások következtében olyan káros hatások

jelenetek meg, mint a peszticidekkel szembeni rezisztencia, vagy mint a növényvédőszer-maradványok jelenléte a terményekben és a környezetben. Ezért fontossá vált a kémiai növényvédelem alternatíváinak kidolgozása. Fontos, hogy a csökkenő természeti erőforrásokkal a lehető legnagyobb terméshozamot érjünk el megóvva a termést és a környezetet. A biotrágyák és biopeszticidek természetes anyagokból álló készítmények, melyek környezetbarát módon irtják a károsítókat, így használatuk nagy szerepet játszhat fenntartható mezőgazdaság kialakításában (Kumar and Singh, 2015). A biopeszticidek alapanyagaik szempontjából lehetnek mikrobiális biopeszticidek, speciális védőanyagokat tartalmazó transzgenikus növények és biokémiai biopeszticidek (illóolajok, növényi növekedést elősegítő szabályozók, rovarok növekedését gátló szerek, másodlagos metabolitok és természetes ásványi anyagok) (Fenibo et al., 2021; Suteu et al., 2020).

Napjainkban egyre nagyobb szerepet kapnak az biopeszticidek közé tartozó növényi eredetű szerek (Seiber et al., 2014). Ismert, hogy a kakukkfű, menta, oregáno és más gyógynövények illóolajai, mint bioherbicidek erős csírázásgátló hatásúak (Sarić-Krsmanović et al., 2023; Yilar et al., 2013). Növényi-alapú biofungicideket állítanak elő alga, zuzmó és zárvatermő fajok illóolajaiból, melyek visszaszorítják növénypatogén gomba fajok növekedését és megzavarják génszabályozásukat (Subba and Mathur, 2022). Sikeresen alkalmazták biofungicidként az eugenol, fahéjaldehid stb. tartalmú szegfűszeg (*Syzygium aromaticum* L.) és a fahéj (*Cinnamomum cassia* L.) SC-CO₂ kivonatát szürkepenésszel (*Botrytis cinerea*) fertőzött eper kezelésénél *in vitro* levélkorong vizsgálat során (Šernaitė et al., 2020). Különböző növényi kivonatok (levendula, édeskömény, eukaliptusz stb.) használata bizonyítottan repellens hatást, vedlési rendellenességet, sejttoxicitást okoz rovarkártevőknél (Bett et al., 2017; Singh and Kaur, 2018; Zoubiri and Baaliouamer, 2014). Tanulmányok, melyek a növényi kivonatok mezőgazdasági kártevőkre gyakorolt hatását írták le, kitérnek hátrányukra is, mivel rossz fizikai-kémiai stabilitásuk, nagy illékonyságuk és hőbomlásuk miatt hatékonyságuk szabálytalan és lassú (de Oliveira et al., 2014).

2.5. Nanorészecskék a biopeszticidok és biostimulátorok formulálásban

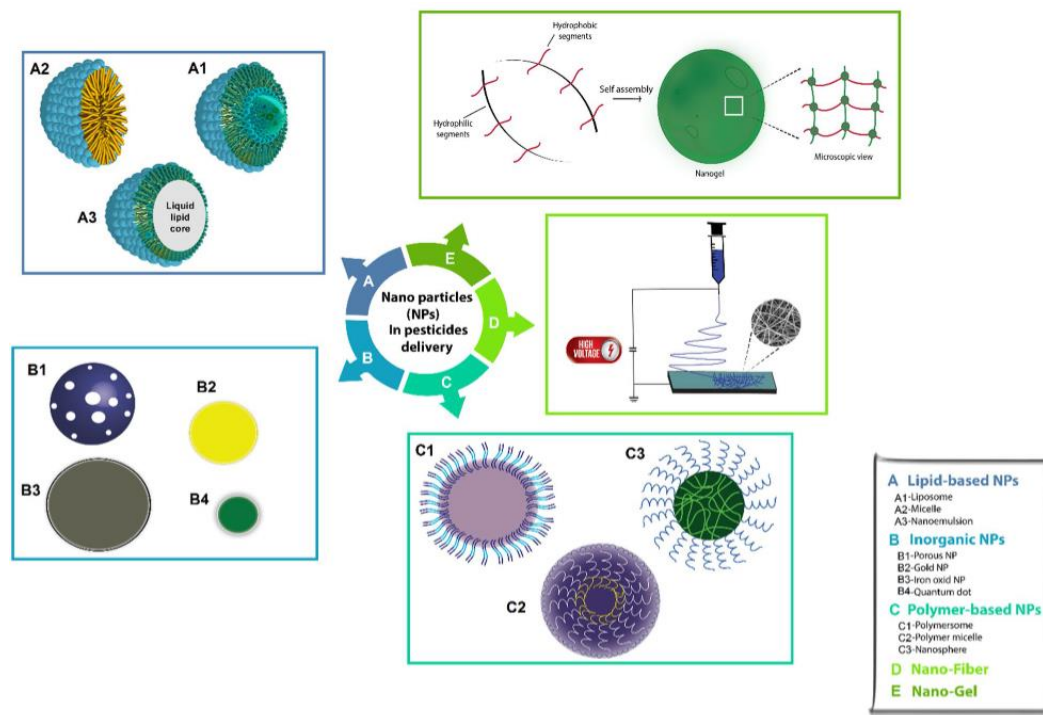
2.5.1. Nanobiopeszticidok

A biopeszticidok/biostimulátorok formulálása kulcskérdés mezőgazdasági felhasználásuk elterjedésében, melyhez napjainkban az egyik legígéretesebb technológia a nanotechnológia. A nanoméretű formulálás széles körben kutatott technológia az orvostudományban a hatóanyag cél szövetekbe juttatásának növelésére, de napjainkban az agronómiában is (Dutta, 2018; Latef et al., 2017; Lin et al., 2015; Ye et al., 2020). Nanotechnológiai eljárások segítenek a biopeszticidok stabilitásának javításában, azok növényekbe juttatásában és a növényi szervezetben a célhelyre történő eljutásban (Manchikanti, 2019). Számos országban kereskedelmi forgalomban kaphatók mezőgazdasági felhasználásra engedélyezett nanobiopeszticidok, nanostruktúrába kapszulázott növényi kivonatok (pl. eugenol, genariol, thymol stb.), melyek nanoemulziók, polimer vagy élesztősejt alapú készítmények (de Oliveira et al., 2014). A nanobiopeszticidok a konvencionális biopeszticidektől méretükben és struktúrájukban térnek el. Legalább egy kiterjedésükben 1-1000 nm nagyságrendűek (Nuruzzaman et al., 2019). Aktív összetevőjű részecskék vagy tervezett struktúrák, melyek a károsítók kártételét visszaszorítják, mérséklik vagy megelőzik (Bergeson, 2010). A nanorészecskék (nanoparticles) előállítása történhet fizikai (litográfia, pirolízis, marás, mechanikai darálás stb. által), kémiai (szonokémia, elektrokémia, mikrohullám stb.) és biogén/'zöld' szintézissel (élő mikroba/növény, vagy kivonataik/vegyületeik által). A széleskörben alkalmazott nanobioanyagok felhasználásuk szempontjából lehetnek bionanocidok (nanocide), nano méretű szállító biopeszticidok (nanodelivered), nano méretű összetevőket tartalmazó biopeszticidok (nanocomposited) vagy nanocsepp-orientált biopeszticidok (nanodroplet-oriented) (Nuruzzaman et al., 2019).

2.5.2. Nano méretű szállító-biopeszticidok

A nanoméretű szállítókat a biopeszticidok hatóanyagainak hordozóanyagaként használják (Nuruzzaman et al., 2016), mely megvédi a hatóanyagokat az idő előtti lebomlástól (fotolízistől, hidrolízistől, biológiai lebomlástól stb.), a kilúgozás és elpárolgás okozta veszteségektől. Ezért hatékonyabbak, mint a hagyományos peszticid készítmények (Vurro et al., 2019; Zhao et al., 2017). A bioaktív ágensek adszorpcióval vagy a

nanohordozók külső felületén lévő ligandumok kötődésével vagy nanorészecskékkel történő kapszulázással kerülnek a nanohordozó anyagokba. A folyamat során a nanohordozók pórusaiban, rétegeiben, mátrixában vagy üregeiben mag-héj elrendezést vagy 'csapdát' (entrapment) alakítanak ki. A biopeszticid molekulákat nanocseppekbe zárva is szállítják. Formulázásukat tekintve a készítmények lehetnek nanoemulziók, nanokapszulák, nanovezikulák, nanogelek, nanoszálak stb (2. ábra).



2. ábra. Nanorészecskék a biopeszticidok szállításában: A) Lipid alapú nanorészecskék, B) Szeretlen nanorészecskék, C) Polimer alapú nanorészecskék, D) Nanoszálak, E) Nanogelek (Forrás: Abdollahdokht et al. 2022)

Nagyon ígéretes megoldás a biopeszticidok nanohordozó felhasználásával történő előállítása, mert a bioaktív összetevőkkel kapcsolatos negatív fizikai-kémiai tulajdonságok kezelhetőek. Ilyen tulajdonságok közé tartozik az alacsony vízdékonyság, a magas párolgási sebesség és a környezet okozta oxidáció (Mattos et al., 2018; Nuruzzaman et al., 2019). Ezenkívül az eljárás alkalmazásával a bioaktív anyagok felszabadulási sebessége szabályozhatóvá válik, pl. hőmérséklet, a pH, a kibocsátó közeg ionerőssége vagy biotikus és/vagy abiotikus stresszorok által (Camara et al., 2019; Kumar et al., 2019b; Mattos et al., 2017). Napjainkban használt nanorészecske hordozóanyagok elősegítik a peszticid hatóanyagok penetrációját, hatáskifejtését, mindamelllett, hogy a környezetre nem toxikusak (Abdollahdokht et al., 2022).

Fokhagyma illóolajat tartalmazó polietilén-glikollal (PEG) bevont nanorészecskék vörös lisztbogár (*Tribolium castaneum*) raktári kártevő elleni inszekticid hatása megmutatkozott öt nappal a kezelés után és hatékonysága 80% felett maradt öt hónap elteltével is, feltehetően az aktív komponensek nanorészecskékből történő lassú és tartós felszabadulása miatt. Ezzel szemben a kapszulázás nélküli, szabad fokhagyma illóolaj hatékonysága hasonló koncentrációban csak 11% volt. Ez azt jelzi, hogy a PEG-bevonatú, fokhagyma illóolajjal megtöltött nanorészecskék használhatók a tárolt termékek kártevőinek irtására (Yang et al., 2009). *Melissa officinalis* illóolaját kitozán biopolimer alapú nanokompozit film készítése használták élelmiszer csomagolóanyagként, igazolták antimikrobiális hatását *E. coli* ellen (Sani et al., 2019). Szegfűszeg (*Syzygium aromaticum*) illóolaj nanoemulzió mutatott nagyfokú micélium növekedésgátlást (53-82%) *Carum carvi* L. növényből izolált *Neoscytalidium dimidiatum* aszkomikota gombával szemben (Hashem et al., 2023).

Biopeszticidek nanokapszulázására alkalmaznak szerves anyagokat, mint például szintetikus és természetes polimereket (Arasoglu et al., 2016; Liang et al., 2018; Pang et al., 2019; Shakiba et al., 2020; Yan et al., 2019), lipideket (de Oliveira et al., 2014; Nguyen et al., 2012), növényi eredetű nanorészecskéket (Cao et al., 2015; Chariou et al., 2019; Chariou and Steinmetz, 2017), valamint szervetlen anyagokat (szilícium-dioxid, szén, kalcium és agyag) (Chen et al., 2018; Kumar et al., 2019b). A kapszulázás elektrosztatikus komplexképző kölcsönhatások vagy kovalens kötés révén történhet, ami javítja a felvételt, a diszpergálhatóságot, a mobilitást, az adhéziót és a szabályozott vagy célzott felszabadulást (Shakiba et al., 2020).

2.5.3. Liposzómák használata a növényi biopeszticidek és biostimulátorok formulálására

Lipid alapú nanokapszulák típusai lehetnek nanoliposzóma, nanoemulzió, nanostrukturált lipidhordozó (nanostructured lipid carriers) és szilárd lipid nanorészecske (solid lipid nanoparticles) (Jogaiah et al., 2021). A liposzómák gömbölyű, egy belső vizes teret kétrétegű, többnyire foszfolipid réteggel körülvett vezikulák. A vezikulák lehetnek egyrétegűek (unilamelláris) vagy többrétegűek (multilamelláris), melyek hidrofíl, lipofil és amfifil vegyületeket tartalmazhatnak belsejükben. Továbbá léteznek multivezikuláris

liposzómák, mikor több vezikula található az unilamelláris liposzómában (Jogaiah et al., 2021; Mozafari, 2006; Soussan et al., 2009) (3. ábra).

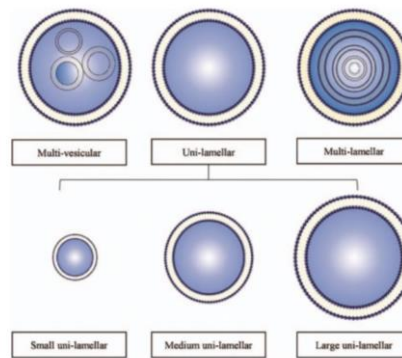


Figure 2.2 Schematic of nanoliposomal delivery systems. Adapted from Rostamabadi, H., Falsafi, S.R., Jafari, S.M., 2019. Nanocapsulation of carotenoids within lipid-based nanocarriers. *J. Controlled Release* 298, 38–67 (Rostamabadi et al., 2019).

3. ábra. Liposzómák típusai (Forrás: Jogaiah et al. 2021)

A liposzómákat természetes, biológiailag lebomló lipidekből állítják elő, amelyek biológiailag inaktívak, nem toxikusak (Campbell, 1983). A liposzómák nagyfokú fizikokémiai stabilitást mutatnak a tárolás során, mind a nanokapszulákat, mind a bennük tárolt hatóanyagokat illetően (Jogaiah et al., 2021). Széleskörűen használják gyógyszerek, enzimek, vitaminok, bioaktív növényi kivonatok kapszulázásához (Chawda et al., 2017; Emami et al., 2016; Khatibi et al., 2014; Panahi et al., 2017).

A liposzómák penetrációjáról kevés kutatási eredmény áll rendelkezésünkre. Karny et al. (2018) szója lecitin eredetű lipidekből álló liposzómákat vizsgáltak mikrotápanyagok paradicsom növény felületére juttatásával. Egyetlen felső levélfelületére juttatás után a liposzómák behatoltak a levélbe és kétirányú transzlokációt végeztek, először a szomszédos levelekbe, majd eloszlottak más levelek és a gyökerek felé. A liposzómákat ezután a növényi sejtek internalizálták, ahol felszabadították hatóanyagukat a kezelést követő 96 órában. A levélre felvitt liposzómák moláris koncentrációja csökkent a kezelési ponttól mért távolság növekedésével, de mikroelem-hiányok kezeléséhez szükséges mennyisége megmaradt (100 ppb). A felhasznált nanorészecskék maximum 33%-a hatolt be a levélbe 72 óra alatt, míg a hasonló módon alkalmazott szabad molekulák kevesebb mint 1%-a. Rövid, 1-2 méter hatótávolságú nanorészecske-stabilitást vizsgáltak permetezés után, mely során igazolták, hogy a befogólemezekeken összegyűjtött részecskék csak 5%-kal tértek el az előpermetezett liposzómák kezdeti populációjától. Ezenkívül a levegőben szálló nanorészecskék biztonságos foszfolipidekké bomlottak le így csökkentik a környezetterhelést.

A liposzóma formulált növényi kivonatok hatásának vizsgálatai többnyire *in vitro* körülmények között történtek, kevés szántóföldi adat áll rendelkezésre.

2.5.3.1. Liposzóma formulált növényi kivonatok növénypatogén vírusellenes hatása

Az antioxidáns hatásáról ismert növényi flavonolvegyületet, kvercetin állítottak elő bioanyagokból és formulázták lecitin liposzómákba. A nanoformulázás nélküli kvercetin gyenge oldhatóságú és instabil vegyület, ezért korlátozott a védekezési hatékonysága a növényi vírusos betegségek ellen. Dohány növényen bemutatott tenyészedényes és szántóföldi kísérlet során a dohány mozaik vírus hősokk protein 70 (HSP70) fehérjék expresszióját csökkentette a kvercetin, amely részt vesz a vírus replikációjában. Liposzómák részecskeméretük és hidrofilitásuk miatt hatékonyan tudják szállítani a kvercetin a növényekben, ozmózzissal áthatolnak a sejtmembránon és eléri a célgént tartalmazó organelum környékét (Wang et al., 2022).

2.5.3.2. Liposzóma formulált növényi kivonatok növénypatogén baktériumellenes hatása

A biotartósítószerként használt, liposzóma formulált fokhagymakivonat antibakteriális hatását mutatták ki *Escherichia coli* (Zabihi et al., 2017), valamint fokhagymakivonat és nizin (antibakteriális hatású policiklikus peptid) kombináció erős szinergista aktivitását *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* és *Staphylococcus aureus* (Pinilla and Brandelli, 2016) fajokkal szemben. Az allicint tartalmazó lecitin liposzómák magas bejutási hatékonyságot és stabil tulajdonságokat mutattak, amelyek hatékonyan megvédhetik az allicint a kedvezőtlen körülményektől, például fénytől, hőtől és lúgos körülményektől, ami meghosszabbítja a termék eltarthatóságát és gyengíti sértő szagát is (Lu et al., 2014).

2.5.3.3. Liposzóma formulált növényi kivonatok növénypatogén gombaellenes hatása

A liposzóma formulált növényi kivonatok növényvédelmi felhasználásáról kevés adat van, inkább az élelmiszeripari felhasználás szemszögéből tanulmányozták. A növényi kivonatok formulázását vizsgálva Gortzi et al. (2007) megfigyelték, hogy az *Origanum dictamnus* metanolos és diklór-metános kivonatai liposzómákba történő zárása után magasabb antioxidáns és antimikrobiális aktivitás mutatott, mint ugyanezen kivonatok

tiszta formájukban. Különböző töménységű (1-10%) gyömbérvonatot tartalmazó liposzómák gátló hatását figyelték meg *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus* gombák növekedésére, melynek mértékét korongdiffúziós és mikrolemezes hígítási módszerrel határozták meg (Mohammadi et al., 2020). Ugyancsak liposzóma kapszulázott *Cinnamomum verum*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale*, *Syzygium aromaticum*, *Laurus nobilis* etanolos kivonatok kiemelkedő gombaellenes hatást mutattak az *Aspergillus sp.* és *Penicillium sp.* ellen (Aslan et al., 2023).

Pinilla et al. (2019) liposzómában kapszulázott fokhagymakivonat *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium herquei*, *Fusarium graminearum* és *Aspergillus flavus* gombatörzsek elleni gombaellenes aktivitását írták le *in vitro* és *in situ* kísérletekben, öt napig penészgátlást mutattak kenyérfélesztményeken.

2.5.3.4. Liposzóma formulált növényi kivonatok rovarellenes hatása

Tanulmányok igazolják a liposzóma formulált növényi illóolajok repellens hatását csombor menta (*Mentha pulegium*), gyantás husáng (*Ferula gummosa*) (Faraji et al., 2020), tengerparti seprúcserje (*Baccharis salicifolia*) (García et al., 2005) alkalmazása esetében. Lopes et al. (2020) kerti ruta (*Ruta graveolens*) levél diklór-metán kivonatát etanolos injekciós módszerrel szója lecitin liposzómákba és kitozán nanostruktúrákba formulálták. A nanoformulázott növényi kivonat több mint 70%-os életképességvesztést tudott okozni őszi sereghernyó (*Spodoptera frugiperda*) Sf9 rovarsejtkultúrában, meghaladva a kereskedelmi forgalomban kapható klórpiprifosz rovarirtó hatását. Ez a kivonat kromatin kondenzációt és fragmentációt váltott ki a kezelt sejtekben. A felszabadulási vizsgálatok azt mutatták, hogy a kitozán nanoemulziók gyors és teljes kivonatfelszabadulást biztosítanak, míg a liposzóma alapú rendszerek alkalmasak késleltetett felszabadulásra. e Santos et al. (2022) a flavonoidokban gazdag nagyvirágú és kisvirágú büdöske (*Tagetes erecta* és *T. patula*) etanol kivonat inszekticid aktivitását vizsgálta dipalmitoil-foszfátidilkolin multilamelláris liposzómákba formulázva kukorica zsizsik (*Sitophilus zeamais*) lárvák életképességére. A vizsgálata során 48-60 óra elteltével laboratóriumi körülmények között (98-100%) aktivitást mutatott a kivonat.

2.6. A szuperkritikus extrakció

A szuperkritikus kivonás során alacsony hőmérsékletet (kritikus hőmérséklet 30°C) és magas nyomást (100–200 bar) alkalmaznak. A szuperkritikus folyadékokat használó extrakciós technikák a hagyományos alternatívákhoz képest környezetbarát eljárások (Beckman, 2004), melynek során olyan végtermékeket hozhatnak létre, amely számos folyékony szerves oldószernél jobb transzporttulajdonságokkal (diffúziós képesség, tömegátadási együttható, penetrációs képesség) rendelkezik (Brunner, 2005). Az algák szuperkritikus kivonatait, mint biostimulátorokat átfogóan vizsgálták őszi búzában, repcében és mustárban (Michalak et al., 2016; Michalak et al., 2017). Hincapié et al. (2008) arról számoltak be, hogy a SC-CO₂ oldószerként való alkalmazásával magas koncentrációjú, biológiailag aktív vegyületeket tartalmazó fokhagymakivonatokat állítottak elő és sikeresen használták *Tetranychus urticae* ellen. Az SC-CO₂ fokhagymakivonatok előnye, hogy nem tartalmaznak toxikus extrakciós oldószereket, valamint megőrzik az oxidációra hajlamos anyagokat, például az allicint (Bravi et al., 2017).

2.7. A növények veleszületett és indukálható védekezése

A növények – az emlősökkel ellentétben – nem rendelkeznek mobilis immunsejtekkel, illetve szomatikus adaptív immunrendszerrel. Immunvédelmüket elsősorban az egyes sejtek autonóm, veleszületett immunmechanizmusai biztosítják, kiegészülve a fertőzési gócpontokból kiinduló szisztémás jelátviteli folyamatokkal.

A növényi védelmi válaszok rendkívül összetettek, többrétegűek. A növényi védekező válasz első rétegét a folyamatosan jelen lévő fizikai (viaszréteg, kutikuláris lipidek, sejtfalvastagodás) és kémiai gátak (antimikrobiális enzimek, másodlagos metabolitok) adják, amelyek hátráltatják a patogén behatolását a gazdaszervezetbe (van Loon et al., 2006). Abban az esetben, ha a kórokozók képesek leküzdeni ezt az elsődleges védelmi bástyát, a kórokozó-növény kölcsönhatás kimentele a patogén felismerésének gyorsaságán, illetve az arra adott specifikus növényi védekező válaszok hatékonyságán múlik.

A „növényi immunrendszert” a legújabb irodalmak egy ún cikk-cakk modellel írják le, amelynek kiinduló pontja a mikrobiális, vagy patogénhez kapcsolódó molekuláris mintázat (MAMPs, PAMPs) felismerése a gazdaszervezet mintázat felismerő receptorai

(PRRs) által, amelynek eredményeként a növény PAMP által generált immunitást (PTI) nyer. A sikeres patogének effektorokkal (virulencia faktorok) elnyomják a PTI-t (effector triggered susceptibility), és ez szabad utat nyit számukra a most már védtelen növényben. Azonban egyes esetekben a növények képesek direkt, vagy indirekt módon felismerni ezeket a patogén eredetű effektorokat, és aktiválni az effektor által indukált immunitási választ (ETI) (Chisholm et al., 2006; Jones and Dangl, 2006).

Az elicitorok (pl. a PTI archetípusos aktivátora a bakteriális flagellin) olyan molekulák, amelyeket mikrobák állítanak elő vagy mikrobák felszínéről származnak és képesek növényi védekező választ kiváltani (Lavanya et al., 2022). Az indukálható védekezés valószínűleg összetett és egymással összefüggő stresszreakciók sorozatából áll, amelyeket a mikrobiális támadások mellett más ingerek is kiválthatnak (Ahlfors et al., 2004). A gazdaszervezet védekező válasza a kórokozó támadási helyén kezdődnek, majd kiterjednek a környező sejtekre, ezáltal szisztémásan aktiválják a rezisztencia jelet és tovább manifesztálják a védekezési válaszokat az egész növényben. A lokális növény-mikroba kölcsönhatások által kiváltott szisztémás immunitást szisztémás szerzett rezisztenciaként (systemic acquired resistance - SAR) vagy indukált szisztémás rezisztenciaként (induced systemic resistance - ISR) határozták meg az indukció helyétől és az indukáló mikroorganizmus életmódjától függően. A SAR-t a levelekkel kölcsönhatásba lépő kórokozók, míg az ISR-t a gyökerekkel kölcsönhatásba lépő hasznos mikrobák indukálják (Vlot et al., 2021). Ezek a válaszok gyakran konvergálnak különböző fitohormon útvonalakon, amelyek kölcsönhatásba lépnek egymással és feltehetően finomhangolják a növény választ a védekezés optimalizálása érdekében (Erb, 2019; Pieterse et al., 2014). A négy legfontosabb védelmi válaszokat indukáló, szabályozó fitohormon a szalicilsav (SA), a jázmonsav (JA), az etilén (ET), illetve az abszizinsav (ABA) (Glazebrook, 2005; Glazebrook et al., 2003; Pieterse et al., 2014; Vlot et al., 2021). A biotróf és hemi-biotróf kórokozók ellen, amelyek táplálkozása az élő gazdaszövetektől függ, a növények főként SA-függő immunmechanizmusokon keresztül védekeznek. Az elhalt szövetekből élő nekrotróf kórokozók, valamint a rovarok fokozzák a JA védekezőképességét és az ET-vel összhangban hatnak (Conrath et al., 2015). Az ABA és a hősokkfehérje/chaperon jelátviteli útvonalak (heat shock protein - HSP) a növényi stressz elleni védekezés központi szabályozói, melyek kölcsönhatásba lépnek más jelátviteli útvonalakkal. A rendszerhez kapcsolódó központi tényezők az SWI/SNF kromatin-remodelling fehérjék (sucrose non-fermenting 1-related protein kinase - SnRK2, protein phosphatases 2C - PP2C, ABF/ ABA-responsive element binding protein

- AREB), amelyek részt vesznek a stresszmemóriában (Bulgakov et al., 2019; Kuromori et al., 2018). Bár az ABA-t általában növényi növekedésgátlónak tekintik, számos kísérlet bizonyította, hogy képes fokozni a növekedést mind a gyökerekben, mind a hajtásokban (Humplík et al., 2017). Ez a szerepe koncentrációfüggő, mert a nagyon alacsony koncentrációi fokozott biomassza termelést eredményeznek, míg a magasabb koncentrációk növekedési gátláshoz vezetnek (McWha and Jackson, 1976; van Staden and Bornman, 1969; Zhang and Davies, 1990). Latif (2014) különböző ABA-koncentrációkkal (50, 100 és 150 $\mu\text{g/ml}$) történő lombtrágyázás hatását vizsgálta szárazság stresszelt borsónövényekben. A kezelést egyszer alkalmazták a korai vegetatív szakaszban, majd 36 nap elteltével a levelekben vizsgálták a szárazság stressz hatását a növekedésre, a fotoszintetikus pigmentekre, a fitohormon és ásványi anyag szintekre, valamint néhány antioxidáns enzim aktivitására. Az ABA kezelés szignifikánsan mérsékelte a hajtás és a gyökér szárazság stressz által indukált tömeg csökkenését, ellensúlyozta a hormonszintek (indol 3 ecetsav - IAA, GA), az összes klorofilltartalom, a POD és a savas foszfatáz (acid phosphatase - ACP) enzimek aktivitásának csökkenését. Ezen túlmenően a SAR-t a patogenezissel kapcsolatos (pathogenesis-related - PR) gének koordinált aktiválása kíséri, amelyek közül sok antimikrobiális aktivitással rendelkező PR-fehérjéket kódol. A legjobban jellemzett PR gének közé tartozik a PR-1, amelyet gyakran használnak a SAR markerként (van Loon et al., 2006).

2.8. Célkitűzések

A Gyógynövénykutató Intézet Kft. által fejlesztett, gyógynövény alapú, liposzóma formulált EliceVakcina növény kondicionáló termék az ökológiai gazdálkodásban felhasználható termésközelítő anyag. A készítmény technológiai fejlesztése arra irányult, hogy 150-200 nm méretű, multilamelláris liposzómába „csomagoljuk” a kiválasztott 11 SC-CO₂ extrakcióval kivont gyógynövény extraktumokat, amely technológia újdonságnak számít a növénykondicionálók körében. A Gyógynövénykutató Intézet Kft. által fejlesztett másik készítmény a csak fokhagymakivonatot tartalmazó Garlic-lipo, melynek formulázása az EliceVakcinához hasonlóan történt.

A kísérletbe vont nanoméretű liposzómákba kapszulázott gyógynövénykivonatok biostimulátorként való alkalmazhatóságának vizsgálata során az alábbi célkitűzéseink voltak:

1. Olyan nanoméretű liposzóma formulált gyógynövénykivonatokból álló biostimulátorok fejlesztése (Garlic-lipo és EliceVakcina), amelyek magas ABA tartalommal rendelkeznek.
2. Az előállított biostimulátorok antifungális hatásának vizsgálatát.
3. A Garlic-lipo kezelés hatásának kimutatása genomszintű transzkriptomikai profilozással.
4. Az EliceVakcina kezelés hatásának kimutatása genomszintű transzkriptomikai profilozással.
5. Az előállított biostimulátorok növényi hormon jelátvitel és védelmi válaszhoz köthető útvonalakra gyakorolt hatásának összehasonlító vizsgálata.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgált növényi-alapú biostimulátorok

3.1.1. A növényi-alapú biostimulátorok összetevői

A kísérletekhez a Gyógynövénykutató Intézet Kft. által fejlesztett és előállított három gyógynövény alapú terméket használtuk, melyek az EliceVakcina[®], a Garlic-lipo és a Fitokondi[®].

Az EliceVakcina (korábbi elnevezése Elice16Indures) a Nébih által engedélyezett növénykondicionáló készítmény, mely SC-CO₂ extrakcióval kivont 11 gyógynövénykivonatot (Flavex Naturextrakte GmbH, Németország) tartalmaz. A készítmény fő összetevője a fokhagyma (*Allium sativum* L.) gerezdkivonat, a részletes összetételt a 1. táblázat összegzi. A gyógynövénykivonat keverékét napraforgó lecitin alapú liposzómákba kapszuláztuk.

1. táblázat. Az EliceVakcina előállításához használt növényi kivonatok, az összetevők pontos mennyisége a GYNKI adatbázisában

Latin binomiális név	Növényi rész	Fő aktív komponensek
<i>Melissa officinalis</i>	levél	citrál, kariofilén, citronellal, geranil-acetát, kariofilén-oxid
<i>Carum carvi</i>	mag	karvon, limonén
<i>Cinnamon Ceylanicum</i>	kéreg	fahéj-aldehyd, o-metoxi fahéj-aldehyd, kumarin
<i>Syzygium aromaticum</i>	virágbimbó	eugenol, kariofilén, eugenil-acetát
<i>Allium sativum</i>	gerezd	diallil-diszulfid, diallil-triszulfid, metil-allil-diszulfid, vinil-ditiin, ajoén, allicin
<i>Zingiber officinalis</i>	rizóma	zingiberén, farnezen, kurkumén
<i>Calendula officinalis</i>	virág	pentaciklusos triterpén-alkoholok és triterpendiol-monoészterek, főleg mirisztin- és palmitinsavval észterezett faradiol-észterek
<i>Origanum majorana</i>	levél	biciklusos monoterpének cisz- és transz-szabin-hidrát
<i>Salvia officinalis</i>	levél	alfa és béta tujon, kámfor, cineol
<i>Thymus vulgaris</i>	levél	timol, p-cimol

A másik készítmény, laboratórium elnevezés szerint Garlic-lipo, fejlesztés alatt áll, mely egykomponensű szuperkritikus fokhagymakivonatot (Flavex Naturextrakte GmbH, Németország) tartalmaz. Formulázási módszere megegyezik a EliceVakcina liposzóma

formulázásával. Kísérleteinkben használtuk a Flavex által forgalmazott fokhagymakivonatot Garlic-oil néven, jelezve az anyag jellemzőit.

A kísérletbe pozitív kontrollként bevont Fitokondi is a Nébih által engedélyezett növénykondicionáló készítmény, mely gyógynövények vizes kivonatát tartalmazza (gyógynövények 80%, biohumusz vizes kivonata 15% és kálium-szorbát 1%), azonban formulázása nem liposzóma alapú.

3.1.2. A növényi-alapú biostimulátorok ABA és tiamin (B1 vitamin) tartalmának mérése HPLC-vel

A növényi-alapú biostimulátorok (EliceVakcina, Garlic-lipo, Garlic-oil és Fitokondi) ABA szint műszeres mérését Lei et al. (2016) által optimalizált módszer alapján végeztük el HPLC-DAD (high-performance liquid chromatography with diode-array detection) Agilent (Hewlett Packard, Palo Alto, USA) 1100-as széria, UV-VIS MWD (Ultraviolet visible absorbance MultipleWavelength Detector) típusú készülékkel. A méréshez használt standard: abscisic acid (S-ABA) assay (HPLC) > 98 %, CAS: 21293-29-8 (Duchefa Biochemie, Haarlem, Hollandia). Továbbá mértük a készítmények tiamin tartalmát is. A méréshez használt standard: thiamine hydrochloride $\geq 98.0\%$ by HPLC CAS: 67-03-8 (VWR International, LLC, Radnor, USA). Ezen a készüléken mértük a borsó növények termést tartalmazó hajtásainak tiamin és metabolitjainak tartalmát Abdelwahab and Farid (2014); Ulusoy and Akçay (2018) által ajánlott módszert alkalmazva.

3.1.3. A liposzómák stabilitásának és részecskeméretének meghatározása

A hatóanyagokat 150-200 nm multilamelláris vezikulákba zártuk aktív csapdázási technikát alkalmazva (Mayer et al., 1986). Az elektrosztatikus stabilizációt, a diszperziós tulajdonságokat és a nanorészecske méreteloszlást dinamikus fényszórással mértük Zetasizer Ultra műszerrel szobahőmérsékleten (Malvern Panalytica, Malvern, UK). A polidiszperzitási indexet (PDI) és a Zéta potenciált négy technikai ismétlésben mértük. A minták hígítása Milli-Q vízzel minden alkalommal 10^{-4} volt. Az adatokat a ZS Xplorer Software V.2.3.1 segítségével dolgoztuk fel. A liposzómák részecskeméretét az átlagos

Z-átmérő és PI polideszperzitás index négy mérésének kumulatív elemzéséből adtuk meg. A liposzómák méretét transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) is meghatároztuk.

3.2. Növényi-alapú biostimulátorok in vitro antifungális hatása

A fent említett növényi-alapú biostimulátorok (EliceVakcina, Garlic-lipo, Garlic-oil és Fitokondi) antifungális hatását vizsgáltuk négy *Fusarium* fajon laboratóriumi körülmények között (2. táblázat).

2. táblázat. A kísérletbe vont növényi-alapú biostimulátorok jellemzőinek összefoglalása

Készítmény neve	Rövidítés	Gyártó	Formulálás	Fokhagyma-kivonat (%)
EliceVakcina	E	GYNKI	liposzóma, SC-CO ₂ kivonat	~65
Garlic-lipo	G-L	GYNKI	liposzóma, SC-CO ₂ kivonat	~90
Fitokondi	F	GYNKI	vizes kivonat	~1
Garlic-oil	G-OIL	Flavex	SC-CO ₂ kivonat	100

3.2.1. *Fusarium* fajok fenntartása

A kiválasztott vad típusú fajok (*F. verticilloides* (FGSC 7600), *F. graminearum* (FGSC 9075), *F. oxysporum* (FGSC 9935) - Fungal Genetics Stock Center (FGSC), Kansas State University, Manhattan, USA) és *F. proliferatum* (NRRL 62905 - Joint Genome Institute (JGI), University of California, Berkeley, USA) konidiospóra szuszpenzióit 50%-os glicerinben -70°C-on tároltuk. A növekedési vizsgálatokhoz starter inokulumok készítettünk. A törzseket 20 g/l szacharózt tartalmazó Potato Dextrose Agar (PDA - Merck KGaA, Darmstadt, Németország) táptalajon tenyésztettük 7 napig 25 °C-on. A konidiospórákat 9 g/l NaCl és 100 µl/l TWEEN-80 (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) tartalmazó steril vízben szuszpendáltuk. A szuszpenziót két réteg Miracloth (Merck-Millipore, Burlington, USA) segítségével átszűrtük és mennyiségét hemocitóméterrel meghatároztuk (Leslie and Summerell, 2008).

3.2.2. A minimális gátló koncentráció meghatározása *Fusarium* fajokban

A toxicitási tesztet, a minimális gátló koncentráció (Minimal Inhibitory Concentration - MIC) meghatározását a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) mikrodilúció módszere szerint végeztük 10 V/V%-tól félhígítást alkalmazva (Perczak et al., 2019; Pfaller et al., 2000), valamint növekedési kontrollt és negatív kontrollt is alkalmaztunk 96 lyukú microplate-n. Az inokulum 2.5×10^5 cfu/ml frissen lemosott kultúrából készült. A lemezeket 25 °C-on hét napig inkubáltuk, majd a tenyészetek abszorbanciáját 600 nm-en mértük.

3.2.3. Papírkorongos gátlási zóna meghatározás *Fusarium* fajokban

A kísérletben a különböző *Fusarium* fajok sajátosságainak megfelelően 7–14 napos spóraszuszpenziókat alkalmaztunk. A spórák koncentrációját 5×10^6 db/ml-re állítottuk be, majd 100 µl-t PDA táptalaj felszínére oltottunk. Ezt követően a táptalaj közepére helyezett steril szűrőpapírkorongra 10 µl növényi kivonatot adagoltunk. Az inkubációt 25°C-on, három napon keresztül végeztük (Perczak et al., 2019).

3.2.4. Csírázóképeség vizsgálat *F. oxysporum* inokullummal

A magvakat 1%-os nátrium-hipoklorit oldattal sterilizáltuk 10 percig, majd háromszor steril vízzel átmostuk. Továbbá 24 órán át áztattuk 0,5-1% EliceVakcina és Garlic-lipo kivonatban. A fertőzési teszthez 10^4 spóra/ml koncentrációjú *F. oxysporum* spóraszuszpenzió használtunk 30 percig. A kezelt magokat nedves szűrőpapírra tettük és szobahőmérsékleten négy napig inkubáltuk.

3.3. A vizsgált növény fajok

Kísérleteket állítottunk be kisparcellákon és üvegházban. A EliceVakcina kisparcellás kezeléseket három kultúrában végeztük el, melyek a velőborsó (*Pisum sativum* subsp. *sativum* convar. *medullare* var. *pervicax* 'Angela' fajta), a repce (*Brassica napus* 'GK Mécses' fajta) és a szója (*Glycine max* 'ES Director' fajta). A Fitokondi ajánlott szántóföldi dózisa volt a pozitív kontroll a *P. sativum* kezeléseknél. A Garlic-lipo

kezelések *Triticum aestivum* 'Cellule' fajta bevonásával készültek üvegházi körülmények között.

3.4. Kezelések és mintagyűjtés

3.4.1. Üvegházi kísérlet és mintagyűjtés

A *T. aestivum* magjait Petri-csészékben csíráztattuk (30°C/20°C) 16 órás fotoperiódusban BD Avantgarde Line inkubátorban (Binder GmbH, Tuttlingen, Germany), majd cserépbe ültetve kontrollált üvegházi körülmények között neveltük. A növényeket korai vegetatív fázisban (BBCH12) permetezzük Garlic-lipo 240 g/ha dózissal Euro Pulvé parcella permetezővel. A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz leveleket gyűjtöttünk a kezelés előtt (kontroll – 0min) és a kezelés után 15 perccel (15min), 24 órával (24h) és 48 órával (48h) három biológiai ismétlésben. Ez a kísérlet segít a mintagyűjtés helyes időpontjainak kiválasztásban, mivel a kezelések utáni növényben lezajló stresszválasz folyamatokról szeretnénk képet alkotni. A mintákat RNA Shield tartósítóban (Zymo Research, Irvine, CA, USA) tároltuk -25 °C-on az RNS kivonásig.

3.4.2. Kisparcellás kísérletek és mintagyűjtések

A kisparcellás növénytermesztési kísérleteket a Plant-Art Research Kft. munkatársaival végeztük Tata környékén (GPS koordináták *P. sativum*: 47°38'26.7"N 18°17'05.1"E; *B. napus*: 47°32'57,89"N 18°21'40,86"E; *G. max*: 47°37'56.1"N 18°15'52.9"E) GEP minőségbiztosítási rendszerben. A vizsgálatokhoz négy ismétléses blokkrendszert használtunk 10 m²-es kísérleti parcellákon.

Az EliceVakcina növénykondicionáló készítmény esetében a gyártó egy vegetáció alatt háromszori kijuttatást ajánl különböző fejlődési stádiumokban, melyek a növény juvenilis/érett vegetatív fázisa és a reprodukív fázisa.

A vizsgált dózisok 20 és 240 g/ha voltak. A kezeléseket Euro Pulvé parcella permetezőgéppel TeeJet 11004 AIXR szórófejekkel végeztük. A kijuttatáskor a növények fenológiai fázisai különbözőek voltak, melyeket BBCH-skála (Zadoks et al., 1974) segítségével határoztunk meg. A kisparcellás kezelések után mintát vettünk a levelekből a molekuláris biológiai vizsgálatokhoz. Így a *P. sativum* és a *B. napus* esetében a reprodukív fázisban egyszer történt mintavételezés a transzkriptom elemzéshez az utolsó

kezelés után két nappal. A *G. max* esetében pedig háromszor vettünk mintát a kezelések után két-két nappal (3. táblázat), azonban a generatív fázisban vett mintákból sajnos nem készültek NGS könyvtárak gazdasági nehézségek miatt. A mintákat RNA Shield tartósítóban (Zymo Research, Irvine, CA, USA) tároltuk -25 °C-on az RNS kivonásig.

3. táblázat. Kezelések és mintagyűjtések a BBCH skála szerint

Növény	Fajta	Kezelés			Mintagyűjtés NGS könyvtárhoz		
		Juv.v.f. (BBCH)	Érett v.f. (BBCH)	Rep.f. (BBCH)	Juv.v.f. (BBCH)	Érett v.f. (BBCH)	Rep.f. (BBCH)
<i>P. sativum</i>	Angela	16	51	67	-	-	74
<i>B. napus</i>	GK Mécses	16	51	67	-	-	69
<i>G. max</i>	ES Director	16	51	67	19	53	73

Kezelések: *P. sativum*: 6 leveles állapot (16), első virágbimbók megjelenése (51), virágzás hanyatló: a szirmok többsége lehullott (67), a hüvelyek 40%-a elérte a végleges nagyságot, zseneség (74). *B. napus*: zöldbimbós állapot (51), teljes virágzás (67, 69).

G. max: 6 leveles állapot (16), 9 leveles állapot (19), látható a harmadik másodrendű oldalhajlás (33), első virágbimbók kifejlődése (51-53), teljes virágzás (65). Rövidítések juvenilis vegetatív fázis (juv.v.f.), érett vegetatív fázis (érett v.f.), reprodukív fázis (rep.f.)

3.5. Újgenerációs szevenálás, NGS könyvtár készítése

Az RNS kivonás során 30 mg növényi szövetet homogenizáltunk 100 µl TRI-reagenssel (Zymo Research, Irvine, USA). A teljes RNS-t Direct-zol™ RNA MiniPrep System (Zymo Research, Irvine, USA) segítségével vontuk ki. Az RNS integritását (RNA Integrity Numbers RIN) és az RNS koncentrációját 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) és Qubit 3.0 fluoriméterrel (RNA HS Assay Kit) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg. A génexpresszió profilozáshoz NGS technikát alkalmaztunk, a könyvtár elkészítéséhez a QuantSeq 3'mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina (Lexogen GmbH, Wien, Ausztria) kiten használtuk a gyártó protokollja szerint. A könyvtárakat 1,8 pM-ra hígítottuk az 1 × 85-87 bp-os single end szekvenáláshoz 75 ciklusú High Output v2 Kittel a NextSeq 550 Sequencing System-en (Illumina, San Diego, CA, USA) a gyártó protokollja szerint. A QuantSeq FWD lehetővé teszi a poli(A) RNS 3'-végének pontos meghatározását és ezáltal pontos információk megszerzését a 3'-es UTR-ről. Ezzel a szekvenálással a kódoló szekvenciák fragmensei átlagosan 260-300 bp hosszúak.

3.6. Az NGS leolvasások bioinformatikai adatfeldolgozása

3.6.1. A szekvenált leolvasások előfeldolgozása és összeszerelése

A leolvasások előfeldolgozása Trimmomatic software (Bolger et al., 2014), a minőségellenőrzés FastQC software (Wingett and Andrews, 2018) segítségével történt. A folyamat során a Phred-score értékeket (Qscores) >30-ra állítottuk be. Az elemzés során az adaptereket és a szennyezett szekvenciákat eltávolítottuk, a rossz minőségű bázisokat, a rövid és gyenge minőségű leolvasásokat kiszűrtük. A szennyeződési szekvenciákat és az N-eket egy saját fejlesztésű, GenoUtils alkalmazással szűrtük ki (Mátyás et al., 2019), valamint a 30%-nál több N-t tartalmazó leolvasásokat töröltük. A nyers szekvenálási leolvasásokat feltöltöttük a National Center for Biotechnology Information (NCBI) BioProject és Sequence Read Archive (SRA) adatbázisába, valamint a Mendeley Data adattárba is (4. táblázat).

4. táblázat. A vizsgált növényi mintákból készült könyvtárak és elemzések elérhetősége az NCBI és Mendeley Data (doi) adatbázisban

Növény	Bioproject	SRA	TSA	CountTable AnnotationTable
<i>T. aestivum</i>	PRJNA808851	SRR18107541- SRR18107544	GJUY00000000.1	10.17632/p66v4yxbtp.1
<i>P. sativum</i>	PRJNA870114	SRR21124993- SRR21124996	GKBF00000000.1	10.17632/f93mjns9t6.2
<i>B. napus</i>	PRJNA838472	SRX15287948- SRX15287949	GJYZ00000000.1	10.17632/hp4hjpjyfh.1
<i>G. max</i>	PRJNA778970	SRX13119884- SRX13119889	GJRQ00000000.1 GJRP00000000.1	10.17632/d2yypjh2hr.1

A szűrt readekkel elkészítettünk minden mintánál egy *de novo* referencia-transzkriptomot Trinity software v2.15.1 segítségével (Grabherr et al., 2011). Az illesztés során a bemeneti RNA-Seq leolvasásokat a Bowtie2 v2.4.5 segítségével illesztettük a transzkriptomhoz (Langmead and Salzberg, 2012). A *de novo* referencia transzkriptomokat feltöltöttük Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) - DBJ/EMBL/GenBank adatbázisba (4. táblázat). A génexpresszió vizsgálatokhoz gén szintű elemzést használtunk (SuperTranscript). Mind a négy kísérlethez kapcsolódóan Bioproject-et hoztunk létre az NCBI adatbázisban, mely segítségével nyomon követhető a bioinformatikai vizsgálatok alapját képező könyvtárak létrejötte.

3.6.2. *Transzkript abundancia meghatározás és annotálás*

Az RNS minták szekvenálásból származó könyvtárak génexpresszió becsléséhez elkészítettük az abundancia táblázatot (CountTable), amely a kísérlet során keletkezett könyvtárak adott génhez való illesztett leolvasásainak számát tartalmazza a teljes referencia transzkriptomot lefedve. A CountTable létrehozása az a HTseq pakage (Anders et al., 2015) és a Bowtie2 programok segítségével történt beépítve az OmixBox.BioBam (<https://www.biobam.com/omicsbox/>) segédprogramba. Ezt az abundancia táblázatot használtuk fel a továbbiakban a génkifejeződésbeli különbségek meghatározására. Az elkészült CountTable adatok elérhetőek a Mendeley-adatbázisban (4. táblázat).

3.7. A kezelések közötti különbségek kimutatásra használt bioinformatikai elemzések

3.7.1. *Páronkénti differenciális expresszió meghatározása (Pairwise DEG)*

A páronkénti differenciális expresszió (Differentially expressed genes - DEG) numerikus elemzése a különböző kísérleti körülmények között gyűjtött két minta összehasonlítását teszi lehetővé, melyet a Bioconductor projekthez tartozó NOISeq v2.40.0 software csomag segítségével határoztunk meg. A használt alkalmazás az RSEM és edgeR programon alapul, amely kvantitatív statisztikai módszerekkel hasonlítja össze az egyes gének szignifikanciájának értékeit a két kísérleti körülmény között (Li and Dewey, 2011; Robinson et al., 2010). Az adatok értelmezéséhez TMM normalizálási módszert alkalmaztunk.

3.7.2. *Funkcionális annotáció*

A funkcionális annotációt és a génontológiai (Gene Ontology GO) elemzést az OmixBox.BioBam segítségével végeztük el az alábbiak szerint: i.) A szekvenciákat blast-al illesztettük az NCBI nr (nem redundáns) *Viridiplantae* adatbázisához (letöltve 2019-2022), lokális blastn konfigurációt alkalmazva; ii.) a Blast kereséssel kapott 10 találatához kapcsolódó GO kategóriák meghatározása (GO annotáció) a transzkriptek funkcionális meghatározása céljából történt. iii.) A GO annotációkat a GO kifejezések szerint határoztuk meg úgy, mint molekuláris funkció, biológiai folyamat és

sejtkomponens. A transzkriptomok annotációja elérhető a Mendeley adatbázisban (4. táblázat).

3.7.3. Útvonalelemzés (*Pathway analysis*)

Annak érdekében, hogy pontos képet kapjunk a biostimulátor kezelések által kiváltott biokémiai utakról, útvonalanalízist végeztünk a szekvenciák KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) adatbázishoz való illesztésével. Ezt az információk összegzése és az eredmények pontosabb értelmezése miatt végeztük el.

3.7.4. Időbeli-változás elemzés (*Time-course expression analysis*)

A búza RNS-seq-ből származó abundancia adatok (CountTable) alapján időbeli expresszió analízist (Time-course expression analysis) végeztünk a genomi jellemzők kimutatására, melynek segítségével meghatároztuk a jelentős időbeli expresszió változásokat és szignifikáns különbségeket a kísérleti csoportok között. A jellemzők kimutatására a Bioconductor projekthez tartozó „maSigPro” szoftvercsomagot használtuk (Nueda et al., 2014). A szignifikánsan eltérő expresszió szintekkel rendelkező géneket kilenc klaszterbe osztottuk. Az így meghatározott TimeCourse Table elérhető a Mendeley Data adatbázisban (2022.07.23. <https://data.mendeley.com/datasets/xvvsxcpz6w/1> doi:10.17632/xvvsxcpz6w.1)

A klasztergének változásainak expresszió dinamikája szerint ezt a kilenc klasztert további négy csoportba soroltuk: 1, az expresszió szint fokozatosan emelkedett; 2, az expresszió szint fokozatosan csökkent; 3, az expresszió szint kezdetben nőtt, majd csökkent; 4, az expresszió szint kezdetben csökkent, majd visszatért az eredeti szintre. Ezek közül az 1. csoportba tartozó, fokozatosan megnövekedett expresszió szintekkel rendelkező géneket vizsgáltuk tovább.

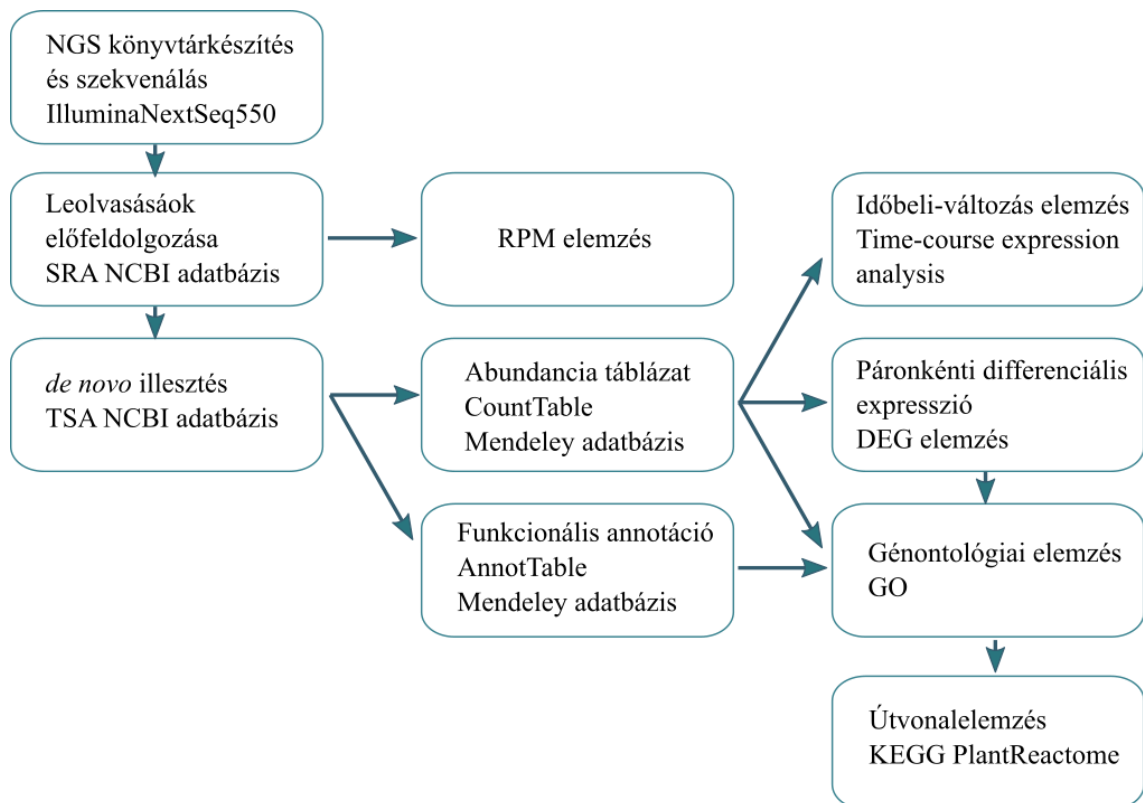
3.7.5. Kiválasztott útvonalhoz tartozó gének RPM elemzése

A KEGG analízis során a jelentősen változó, stresszválaszokhoz kapcsolódó útvonalakat tovább vizsgáltuk. A vizsgált folyamatokban résztvevő gének egyedi génextpresszió elemzését (Reads Per Million mapped read - RPM) végeztük el olyan

módon, hogy a kezeletlen és a kezelt mintákból származó leolvasásokat Bowtie2 segítségével a referenciaszekvenciákhoz igazítottuk. Az egyes génekhez tartozó RPM értékeket az alábbi egyenlettel számítottunk ki négy biológiai ismétlésben (1. egyenlet).

$$\text{RPM} = \frac{\text{génhez tartozó leolvasások} \times 10^6}{\text{összes leolvasás}}$$

Az RPM értékekből megkaptuk az adott időpontban, az alkalmazott kezelések által kiváltott enzimszekvenciák egyedi expresszió szintjeit (Atallah et al., 2013). Az alkalmazott bioinformatikai módszereket a 4. ábra foglalja össze.



4. ábra. Az alkalmazott bioinformatikai módszerek kapcsolódása

3.8. Valós idejű RT-qPCR elemzés

Az *in silico* elemzés során a legnagyobb különbségeket mutató géneket biológiailag is validáltuk valós idejű PCR, RT-qPCR analízissel (Real-time PCR analysis). A teljes RNS mennyiségét Nanodrop 2000c spektrofotométerrel és Qubit 2.0 fluoriméterrel (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg. Ötszáz nanogramm (ng) teljes

RNS-t reverz transzkriptáz enzimet tartalmazó M-MuLV RT-vel átírtuk (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Ötven ng cDNA-t használtunk fel 10 µl-es reakciókban az Xceed qPCR SG 2× Mix (Institute of Applied Biotechnologies, Praha-Strašnice, Cseh Köztársaság) és CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével. Az adatokat a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel Livak and Schmittgen (2001) alapján elemeztük. A génexpresszió analízist három technikai és biológiai replikáció alapján hoztuk létre és a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), a tubulin (TUB) és az ubiquitin referenciagének segítségével normalizáltuk. A statisztikai elemzést varianciaanalízissel végeztük és az összes adatot átlag \pm SEM-ben fejeztük ki. A biológiai replikátumok homogenitását F-próbával (Levene teszt) vizsgáltuk. A kezelési minták összehasonlítását egyutas ANOVA teszttel végeztük post hoc korrekcióval (SPSS for Windows, 21.0 verzió). A Student-féle t-próbát a csoportok átlagértékeinek összehasonlítására használtuk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Növényi-alapú biostimulátorok ABA és tiamin mennyiségének HPLC-DAD mérése

A vizsgált négy növényi-alapú biostimulátor ABA tartalmának HPLC-DAD mérési eredménye alapján megállapítottuk, hogy a nagy arányban fokhagymakivonatot tartalmazó készítményekben az ABA szint magas (5. táblázat). Azonban a négy növényi-alapú biostimulátor nem tartalmazott tiamint.

5. táblázat. A vizsgált kivonatok HPLC-DAD mérései

Készítmény neve	Formulálás	Fokhagyma-kivonat (%)	ABA tartalom (µg/g)
EliceVakcina	liposzóma, SC-CO ₂ kivonat	~65	6,3± 1,2
Garlic-lipo	liposzóma, SC-CO ₂ kivonat	~90	81,4± 2,2
Fitokondi	vizes kivonat	~1	-
Garlic-oil	SC-CO ₂ kivonat	100	80,0± 2,4

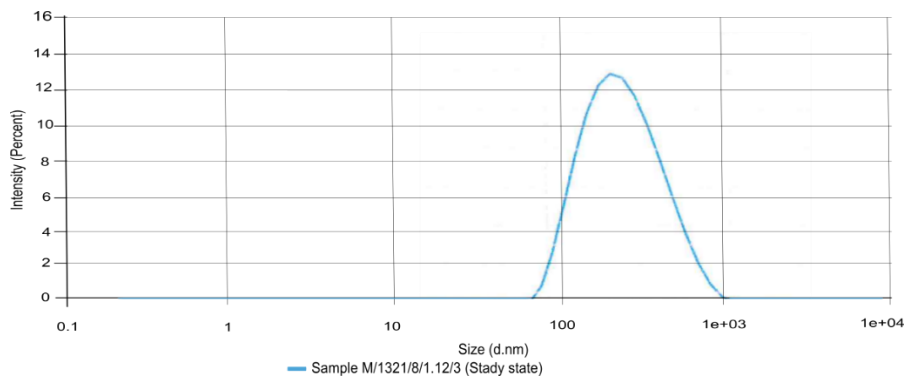
4.2. Az EliceVakcina és Garlic-lipo készítmények liposzóma stabilitás mérése és részecskeméret meghatározása

A vizsgált minták liposzóma tulajdonságai azt mutatták, hogy mind a részecskeméret, mind a polidiszperzitási index ($p > 0,05$, Pear-son) viszonylag állandó méretű (233 és 149,2 nm, polidiszperzitási index = 0,1733 és 0,13035) a négy mért mintában. A méretmeghatározási paramétereket az 6. táblázat foglalja össze, a mérések reprezentatív adatait a 5. ábra mutatja.

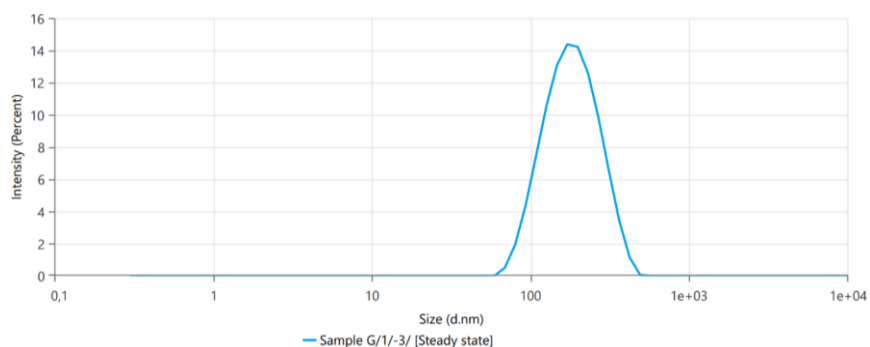
6. táblázat. Az EliceVakcina és Garlic-lipo minták részecskeméret-eloszlása (PSD) az intenzitás statisztika szerint

Név	EliceVakcina (átlag)	Garlic-lipo (átlag)
Z-átlag (nm)	233	149,2
Polidiszperzitási index (PI)	0,1733	0,13035
Intercept	0,9443	0,951
Egy csúc intenzitás (nm)	284,3	160,6
Egy csúcsterület intenzitás (%)	100	100
Származtatott átlagos számlálási arány (kcps)	174 200	171 300

a)



b)

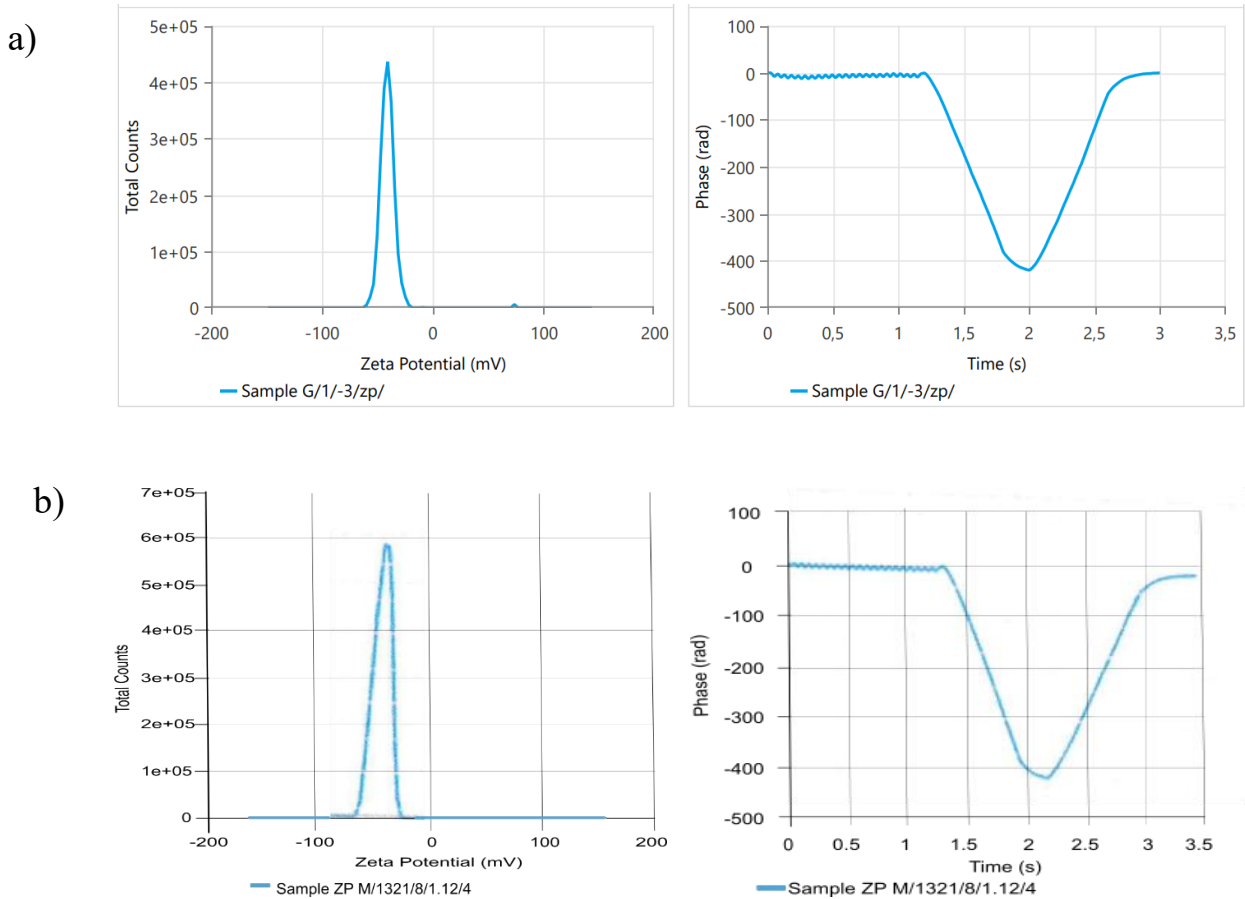


5. ábra. a) EliceVakcina és b) Garlic-lipo koloid liposzómáinak méretmeghatározási diagramja. A liposzómák mérete 233 és 149,2 nm között van

A Zéta-potenciál elemzés eredményét az 7. táblázat és a 6. ábra foglalja össze.

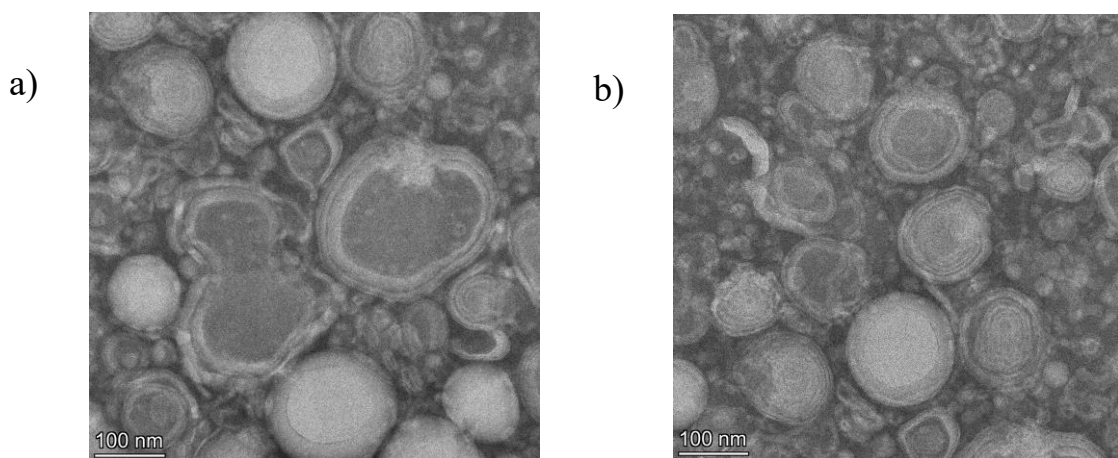
7. táblázat. Az EliceVakcina és Garlic-lipo minták egyes liposzómáinak Zéta potenciálja és minőségének mérése

Név	EliceVakcina (átlag)	Garlic-lipo (átlag)
Származtatott átl. számlálási arány (kcps)	174 200	171 300
Zéta potenciál (mV)	-44,47	-40,595
Egy csúcs zéta átlag	-44,7	-41,18
Vezetőképesség (mS/cm)	0,001882	0,007439
Fal zéta potenciál (mV)	-57,96	-66,28
Zéta eltérés (mV)	5,433	8,632
Származtatott átl. számlálási arány (kcps)	42 960	85 150
Referencia nyalábszámlálási sebesség (kcps)	3037	3671,5
Minőségi tényező	8,135	4,509



6. ábra. Zéta potenciál meghatározása a) EliceVaccina és b) Garlic-lipo liposzómák elektroforetikus mobilitása alapján. (1) Zéta potenciál eloszlás: a kolloid stabilitása bizonyítottan magas, a Zéta potenciált $-44,47$ és $-40,595$ mV közötti. (2) Fázisdiagram a részecskék elektroforetikus mobilitásának becsléséhez: A fáziskülönbség arányos a nanoanyag elektroforetikus mobilitásával és így a vizes közeg Zéta-potenciáljával

Továbbá az előállított liposzómák méretét és szerkezetét jellemeztük transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) (7. ábra).



7. ábra. TEM felvételek az (a) EliceVaccina, (b) Garlic-lipo liposzómák szerkezetéről. A multilamellrális liposzómák ~ 100 - 200 nm méretűek

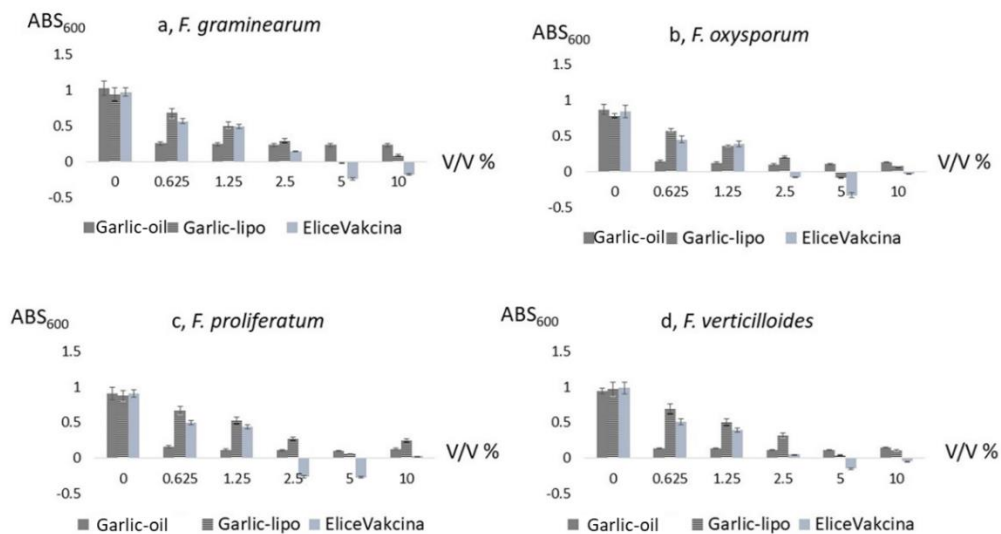
4.3. Növényi-alapú biostimulátorok antifungális hatása

A Gyógynövénykutató IntézetKft. által fejlesztett három növényi-alapú biostimulátor az EliceVakcina, a Garlic-lipo és a Fitokondi, valamint a Garlic-oil antifungális hatását vizsgáltuk laboratóriumi körülmények között.

4.3.1. Mikrodilúció toxicitási teszt és papírkorongos gátlási zóna meghatározása

Fusarium fajokban

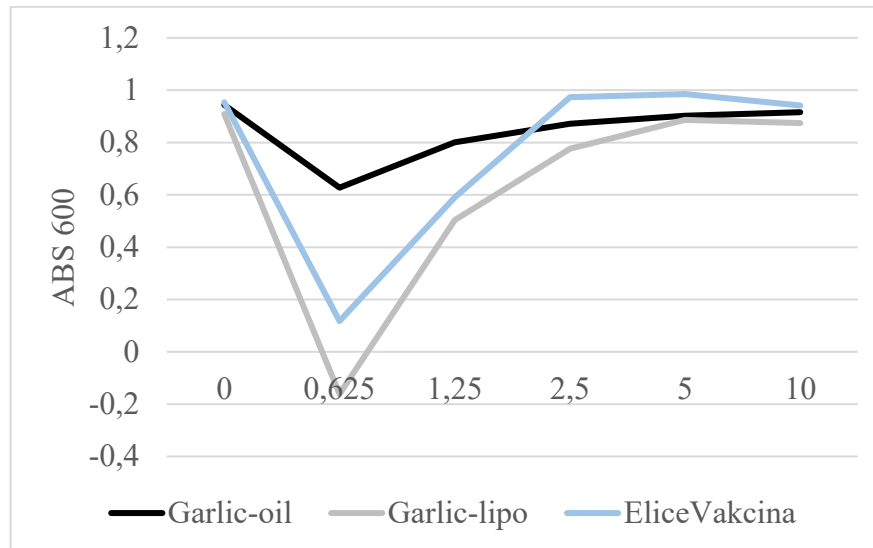
Méréseink alapján a fokhagymakivonatokat tartalmazó készítmények gátolták a *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* és *F. verticilloides* fajok növekedését, a négy faj hasonló reakciót mutatott a kivonatokra (8. ábra). A negatív érték megjelenése azzal magyarázható, hogy a gombák felszívják a liposzómákat, ami a rendszeren belüli liposzóma-eredetű kivonatok abszorbanciájának csökkenését eredményezi. A fokhagymakivonatot nem tartalmazó Fitokondi nem mutatott antifungális hatást.



8. ábra. Növényi-alapú biostimulátorok antifungális hatása négy *Fusarium* faj ellen mikrodilúció toxicitási tesztet alkalmazva. A kísérlethez a CLSI szabvány szerinti félhígítási módszert alkalmaztunk. Az ábra a felhasznált növényi-alapú biostimulátorok térfogatszázalékát mutatja

A vizsgált négy *Fusarium* faj MIC vizsgálata hasonló lefutású adatokat mutatott, ezért a szignifikancia vizsgálatot a négy faj átlagában végeztük el. A vizsgálat szerint 0,625 V/V% dózis használatakor a leghatékonyabb a Garlic-lipo (-0,1612) volt, majd az EliceVakcina (0,11755) követte, végül pedig a Garlic-oil (0,62745) szerepelt (9. ábra).

Az alacsonyabb térfogat százalékban a liposzóma formulált termékek mutattak nagyobb hatékonyságot, 2,5-10 V/V% méréseknél a formulált és a formulázás nélküli fokhagymakivonat gátló hatása között nem volt szignifikáns különbség a *Fusarium* fajok növekedésére (melléklet M1. táblázat).



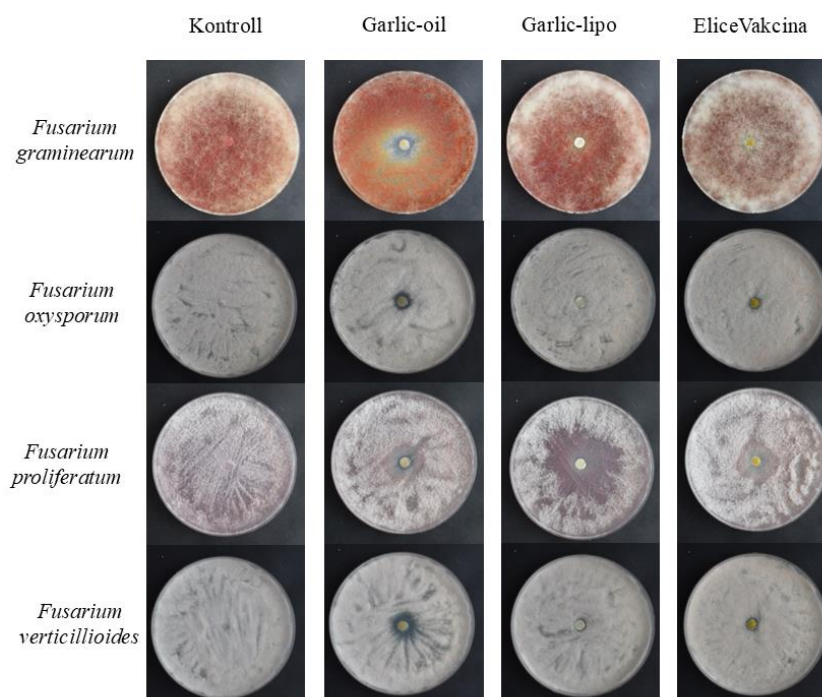
9. ábra. Egy egységnyi dózis a négy *Fusarium* faj átlagában. Növényi-alapú biostimulátorok antifungális hatása mikrodilúció toxitás teszt szignifikancia vizsgálata

Továbbá az antifungális hatást vizsgáltuk papírkorongos gátlási zóna meghatározásával is (10. ábra). A négy *Fusarium* faj eltérő érzékenységet mutatott a vizsgált gyógynövénykivonatokkal szemben. A legérzékenyebb mindhárom kivonatra a *F. proliferatum* volt, amely különösen erősen reagált a Garlic-lipo kezelésre. Ennek hatására kiterjedt gátlási zóna alakult ki, ahol micélium növekedés nem volt megfigyelhető.

A *F. graminearum* esetében a legnagyobb mértékű gátlást a Garlic-oil okozta, mivel a konídiumtartók kizárólag a táptalaj szélén voltak megfigyelhetők. Emellett a Garlic-lipo is jelentősen csökkentette a konídiumtartók képződését.

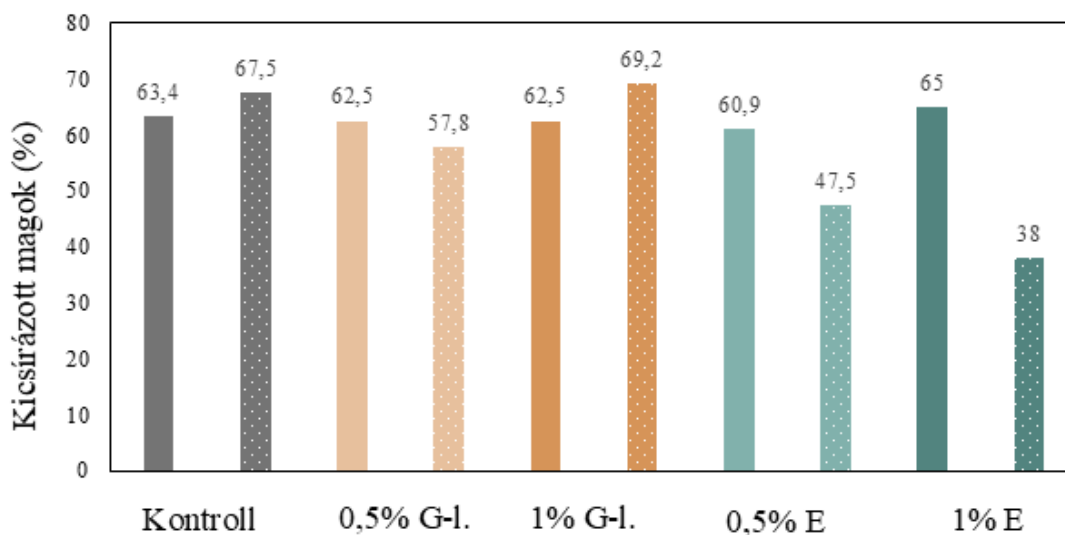
Az *F. verticillioides* micéliumképződését mindhárom kivonat gátolta, azonban a legnagyobb mértékű érzékenységet a Garlic-oil kezelés váltotta ki. Ugyanakkor a spóráképződés esetében nem volt kimutatható gátló hatás.

Hasonló jelenség figyelhető meg az *F. oxysporum* esetében is, bár enyhébb mértékben. Az EliceVakcina és a Garlic-lipo kivonatok gátolták a micélium növekedését, azonban a Garlic-lipo kezelés során a papírkorong környezetében nem alakult ki gátlási zóna. Emellett egyik kivonat sem mutatott hatást a spóráképződésre.



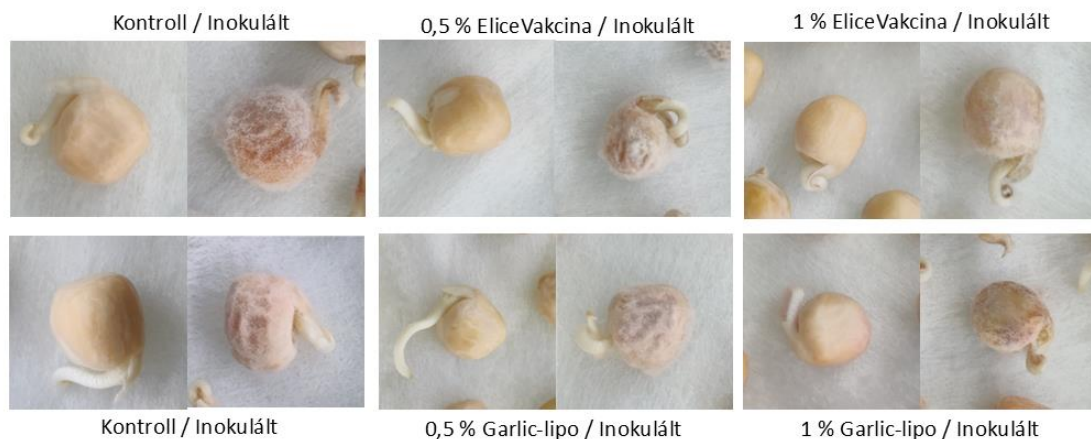
10. ábra. *Fusarium* fajok antifungális hatását mutató papírkorongos gátlási zóna meghatározása

Borsó magok csírázókéességét vizsgáltuk az EliceVakcina és Garlic-lipo 0,5-1 % oldatával kezelve. Mindkét biostimulátor csökkentette a csírázókéességet a fertőzés nélküli magokon. A *F. oxysporum* spórasuszpenzióval megfertőzött magok csírázókéességét viszont elősegítette az 1%-os Garlic-lipo kezelés (11. ábra).



11. ábra. EliceVakcina (E) és Garlic-lipo (G-l) kezelt borsó magok csírázókéessége *F. oxysporum* gombával inokulálva (pontosított oszlop) és fertőzés nélkül (egyszínű oszlop)

A növényi kivonatokkal előkezelt magvak csökkent elszíneződést mutattak, ellentétben a kontroll magvakkal, amelyeknél a súlyos fertőzéshez kapcsolódó jellegzetes barnás-vöröses elszíneződés alakult ki, ami a fertőzés agresszívabb progresszióját mutatta. Ez arra utal, hogy a növényi kivonatok részben enyhítették a fertőzés fiziológiai tüneteit, annak ellenére, hogy nem akadályozták meg a fertőzést (12. ábra).



12. ábra. *F. oxysporum* fertőzés előrehaladása az EliceVaccina és Garlic-lipo kezelt borsó magokon a spórákkal történő beoltása után négy nappal

4.4. NGS szekvenálás feldolgozása

4.4.1. NGS könyvtár szekvenálása, előfeldolgozása és összeszerelése

Négy NGS könyvtárat állítottunk elő a Garlic-lipo-val kezelt *T. aestivum* mintákból. Továbbá az EliceVaccinával kezelt mintákból készítettünk könyvtárat: négy könyvtár a *P. sativum* mintákból, kettő könyvtár a *B. napus* mintákból, hat könyvtár a *G. max* mintákból. Általánosságban elmondható, hogy a nyers readok tisztítása után a megmaradt adatkészlet az eredeti 95-97%-a. A szekvenálás, az előfeldolgozás és összeszerelés adatait a 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat. Az elemzések során használt könyvtárak statisztikai adatai.

Növény	Könyvtár elnevezése	Összes tisztított read	Összes transzkript	Összes illesztett bázis	Összes gén	GC (%)	Átlag hossz (bp)
<i>T. aestivum</i>	t_C	26 836 641	9 326	2 851 814	5 278	42,58	305,79
	t_G240_15	17 078 816					
	t_G240_24	14 425 037					
	t_G240_48	13 242 086					
<i>P. sativum</i>	p_C	15 569 885	7 513	2 700 878	6 897	35,09	359,49
	p_E20	15 527 651					
	p_E240	14 627 132					
	p_F	15 089 578					
<i>B. napus</i>	b_C	15 421 112	3 859	1 142 201	3 171	39,18	295,98
	b_E240	14 862 309					
<i>G. max</i>	g_525_C	14 724 434	10 492	3 157 440	8 308	51,71	322,19
	g_525_E20	14 760 776					
	g_525_E240	14 292 341					
	g_710_C	14 915 888					
	g_710_E20	15 182 823					
	g_710_E240	14 473 178					

C: kontroll, G240: Garli-lipo 240 g/ha kezelés, E20: EliceVakcina 20 g/ha kezelés, E240: EliceVakcina 240 g/ha kezelés, F: Fitokoni 4 l/ha kezelés

4.4.2. Génszintű abundancia meghatározás és annotáció

Az összeállított CountTable alapján könyvtáranként mértük a leolvasások abundanciáját. A transzkriptek funkcionális meghatározása céljából elvégzett annotáció és a GO elemzés értékeit a 13. ábra szemlélteti.

	<i>P. sativum</i>	<i>B. napus</i>	<i>G. max</i>	<i>T. aestivum</i>
Összes gén	6897	3171	8308	5278
Blast találat	6895	1998	8263	5226
GO t.	6408	1772	7753	3729
GO a.	3858	1744	3921	1322

13. ábra. Az annotált szekvenciák száma az NCBI nr adatbázis szerint a négy kultúra transzkriptomában. Rövidítések: GO t. (GO térképezés), GO a. (GO annotáció)

4.4.3. Páronkénti differenciális expresszió elemzés (DEG)

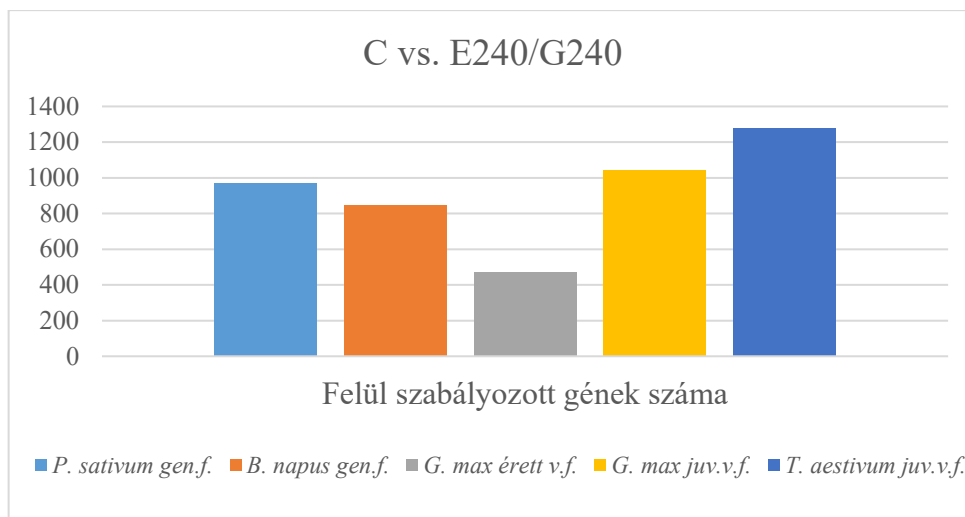
EliceVakcina és Garlic-lipo hatását hasonlítottuk össze két-két kísérleti körülmény között DEG elemzéssel és a legnagyobb szignifikáns különbséggel expresszáldó 50 gén kontigját (Top50) választottuk ki. Az adatok M-értékét a súlyozott vágott átlag normalizálási módszerrel kaptuk meg. A DEG statisztikai adatait kultúrákként az 9. táblázat foglalja össze.

9. táblázat. Top50 DEG statisztikai adatai kultúránként

Növény	Vizsgált párok	Össz. gén szám	DEG szám (p > 0,9)	felül szabályozott	alul szabályozott
<i>T. aestivum</i>	t C vs. t G240 15	5 278	1 712	919	793
	t C vs. t G240 24		2 485	1 279	1 206
	t C vs. t G240 48		2 578	865	1 713
<i>P. sativum</i>	p C vs. p E20	6 897	4 475	4 102	373
	p C vs. p E240		1 478	970	508
	p C vs. p F		4 585	4 353	232
	p E20 vs. p E240		4 245	415	3 830
	p E20 vs. p F		2 216	763	1 453
	p E240 vs. p F		4 494	251	4 243
<i>B. napus</i>	b C vs. b E240	3 171	1 486	849	637
<i>G. max</i>	g 525 C vs. g 525 E20	8 308	1 754	1 036	718
	g 525 C vs. g 525 E240		2 798	1 044	1 754
	g 525 E20 vs. g 525 E240		2 830	897	1 933
	g 710 C vs. g 710 E20		1 572	795	777
	g 710 C vs. g 710 E240		3 282	470	2 812
	g 710 E20 vs. g 710 E240		3 344	510	2 834

C: kontroll, G240: Garli-lipo 240 g/ha kezelés, E20: EliceVakcina 20 g/ha kezelés, E240: EliceVakcina 240 g/ha kezelés, F: Fitokoni 4 l/ha kezelés

A kontroll és EliceVakcina 240 g/ha dózis kezelés DEG elemzése során a felülszabályozott gének figyelembevételével hasonlítottuk össze a könyvtárakat. Mivel a mintavételezés eltérő időszakokban történt, fejlődési stádiumok szerinti összehasonlítást végeztünk. A *P. sativum* és *B. napus* (generatív fázis: BBCH69-74), valamint a *G. max* (g_525) és *T. aestivum* mintavételezése (juvenilis vegetatív fázis: BBCH16-19) történt hasonló fejlődési stádiumban, és a gének száma is hasonló. Mivel a *G. max* érett vegetatív fázisban történt mintavételezése (g_710: BBCH 53) jelentősen eltér a többi mintától a felülszabályozott gének számában, kizártuk a további vizsgálatból (14. ábra).



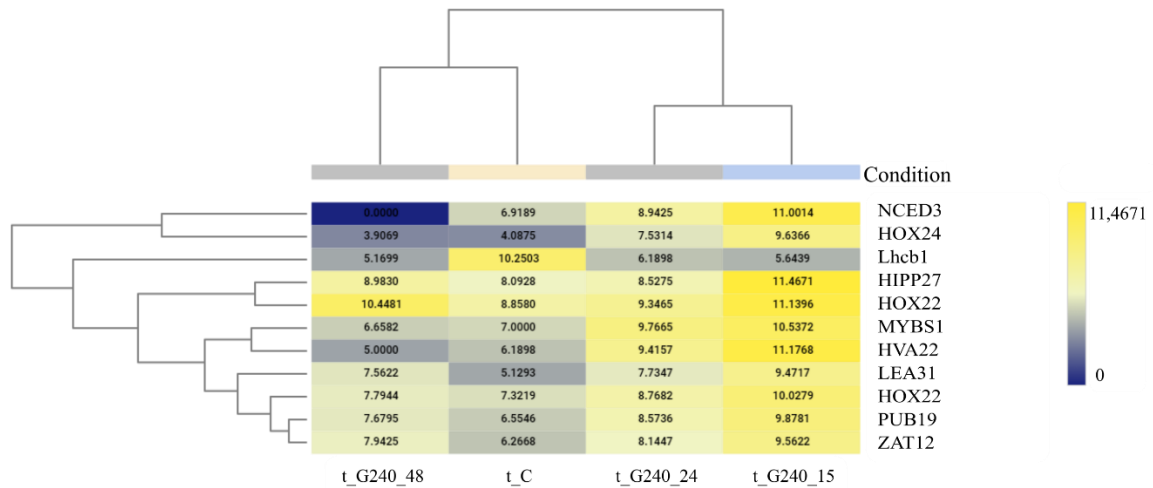
14. ábra. DEG elemzések összehasonlítása kultúránként a felül szabályozott gének figyelembevételével. C vs. E240 (kontroll vs. EliceVakcina 240 g/ha) összehasonlítása *P. sativum*, *B. napus* és *G. max* mintákban. C vs. G240 (kontroll vs. Garlic-lipo 240 g/ha) *T. aestivum* mintákban

4.5. Garlic-lipo kezelés hatásának kimutatása genom szintű transzkriptomikai profilozással

4.5.1. *T. aestivum* minták DEG összehasonlítása

A Garlic-lipo kezelés után három mintavételi időpontban (15 perc/24 óra/48 óra) mért DEG-ek expresszió szintjeit a kontrollal (0 perc) hasonlítottuk össze, így meghatároztuk a génkifejeződésbeli különbségeket és hőtérképeken ábrázoltuk a legnagyobb különbséget mutató Top50 gént. Részletes Top50 DEG hőtérképek elérhetőek a megjelent publikációban (Kutasy et al., 2023b).

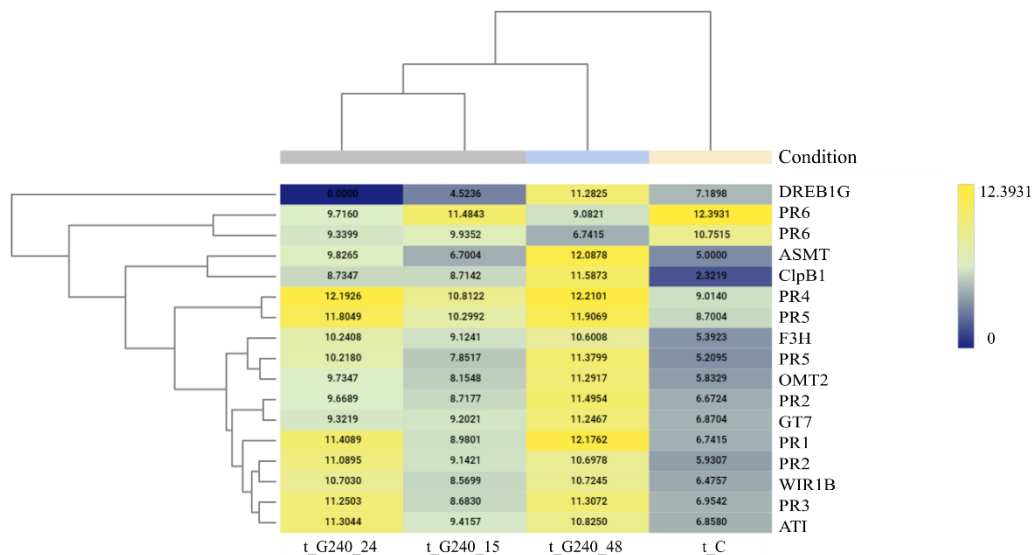
A kezelés után 15 perccel gyűjtött mintában a stresszválaszban és az ABA jelátvitel/bioszintézis útvonalban részt vevő fehérjék génjei felül szabályozott szintet mutattak. Többek között az ABA által indukált fehérje (early ABA-inducible protein - HVA22), a late embryogenesis abundant protein - LEA31, az 9-cisz-epoxi-karotinoid dioxigenáz (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase - NCED3) és U-box domént tartalmazó protein 19 (U-box domain-containing protein - PUB19). A mintában a TF illetően a zinc finger protein12 (ZAT12 - C2H2 család), a homeobox-leucine zipper protein 22/24 (HOX22 és HOX24 - HD-ZIP család) és a R1/2-type myeloblastosis (MYBS1) mutatott felül szabályozottságot, ami GA és JA jelátvitelhez köthető. A mintában az alul szabályozott gének a fotoszintézissel, valamint a riboszómális RNS-génekekkel kapcsolatosak voltak (15. ábra és melléklet M2. táblázat).



15. ábra. *T. aestivum* Top50 DEG hőterkép részlet a 15 perces és a kontroll minták összehasonlítása alapján (t_C vs. t_G240_15). Feltüntetésre kerültek a t_G240_24, t_G240_48 minták adatai is

A 24h mintában a Top50 DEG többnyire alul szabályozott géneket mutatott, kivéve a PR1 és az aldehid-dehidrogenáz 7A1 (aldehyde dehydrogenase 7 - ALDH7). A fotoszintézishez (pl. chlorophyll a-b binding protein 1 - Lhcb1) és a riboszómához kapcsolódó gének a kezelést követő 24 órában is alul szabályozottak (Kutasy et al., 2023b).

A stresszválaszhoz köthető gének vonatkozásában a legnagyobb eltérést a 48h minta mutatta.



16. ábra. *T. aestivum* Top50 DEG hőterkép részlet a 48 órás és a kontroll minták összehasonlítása alapján (t_C vs. t_G240_48). Feltüntetésre kerültek a t_G240_24, t_G240_15 minták adatai is

Míg a 15min és a 24h mintában több ABA útvonalhoz kapcsolódó gént is találtunk magas expresszió szinttel, a 48h mintában csak egyet, a felül szabályozott flavanon-3-hidroxiáz (flavanone 3-dioxygenase - F3H) génjét (16. ábra és melléklet M2. táblázat). Ezenkívül a PR1-5 gének és más stressz indukált gének is felülszabályozottak a 48h mintában. A fokozottan szabályozott PR gének, mint például a PR1, az endo-béta-1,3-glükánáz (endo-1,3-beta-glucosidase - PR2), a kitinázok (PR3), a wheatwin-2 protein (PR4) és a taumatin protein (PR5) génei szignifikánsan magasabb génkifejeződésbeli különbségeket mutattak, mint a kontroll. Csupán a PR család egyik tagja, a Bowman-Birk típusú tripszin inhibitor (Bowman-Birk type trypsin inhibitor - PR6) mutatott csökkent expresszió szintet.

A biotikus és abiotikus stresszreakcióhoz köthető gének expresszió szintje nőtt a 48h mintában, például az alfa-amiláz inhibitor (alpha-amylase/trypsin inhibitor - ATI), a kazeinolitikus proteáz (caseinolytic protease B1 - ClpB1), a wheat-induced resistance 1B (WIR1B) és a nehézfémekkel kapcsolatos izoprenilált növényi fehérje (heavy metal-associated isoprenylated plant protein 27 - HIP27). Különböző transzferázok, például UDP-glükóz flavonoid 3-O-glükoziltranszferáz 7 (UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase 7 - GT7), tricetin 3',4',5'-O-trimetiltranszferáz 2 (tricetin 3',4',5'-O-trimethyltransferase - OMT2) és acetil-serotonin O-metiltranszferáz 1 (acetylserotonin O-methyltransferase - ASMT) felül szabályozott szinten mutatkoztak. Továbbá az abiotikus stresszre reagáló a dehidratációra reagáló elemkötő 1G fehérje (dehydration-responsive element-binding protein - DREB1G / AP2 TF család) megemelkedett expresszió szintjét figyeltük meg.

A három minta Top50 DEG meghatározása kimutatta az ABA útvonalhoz kapcsolódó gének, PR-ek és TF-gének expresszió szintjének változását.

4.5.2. Útvonalelemzés *T. aestivum* mintákban

A *T. aestivum* növények Garlic-lipoval történt kezelésének kontrollhoz viszonyított eredményei szerint a tiamin (B1 vitamin) metabolizmusához tartozó gének aktivitása volt a legmeghatározóbb: nukleozid-trifoszfátáz (nucleoside-triphosphatase - NTPCR), tiamin-foszfát-foszforiláz (thiamine-phosphate pyrophosphorylase - thiE), savas foszfátáz (acid phosphatase - PHO) és a phosphomethylpyrimidine synthase - thiC. Továbbá a glutation metabolizmus transzferázai (GST23, GSTU6) és a fenilpropanoid

bioszintézis folyamataiban részt vevő gének (shikimate O-hidroxicinnamoiltranszferáz (hydroxycinnamoyltransferase - HCT), kávésav 3-O-metiltranszferáz (caffeic acid 3-O-methyltransferase - COMT) és peroxidázok) mutattak megemelkedett expresszió szintet. A 48h mintában a jelátviteli útvonalak nem mutattak génexpresszió különbséget, csupán 1-1 gén expresszió szintje változott meg a mitogén-aktivált proteinkináz (MAPK) kaskád, a növényi hormon szignáltranszdukció (PR1) és a növény-patogén interakció (regulatory protein NPR1) útvonalakon (10. táblázat).

10. táblázat. KEGG útvonalelemzés során differenciált expresszióval rendelkező gének száma a *T. aestivum* növények Garlic-lipo kezelése után 48 órával

Útvonal	ID	Szekvenciák száma	Differenciáltan expresszálódó szekvenciák száma
Tiamin (B1 vitamin) metabolizmus	map00730	53	29
Glutation metabolizmus	map00480	22	13
Fenilpropanoid bioszintézis	map00940	13	12
Növény-patogén interakció	map04626	1	1
Karotenoid bioszintézis	map00906	2	1
MAPK jelátvitel	map04016	1	1
Növényi hormon szignáltranszdukció	map04075	1	1
Diterpenoid bioszintézis	map00904	1	1

4.5.3. Hormon szignáltranszdukció útvonalhoz tartozó gének RPM elemzése *T. aestivum* mintákban

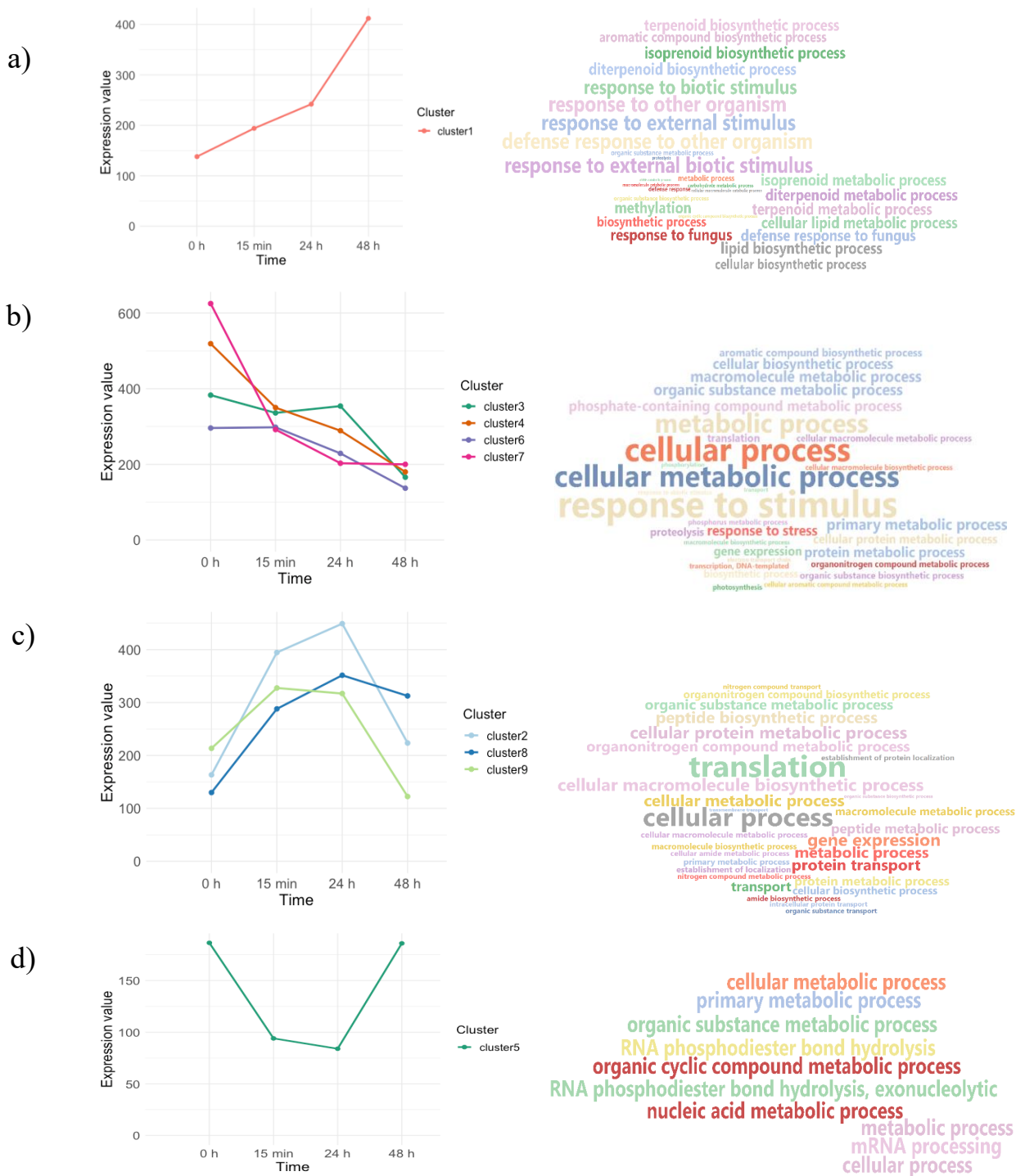
T. aestivum mintákban végzett egyedi génexpresszió méréssel megvizsgáltuk az ABA jelátvitel és bioszintézis génjeit és megfigyeltük, hogy az expresszió szint folyamatosan emelkedett a 15min, majd a 24h mintában, azonban a 48h mintában a kiindulási szint alá esett: ABA3, ABF2/3, NCED2/3 és a zeaxantin epoxidáz (zeaxanthin epoxidase - ZEP). Az SnRK2 fehérjék génjei folyamatosan emelkedő szintet mutattak. A JA útvonalhoz tartozó gének közül a coronatine-insensitive protein 1 (COI1) és a lipoxigenáz (lipoxygenase – LOX) mutat felül expresszáltságot az idő múlásával, a többi gén esetében vagy nincs jelentős változás, vagy nincs a változásnak egyirányú dinamikája. Ugyanez mondható el a SA útvonalhoz tartozó gének esetében is (11. táblázat).

11. táblázat. Egyedi génexpresszió analízis számított RPM értékei a *T. aestivum* Garlic-lipo magas dózisú kezelés után. Referencia gének azonosítóit az NCBI adatbázisban található ID alapján tüntetjük fel

Gén	Referencia gén	C	15 min	24h	48h
ABA-függő					
ABA3	XM 048690172.1	7,04261	7,527022	11,36506	5,552111
ABA3	XM 048690172.1	1,788599	2,517739	4,714026	2,567571
ABF3	AF519804.1	0,5962	4,332853	4,090111	1,510336
ABF2	AB286054.1	13,04187	17,96052	23,17727	11,96126
NCED2	JX183986.1	259,496	344,678	710,1857	27,83508
NCED3	XM 048675717.1	1,453237	36,82925	13,17154	0
SnRK2.2	KF688097.1	2,757424	4,806861	6,334623	8,719422
SnRK2.8	KR611569.1	1,1924	2,720162	4,993173	7,527022
SnRK2.9	MH844552.1	3,055524	5,365798	6,29736	9,501934
SnRK2.9	KF688097.1	1,04335	0,526969	0,415943	6,947546
ZEP	XM 048693465.1	168,0538	172,6115	202,9111	147,4088
JA-függő					
AOS	AY196004.1	41,73399	82,73407	51,64631	109,8014
COI1	HM447645.1	63,04813	90,46295	121,6635	133,5137
JMT1	XM 048692301.1	0,111787	0,29276	1,24783	0
JMT2	XM 048686963.1	0,074525	0,409864	0,138648	0,302067
LOX1	GQ166692.1	0,409887	0,936833	0,762563	2,492054
LOX2	HQ913602.1	2,571112	3,161812	5,268617	4,304458
MYC4	MH063274.1	0,074525	0,117104	0	0,377584
OPR2	KM216389.1	1,266925	3,220364	6,932391	0,302067
SA-függő					
EPS1	XM 048688482.1	0,633462	1,112489	1,386478	0,755168
ICS2	NM 001405972.1	2,012174	2,342083	1,178507	1,812403
WRKY8	DQ323885.1	1,080612	1,756562	1,24783	3,096189
WRKY28	XM 044569122.1	2,422062	0,468417	2,426337	7,249613
WRKY46	EF368365.1	0,074525	0,526969	0	0

4.5.4. *T. aestivum* minták időbeli-változás elemzése

Annak érdekében, hogy az alkalmazott biostimulátor kezelést követően a búzában zajló élettani folyamatokról bővebb információt kapjunk, a mintákat időbeli változás elemzéssel vizsgáltuk. Az időbeli expresszió változás mérése megfelelő eszköz az RNA-seq technológiából származó adatok kiértékeléséhez, mely olyan géneket reprezentál, amelyek expressziója a kísérleti csoportok között jelentős eltérést mutat a vizsgált időszakban. A TSA és a CountTable adatok felhasználásával 5287 kontigot teszteltünk és szűrtünk, amit kilenc klaszterbe soroltunk. A klasztereket négy csoportba osztottuk változási dinamikájuk szerint: az expresszió szint a) fokozatosan emelkedett, b) fokozatosan csökkent, c) kezdetben nőtt, majd csökkent, és d) kezdetben csökkent és majd visszatért az eredeti szintre (17. ábra). Az annotált géneket a GO kifejezések és biológiai folyamatok felhasználásával vizsgáltuk.

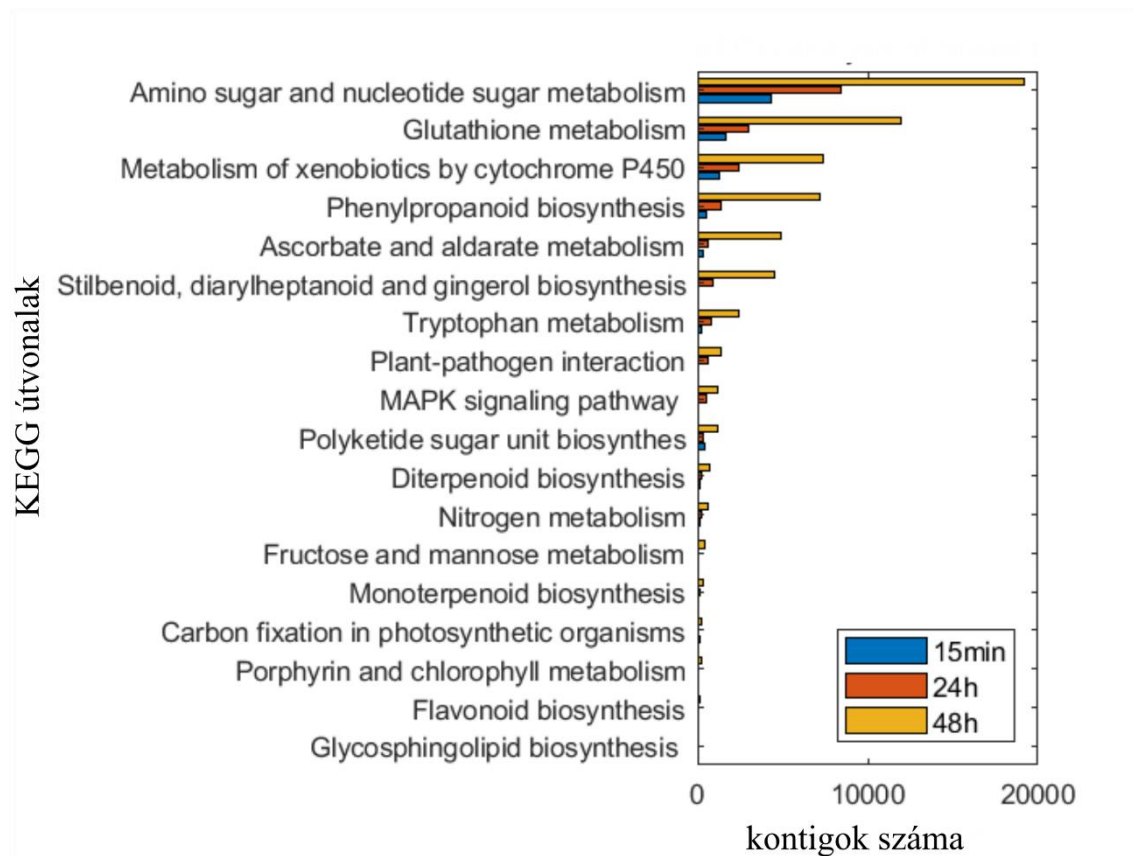


17. ábra. Időbeli-változás elemzés: az egyes géncsoportok medián szintű expresszióját (szignifikancia szint 0,05; R-négyzet határértéke 0,7) mutatja az idő függvényében. A szófelhők a génontológia (GO) kifejezést (biológiai folyamatot) képviselik, az egyes csoportok annotált génjeit összegezve, a betűméret a szekvenciaszámtól függ. A szignifikánsan eltérő expresszió szinttel rendelkező géneket a változás dinamikája szerint 9 klaszterbe soroltuk: a) az expresszió szint fokozatosan emelkedett, b) fokozatosan csökkent, c) kezdetben emelkedett, majd csökkent, d) kezdetben csökkent, majd visszatért az eredeti szintre

A fokozatosan növekvő expresszió szinttel rendelkező gének csoportja (a): 1. klaszter) főként védekezési válaszfolyamatokhoz kapcsolódik, míg a fokozatosan csökkenő expresszió szinttel rendelkező gének csoportjai (b): 3., 4., 6. és 7. klaszter) a sejt szintű bioszintetikus és metabolikus folyamatokhoz kapcsolódnak és alul szabályozottságot mutattak. A kezdetben emelkedett, majd csökkent expresszió szinttel rendelkező gének csoportjai (c): 2., 8. és 9. klaszter) részt vesznek a különböző transzport- és transzlációs folyamatokban. A kezdetben csökkent, majd eredeti szintjükre visszatérő expresszió szinttel rendelkező gének csoportja (d): 5. klaszter) transzkripció és anyagcsere-folyamatokhoz kapcsolódik (Kutasy et al., 2022).

4.5.5. *T. aestivum* klaszterek útvonalelemzése

A kilenc klaszter génjeit KEGG elemzéssel is osztályoztuk (Kutasy 2022). Ebben a vizsgálatban a fokozatosan emelkedő expresszió szinttel rendelkező gének védekezési válasz asszociációkat mutattak (18. ábra).



18. ábra. Az 1. klaszter KEGG elemzése a három vizsgált időpontban a kontrollhoz viszonyítva. A gének expresszió szintje fokozatosan emelkedett. A kontigok adatait az annotált TimeCourseTable (doi: 10.17632/xvvsxcpz6w.1)

Az időbeli-változás elemzés 24 KEGG útvonalat azonosított összesen 201 szekvencia bevonásával (Kutasy et al., 2022) az 1. klaszterben, a glutation metabolizmus, a fenilpropanoid, flavonoid és terpenoid bioszintézis, a növény-patogén interakció, a MAPK jelátviteli útvonal és a citokróm P450 általi metabolizmus útvonalakat (18. ábra). Ezekhez az útvonalakhoz olyan enzimek tartoznak, amelyek részt vesznek a stresszválaszra adott elsődleges védekezési reakciókban. Az elemzés során detektált PR1 fehérje részt vesz a növény-patogén kölcsönhatásban, a növényi hormonok jelátvitelében és a MAPK jelátvitelében, míg a disease resistance protein RPM1 a növény– patogén kölcsönhatásban. A mono- és diterpenoid bioszintézis útvonalakhoz kapcsolódó enzimek közül megmutatkoztak a 7-dezoxiloganetin-glükóziltranszferáz (7-deoxyloganetin glucosyltransferase UGT85A23-24), az ent-kaurene oxidase (CYP701A3) és az ent-sandaracopimaradiene 3-hydroxylase (CYP701A8) fehérjék. A fenil-propanoid bioszintézis útvonalon a HCT, COMT és a peroxidáz fehérjéit azonosítottuk. A citokróm P450 és a glutation metabolikus útvonalak is kiemelkedtek, elsősorban a glutation S-transzferázok (GST23 és GSTU6) és az APX fehérjéi.

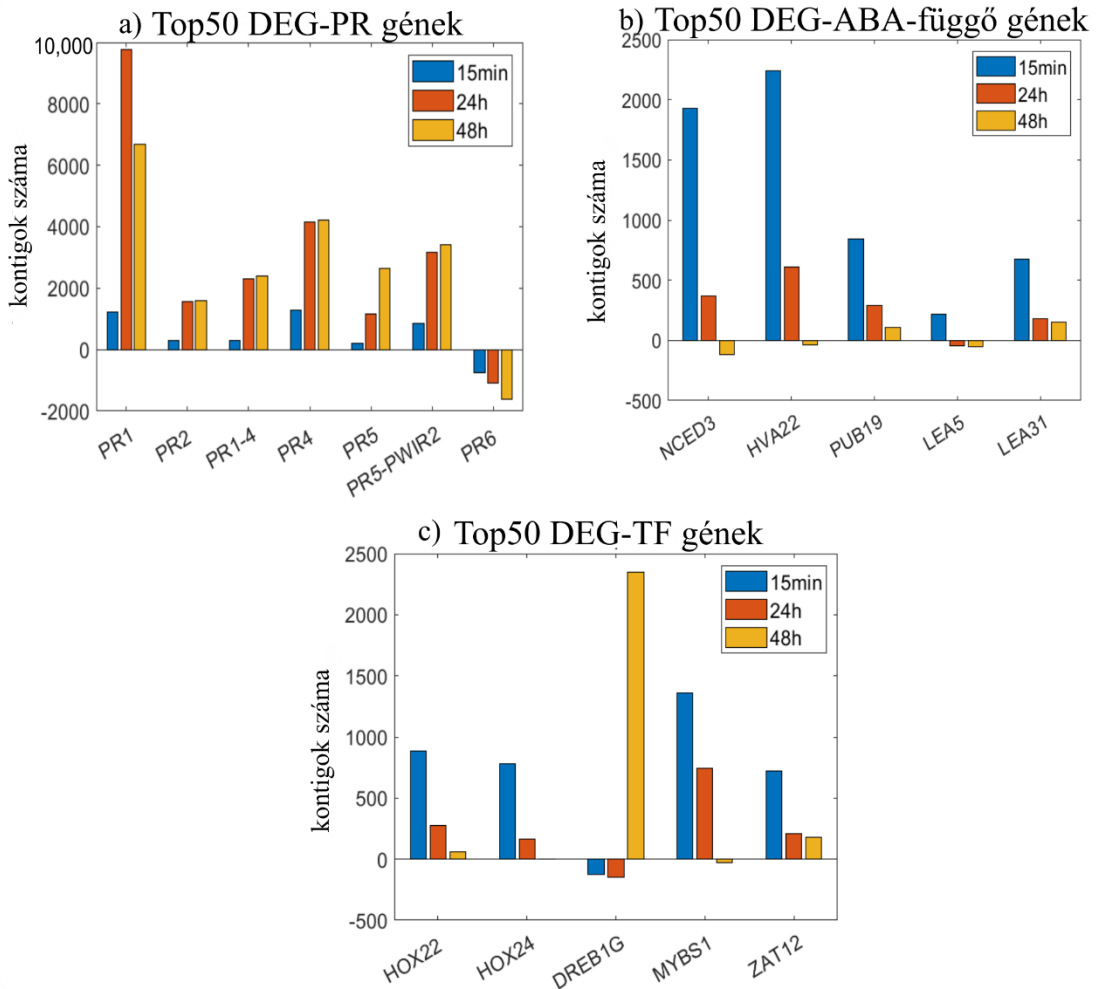
A második csoport b), a 3., 4., 6. és 7. klaszterek időbeli expresszió analízise során a sejt szintű bioszintetikus és metabolikus folyamatok emelkedtek ki: a fotoszintézishez kapcsolódó folyamatok a peroxiszóma, glioxilát és dikarboxilát metabolizmus folyamatai; linolsav anyagcsere; oxidatív foszforiláció és ribozómális folyamatok. A növény-patogén interakciós útvonalat tekintve hőszokkfehérjék aktivitása nőtt meg időszakosan.

A harmadik csoport c), a 2., 8. és 9. klaszter időbeli elemzése olyan enzimeket mutatott ki, amelyek részt vesznek az endocitózis folyamatában, MAPK jelátviteli útvonalban, valamint a cisztein és metionin metabolizmusban. Ezek a klaszterek a citoszolban zajló riboszómális folyamatokhoz is kapcsolódnak.

A negyedik csoport d), az 5. klaszter időbeli elemzése az mRNS-feldolgozással, az RNS-foszfo-diészterhez kötött hidrolízissel és a nukleinsav-metabolikus folyamatokkal mutatott összefüggést. Az 5. klaszter KEGG elemzése nem adott eredményt.

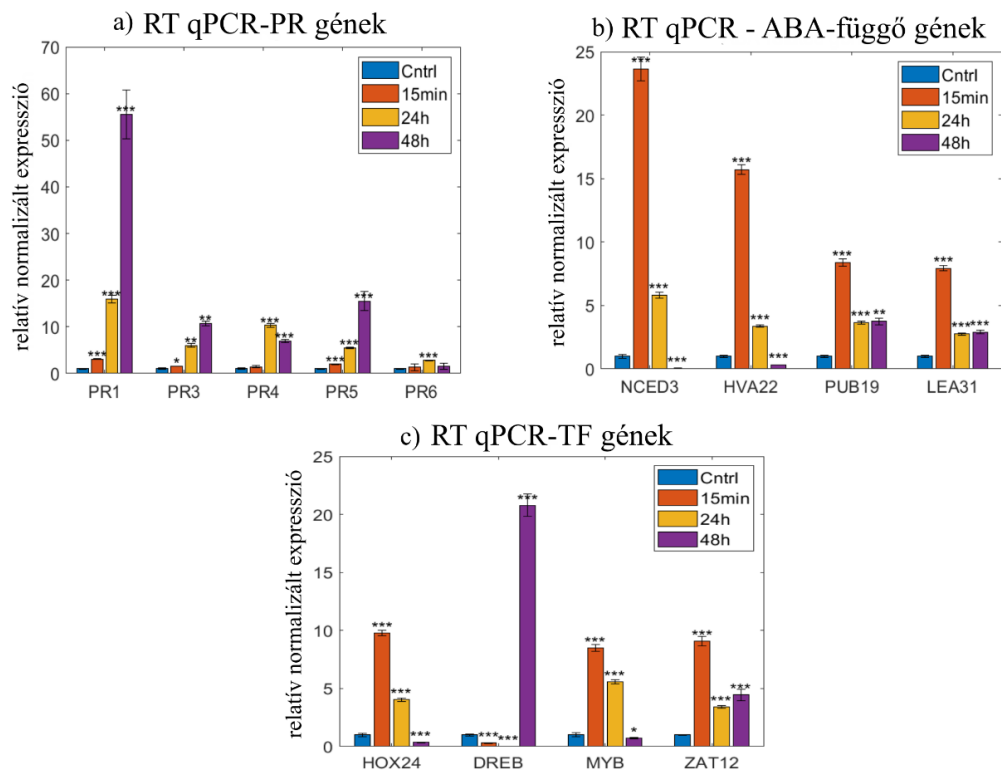
4.5.6. *T. aestivum* minták *in silico* elemzésnek validálása RT-qPCR-rel

A fent már tárgyalt Top50 DEG legfontosabb védekezési válasz génjeit a 19. ábra foglalja össze. A Garlic-lipo kezelés következtében jelentősen növekedik a patogenezishez köthető (PR) gének (kontigok száma 9764-1603) és stressz indukált gének expressziója (kontigok száma 2345-214).



19. ábra. A legjobb 50 differenciálisan expresszált gén (Top50 DEG) *in silico* meghatározása a három mintavételi alkalommal *T. aestivum*. A DEG-ek numerikus elemzését két idő páronkénti összehasonlításában az RSEM és edgeR programokon alapuló OmixBox.BioBam segítségével vizsgáltuk. Ezeket a kvantitatív statisztikai módszereket az egyes gének szignifikanciájának értékelésére a) patogenezissel kapcsolatos (pathogenesis-related PR) gének; b) abszcizinsav (ABA) útvonalhoz kapcsolódó gének; és c) transzkripciós faktor (TF) gének expresszió szint változásának vizsgálata

A DEG analízis segítségével meghatározott gének expresszó szintjét RT-qPCR módszerrel validáltuk. A PR1-5 megnövekedett expresszió szintet mutatott a teljes kísérleti periódus alatt, azonban a 48h mintában volt a legmagasabb, amint azt a transzkriptom analízis is mutatta. A validálás során a PR1 gén expresszió szintje is fokozatos emelkedést mutatott az *in silico* elemzéssel ellentétben, ahol a 24h mintában adott legmagasabb értéket. Az ABA útvonalhoz kapcsolódó gének (NCED3, HVA22, PUB19 és LEA31) és a TF-ek (HOX24, ZAT12 és MYBS1) expresszió szintjében is hasonló változásokat detektáltunk a validáció során, ahogyan azt az *in silico* elemzés jóslta. Ezek a gének általában 15min és 24h mintákban mutattak maximális expresszió szintet. Csak a DREB1G TF expresszálódott magasan a 48h mintában a DEG analízisben és ezt RT-qPCR módszerrel megerősítettük (20. ábra).



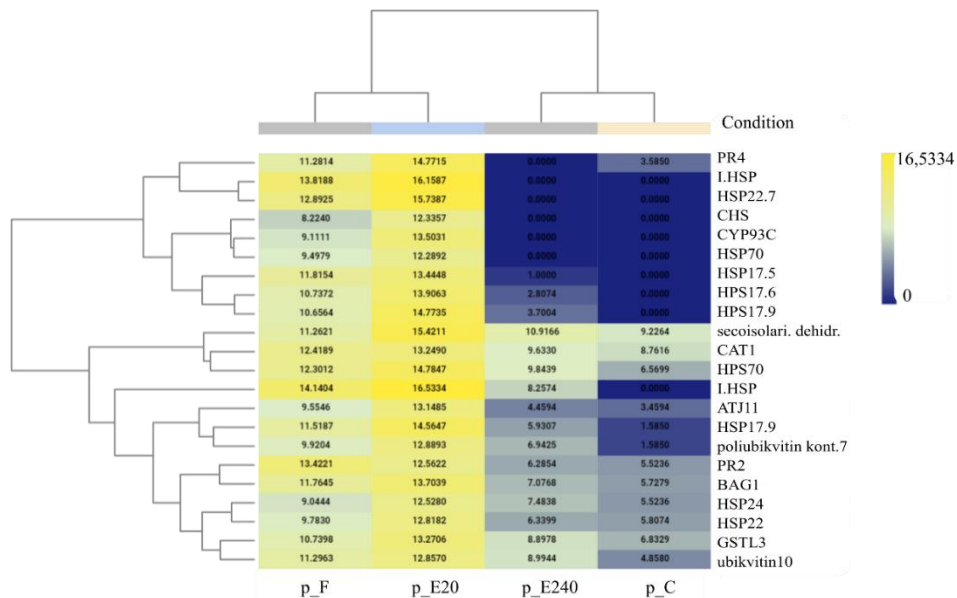
20. ábra. Az RT-qPCR reakciók eredményei három mintavételi időpontban a kontrollhoz képest. a) patogenezissel kapcsolatos (pathogenesis-related PR) gének expresszió szintjének változásai; b) abszcizinsav (ABA) útvonalhoz kapcsolódó gének; és c) transzkripciós faktor (TF) gének. Cntrl: kezeletlen kontroll, 0 időpont. Az értékek átlag \pm SEM (n = 4) formában vannak megadva. $p < 0,05$ vs. kontroll, $p < 0,05$ vs. kezelt csoport. Egy csillag statisztikailag szignifikáns különbséget jelöl a kezelt mintakészlet átlaga és az 5%-ra beállított kontroll minta átlaga között; két csillag statisztikailag szignifikáns különbséget jelez 1%-hoz képest; három csillag statisztikailag szignifikáns különbséget jelez 0,1%-ig

4.6. EliceVakcina kezelés hatásának kimutatása genomszintű transzkriptomikai profilozással

4.6.1. EliceVakcina kezelés hatásának kimutatása DEG összehasonlítással

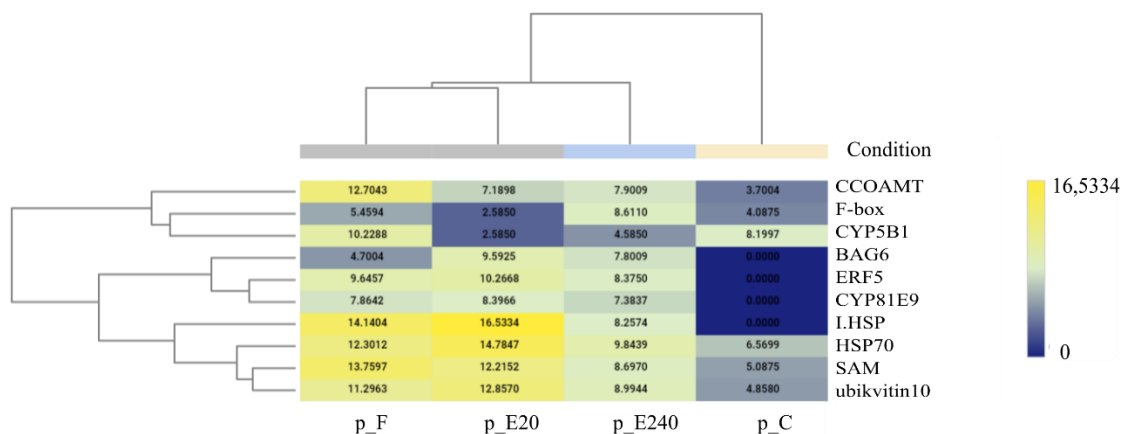
4.6.1.1. *P. sativum* minták DEG összehasonlítása

P. sativum EliceVakcina 20 és 240 g/ha dózis kezeléseket hasonlítottuk össze a kezeletlen mintával páronként, ahol a Fitokondi kezelést használtuk pozitív kontrollként. Az EliceVakcina 20 g/ha dózissal kezelt növényekben (p_C vs. p_E20) a stresszválaszhoz köthető PR gének, pontosabban a PR2 és PR4 mRNS szintje növekedett a kontrollhoz képest. A flavonoid bioszintézissel összefüggésbe hozható gének közül a kalkon szintáz (chalcone synthase - CHS) és az izoflavon szintáz (isoflavone synthase - CYP93C) mutatott jelentős felül szabályozottságot. A kezelés növelte a secoisolariciresinol dehydrogenase (SDH) enzim aktivitását, mely hatással van a fitoalexin momilakton-A szintézisére. Továbbá a növényi sejtek méregtelenítési folyamataiban szerepet játszó GSTL3 aktivitása is emelkedett. A sejtek védelmét szolgáló CAT1 gén expresszió szintje megnőtt, mely segíti a hidrogén-peroxid lebomlását így csökkentve az oxidatív stressz negatív hatásait, de mindemelett ABA kezelés hatásaira is megnőtt aktivitását detektálták. Számos HSP mutatott aktivitást a kezelés hatására (21. ábra és melléklet M3. táblázat).



21. ábra. *P. sativum* Top50 DEG hőterkép részlet (p_C vs. p_E20), ahol a kezeletlen a referencia (C kontroll) és az EliceVakcina 20 g/ha (E20) a kezelt minta került összehasonlításra. Az elemzés során találatot adott gének expresszió szintjét az EliceVakcina 240 g/ha (E240) és Fitokondi 4 l/ha (F) kezelt mintákban is mutatja

A borsó növények EliceVakcina 240 g/ha dózissal történő kezelése hatással volt a fenilpropanoid és flavonoid bioszintézis útvonalhoz tartozó enzim, a caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCOAMT) génjének felül szabályozottságára, amely részt vesz a lignin és a flavonoidok bioszintézisének redundáns funkcióiban. Ugyancsak stresszválaszban részt vevő enzim, az izoflavon 3'-hidroxiláz (isoflavone 3'-hydroxylase - CYP81E9) aktivitása is megnőtt, ami hatással van a pterocarpin fitoalexinek bioszintézisére. Valamint megfigyeltük, hogy az ET képződését eredményező kémiai reakciók és utak enzime, az S-adenozil-metionin szintetáz (S-adenosylmethionine synthase - SAM) és az ET-re reagáló TF 5 (ERF5) mutatott felül szabályozottságot a kezelés hatására. Ez a TF olyan aktivátorként működik, mely a patogenezissel kapcsolatos GCC-box promóter elemhez kötődik és részt vesz a génexpresszió stresszfaktorok és a stressz indukált jelátviteli útvonal komponensei általi szabályozásában. Továbbá néhány HSP mutatott aktivitást a kezelés hatására (22. ábra és M3. táblázat).



22. ábra. *P. sativum* Top50 DEG hőterkép részlet (p_C vs. p_E240), ahol a kezeletlen minta (C kontroll) és az EliceVakcina 240 g/ha (E240) által kezelt minta került összehasonlításra. A teszt során találatot adott gének expresszió szintjét az EliceVakcina 20 g/ha (E20) és Fitokondi 4 l/ha (F) kezelt mintákban is mutatja.

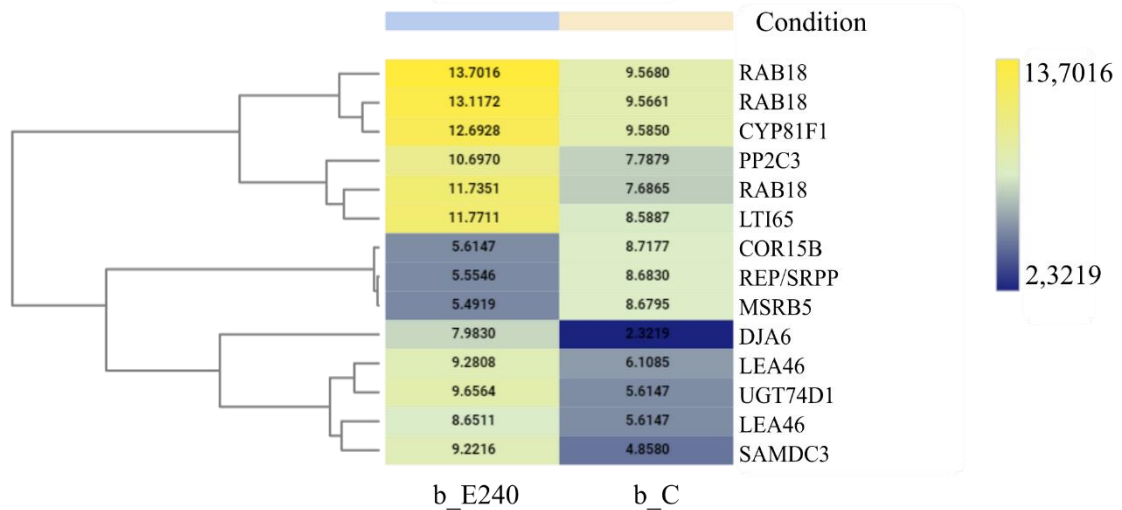
Aktivált hőstresszválasz gének nagy számban mutatkoztak mind az EliceVakcina alacsony és mind a magas dózissal történő kezelését követően kontrollhoz képest. Számos HSP és hőshock faktor, chaperon (HSF) génje mutatott felül szabályozott expresszió szintet, melyek elősegítik a növények hőstressztűrő képességének javítását és a hőindukált transzkripciós kaszkádok szabályozását. Továbbá mindkét dózissal történő kezelés következtében számos, az ubikvitinációban szerepet játszó gén expresszió szintje emelkedett meg,

melyeket a növényi immunitás kulcsfontosságú szabályozójaként írtak le. A részletes Top50 DEG hőtérekpek elérhetőek megjelent publikációban (Kutasy et al., 2023a).

4.6.1.2. B. napus minták DEG összehasonlítása

A repce növényekből vett minták DEG páronkénti összehasonlítással végeztük el és értékeltük az egyes gének jelentőségét a stresszválaszban két kísérleti körülmény között, a kezeletlen kontroll és EliceVakcina 240 g/ha dózissal történő kezelés között (b_C vs. b_E240).

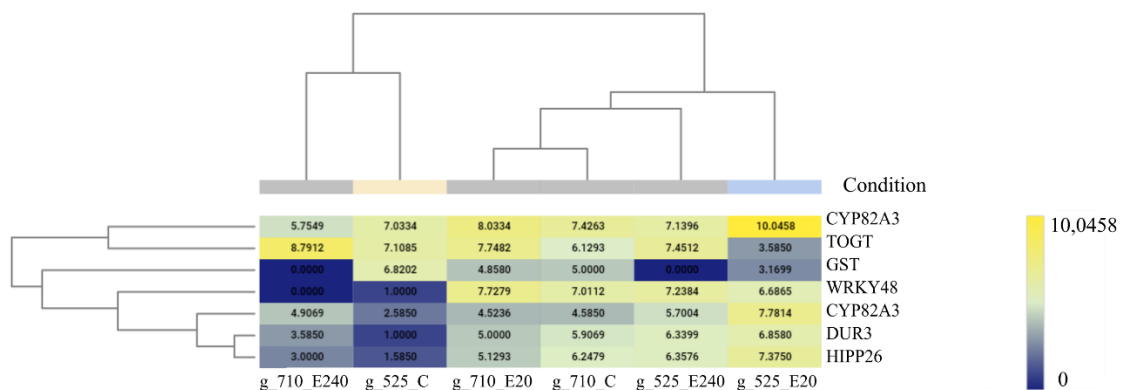
Az ABA növényi hormon alapvető szerepet játszik a szignáltranszdukcióban, a növények biotikus és abiotikus stresszre adott válaszaiban a sztómazáródás és a génextpresszió szabályozása révén. A kezelés következtében megváltozott aktivitású ABA kapcsolatos enzimeket detektáltunk, mint a LEA46, a PP2C3, a dehydrin Rab18 (RAB18) és a low-temperature-induced 65 kDa protein (LTI65). Továbbá megfigyeltünk egy másik stresszel kapcsolatos növényi hormon, a JA kapcsolatos fehérjék megváltozott szabályozottságát. Az UDP-glycosyltransferase 74D1-like (UGT74D1) aktivitása nőtt, mely a JA és JA-származékokat glükózilálja. Valamint megnőtt a cytochrome P450 81F1 (CYP81F1) gén expresszós szintje, mely metil-jazmonát (MeJA) kapcsolatos. A poliamin szintézisben szerepet játszó S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme 3 (SAMDC3) és az ubukvitinációban részt vevő enzimek génjei is szignifikáns változást mutattak expressziójukban a kezelést követően. A CYP81F1 részt vesz az indol glukozinátok metabolizmusában, biotikus stresszválaszban. Alul szabályozottságot mutatott a peptide methionine sulfoxide reductase B5 (MSRB5) génje, egy elongációs faktor és a protein COLD-REGULATED 15 (COR15) (23. ábra és melléklet M4. táblázat). A részletes Top50 DEG hőtérekp megtekinthető a megjelent publikációban (Decsi et al., 2022).



23. ábra. *B. napus* Top50 DEG hőtércék részlet a magas dózisu kezelés összehasonlítása a kezeletlen mintával: b_C vs. b_E240

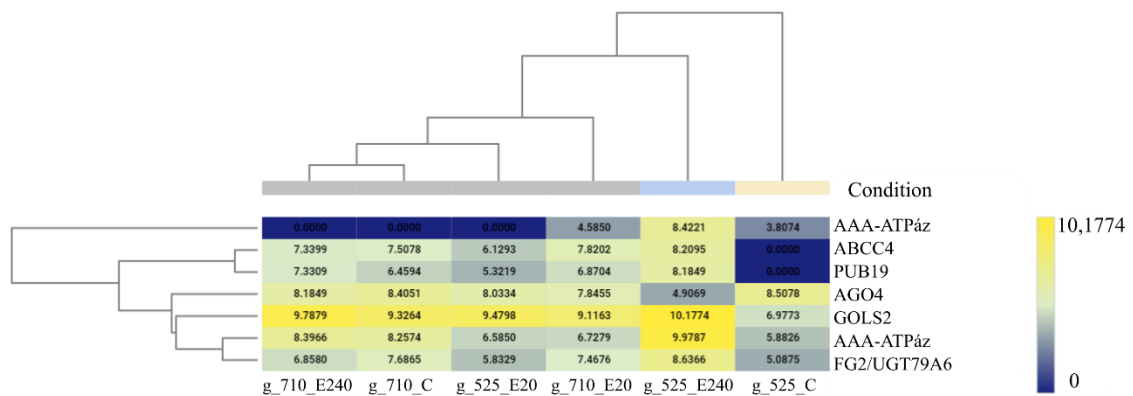
4.6.1.3. *G. max* minták DEG összehasonlítása

G. max növényeket juvenilis vegetatív fázisban kezeltük EliceVakcina 20 és 240 g/ha dózissal, a mintákat páronként hasonlítottuk össze a kontrollal. Az alacsony dózisu kezelés után (g_525_C vs. g_525_E20) eltérően expresszáldó Top50 kontig (melléklet M5. táblázat) között különböző stresszválasz gének mutattak aktivitást: a redox reakció katalízisében részt vevő CYP82A3, a heavy metal-associated isoprenylated plant protein 26 (HIPP26), valamint a nitrogén hiány stresszre reagáló urea-proton symporter (DUR3) és a baktérium támadásra reagáló WRKY48 TF. A fenilpropanoid aromás szubsztrát, kumarinszármazék szállítását végző speciális UGT, a szkopoletin glükoziltranszferáz (TOGT) mutatott alul szabályozottságot (24. ábra és melléklet M5. táblázat).



24. ábra. *G. max* Top50 DEG hőtércék részlet az alacsony dózisu kezelés összehasonlítása a kezeletlen mintával: g_525_C vs. g_525_E20. A többi minta adatai is feltüntetésre kerültek (g_525_E240, g_710_E20, g_710_E240, g_710_C)

A magas dózisu kezelés hatására megváltozott expresszió szintet mutattak különböző jelátviteli útvonalakat befolyásoló gének: a SA növényi hormonhoz köthető AAA-ATPase, az auxinhoz köthető WALLS ARE THIN1 (WAT1) gén. Az ABA-függő galaktinol-szintáz 2 (galactinol synthase - GOLS2) és a PUB19, valamint transzport folyamatokhoz tartozó stresszválasz gének (ABC transporter C family member 4 - ABCC4, UDP-glycosyltransferase 79A6 - FG2) is megnövekedett aktivitást mutattak (25. ábra és melléklet M5. táblázat). Alul szabályozottságot tapasztaltunk a JA jelátvitelhez köthető protein argonaute 4 (AGO4) génje esetében.



25. ábra. *G. max* Top50 DEG hőterkép részlet a magas dózisu kezelés összehasonlítása a kezeletlen mintával: g_525_C vs. g_525_E240. A többi minta adatai is feltüntetésre kerültek (g_525_E240, g_710_E20, g_710_E240, g_710_C)

4.6.2. Útvonalelemzések

Az EliceVakcina kezelések után az útvonalak genomszintű génextpresszió eredményeit elsősorban stressz védekezésre reagáló gének szempontjából vizsgáltuk. KEGG elemzéssel vizsgáltuk a gének részvételét a különböző biokémiai folyamatokban.

4.6.2.1. Útvonalelemzés *P. sativum* mintákban

Összehasonlítottuk *P. sativum* növények EliceVakcinával történő kezelését a kontrollal és markáns különbséget kaptunk az alacsony és magas dózisu kezelés után is. A kezelések után a növényi stresszválaszban részt vevő bioszintetikus útvonalak közül magas szintű különbséget mutatott a glutation metabolizmus (glutation transzferázok, dehidrogenázok, reduktázok és peroxidázok) és a fenilpropanoid bioszintézis (26. ábra: fenilalanin

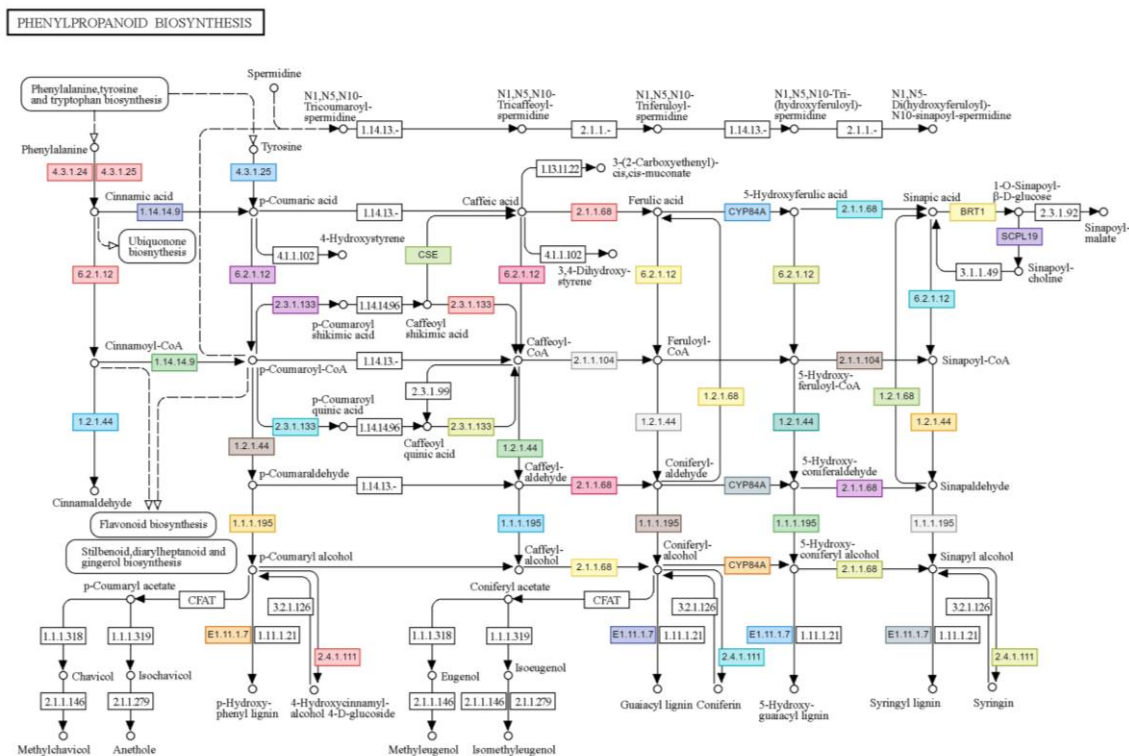
ammónia-liáz (phenylalanine ammonia-lyase - PAL), fenilalanin/tirozin ammónia-liáz (phenylalanine/tyrosine ammonia-lyase - PTAL), cinnamil-alkohol-dehidrogenáz (cinnamyl alcohol dehydrogenase - CAD), peroxidáz, 4-kumarát---CoA ligáz (4-coumarate--CoA ligase - 4CL), cinnamoil-CoA reduktáz (cinnamoyl-CoA reductase - CCR), HCT, CCOAOMT, transz-cinnamát 4-monooxigenáz (trans-cinnamate 4-monooxygenase - CYP73A/C4H), coniferyl-aldehyde dehydrogenase (REF1), ferulate-5-hydroxylase (CYP84A/F5H), UGT72E, caffeoilshikimate esterase (CSE), sinapate 1-glucosyltransferase (BRT1) és a serine carboxypeptidase-like 19 (SCPL19).

Továbbá megfigyeltük a B1 vitamin metabolizmushoz tartozó gének magas expresszió szintjét (NTPCR, PHO, thiE, cysteine desulfurase (iscS/ NFS1), adenilát-kináz (adenylate kinase - adk), 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (dxs) melléklet M1. ábra). A karotenoid bioszintézis bizonyos génjei (ZEP, NCED, fitoén-szintáz (phytoene synthase - PSY), beta-carotene isomerase (DWARF27), abscisic acid 8'-hydroxylase (CYP707A), beta-carotene 3-hydroxylase (CrtZ), 15-cis-phytoene synthase (CrtB)) mutattak meglemeledett expresszió szintet.

A jelátviteli útvonalak közül a MAPK jelátvitel (HSP70, CAT1, SnRK2, PR1, nucleoside diphosphate kinase (NdK) és a basic endochitinase B (CHIB)) a növényi hormon szignáltranszdukció (SnRK2, ABF, PR1, jasmonate ZIM domain-containing protein (JAZ) és a jasmonic acid-amino synthetase (JAR1)), valamint a növény-patogén interakció (HSP90A/B, PR1, kalmodulin (CaLM) és az enhanced disease susceptibility 1 protein (EDS1)) folyamataiban részt vevő gének esetében figyeltünk meg eltéréseket (12. táblázat).

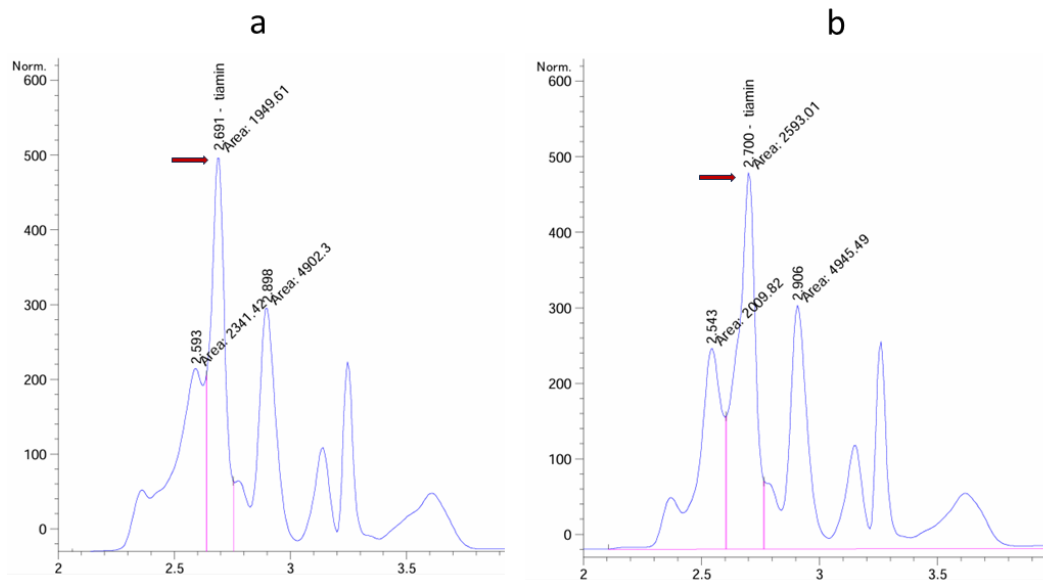
12. táblázat. KEGG útvonalelemzés során differenciált expresszióval rendelkező gének száma a *P. sativum* növények EliceVakcina kezelése után

Útvonal	ID	Szekvenciák száma		Differenciáltan expresszáló szekvenciák száma	
		E20	E240	E20	E240
Tiamin (B1 vitamin) metabolizmus	map00730	170	170	125	52
Glutation metabolizmus	map00480	42	42	34	12
Fenilpropanoid bioszintézis	map00940	35	35	23	13
Flavonoid bioszintézis	map00941	18	18	14	6
Izoflavonoid bioszintézis	map00943	13	13	13	3
Növény-patogén interakció	map04626	13	13	11	4
Karotenoid bioszintézis	map00906	12	12	9	2
Flavon és flavonol bioszintézis	map00944	11	11	8	5
MAPK jelátvitel	map04016	8	8	6	1
Monoterpenoid bioszintézis	map009027	7	7	6	2
Növényi hormon szignáltranszdukció	map04075	7	7	7	2
Diterpenoid bioszintézis	map00904	1	1	1	1



26. ábra. *P. sativum* minták KEGG útvonalelemzése során a fenilpropanoid bioszintézishez kapcsolódó differenciáltan expresszálódó kontigok színes négyzetekben vannak feltüntetve (KEGG map 00940 alapján): fenilalanin ammónia-liáz (PAL, Ec:4.3.1.24), fenilalanin/tirozin ammónia-liáz (PTAL, Ec:4.3.1.25), cinnamil-alkohol-dehidrogenáz (CAD, Ec:1.1.1.195), peroxidáz (Ec:1.11.1.7), 4-kumarát---CoA ligáz (4CL, Ec:6.2.1.12), cinnamoil-CoA reduktáz (CCR, Ec:1.2.1.44), shikimát O-hidroxicinnamoiltranszferáz (HCT, Ec:2.3.1.133), koffeoil-CoA O-metiltranszferáz (CCOAMT, E2.1.1.104), transz-cinnamát 4-monooxygenáz (CYP73A/ C4H, Ec:1.14.14.91), koniferil-aldehyd-dehidrogenáz (REF1, Ec:1.2.1.68), ferulát-5-hidroxiláz (CYP84A/F5H Ec:1.14.-.-), koniferil-alkohol-glükoziltranszferáz (UGT72E, Ec:2.4.1.111), koffeoil-shikimát-észteráz (CSE, Ec:3.1.1 szinapát 1-glükoziltranszferáz (BRT1, Ec:2.4.1.120), szerin-karboxipeptidáz-szerű 19 (SCPL19, Ec:3.4.16.- 2.3.1.91)

Az útvonalelemzés során magas expresszió szinttel mutakozó tiamin metabolizmust validáltuk. EliceVakcina 20 g/ha kezelés után borsó növény termést tartalmazó hajtások tiamin és metabolitjai tartalmát HPLC-DAD készülékkel mértük (27. ábra). A kezelést követő 5 nap alatt 8%, 10 nap alatt 14,3%-kal megnőtt a hajtás tiamin és metabolitjait detektáló standard jel alatti terület nagysága a kromatogram szerint.



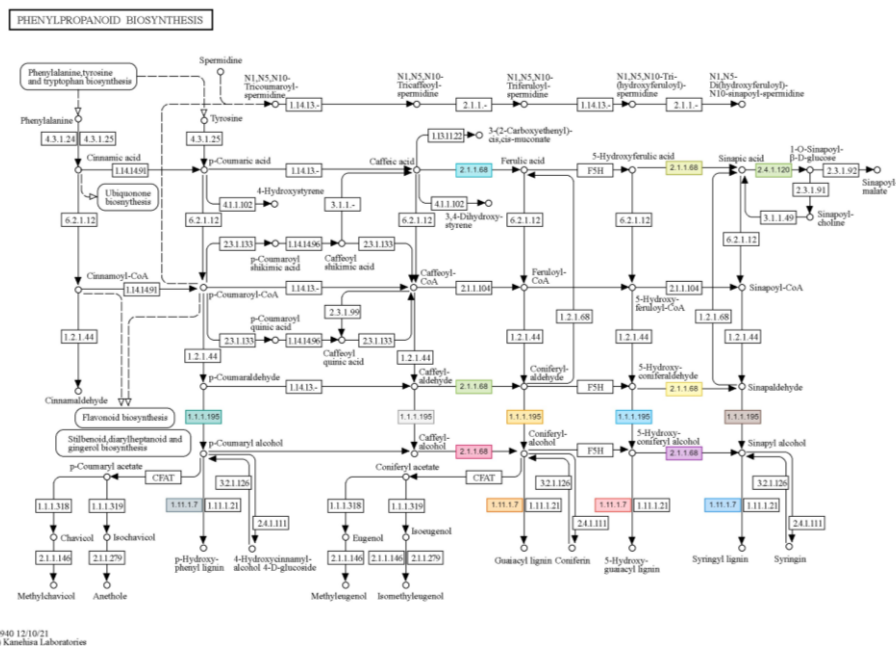
27. ábra. Tiamin HPLC-DAD mérése borsónövényekben. Kezeletlen (a) és EliceVaccina kezelt növények (b) tiamin és metabolitjai tartalom tíz nappal a kezelés után

4.6.2.2. Útvonalelemzés *B. napus* mintákban

B. napus növényekben történt változásokat az EliceVaccina magas dózisú kezelése után útvonalelemzésekkel vizsgáltuk (13. táblázat). A növényi stressz védekezési válaszokban részt vevő folyamatok közül a glutation metabolizmus (GST, glutation szintáz (glutathione synthetase - GSH)), növény-patogén interakció (CaLM, PR1, calcium-dependent protein kinase (CPK), delta3-delta2-enoyl-CoA isomerase (ECI3)), a növényi hormon szignáltranszdukció (PP2C, PR1, szerin/treonin-protein kináz (serine/threonine-protein kinase - CTR1), auxin response factor (ARF)), a MAPK jelátvitel (CaLM, CTR1, PR1) és a fenilpropanoid bioszintézis (CAD, COMT, BRT1 és peroxidáz) mutatott szignifikáns különbséget (28. ábra). Valamint kiemelkedő szekvencia számban jelentkezett a B1 vitamin metabolizmusa (NTPCR, PHO, thiE, thiC és a thiaminase (thiD) melléklet M2. ábra).

13. táblázat. KEGG elemzés a *B. napus* növények magas dózisú EliceVakcina kezelése után

Útvonal	ID	Szekvenciák száma	Differenciáltan expresszáldó szekvenciák száma
Tiamin (B1 vitamin) metabolizmus	map00730	117	57
Glutation metabolizmus	map00480	21	12
Növény-patogén interakció	map04626	16	8
Növényi hormon szignáltranszdukció	map04075	6	4
MAPK jelátvitel	map04016	6	6
Fenilpropanoid bioszintézis	map00940	5	2
Izoflavonoid bioszintézis	map00943	4	3
Flavonoid bioszintézis	map00941	2	2
Monoterpenoid bioszintézis	map009027	2	2
Karotenoid bioszintézis	map00906	2	-
Flavon és flavonol bioszintézis	map00944	1	1
Diterpenoid bioszintézis	map00904	1	-



28. ábra. *B. napus* minták KEGG útvonalelemzése során a fenilpropanoid bioszintézishez kapcsolódó differenciáltan expresszáldó kontigok színes négyzetekben vannak feltüntetve (KEGG map 00940 alapján): cinnamil-alkohol-dehidrogenáz (CAD, Ec:1.1.1.195), kávésav-3-O-metiltranszferáz (COMT, Ec:2.1.1.68), peroxidáz (Ec:1.11.1.7), szinapat 1-glükoziltranszferáz (BRT1, Ec:2.4.1.12)

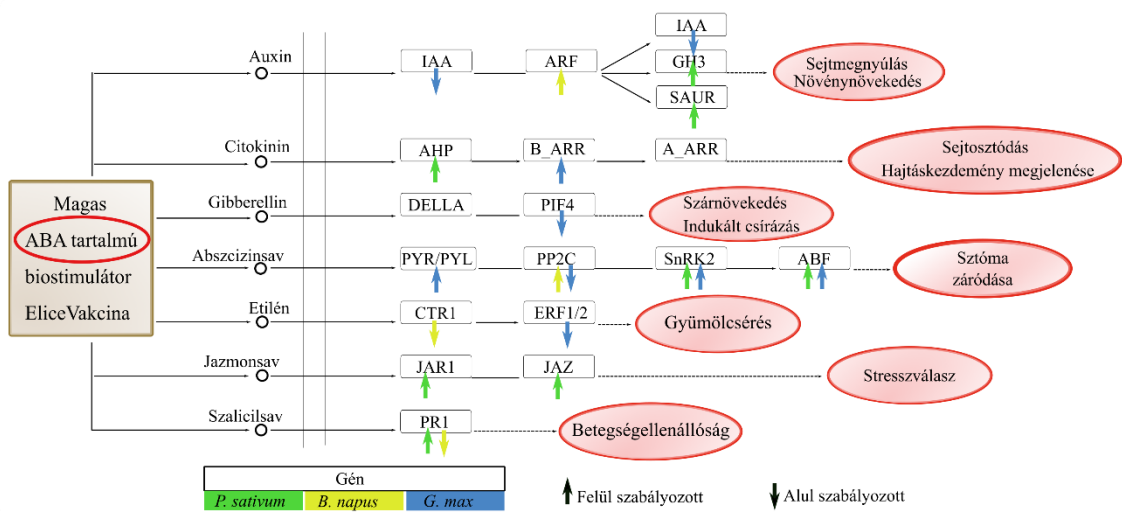
4.6.2.3. Útvonalelemzés *G. max* mintákban

G. max növények EliceVakcinával történt kezelésének kontrollhoz viszonyított eredményei szerint a glutation metabolizmus (GST, glutation reduktázok és peroxidázok, 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz (6-phosphogluconate dehydrogenase - PGD)), a fenilpropanoid bioszintézis (29. ábra) (PAL, PTAL, CAD, peroxidáz, CCR, HCT, CCOAOMT, CYP73A) és a karotenoid bioszintézis (ZEP, NCED3, PSY, CYP707A, zéta-karotin-deszaturáz (zeta-carotene desaturase - ZDS) és a violaxantin-de-epoxidáz (violaxanthin de-epoxidase - VDE)) folyamataiban részt vevő gének mutattak megemelkedett expresszió szintet. Az előző mintákhoz hasonlóan a szójában is megmutatkozott a B1 vitamin metabolizmusához tartozó gének aktiválódása (IscS/NFS1, dxs, thiE melléklet M3. ábra). A jelátviteli útvonalak közül a MAPK jelátvitel (mitogén által aktivált protein kináz kináz kináz 1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 - MEKK1/2), MPK3, ABA receptor PYL, PP2C, SnRK2, ABF, respiratory burst oxidase (Rboh), CaLM és a WRKY33) és növényi hormon szignáltranszdukció (PYL, PP2C, SnRK2, ABF) egyes génjei felülszabályozottak. A növény-patogén interakció (CaLM, HSP90, ESD1, MPK3, suppressor of G2 allele of SKP1 (SGT1) és a szerin/treonin-protein kináz (serine/threonine-protein kinase - PTO)), aktivitása markánsan nőtt a kezelése után gyűjtött mintákban (14. táblázat).

14. táblázat. KEGG útvonalelemzés során differenciált expresszióval rendelkező gének száma a *G. max* növények EliceVakcina kezelése után

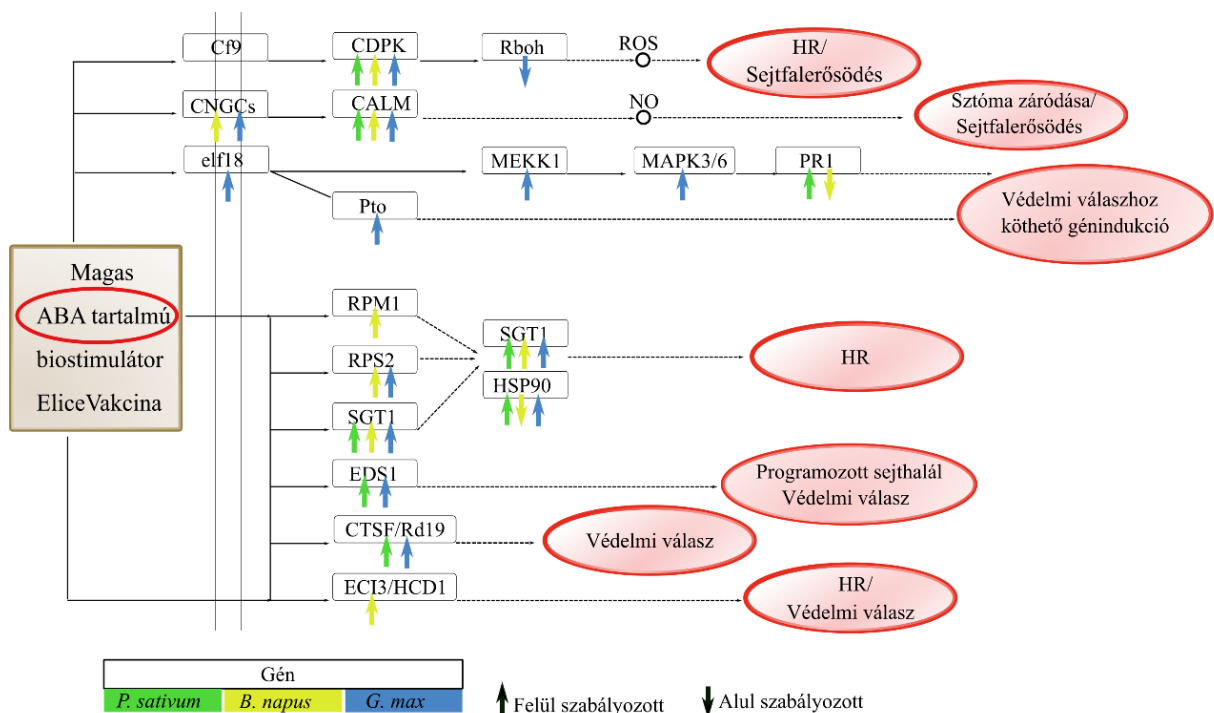
Útvonal	ID	Szekvenciák száma		Differenciáltan expresszáldó szekvenciák száma	
		E20	E240	E20	E240
Tiamin (B1 vitamin) metabolizmus	map00730	170	170	30	54
Növény-patogén interakció	map04626	30	30	7	10
Glutation metabolizmus	map00480	27	27	7	8
MAPK jelátvitel	map04016	21	21	4	10
Növényi hormon szignáltranszdukció	map04075	17	17	3	7
Fenilpropanoid bioszintézis	map00940	15	14	2	8
Flavonoid bioszintézis	map00941	14	15	2	6
Karotenoid bioszintézis	map00906	12	12	3	5
Izoflavonoid bioszintézis	map00943	7	7	5	5
Flavon és flavonol bioszintézis	map00944	2	2	1	1
Diterpenoid bioszintézis	map00904	2	2	2	1

expresszáltságot (JAR1, JAZ). Továbbá SA-függő útvonal a borsóban aktiválódott (PR1). A ET-függő CTR1 gén repace mintákban, az ERF1/2 szója mintákban mutatott alul szabályozottságot. A GA útvonal génje (phytochrome-interacting factor 4 - PIF4) szójában alul expresszálódott. Az AUX-függő gének a borsó (auxin responsive GH3, small auxin up-regulated RNA - SAUR) és repace mintákban (ARF) felül szabályozottságot mutattak, a szójában lefelé szabályozottságot (IAA). Citokinin-függő gének aktivitása nőtt borsóban (histidine-containing phosphotransfer protein - AHP) és szójában (GARP family transcription factor - B_ARR) (30. ábra).



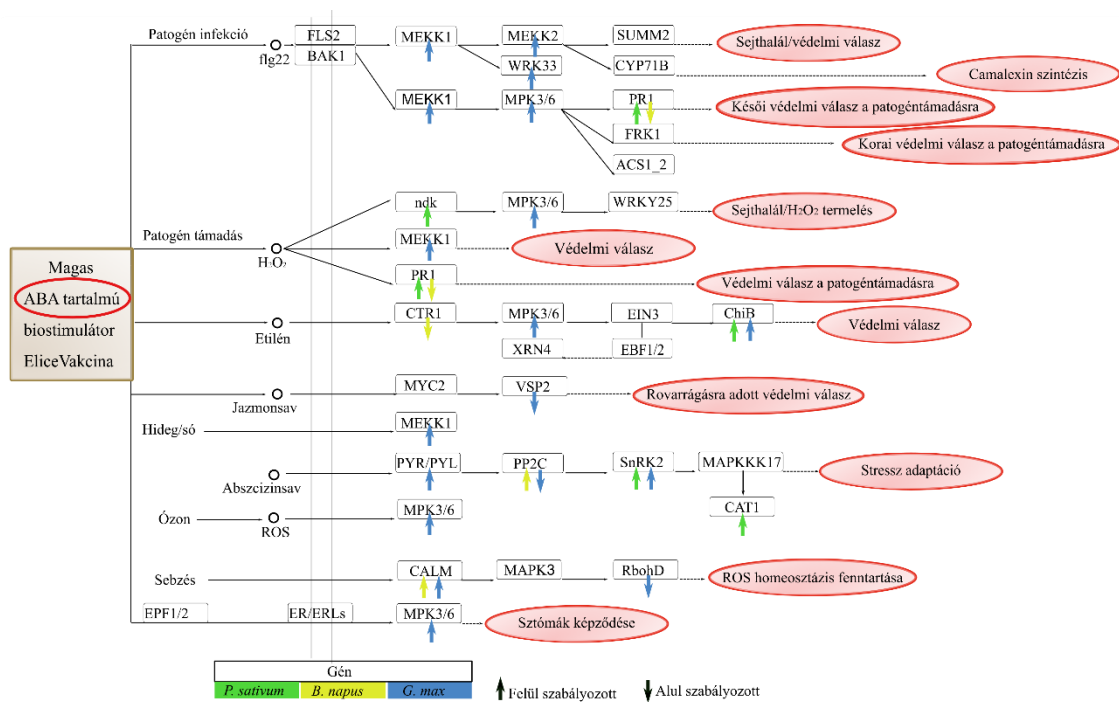
30. ábra. EliceVaccina kezelést követően a növényi hormon szignáltranszdukció útvonalhoz tartozó gének expressziója a három kultúrában. Zöld nyíl *P. sativum*, sárga nyíl *B. napus*, kék nyíl *G. max* (KEGG map 04075 alapján)

A növény-patogén interakció folyamat génjei mindhárom kultúra mintáiban erős aktivitást mutattak. A sejtfalerosódéshez vezető gének (CDPK, CaLM, CNGCs) mindhárom növény esetében felül szabályozottságot mutattak a kezelése után. Továbbá a védelmi válaszhoz (Pto, MEKK1, MAPK3/6, PR1, EDS1, cathepsin F - CTSF, ECI3) és hiperszenzitív reakcióhoz (HR) (disease resistance protein - RPM1, RPS2, SGT1, HSP90) kapcsolódó gének aktivitása is megnőtt a vizsgált három kultúra mintáiban (31. ábra).



31. ábra. EliceVaccina kezelést követően a növény-patogén interakcióban részt vevő gének expressziója a három kultúrában. Zöld nyíl *P. sativum*, sárga nyíl *B. napus*, kék nyíl *G. max* (KEGG map 04626 alapján)

A jelátviteli útvonalak közül a MAPK jelátvitel szója mintákban nagyfokú aktivitást mutatott (MEKK1/2, MPK3/6, ChiB, PYL, PP2C, SnRK2, ABF, Rboh, CaLM, WRKY33) a kezelések után. A MAPK kaszkád egyes részei mutattak aktivitást borsóban (PR1, ChiB, ndk, SnRK, CAT). Viszont repcében alul szabályozottságot figyeltünk meg az útvonal génjeit illetően, kivéve a CaLM aktivitása nőtt (32. ábra).



32. ábra. EliceVakcina kezelést követően a MAPK jelátvitel útvonalban részt vevő gének expressziója a három kultúrában. Zöld nyíl *P. sativum*, sárga nyíl *B. napus*, kék nyíl *G. max* (KEGG map 04016 alapján)

4.6.3. Hormon szignáltranszdukció útvonalhoz tartozó gének RPM elemzése

Az elicitorok indukálta jeltovábbítás megváltoztatja a sejt génkészletének expresszió szintjét és szabályozó folyamatokat indít el, melynek komponensei többek között a növényi hormonok, MAPK kaszkád. Az egyes komponensek gyakran egymásra hatnak, hálózatot hoznak létre. Ezért vizsgáltuk a növényi hormon szignáltranszdukció komponensei, az ABA, a SA és a JA bioszintézis és metabolizmus útvonal érdeklődésre számot tartó génjeinek egyedi génexpresszió analízisét az RPM számítással.

4.6.3.1. Hormon szignáltranszdukció útvonalhoz tartozó gének RPM elemzése *P. sativum* mintákban

P. sativum mintákban az alacsony dózisú kezelés után az ABA-függő gének közül az SnRK2 és ABF2/3 mutattak aktivitást, valamint a negatív szabályozó PP2C. A magas dózisú kezelés után pedig a negatív szabályozó PP2C, az SnRK2.6, a ZEP, valamint az ABA indukált LEA gén. JA útvonal génjei közül az alacsony dózisú kezelés után felül

expresszáltak JAR4, COI1, suppressor of kinetochore protein 1 génje (SKP1) és a MYB2 TF, a magas dózisu kezelés után az allene oxide cyclase (AOC) génje mutatott aktivitást. Ezen útvonal génjei közül mindkét kezelés után a LOX és 12-oxo-fitodiénsav-reduktáz (12-oxophytodienoate reductase - OPR) gének aktivizálódtak. A SA útvonalban szerepet játszó gének közül az alacsony dózisu kezelés után aktivitást mutatott az abnormal inflorescence meristem 1 (AIM1), kalmodulin-kötő transzkripciós aktivátor (calmodulin-binding transcription activator - CAMTA2), enhanced pseudomonas susceptibility 1 (EPS1), prohibitin3 (PHB3), NPR1 és a TF-ek közül a TGA2, WRKY15/40/70. A magas dózisu kezelés után kevesebb gén aktiválódott ezen az útvonalon a ciklin-függő kináz (cyclin-dependent kinase G-2 - CDKG2), NPR1, WRKY15/40 és az aktivitás mértéke is alacsonyabb, mint az alacsony dózisu kezelés után megfigyelhető volt (15. táblázat).

15. táblázat. Egyedi génexpresszió analízis számított RPM értékei a *P. sativum* EliceVakcina alacsony és magas dózisu kezelés után.

Gén	Referencia gén	C	E20	E240
ABA függő				
PP2C	XM 051029700.1	21,96548	18,41876	1,504054
SnRK2.3	XM 051015805.1	9,633983	116,4374	7,72537
SnRK2.4	XM 051019333.1	8,799037	26,53331	5,400922
SnRK2.6	XM 051031525.1	1,284531	17,00193	13,94668
SnRK2.8	XM 051037259.1	3,789366	6,24692	0,888759
ZEP	XM 051015777.1	14,77211	7,019735	56,19694
ABF2/3	XM 051029046.1	1,734117	6,118118	2,80301
LEA	XM 051022218.1	211,0484	0	262,1156
JA-függő				
LOX	XM 051017954.1	0,513812	33,42424	2,871376
AOC	AB095986.1	2,376382	0,772815	4,922359
OPR	XM 051051551.1	23,9565	258,571	40,67783
JAR4	XM 051061014.1	0,449586	2,769253	0
COI1	XM 051048364.1	1,86257	35,29188	1,435688
SKP1	XM 051050509.1	101,3495	520,2976	89,49123
SKP1	XM 051050509.1	56,64782	137,3034	19,00578
MYB2	XM 051032495.1	0,770719	67,2349	0,478563
SA-függő				
AIM1	XM 051047401.1	3,468234	22,54043	3,896868
CAMTA2	XM 051025100.1	0,899172	10,3686	0,205098
CDKG2	XR 007785918.1	16,6989	15,7783	39,37887
EPS1	XM 051037883.1	0,128453	293,6697	0,752027
NPR1	XM 051017238.1	0,321133	38,70515	12,511
PHB3	XM 051026705.1	0,19268	18,86956	0,273464
TGA2	XM 051017137.1	7,514506	40,57278	4,648895
WRKY15	XM 051015736.1	0,128453	11,65662	8,135566
WRKY40	XM 051028558.1	0	64,78765	2,80301
WRKY70	XM 051021125.1	0,513812	19,32037	0

Referencia gének azonosítóit az NCBI adatbázisban található ID alapján tüntetjük fel

4.6.3.2. Hormon szignáltranszdukció útvonalhoz tartozó gének RPM elemzése *B. napus* mintákban

A *B. napus* EliceVakcina magas dózisú kezelés után az egyedi génexpresszió analízis szerint az ABA útvonalhoz köthető gének részben expresszió változást mutattak, az ABF2, ZEP, MYC2 és az SnRK2.6 aktivitása volt megfigyelhető. A JA útvonalat illetően a a LOX, jászmonsav-karboxil-metil-transzferáz (jasmonate O-methyltransferase - JMT) és bHLH3 gének mutattak felül szabályozottságot. Alul szabályozottságot a JAR1, AOC, allén-oxid-szintáz (allene oxide synthase - AOS), valamint a MYC TF-ek esetében számoltunk. A SA útvonal génjei kevés expresszió változást mutattak. Lefelé szabályozott az EPS1, izokorizmat szintáz 1 (isochorismate synthase 1 - ICS1), TGA1 és a WRKY48. Egyedül a WRKY70 TF mutatott felfelé szabályozottságot (16. és 17. táblázat).

16. táblázat. Egyedi génexpresszió analízis számított RPM értékei a *B. napus* EliceVakcina magas dózisú kezelés után, ABA és JA-függő gének esetében

Gén	Referencia gén	C	E240
ABA-függő			
ABA3	XM 013805036.3	1,633584	2,915639
ABA	XM 013831057.3	1,110837	1,423917
ABF2	NM 001333256.1	1,110837	4,882001
MYC2	XM 048779544.1	0,653433	3,390278
PP2C	JX122896.1	70,89753	229,454
SnRK2.6	KT236164.4	2,221674	8,204474
SnRK2.10	KT236169.4	4,966094	7,594224
ZEP	FJ606830.4	42,14646	53,43079
JA-függő			
AOC	XM 013801891.6	5,031437	2,915639
AOS	JQ771611.4	3,593884	1,762945
AOS	XM 013807203.6	21,17124	7,119585
bHLH3	XM 013888137.6	3,33251	8,340085
COI1	GU263836.4	0,58809	0,271222
JAR1	XM 013856052.6	75,0795	62,0421
JMT	GR725923.4	0,58809	4,068334
LOX	AY162142.4	2,613734	7,051779
LOX	AY162143.4	163,9464	189,1775
MYC2	MK571811.4	0	0,61025
MYC3	MK571812.4	11,63111	9,831808
MYC4	XM 048782105.4	12,87264	7,865446
MYC5	MK571815.4	3,13648	1,423917

Referencia gének azonosítóit az NCBI adatbázisban található ID alapján tüntetjük fel

17. táblázat. Egyedi génexpresszió analízis számított RPM értékei a *B. napus* EliceVakcina magas dózisú kezelés után, SA-függő gének esetében

SA-függő gén	Referencia gén	C	E240
AIM1	GR728231.4	1,241523	0,678056
EDS5	XM_013765301.4	2,090987	1,898556
EPS1	XM_013830783.6	5,358154	3,593695
ICS1	XM_013845172.6	4,312661	1,627334
NPR1	MN646953.4	0,130687	0
TGA1	XM_013787636.6	3,33251	1,152695
TGA4	XM_013823164.6	0	0,271222
WRKY8	KF430031.4	1,894957	1,423917
WRKY18	FJ210288.4	17,57736	16,68017
WRKY28	KF430045.4	3,72457	4,678584
WRKY40	FJ384109.4	1,045493	0,203417
WRKY48	MH345837.4	5,554184	1,152695
WRKY70	KF430076.4	10,38959	14,84942

Referencia gének azonosítóit az NCBI adatbázisban található ID alapján tüntetjük fel

4.6.3.3. Hormon szignáltranszdukció útvonalhoz tartozó gének RPM elemzése *G. max* mintákban

G. max mintákban végzett egyedi génexpresszió mérések adatai kevés találatot adtak az ABA útvonal génjeire, az ABA2 mutatott megemelkedett expresszió szintet. A JA útvonalhoz kapcsolódó géneket illetően a mért adatok felfelé szabályozottságot mutattak a AOC3, AOS2, COI1 és a MYC2 gének esetében, alul szabályozottságot pedig a LOX, az AOC2/6 és a MYB75 gének esetében. A SA útvonalhoz tartozó több gén is mutatott aktivitást, mint a NPR1, EDS5, a trihelix TF (GTL1), TCP8/9 és az ICS1. Alul szabályozottságot figyeltünk meg az ethylene insensitive 3 (EIN3) gén esetében (18. táblázat).

18. táblázat. Egyedi génexpresszió analízis számított RPM értékei a *G. max* EliceVakcina alacsony és magas dózisu kezelés után.

Gén	Referencia gén	C	E20	E240
ABA3	XM 003516638.5	4,115847102	0,318595	3,05332
ABA2	XM 006591097.3	1,543442663	2,336361	2,632172
ABI5	NM 001358742.1	4,424535635	1,274379	0,842295
AOC2	HM803107.1	1,543442663	1,699172	0
AOC3	HM803108.1	0,82316942	3,716938	2,316312
AOC6	HM803111.1	3,601366214	0,743388	2,948033
AOS2	DQ288261.1	0	0,530991	2,105738
LOX	U26457.1	768,1199654	643,4551	358,3966
MYB75	DQ822894.1	4,733224167	1,699172	0
MYC2	XM 003548147.5	0	2,017767	8,001804
COI1	NM 001251661.1	0	4,354128	1,579303
EDS5	FJ528665.1	11,42147571	21,13345	14,21373
EIN3	NM 001348943.1	12,24464513	2,654956	4,527337
GTL1	XM 003547243.5	2,366612084	3,823137	0
NPR1	FJ418595.1	35,60207743	51,61234	89,91501
PCRK1	XM 003521352.5	3,704262392	5,41611	2,211025
TCP8	XM 003548631.5	0,205792355	0,743388	1,158156
TCP9	XM 003549819.5	2,572404439	8,071066	3,579755
WRKY8	NM 001361257.1	4,733224167	6,690489	0
WRKY28	EU375345.1	0	1,592974	1,68459
WRKY46	NM 001354170.1	112,0539374	102,1627	93,81063
WRKY48	EU019584.2	1,955027373	3,716938	12,21328
ICS1	XM 003522145.4	0	2,867352	1,68459

Referencia gének azonosítóit az NCBI adatbázisban található ID alapján tüntetjük fel

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Világszerte a tudományos közösség és a kereskedelmi vállalkozások olyan környezetbarát módszerek kifejlesztésére összpontosítanak, amelyek elősegítik a növények növekedését és védelmét. A növényi biostimulátorok hatékonyak lehetnek a célok elérésében, mivel alapanyagaik magas immunkémiai tartalmú természetes anyagok, így fiziológiai és molekuláris folyamatokat generálnak a növényekben a stressztűrés, valamint a termésminőségi jellemzők fokozása érdekében (Beckers and Conrath, 2007; Calvo et al., 2014; Du Jardin, 2015). A növényi-alapú biostimulátorok használata számos előnnyel jár, mint például a jobb terméshozam és a termésminőség, az emberekre és a környezetre gyakorolt alacsony toxicitás, a növények fokozott ellenálló képessége az abiotikus és biotikus stresszekkel szemben, valamint a peszticidek és ásványi műtrágyák kijuttatásának csökkenése (Godlewska et al., 2021; Rouphael and Colla, 2020). Főleg másodlagos növényi metabolitokból állnak, amelyek többek között fitohormonok, flavonoidok, antioxidánsok, az abiotikus stressz elleni védelemben játszanak szerepet, valamint mikrobaellenes vegyületek, amelyek védelmet nyújtanak a növények számára a biotikus stressz esetén. Különböző családokhoz tartozó növények (*Amaryllidaceae*, *Brassicaceae*, *Ericaceae*, *Fabaceae*, *Fagaceae*, *Moringaceae*, *Plantaginaceae*, *Poaceae*, *Rosaceae*, *Solanaceae*, *Theaceae*, *Vitaceae*) magvait, gyökereit, leveleit sikeresen alkalmazták biostimulátor nyersanyagaként (Makkar et al., 2007; Šernaitė, 2017; Yakhin et al., 2017). A vizes fokhagymakivonat ígéretes növényi-alapú biostimulátornak bizonyult javítva a kezelt növények fiziológiai állapotát, a növényi hormonok szintjét (Elzaawely et al., 2018; Hayat et al., 2018b; Mohamed et al., 2020), valamint stressz védelmi mechanizmusait *Fusarium*, *Botrytis*, *Verticillium* és *Phytophthora* fitopatogének támadása után (Hayat et al., 2018b; Hayat et al., 2016). A zöld technológián alapuló, 11 növényi kivonatot (fő összetevő a fokhagymakivonat) tartalmazó EliceVakcina és a csak fokhagymakivonatot tartalmazó Garlic-lipo növények vitalitására gyakorolt jótékony hatását vizsgáltuk. Az alacsony ráfordítást igénylő fenntartható mezőgazdaságra összpontosítva a gyógynövénykivonatok hatékonyságának megerősítését szolgáló SC-CO₂ extrakció és liposzóma nanotechnológiai formulázást alkalmaztunk a jobb hatás érdekében.

Az EliceVakcina 11 hatóanyagkomplex és a Garlic-lipo fokhagymakivonata 100-150 nm átmérőjű multilamelláris vezikulákba került. Ezeket a liposzómákat aktív csapdázási

technikák alkalmazásával állítottuk elő. Transzmissziós elektronmikroszkópiát és Zetasizert használtunk a liposzómák méretének, szerkezetének és stabilitásának jellemzésére. A liposzóma méret meghatározását és a kolloid jellemzők monitorozását dinamikus fényszórás segítségével végeztük. A liposzómák mérete 134,2 és 164,2 nm között volt, a kolloid stabilitása pedig magasnak bizonyult, a Zéta potenciál -40,66 és -40,53 mV között volt. A liposzómák ezen fizikai-kémiai tulajdonságai nagy stabilitást és nagy bioaktivitást biztosítanak a készítményeknek (Hanachi et al., 2022). Egy ilyen termék mezőgazdasági gyakorlatban történő alkalmazásáról azonban csak néhány közlemény létezik.

A fokhagymakivontból készült biostimulátorok gombaellenes hatását detektálták *Fusarium* fajokon, többek között *F. graminearum* (Pinilla et al., 2019), *F. oxysporum* növekedését gátolta a kezelés (Hayat et al., 2016). Növényi-alapú biostimulátorok, az EliceVakcina, a Garlic-lipo és a Fitokondi, valamint a Garlic-oil antifungális hatását teszteltük *Fusarium* fajokon. A mikrodilúció toxicitási teszt szerint a *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* és *F. verticilloides* fajok növekedését alacsonyabb térfogat százalékban (0,625 V/V%) a liposzómázott termékek, a Garlic-lipo (-0,1612) és az EliceVakcina (0,11755) gátolta legjobban. A vizsgálat szerint 2,5-10 V/V% méréseknél a formulált és a formulázás nélküli fokhagymakivonat gátló hatása között nem volt szignifikáns különbség a *Fusarium* fajok növekedésére. A papírkorongos gátlási zóna meghatározása szerint a négy *Fusarium* faj eltérő antifungális hatást mutatott a vizsgált biostimulátorokkal szemben. A *F. proliferatum* érzékeny volt liposzóma formulált szerekre, különösen erősen reagált a Garlic-lipo kezelésre, a kiterjedt gátlási zónában nem volt spóráképződés. A Garlic-oil használata során a *F. graminearum* konídiumtartói kizárólag a táptalaj szélén voltak megfigyelhetőek, valamint a Garlic-lipo is jelentősen csökkentette a konídiumtartók képződését. *F. verticillioides* és *F. oxysporum* micéliumképződését mindhárom kivonat gátolta, azonban a spóráképződésre nem mutattak gátló hatás. A 0,5-1%-os EliceVakcina és a Garlic-lipo készítmények csírázásgátló hatását detektáltuk, azonban a *F. oxysporum* spóraszuszpenzióval kezelt borsó magok csírázását az 1%-os Garlic-lipo kezelés elősegítette.

A liposzóma formulált Garlic-lipo készítménnyel kezelt *T. aestivum* növényekből, valamint az EliceVakcina készítménnyel kezelt *P. sativum*, *B. napus* és *G. max* növényekből levélmintákat gyűjtöttünk NGS könyvtárak létrehozása céljából, hogy megvizsgáljuk a kezelés után végbemenő változásokat transzkripció szintjén. A

megfelelő abundancia értékekkel rendelkező annotált könyvtárakat hasonlítottuk össze különböző bioinformatikai módszerekkel. A genomszintű transzkripciós profilozást DEG elemzéssel, KEGG útvonalelemzéssel és RPM analízissel végeztük el mind a négy kultúrában.

Garlic-lipo hatását búza növények kezelése utáni két napon követtük figyelemmel, hogy vizsgáljuk a növényi stresszválaszban részvevő folyamatokat. A DEG elemzés és a RT-qPCR eredményei alapján az ABA útvonalhoz kapcsolódó gének expresszió szintjének növekedése különösen a kezelés után 15 perccel volt megfigyelhető, de 24 óra elteltével is fennmaradt aktivitásuk. Párhuzam vonható a fokhagymakivonatokban leírt nagy mennyiségű fitohormon mennyiséggel, különösen a magas ABA szinttel, mely 10-25x magasabb, mint a citokinin, az AUX és a JA szintje (Arguello et al., 1991; Atif et al., 2021). HPLC-DAD mérésünk szerint a Garlic-lipo ABA szintje $81,4 \pm 2,2 \mu\text{g/g}$. A magas ABA-tartalmú fokhagymakivonattal végzett Garlic-lipo kezelés serkentheti a növények biotikus vagy abiotikus stresszre adott válaszait és növelheti a termésszintet, amint azt szakirodalomban publikált exogén ABA-kezelések is mutatták (Aroca et al., 2008; Chan, 2012; Travaglia et al., 2010). Valamint fontos megemlíteni, hogy az ABA és a chaperon jelátviteli útvonalak a növényi stressz elleni védekezés központi szabályozói (Bulgakov et al., 2019). Ezen információk alapján azt feltételeztük, hogy a magas ABA-tartalmú Garlic-lipo stimulálhatja az ABA útvonalhoz kapcsolódó géneket. A 15 vs. C Top50 DEG között szerepel a stressz és ABA által kiváltott NCED3 homológ fehérje, mely kulcsfontosságú sebességkorlátozó enzim az ABA bioszintetikus útvonalában, valamint a HVA22 és LEA fehérjék, melyek a multi-abiotikus stressztűrést szabályozzák (Hao et al., 2009; Huang et al., 2018; Iuchi et al., 2001; Shen et al., 2001; Zhang et al., 2014). A sóstresszre (Bergler and Hoth, 2011) és a szárazság stresszre (Seo et al., 2016) reagáló fehérje a PUB19 (Azevedo et al., 2001) is felül szabályozottságot mutatott, amely ismert ABA által szabályozott fehérje az *A. thaliana*-ban (Liu et al., 2011). Mintáinkban a lefelé szabályozott gének a fotoszintézishez, valamint a riboszómális RNS-génekhez kapcsolódtak. A fotoszintézisben részt vevő gének ABA általi leszabályozottságát figyeltük meg, mely összefüggésbe hozható az ABA által közvetített klorofill lebomlással és a levelek öregedésével (Gao et al., 2016; Staneloni et al., 2008).

Az ABA jelátvitel útvonal gének szabályozása a TF-ek túlzott expressziójával függött össze, melyek a HD-ZIP, bZIP, C2H2 és AP2 családok tagjai: HOX22, HOX24, MYBS1, ZAT12, DREB1G. A legmagasabb értékeket 15min mintában figyeltük meg. A HOX22

részt vesz a patogénekkal kapcsolatos stresszválasz védekező mechanizmusában (González-Diéguez and Orozco, 2020), valamint a szárazság és a hőstressztűrő képességben (Pasini et al., 2014). A HOX24 (Chaudhary et al., 2021) és a MYBS1 (Mohanty, 2022) az α -amiláz gén promotert szabályozó cukor szignalizációs útvonal alapvető komponensei (Lu et al., 2007). A ZAT12 részt vesz a hideg akklimatizációban, a hidegre reagáló és az oxidatív stressz gének indukciójában és elnyomásában (Fujita et al., 2006). A ZAT12 transzkripció represszor C-ismétlést kötő faktorokkal (C-repeat/dehydration-responsive element binding factors CBF/DREB) indukálható (Vogel et al., 2005) és az ethylene-responsive element binding-factor-associated amphiphilic repression (EAR) domént tartalmaz (Xie et al., 2019). Az előző TF-ektől eltérően a kezelés után 48 órával magas expresszió szintet mutatott a DREB1G, amely egy tipikus hideg stresszválaszt szabályozó CBF/DREB TF (Moon et al., 2019; Sakuma et al., 2002) az *Arabidopsis thaliana*-ban is (Maruyama et al., 2004; Medina et al., 2011). Kimutatták, hogy a CBF2 és CBF3 túlzott expressziója számos hidegre reagáló COR gént indukál (Gilmour et al., 2004; Guo et al., 2018).

A felül szabályozott PR gének mind a kezelést követő 24h, mind 48h mintában megtalálhatók voltak, amelyek közül a 48h mintában magasabb expresszió szintet mutattak. A PR1 védekező fehérjeként működik a növény-patogén kölcsönhatásokban búza kísérletekben (Lu et al., 2011; Naz et al., 2014), valamint SA markergén. A PR2 részt vesz a búza sárgarozsda (*Puccinia striiformis f. sp. tritici*) rezisztenciájában (Kemp et al., 1999; Liu et al., 2010), a PR3 a gombaellenes fehérjék második legnagyobb csoportját alkotja (Kasprzewska, 2003). A PR4 gombaellenes hatással rendelkezik számos patogén gomba (*Fusarium* sp., *Botrytis* sp.) ellen (Bertini et al., 2009; Caporale et al., 2004), a PR5 pedig leginkább az abiotikus stresszekre, különösen a szárazságra és az ozmotikus stresszekre adott válaszokhoz kapcsolódik (de Jesús-Pires et al., 2020). A proteináz inhibitor PR6, a Bowman-Birk fehérje viszont lefelé szabályozott expresszió szintet mutatott (Rakwal et al., 2001; Wu et al., 2014). Továbbá az F3H fokozottan felül szabályozottsága volt tapasztalható, amely egy ABA-indukált abiotikus stressz gén és katalizálja a központi flavonoid bioszintetikus útvonal harmadik lépését (Han et al., 2017; Owens et al., 2008).

Tehát a Top50 DEG többsége az ABA útvonal és PR gének csoportjába sorolható, indukciójuk azonban erősen összefüggött az idővel. A kezelésre adott gyors választ figyeltünk meg az ABA jelátvitelben a 15min mintában, ezzel ellentétben a PR indukciót 24-48 órával a kezelés után észleltük. A PR gének megfigyelt időeltolódási hatása

jellemző az olyan induktorokra, amelyeket gomba fertőzés vagy kémiai kezelések váltanak ki (Pasquer, 2005; Wu et al., 2014).

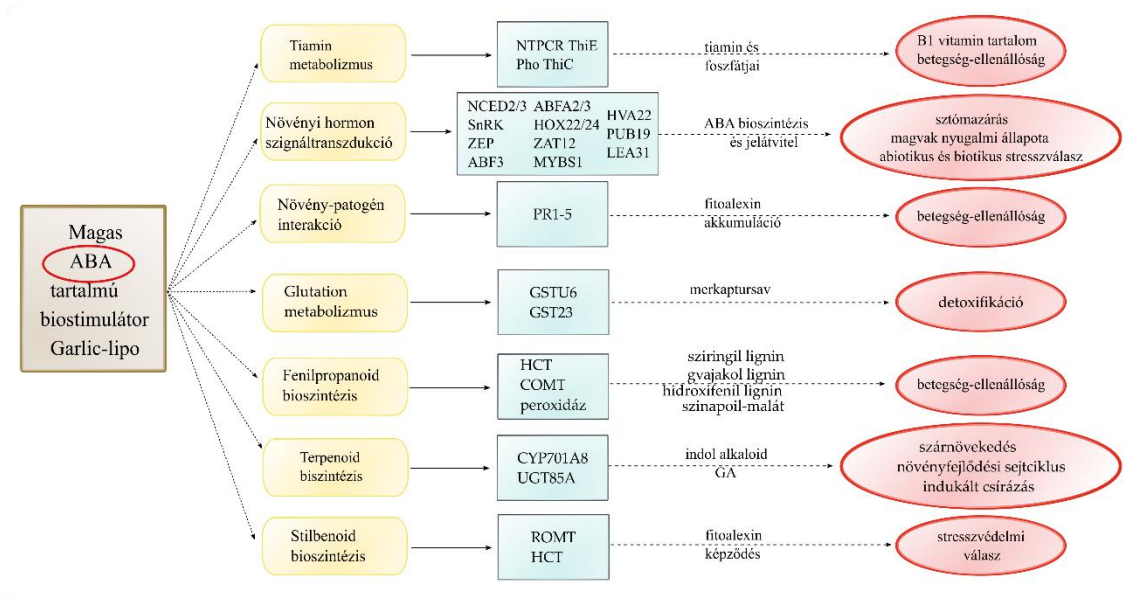
Ezen túlmenően a biotikus és abiotikus stresszválasz gének a 48h mintában felfelé szabályozottak voltak, mint például az ATI, amely védekező mechanizmussal rendelkezik a rovarok támadásával szemben (Carbonero et al., 1999); ClpB1, amely egy nagy molekulatömegű chaperon fehérje, a HSP 100 család része (Erdayani et al., 2020); a WIR1B, amely egy kis mennyiségű, glicinben és prolinban gazdag fehérje, kulcsszerepet játszik a *Fusarium graminearum* gomba által okozott fertőző betegség elleni védekezési reakciókban (Biselli et al., 2018), valamint a növény-kórokozó kölcsönhatásokban *Blumeria graminis* fertőzéskor (Douchkov et al., 2011); továbbá a HIP27, amely egy metallochaperon, fontos szerepet játszik a kadmium mérgeztelenítésében (Zhao et al., 2013) és a fonálférgek fertőzésére adott válaszban (de Abreu-Neto et al., 2013). A 48h mintában a különböző transzferázok felfelé szabályozott szinteket mutattak, mint például a GT7, amely elsősorban cukormolekulákat szállít az aglikonokba, hogy javítsa az oldhatóságot és stabilitást a flavonol bioszintézis során (Dooner et al., 1991); OMT, amely a flavon-tricetin három egymást követő metilezését katalizálja; és az ASMT1, amely az N-acetil-serotonin és a melatonin szintéziséért felelős. A melatonin triptofánból szintetizálódik és fontos szerepet játszik a növények biotikus és abiotikus stresszekkel szembeni rezisztenciájának fokozásában (Tan et al., 2012), jelentősen javítja a búza palánták szárazságtűrő képességét a membránkárosodás csökkentésével (Cui et al., 2017).

Mivel a Garlic-lipo hatásai erős időbeli összefüggést mutattak, időbeli-változás génextpresszió elemzést végeztünk a kezelési hatások által kiváltott egyéb génklaszterek meghatározására. A vizsgálat kilenc klasztert eredményezett, a besorolt géneket GO kategóriák meghatározásával és KEGG analízissel tanulmányoztuk tovább. A fokozatosan emelkedő aktivitást mutató gének mind a GO, mind a KEGG elemzések szerint a védekezési válaszfolyamatokhoz kapcsolódnak. A kísérleti időszakban a PR1-5 gének, a terpenoidok és a fenilpropanoidok bioszintézisében részt vevő gének folyamatosan magas szinten működtek, melyek proteáz inhibitorok, glükánázok, kitinázok és taumatin fehérjék (Jain and Khurana, 2018). Ezenkívül a stresszválaszban részt vevő CYP450 és glutation transzferáz (GSTU6, GST23) gének magas szintű expressziót mutattak. A GST gének erősen indukálhatók stresszhelyzetek széles skálájával, beleértve a biotikus stresszt is. Ismert szerepük a glutationnal való konjugációjuk révén történő mérgeztelenítésben, az oxidatív stressz mérséklésében és a

hormonszállításban (Gullner et al., 2018). Valamint megfigyelték a *Fusarium pseudograminearum* patogén fertőzéskor a GSTU6 védelmi mechanizmusban betöltött szerepét (Qiao et al., 2021).

A fotoszintézisben részt vevő gének lefelé szabályozottságát a DEG, GO és KEGG elemzés alapján is megfigyeltük. A KEGG elemzés kimutatta, hogy a fotoszintézis helyreállításának folyamata már elkezdődött a kezelést követő 48 órában: a porfirin- és klorofill anyagcsere-útvonal (map00860), a fotoszintetikus organizmusok szénmégköő útja (map00710), a klorofilláz (CLH) és a malát-dehidrogenáz (MDH) expressziója megemelkedett.

Az összes *in silico* elemzést áttekintve elmondható, hogy a Garlic-lipo kezelés után olyan növényfejlődést és a stressz védelmi mechanizmust befolyásoló gének aktiválódtak, melyek az ABA útvonal és a rezisztencia-mechanizmus erős szabályozására utalnak. Az ABA növényi hormon szintézisének kulcsszerepe van a növény fejlődésében, a sztóma záródásában és a jelátvitelben különböző növényi stresszek esetén. A Garlic-lipo kezelés gyorsan befolyásolhatja a növények ABA jelátviteli útvonalát a nanorészecskék expozíciójára válaszul, ami fokozott ABA-val kapcsolatos génaktivitáshoz és védekezési válaszhoz vezet. Kimutattuk, hogy a Garlic-lipo feltételezett fitopatogén aktivitása szisztémás szerzett rezisztenciát (PR1, PR2 és PR5) és lokális szerzett rezisztenciát (PR3, PR4) magában foglaló PR géneket is kivált. Ezen túlmenően, a vizsgált minták KEGG útvonal analízise (33. ábra) során megállapítottuk, hogy az általánosan felül szabályozott Top50 DEG gének a monoterpenoid, fenilpropanoid, diterpenoid és sztilbenoid bioszintézisében, valamint a glutation és fenilalanin metabolizmusában játszottak szerepet.



33. ábra. Összefoglaló a Garlic-lipo kezelés hatásáról búzában KEGG útvonalelemzés alapján. Az aktiválódott útvonalak sárgával, gének kékkel, folyamatok pirossal jelölve

Ezeknek az útvonalaknak kulcsszerepük van a növények fejlődésében, a sejtciklusban, a szár növekedésének szabályozásában, az indukált csírázásban, a védekezési mechanizmusokban és a betegségekkel szembeni ellenállásban. Mindezen eredmények alapján megállapítható, hogy a több megközelítéssel vizsgált transzkriptomikus változások egyöntetűen azt jelzik, hogy a Garlic-lipo használata javíthatja a növények egészségét és fejlődését azáltal, hogy erősíti a biotikus és abiotikus stresszre adott reakciókat.

Mivel az üvegházi kísérletben igazoltuk, hogy a növényi védekező válaszban szerepet játszó folyamatok vizsgálatára alkalmas a kezelés után két nappal történő mintavételezés, ezért a kisparcellás kísérletekben csak ebben az időpontban vettünk mintát. *P. sativum*, *B. napus* és *G. max* mintákon elvégzett *in silico* elemzések (Top50 DEG, KEGG útvonal és RPM) olyan génindukciókat mutattak ki, amelyek az abiotikus és biotikus stresszhatásokban egyaránt szerepet játszó, megerősödött stresszválaszokra utalnak. Ez magában foglalja a PR, a GST, a fenilpropanoid útvonal, a tiamin metabolizmus, a hormonális jelátvitelhez kapcsolódó gének, valamint növény-patogén interakció és a MAPK kaskád géneinek felülszabályozását.

Borsó minták útvonalelemzése során az EliceVakcina kezelés után szembetűnő változások közé tartozik az erősen indukálódott tiamin bioszintézis, 125 differenciáltan expresszáldó szekvenciát detektáltunk a NTPCR, *adk*, *thiE*, *iscS/NFS1*, *dxs* gének esetében. A B1 vitamin tartalom különösen jelentős a hüvelyesekben, így a borsóban is (Marshall et al., 2021; Siitonen et al., 2024), ami humánegészségügyi szempontból fontos B1 vitamin forrás. Felelős a gerincvelő és az agy közötti idegi jelátvitelért, elengedhetetlen azon enzimek működéséhez, amelyek elősegítik az energia szénhidrátokból történő előállítását, valamint serkenti a memóriát, megakadályozza az idegkárosodást (Mrowicka et al., 2023). A növényekben a tiamin koenzimként szolgál számos anyagcsere-útvonalban, köztük a glikolízisben, a Krebs-ciklusban és a pentóz-foszfát-útvonalban (Goyer, 2010). Részt vesz továbbá az abiotikus stressz enyhítésben, például a hideghez, a só és a paraquat-expozícióhoz, valamint a biotikus stressz esetében az oxidatív stresszhez való növényi alkalmazkodással kapcsolatos folyamatokban (Tunc-Ozdemir et al., 2009). Rapala-Kozik et al. (2012) kiemelték az ABA potenciális szabályozó szerepét a tiamin bioszintézisében, különösen só- és ozmotikus stressz körülmények között *Arabidopsis*-ban. Mintáinkban az EliceVakcina kezelést követő 5 nap alatt 8%, 10 nap elteltével 14,3%-kal megnőtt a hajtás tiamin és metabolitjait detektáló standard jel alatti terület nagysága a kromatogram szerint.

Továbbá a fenilpropanoid és a hozzá kapcsolódó flavonoid és izoflavonoid útvonal egyes génjei mutattak felül szabályozottságot (*CHS*, *CYP93C*, *CYP81E9*, *CCOAOMT*). A fenilpropanoidok széles körben jelen vannak a növényekben, létfontosságú szerepet játszanak a növények fejlődésében azáltal, hogy a sejtfal alapvető alkotóelemeiként szolgálnak, védnek a káros fény- és UV-sugárzás ellen, továbbá mint fitoalexinek a kártevők és a kórokozók ellen (Deng and Lu, 2017).

Borsó mintáinkban indukálódtak a *PR1/2/4/5* gének, melyek alapvető szerepet töltenek be a növényekben a biotikus/abiotikus stressz körülményekhez való alkalmazkodásban (Ali et al., 2018; Jain and Khurana, 2018). Ismert a *Fusarium* fertőzés elleni védekezésben betöltött szerepük is, mivel promótoreik növényi hormonokra, stresszre reagáló elemeket tartalmaztak és a növényi parazita támadás válaszaként aktiválódnak fokhagymában (Anisimova et al., 2021). A GST-k közül a *GSTL3* és a *GSTF9*, melyek a *Verticillium* hervadással szembeni rezisztencia kulcsfontosságú szabályozójaként azonosítottak (Gong et al., 2018).

Az útvonal elemzések során előtérbe került a növény-patogén interakció. E folyamat génjei (*CDPK*, *CaLM*, *PR1*, *SGT1*, *HSP90*, *EDS1*) mutattak felül szabályozottságot a

kezelések eredményeként, melyek közül az EDS1 enzim jól ismert szabályozó mind az alap-, mind a rezisztencia (R) gén által közvetített rezisztenciának. Patogén-növény jelátvitelben betöltött szerepét leírták *A. thaliana*-ban (Rustérucci et al., 2001), szójában (Wang et al., 2014), valamint csicscriborsó *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri* fertőzés elleni rezisztencia kialakulásánál. A folyamatban részt vesz a WRKY70 homológ WRKY64 TF, mely az EDS1 promoterhez kötődik és serkenti annak transzkripcióját, így az ektópiás sejthalált indukálja (Chakraborty et al., 2018). Az EDS1 gén, mely részt vesz az SA útvonal szabályozásában a HR jól ismert szabályozója, amely komplexeket képez a PAD4 fehérjével, amely a PR1 transzkriptek felhalmozódásához vezet (Venugopal et al., 2009). A növény-patogén interakció útvonalon a nitrogén-monoxid szintet a CaLM fehérjék szabályozzák, amelyek megerősíthetik a sejtfalet. A kalciumionok szabályozzák a CDPK kifejeződését és annak downstream génjét (Rboh), ezáltal befolyásolják a ROS tartalmat, majd a MAPK útvonal aktiválódik, ami olyan védelmi gének kifejeződését indukálja, mint a PR1 és e folyamat erősíti a *Fusarium oxysporum* elleni védelmet (Guan et al., 2023). SGT1 által közvetített jelátviteli kaszkád szükséges az *A. thaliana* biotróf kórokozókkal szembeni rezisztenciájához, valamint okozati szerepet játszik a *Fusarium culmorum* betegség tüneteinek enyhítésében is (Cuzick et al., 2009).

A növényi hormon szignáltranszdukció elemei közül az ABA (SnRK2, ABF), JA (JAR1, JAZ) és SA (PR1, WRKY70) jelátvitel folyamatban részt vevő gének mutattak differenciált expresszió különbséget a KEGG útvonal elemzés során. Az ABA hatására az PYR/PYL/RCAR receptorok egy szabályozási útvonalat kezdenek működtetni a PP2C foszfatázok, az SnRK2 kinázok, majd az ABF szabályozásával (Cutler et al., 2010). Az ABA közvetve részt vesz a biotikus stresszválaszban az ABA, SA, JA és ET jelátviteli hálózaton belüli átfedő génkészletek jelzésével, mint a szinergikus és antagonisták kölcsönhatások komplex hálózatának része (Mauch-Mani and Mauch, 2005). Ezért e hormonok jelátvitel folyamatai és bioszintéziséhez kapcsolódó génjeit egy másik bioinformatikai módszer, az egyedi génexpresszió elemzéssel is megvizsgáltuk. Az RPM számítás alátámasztotta az útvonalelemzés eredményeit. Az ABA-függő gének (SnRK2, ABF2/3, PP2C, ZEP, LEA) aktiválódtak EliceVakcina alacsony és magas dózisu kezelése után is. Az JA (JAR4, COI1, SKP1, MYB2, AOC) és SA jelátvitel és bioszintézishez (AIM1, CAMTA2, EPS1, PHB3, NPR1, TGA2, WRKY15/40/70) köthető gének inkább az alacsony dózisu kezelés után mutattak felül expresszálságot. A kezelés hatására az ERF5 felül szabályozottságát figyeltük meg, amely fontos a patogén támadásra adott molekuláris válasz szabályozásában (Müller and Munné-Bosch, 2015).

A MAPK kaszkád egyes részei mutattak aktivitást, úgy, mint a patogén támadásra reagáló PR1 gén és az ndk (NDPK2), mely a H₂O₂-mediált MAPK jelátvitelhez kapcsolódik (Moon et al., 2003). Továbbá az ET jelátvitel során szabályozó szerepet játszó ChiB (Liu et al., 2004), valamint az ABA válaszként ismert SnRK2 és CAT1.

A növényi HSP-k, mint chaperonok, döntő szerepet játszanak a biotikus és abiotikus stressztűrés biztosításában. Ezenkívül a HSP növeli a membránstabilitást és szabályozza a ROS tartalmat azáltal, hogy pozitívan befolyásolja az antioxidáns enzimrendszert. Ezenkívül a ROS molekulákat használja jelként, így indukálja a HSP aktivitását. A HSP a PR fehérjék felhalmozódásával és stabilitásával is fokozza a növényi immunitást különféle biotikus stresszek alatt (ul Haq et al., 2019).

Összegezve a *P. sativum* minták elemzéseit megállapítható, hogy a kezelések következtében a tiamin metabolizmus, fenilpropanoid bioszintézis, a növény-patogén interakció, PR gének, hősokk fehérjék, MAPK kaszkád és a növényi hormon szignáltranszdukció (ABA, JA, SA) mutatott aktivitást.

A repce növények EliceVakcina kezelése után a növényi stressz védekezési válaszokban részt vevő folyamatok közül a tiamin metabolizmus (NTPCR, thiD, thiE, PHO, thiC), a glutation metabolizmus (GST, GSH) és a növény-patogén interakció (CaLM, CDPK, ECI3, RPM1, PPS2, SGT, CNGCs) mutatott nagyfokú aktivitást. A többi mintához képest kevesebb gén expresszió szintjében tapasztaltunk változást a fenilpropanoid bioszintézis (CAD, COMT) és MAPK kaszkád (CaLM, CTR1, PR1) folyamataiban.

A növényi hormon szignáltranszdukció folyamataiban részt vevő ABA útvonal részben aktivizálódott, felfelé szabályozottságot mutattak az ABF2, ZEP, MYC2 SnRK2.6 és ABA kapcsolatos gének (LEA46, RAB18, LTI65). A másik stresszel kapcsolatos fitohormon, a JA indukált gének megváltozott szabályozottságát figyeltük meg a DEG elemzés során. Az UGT74D1, mely a JA és JA-származékokat glükozilálja, valamint a CYP81F1, mely MeJA kapcsolatos és a glükobrassicin felhalmozódásban vesz részt *Brassicaceae* család tagjainál (Yi et al., 2016). A glükobrassicin a glükozinolatokhoz tartozó másodlagos védekezési vegyület, mely szárazság stressz és a növényevők okozta károk után termelődik (Gutbrodt et al., 2012). A további *in silico* elemzések szerint a LOX, JMT és bHLH3 gének felülszabályozottak, viszont alul szabályozottak JAR1, AOS, AOC és MYC TF-ek. Ellenben a SA útvonal esetében többnyire lefelé szabályozottságát detektáltuk (PR1, EPS1, ICS1, TGA1 és a WRKY48), de felülszabályozott volt a WRKY70.

Összességben elmondható, hogy repce növények EliceVakcina magas dózisú kezelése nem indította be a MAPK kaszkádot. A növényi hormon jelátvitel folyamatok közül az ABA és a JA útvonal aktivizálódása látható volt. Továbbá markáns expresszió szint változást tapasztaltunk a növény-patogén kölcsönhatás folyamataiban és a tiamin metabolizmusban.

Szója növények EliceVakcinával történő kezelése után az *in silico* elemzések abiotikus és biotikus stresszválaszhoz köthető gének expresszió szintjében mutattak változást. Kimutattuk a HIPP26 fehérjét kódoló gén expresszió szint változását, melyet a hideg és a sóstressz indukál, valamint fontos szerepet tölt be a fehérjék prenilációjában, az egyébként hidrofíli fehérjék perifériás lipidmembránfehérjeként való működésében (Barr et al., 2023; Hála and Žárský, 2019). Továbbá a DUR3 gén mutatott aktivitást, mely a nitrogén hiány stresszre reagáló aktív karbamid transzporter (de Souza et al., 2020). Szójában a redox folyamatokat katalizáló CYP82A3 aktivitását figyeltük meg, melyről ismert, hogy erős rezisztenciát eredményez a *Botrytis cinerea* és a *Phytophthora parasitica* ellen, valamint fokozott toleranciát só- és szárazság stresszel szemben. Ez a megnövekedett rezisztencia a JA/ET jelátviteli útvonalhoz kapcsolódó gének fokozott expressziójával jár együtt (Yan et al., 2016).

G. max mintáinkban kiemelkedő a fenilpropanoid és karotinoid bioszintézis, a tiamin metabolizmus, a MAPK kaszkád, növényi hormon jelátvitel, valamint növény-patogén interakció útvonal aktivitása.

A fenilpropanoid bioszintézis számos szabályozó enzime (PAL, PTAL, CAD, peroxidáz, CCR, HCT, CCOAOMT, CYP73A) mutatott felül expresszált szintet, amelyek részt vesznek a lignin és a flavonoidok bioszintézisének redundáns funkcióiban (Vogt, 2010). Valamint megfigyeltük mintáinkban a karotenoid bioszintézis egyes génjeinek aktivitását (ZEP, ZDS, NCED3, VDE, PSY, CYP707A), melyek belső és külső stresszhatásokat enyhítő bioaktív vegyületek képzésére szolgálnak (Uarrota et al., 2018). A glutation metabolizmus (GST, PGD, glutation reduktázok és peroxidázok) is megemelkedett expresszió szintet mutatott.

A tiamin nemcsak mint kofaktor működik az alapvető anyagcsere-útvonalakban, beleértve a glikolízist, a pentoszfoszfát-utat és a trikarbonsavciklust, hanem hatékony az abiotikus és biotikus stresszhatásokra adott válaszban, főként oxidatív stresszhez való alkalmazkodásának hátterében álló folyamatokban. Jelzőmolekula, mivel anyagcserejének modulációja fontos a növények változó környezetre adott válaszai

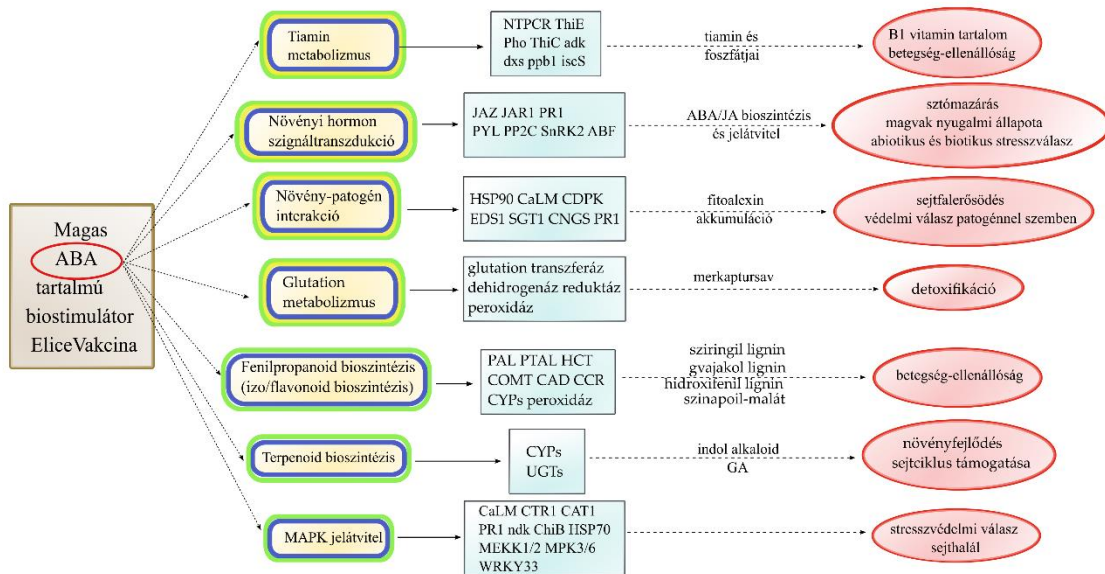
szempontjából (Goyer, 2010; Tunc-Ozdemir et al., 2009). Az ABA szignifikánsan befolyásolta a tiamin bioszintézis expresszióját, a tiamin-difoszfát szintjét, valamint a fő tiamin-difoszfát-függő enzimeket kódoló gének expresszióját sóstressz alatt *A. thaliana*-ban (Rapala-Kozik et al., 2012). Mintáinkban a B1 vitamin metabolizmusához tartozó gének aktiválódása (IscS/NFS1, dxs, thiE) volt megfigyelhető.

A jelátviteli útvonalak közül a MAPK jelátvitel (MEKK1/2, MPK3, PYL, PP2C, SnRK2, ABF, Rboh, CaLM, WRKY33) mutatott nagyfokú aktivitást a kezelések után. *Arabidopsis*-ban leírták, hogy a MPK3/MPK6 általi foszforiláció az ERF6 fehérje felhalmozódását eredményezi *in vivo*, ami pozitívan szabályozza a védekező génexpressziót és a növényi rezisztenciát a *Botrytis cinerea* nekrotróf gombakórokozóval szemben (Meng et al., 2013). MEKK1/2 pozitívan szabályozzák a veleszületett immunválaszokat mind a *Pseudomonas syringae* bakteriális és a gombakórokozó *Botrytis cinerea* szemben (Asano et al., 2020). WRKY33 részt vesz a *Fusarium oxysporum* okozott stressz javításában és más metabolikus folyamatokban a fertőzés során lignifikáció fokozásával (Aamir et al., 2018).

A növényi hormon jelátviteli útvonalakat befolyásoló gének közül az AUX-függő WAT1 gén, JA jelátvitelhez köthető AGO4 és a SA növényi hormonhoz köthető AAA-ATP-áz gén mutatott megnövekedett expresszió szintet a DEG elemzések során. Mintáinkban felül szabályozott a WRKY48, az SA által szabályozott PR1 gének expressziójának és a *Pseudomonas syringae* baktériumos kórokozóval szembeni bazális rezisztenciának a negatív szabályozója (Jiang et al., 2017; Xing et al., 2008a). Továbbá az ABA válaszhoz köthető GOLS2 (Urano et al., 2009), a PUB19 is megnövekedett aktivitást mutattak, valamint az ABA bioszintézis elemei (PYL, PP2C, SnRK2, ABF).

A növény-patogén interakció (CaLM, HSP90, PTO, ESD1, SGT1, MPK3) aktivitása markánsan nőtt a kezelések után gyűjtött mintákban. PTO-interakciós fehérjék sokrétű funkciót töltenek be a növények fejlődésében és különböző biotikus és abiotikus stresszekre adott válaszban. TF-ként modulálják a SA, JA és ET jelátviteli útvonalakat, szabályozták a védekezéssel kapcsolatos génexpressziót, hogy növeljék a *Pseudomonas syringae* betegséggel és a rovar okozta sebzéssel szembeni rezisztenciát (Sun et al., 2022).

Összeségében a kisparcellás kísérleteket vizsgálva a magas ABA tartalmú növényi-alapú biostimulátorok kezelése után mindhárom kultúrában a B1 vitamin metabolizmus, glutation metabolizmus, a növényi hormon jelátvitel (ABA, JA, SA) és a növény-patogén interakció útvonalak aktivitása volt megfigyelhető (34. ábra).



34. ábra. Összefoglaló az EliceVaccina kezelés hatásáról a három kisparcellás kísérletben KEGG útvonalelemzés alapján. Az aktiválódott útvonalak sárga, gének kék, a folyamatok piros téglalapban vannak feltüntetve. Az útvonal téglalapokat szegélyező színek jelzik, hogy melyik kultúrában aktív az adott útvonal: zöld - borsó, sárga - reppce, kék – szója

A növényt érő stresszhatáskor az ABA endogén felhalmozódásával potenciális központi szabályozó szerepet játszik az abiotikus stressztoleranciában (Sah et al., 2016), a tiamin bioszintézisében (Rapala-Kozik et al., 2012), valamint a növényi hormonok működésében. Az ABA és az AUX együtt szabályozza a növények növekedésének és fejlődésének számos aspektusát, a magok csírázását, a primer gyökérnövekedést (Sun and Li, 2014); az etilénnel kölcsönhatásban a sztómazáródás szabályozását (Harrison, 2012); a jázmonátokkal a növényi védekezést és a génexpressziót (Anderson et al., 2004). Azonban különbségeket is tapasztaltunk. Csak a borsó és szója növények kezelése után erősödött meg a MAPK kaszkád, a fenilpropanoid bioszintézis, a hősokk proteinek, SA hormon és PR gének aktivitása. Az ABA komplex jelátviteli hálózata révén más jelátviteli útvonalakkal is integrálódik (Kumar et al., 2019a). A MAPK kaszkád számos ABA-függő válaszban vesz részt, mint a magok csírázásában, a védősejt-jelátvitelben és az antioxidáns védekezésben (Jammes et al., 2009; Xing et al., 2008b; Zhang et al., 2012). Továbbá az ABA szerepet játszik biotikus stresszfaktorok, pl. a gombák elleni védekezési stratégiában is. A növények antioxidáns másodlagos metabolitokat termelnek

(fenilpropanoidok, terpenoidok), melyek az ABA szubsztrátjai, elősegítik szintézisét. Az ABA megnövekedett szintézise korrelál *Fusarium oxysporum* rezisztenciájával, mint a növény fertőzésre adott korai válaszána pozitív szabályozója (Boba et al., 2020). A kórokozókkal szembeni reakció magában foglalja a PR fehérjék, köztük a glükánázok, kitinázok és peroxidázok, pektináz inhibitorok termelődését, valamint a sejtfal változásait, különösen a pektin metilésztereázése és lignifikációra fizikai akadályt képezve a gomba növekedése ellen (Wojtasik et al., 2011). A kórokozók fertőzése során különösen fontos szerepet játszik a SA csökkentve a növények kórokozók fertőzésére való érzékenységét (Di et al., 2016).

Mіндеzen ismeretek fényében feltételezhető, hogy a megfelelő ABA koncentrációjú biostimulátor kezelés növeli a növények abiotikus és biotikus stressztűrését, valamint tápértéktulajdonságait.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Liposzóma formulált biostimulánsok előállítása és jellemzése

Előállításra került két új, szuperkritikus szén-dioxid kivonással készült növényi kivonatokat tartalmazó liposzóma formuláció, az EliceVakcina és a Garlic-lipo, melyek biostimulátor aktivitással rendelkeznek. A készítmények magas abszcizinsav-tartalommal rendelkeznek: Garlic-lipo esetében $81,4 \pm 2,2$ $\mu\text{g/g}$, míg EliceVakcina esetében $6,3 \pm 1,2$ $\mu\text{g/g}$ érték került meghatározásra.

2. Gombaellenes hatás igazolása *Fusarium* fajokkal szemben

Kimutatásra került, hogy az abszcizinsavban gazdag, liposzóma formulált biostimulánsok, mint az EliceVakcina és a Garlic-lipo, hatékony gombaellenes aktivitást mutatnak növénypatogén *Fusarium* fajokkal szemben, úgymint *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. verticillioides* és *F. proliferatum*. A vizsgált 0,625 v/v% koncentrációban az optikai denzitás (ABS_{600}) értéke EliceVakcina esetében 0,11755, míg Garlic-lipo esetében $-0,1612$ volt, ami jelentős gátló hatásra utal.

3. Stresszválaszutak preventív aktiválása

Bizonyítást nyert, hogy az EliceVakcina és a Garlic-lipo preventív módon aktiválják a növényi stresszvédekezési mechanizmusokat. A hatás taxonómiaileg eltérő növényfajokon (*Triticum aestivum*, *Pisum sativum*, *Brassica napus* és *Glycine max*) is megfigyelhető volt, ami a készítmények széles körű alkalmazhatóságát támasztja alá.

4. Patogenezishez köthető és stressz-indukált gének expressziójának fokozása búzában

A Garlic-lipo kezelést követően *Triticum aestivum* növényekben jelentős mértékben nőtt a patogenezishez köthető gének (9764–1603 kontig) és a stressz-indukált gének (2345–214 kontig) expressziója, ami a védekezési és stresszválasz gének transzkripciók aktiválódását igazolja.

5. A B1-vitamin szintézisének serkentése szántóföldi növényekben

Megállapítást nyert, hogy az EliceVakcina elősegíti a környezeti stresszel szembeni ellenállóképességet olyan szántóföldi növényekben, mint a *Pisum sativum*, *Brassica napus* és *Glycine max* a tiamin (B1-vitamin) bioszintézisének aktiválása révén. A tiamin-

bioszintézissel kapcsolatos differenciáltan expresszált szekvenciák száma (*P. sativum*: 125; *B. napus*: 57; *G. max*: 54) jelentősen meghaladta a klasszikus fitohormon-útvonalakhoz kapcsolódó gének számát (*P. sativum*: 11; *B. napus*: 8; *G. max*: 7), ami egy új, abszcizinsav-alapú stresszadaptáció mechanizmus lehetőségét vetíti előre.

6. A B1-vitamin szintjének emelkedése borsóban

Pisum sativum esetében kimutatásra került, hogy a magas abszcizinsav-tartalmú biostimuláns kezelés hatására fokozódik a tiamin bioszintézis génjeinek expressziója, amelyhez 14,3%-os növekedés társult a B1-vitamin és metabolitjai tartalmában a kezelést követő 10. napon.

7. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK

A vizsgált növényi-alapú biostimulátorok gyakorlati alkalmazása az agráriumban több területen is előnyös:

1. Termésminőség és beltartalom javítása: Az EliceVakcina növeli a B1 vitamin (tiamin) mennyiségét a borsóban, ami táplálkozás-élettani szempontból előnyös.

2. Stressztűrő képesség fokozása: A biostimulátorok aktiválják az abszcizinsav-függő jelátviteli útvonalakat, így segítik a növényeket az abiotikus (szárazság, hőstressz) és biotikus (kórokozók) stressz leküzdésében. A biostimulátorok kijuttatása, mint exogén abszcizinsav kezelés alkalmazható, mely az abszcizinsav -függő jelátviteli útvonalakon keresztül aktivál más jelátviteli útvonalakat fokozva a növény stressztoleranciáját.

3. Biofungicid hatás: A liposzóma formulált fokhagymakivonatok hatékonyan gátolják a *Fusarium* fajok növekedését, csökkentve a termésveszteséget. A mikrodilúció toxicitási teszt szerint *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* és *F. verticilloides* fajok növekedését visszaszorították. A vizsgált gombafajok közül a *F. proliferatum* micéliumnövekedését gátolták legjobban, különösen erősen reagált a Garlic-lipo kezelésre kiterjedt gátlási zónát mutatva.

4. Hatékonyabb hatóanyag-kijuttatás: A nanoliposzóma technológia növeli a hatóanyagok stabilitását, csökkenti a párolgást és fokozza a felszívódást, így kisebb mennyiségű extraktum is elegendő lehet a kívánt hatás eléréséhez. E formulálás segíti az alacsony vízdékonyság, a környezet okozta oxidáció elkerülését, továbbá a bioaktív anyagok felszabadulási sebessége szabályozhatóvá válik a hőmérséklet, a pH, a kibocsátó közeg ionerőssége vagy biotikus és/vagy abiotikus stresszorok által. Újszerű megközelítés a bioaktív összetevőkkel kapcsolatos negatív fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező gyógynövénykivonatok kijuttatására, melynek helye van az agrár célú felhasználásban.

5. Széles körű alkalmazhatóság: A kísérletek több növénykultúrában (*Triticum aestivum*, *Pisum sativum*, *Brassica napus* és *Glycine max*) is pozitív hatásokat mutattak, így a technológia többféle termesztési rendszerbe beilleszthető.

6. Összességében az előállított biostimulátorok alkalmazása hozzájárulhat a fenntartható mezőgazdasághoz, csökkentheti a kémiai növényvédő szerek használatát és növelheti a termékbiztonságot.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A növényi-alapú biostimulátorok használata elősegíti a növények stressztűrését, a termés minőségi paramétereinek javítását, továbbá csökkenti a környezetterhelést. A vizsgált EliceVakcina és Garlic-lipo nanoliposzóma formulált szuperkritikus szén-dioxid extrakcióval kivont gyógynövénykészítmények fizikai-kémiai tulajdonságai stabilak, magas koncentrációban abszcizinsavat (ABA) tartalmaznak. Négy *Fusarium* faj (*F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* és *F. verticilloides*) bevonásával készült mikrodilúció toxicitási teszt és gátlási zóna meghatározás szerint a készítmények mutatnak antifungális hatást, de nem nevezhetőek biofungicideknek.

EliceVakcina és a Garlic-lipo készítményekkel történő kezelés hatását vizsgáltuk különböző bioinformatikai módszerekkel, hogy a kezelések következményeként fellépő fiziológiai állapot elősegíti-e a növény védekezési stratégiájának megváltozását. Az újgenerációs szekvenálás (Next-generation sequencing NGS) során készült könyvtárakból *de novo* referencia transzkriptomokat hoztunk létre, majd páronkénti differenciális expresszió (Differentially expressed genes DEG) elemzéssel a legnagyobb szignifikáns különbséggel expresszálódó 50 gén (Top50 DEG) kontigját annotáltuk és meghatároztuk az aktiválódott útvonalakat (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes KEGG), valamint az egyedi génexpresszió analízis értékeit (Reads Per Million mapped read RPM).

A vizsgáltaink alapján megállapíthatjuk, hogy a használt biostimulátorok mind a négy kultúrában aktiválják a növények ABA jelátviteli útvonalát, ami fokozott ABA-függő génaktivitáshoz és védekezési válaszhoz vezet. Az ABA, mint a növényi stressz elleni védekezés központi szabályozója aktivál más jelátviteli útvonalakat, a növényi hormon szignáltranszdukciót, a tiamin metabolizmust. A kezeléseket után megnőtt a fenilpropanoid bioszintézis, a glutation metabolizmus génjeinek expresszió szintje is. A hormon szignáltranszdukciót tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy mindegyik kultúrában aktiválódott a jazmonsav (JA) útvonal, és a repce kivételével a szalicilsav (SA) útvonal is, melynek következményeképpen a patogenezishez köthető (PR) fehérjék génjeinek expresszió szintje megnőtt. Valamint mutatkozott a MAPK jelátvitel aktivitása is a borsó és a szója növényeken végzett kezeléseket után. Tehát feltételezhető, hogy a magas ABA tartalmú növényi-alapú biostimulátorok általi kezelés e bioszintetikus és jelátvitel

útvonalak aktiválódását eredményezi. Ennek következtében megnő a növényben stressz védelmi válasz és betegség-ellenállósággal kapcsolatos gének indukciója. A stressz adaptáció, sejtfalerősödés, reaktív oxigénfajták (ROS) homeosztázis fenntartása mellett megmutatkoztak a növény fejlődését és növekedését fokozó gének aktivitása, és például a B1 vitamin metabolizmusa is. Így e két hatás együttes működése elősegítheti a növény környezeti stresszre adott válaszait.

9. SUMMARY

The application of plant biostimulants (PBs) has been demonstrated to enhance plant tolerance to abiotic stress, improve various crop quality parameters, and mitigate environmental impacts associated with agricultural practices. In the present study, two plant conditioners, EliceVakcina and Garlic-lipo, were evaluated for their potential biostimulant properties. These PBs are based on supercritical carbon dioxide herbal extracts encapsulated in nanoliposomes. The formulations exhibited stable physicochemical characteristics and contained elevated concentrations of abscisic acid (ABA).

The antifungal efficacy of the formulations was assessed against four *Fusarium* species (*F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, and *F. verticillioides*). Antifungal activity was evaluated using the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) broth microdilution method and a solid agar plate assay. The results indicated that, although the biostimulants exhibited measurable antifungal activity, their effects were insufficient to classify them as biofungicides.

The effects of EliceVakcina and Garlic-lipo treatments were investigated using a range of bioinformatic approaches to assess whether the induced physiological state leads to alterations in the plant's defence response. De novo reference transcriptomes were assembled from next-generation sequencing (NGS) libraries. Subsequently, a pairwise differential gene expression (DEG) analysis was conducted, and the 50 genes exhibiting the most statistically significant changes in expression (Top50 DEGs) were selected for annotation. Functional characterization of these contigs was performed, and pathway enrichment analysis was conducted based on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) annotations. Expression levels were further quantified using Reads Per Million (RPM) normalization to identify activated signalling and metabolic pathways.

Our findings indicate that treatment with EliceVakcina and Garlic-lipo led to the activation of the ABA signalling pathway across all four investigated plant species, resulting in enhanced expression of ABA-responsive genes and associated defence mechanisms. As a key regulator of plant responses to abiotic and biotic stress, ABA was found to orchestrate the activation of additional signalling cascades, including plant hormone signal transduction and thiamine (vitamin B1) metabolism. Transcriptomic analysis revealed elevated expression levels of genes involved in phenylpropanoid biosynthesis and glutathione metabolism following treatment.

Further examination of hormone signalling pathways demonstrated that jasmonic acid (JA) signalling was upregulated in all four species. Salicylic acid (SA) signalling was activated in three of the four species, with the exception of rapeseed, and was associated with increased expression of pathogenesis-related (PR) protein genes. Additionally, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling was detected in response to treatment in both pea and soybean.

These results suggest that the high ABA content in EliceVakcina and Garlic-lipo may serve as a primary trigger for the activation of multiple biosynthetic and signalling pathways. The treatments appear to enhance the expression of stress-responsive and disease resistance genes, contributing to improved adaptation to environmental stressors. Beyond stress defence, transcriptomic data also indicated upregulation of genes involved in cell wall reinforcement, reactive oxygen species (ROS) homeostasis, plant development, and vitamin B1 metabolism. Collectively, the activation of these processes supports the hypothesis that these biostimulant treatments promote a coordinated physiological response that enhances both stress resilience and overall plant growth.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. *Aamir, M.-Singh, V. K.-Dubey, M. K.-Kashyap, S. P.-Zehra, A.-Upadhyay, R. S. -Singh, S.*: 2018. Structural and functional dissection of differentially expressed tomato WRKY transcripts in host defense response against the vascular wilt pathogen (*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*). *PLoS One*: 13. e0193922.
2. *Abdel Latef, A. A. -Tran, L.-S. P.*: 2016. Impacts of priming with silicon on the growth and tolerance of maize plants to alkaline stress. *Frontiers in plant science*: 7. 243.
3. *Abdelwahab, N. S. -Farid, N. F.*: 2014. Validated HPLC-DAD method for stability study of sulbutiamine HCl. *RSC advances*: 4. 30523-30529.
4. *Abdollahdokht, D.-Gao, Y.-Faramarz, S.-Poustforoosh, A.-Abbasi, M.-Asadikaram, G. -Nematollahi, M. H.*: 2022. Conventional agrochemicals towards nano-biopesticides: an overview on recent advances. *Chemical and biological technologies in agriculture*: 9. 13.
5. *Ahlfors, R.-Macioszek, V.-Rudd, J.-Brosché, M.-Schlichting, R.-Scheel, D. -Kangasjärvi, J.*: 2004. Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *The Plant Journal*: 40. 512-522.
6. *Ahmad, P.-Jaleel, C. A.-Salem, M. A.-Nabi, G. -Sharma, S.*: 2010. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical reviews in biotechnology*: 30. 161-175.
7. *Ahmad, W.-Noor, M. A.-Afzal, I.-Bakhtavar, M. A.-Nawaz, M. M.-Sun, X.-Zhou, B.-Ma, W. -Zhao, M.*: 2016. Improvement of sorghum crop through exogenous application of natural growth-promoting substances under a changing climate. *Sustainability*: 8. 1330.
8. *Ali, E. F.-Al-Yasi, H. M.-Issa, A. A.-Hessini, K. -Hassan, F. A.*: 2022. Ginger extract and fulvic acid foliar applications as novel practical approaches to improve the growth and productivity of Damask Rose. *Plants*: 11. 412.
9. *Ali, S.-Ganai, B. A.-Kamili, A. N.-Bhat, A. A.-Mir, Z. A.-Bhat, J. A.-Tyagi, A.-Islam, S. T.-Mushtaq, M. -Yadav, P.*: 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*: 212. 29-37.
10. *Alkuwayti, M.-El-Sherif, F.-Yap, Y.-K. -Khatab, S.*: 2020. Foliar application of *Moringa oleifera* leaves extract altered stress-responsive gene expression and enhanced bioactive compounds composition in *Ocimum basilicum*. *South African Journal of Botany*: 129. 291-298.
11. *Anders, S.-Pyl, P. T. -Huber, W.*: 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*: 31. 166-169.

12. Anderson, J. P.-Badruzsauhari, E.-Schenk, P. M.-Manners, J. M.-Desmond, O. J.-Ehlert, C.-Maclean, D. J.-Ebert, P. R. -Kazan, K.: 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*: 16. 3460-3479.
13. Anisimova, O. K.-Shchennikova, A. V.-Kochieva, E. Z. -Filyushin, M. A.: 2021. Pathogenesis-related genes of PR1, PR2, PR4, and PR5 families are involved in the response to *Fusarium* infection in garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Molecular Sciences*: 22. 6688.
14. Arasoglu, T.-Mansuroglu, B.-Derman, S.-Gumus, B.-Kocyigit, B.-Acar, T. -Kocacaliskan, I.: 2016. Enhancement of Antifungal Activity of Juglone (5-Hydroxy-1, 4-naphthoquinone) Using a Poly (d, l-lactic-co-glycolic acid)(PLGA) Nanoparticle System. *Journal of agricultural and food chemistry*: 64. 7087-7094.
15. Arguello, J.-Ledesma, A. -Bottini, R.: 1991. Hormonal regulation of dormancy in garlic (*Allium sativum* L.) cv Rosado Paraguayo. *Agriscientia*: 8.
16. Aroca, R.-del Mar Alguacil, M.-Vernieri, P. -Ruiz-Lozano, J. M.: 2008. Plant responses to drought stress and exogenous ABA application are modulated differently by mycorrhization in tomato and an ABA-deficient mutant (sitiens). *Microbial Ecology*: 56. 704-719.
17. Asano, T.-Nguyen, T. H.-N.-Yasuda, M.-Sidiq, Y.-Nishimura, K.-Nakashita, H. -Nishiuchi, T.: 2020. Arabidopsis MAPKKK δ -1 is required for full immunity against bacterial and fungal infection. *Journal of Experimental Botany*: 71. 2085-2097.
18. Aslan, M.-Ertas, N. -Demir, M. K.: 2023. Storage stability, heat stability, controlled release and antifungal activity of liposomes as alternative fungal preservation agents. *Food Bioscience*: 51. 102281.
19. Atallah, J.-Plachetzki, D. C.-Jasper, W. C. -Johnson, B. R.: 2013. The utility of shallow RNA-seq for documenting differential gene expression in genes with high and low levels of expression. *PLoS One*: 8. e84160.
20. Atif, M. J.-Amin, B.-Ghani, M. I.-Ali, M.-Liu, X.-Zhang, Y. -Cheng, Z.: 2021. *Allium sativum* L.(Garlic) bulb enlargement as influenced by differential combinations of photoperiod and temperature. *Food Chemistry*: 338. 127991.
21. Azevedo, C.-Santos-Rosa, M. J. -Shirasu, K.: 2001. The U-box protein family in plants. *Trends in plant science*: 6. 354-358.
22. Barr, Z. K.-Werner, T. -Tilsner, J.: 2023. Heavy metal-associated isoprenylated plant proteins (HIPPs) at plasmodesmata: exploring the link between localization and function. *Plants*: 12. 3015.
23. Beckers, G. J. -Conrath, U.: 2007. Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current opinion in plant biology*: 10. 425-431.

24. Beckman, E. J.: 2004. Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. *The Journal of Supercritical Fluids*: 28. 121-191.
25. Ben-Jabeur, M.-Vicente, R.-López-Cristoffanini, C.-Alesami, N.-Djéballi, N.-Gracia-Romero, A.-Serret, M. D.-López-Carbonell, M.-Araus, J. L. -Hamada, W.: 2019. A novel aspect of essential oils: coating seeds with thyme essential oil induces drought resistance in wheat. *Plants*: 8. 371.
26. Bergeson, L. L.: 2010. Nanosilver: US EPA's pesticide office considers how best to proceed. *Environmental Quality Management*: 19.
27. Bergler, J. -Hoth, S.: 2011. Plant U-box armadillo repeat proteins AtPUB18 and AtPUB19 are involved in salt inhibition of germination in *Arabidopsis*. *Plant Biology*: 13. 725-730.
28. Bertini, L.-Caporale, C.-Testa, M.-Proietti, S. -Caruso, C.: 2009. Structural basis of the antifungal activity of wheat PR4 proteins. *Febs Letters*: 583. 2865-2871.
29. Bett, P. K.-Deng, A. L.-Ogendo, J. O.-Kariuki, S. T.-Kamatenesi-Mugisha, M.-Mihale, J. M. -Torto, B.: 2017. Residual contact toxicity and repellence of *Cupressus lusitanica* Miller and *Eucalyptus saligna* Smith essential oils against major stored product insect pests. *Industrial Crops and Products*: 110. 65-74.
30. Biselli, C.-Bagnaresi, P.-Faccioli, P.-Hu, X.-Balcerzak, M.-Mattera, M. G.-Yan, Z.-Ouellet, T.-Cattivelli, L. -Valè, G.: 2018. Comparative transcriptome profiles of near-isogenic hexaploid wheat lines differing for effective alleles at the 2DL FHB resistance QTL. *Frontiers in plant science*: 9. 37.
31. Boba, A.-Kostyn, K.-Kozak, B.-Wojtasik, W.-Preisner, M.-Prescha, A.-Gola, E. M.-Lysh, D.-Dudek, B. -Szopa, J.: 2020. Fusarium oxysporum infection activates the plastidial branch of the terpenoid biosynthesis pathway in flax, leading to increased ABA synthesis. *Planta*: 251. 1-14.
32. Bolger, A. M.-Lohse, M. -Usadel, B.: 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*: 30. 2114-2120.
33. Borlinghaus, J.-Albrecht, F.-Gruhlke, M. C.-Nwachukwu, I. D. -Slusarenko, A. J.: 2014. Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules*: 19. 12591-12618.
34. Bravi, E.-Perretti, G.-Falconi, C.-Marconi, O. -Fantozzi, P.: 2017. Antioxidant effects of supercritical fluid garlic extracts in sunflower oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 97. 102-107.
35. Brunner, G.: 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of food engineering*: 67. 21-33.
36. Bulgakov, V. P.-Wu, H.-C. -Jinn, T.-L.: 2019. Coordination of ABA and chaperone signaling in plant stress responses. *Trends in Plant Science*: 24. 636-651.

37. Calvo, P.-Nelson, L. -Kloepper, J. W.: 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and soil*: 383. 3-41.
38. Camara, M. C.-Campos, E. V. R.-Monteiro, R. A.-do Espirito Santo Pereira, A.-de Freitas Proença, P. L. -Fraceto, L. F.: 2019. Development of stimuli-responsive nano-based pesticides: emerging opportunities for agriculture. *Journal of nanobiotechnology*: 17. 1-19.
39. Campbell, P. I.: 1983. Toxicity of some charged lipids used in liposome preparations. *Cytobios*: 37. 21-26.
40. Cao, J.-Guenther, R. H.-Sit, T. L.-Lommel, S. A.-Opperman, C. H. -Willoughby, J. A.: 2015. Development of abamectin loaded plant virus nanoparticles for efficacious plant parasitic nematode control. *ACS applied materials & interfaces*: 7. 9546-9553.
41. Caporale, C.-Di Berardino, I.-Leonardi, L.-Bertini, L.-Cascone, A.-Buonocore, V. -Caruso, C.: 2004. Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity. *Febs Letters*: 575. 71-76.
42. Carbonero, P.-Díaz, I.-Vicente-Carbajosa, J.-Alfonso-Rubi, J.-Gaddour, K. -Lara, P.: 1999. Cereal α -amylase/trypsin inhibitors and transgenic insect resistance. In *Genetics and breeding for crop quality and resistance*: Springer. pp. 147-158.
43. Chakraborty, J.-Priya, P.-Dastidar, S. G. -Das, S.: 2018. Physical interaction between nuclear accumulated CC-NB-ARC-LRR protein and WRKY64 promotes EDS1 dependent *Fusarium* wilt resistance in chickpea. *Plant science*: 276. 111-133.
44. Chan, Z.: 2012. Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in *Arabidopsis*. *Genomics*: 100. 110-115.
45. Chaouch, R.-Kthiri, Z.-Soufi, S.-Jabeur, M. B. -Bettaieb, T.: 2023. Assessing the biostimulant effect of micro-algae and thyme essential oil during in-vitro and ex-vitro rooting of strawberry. *South African Journal of Botany*: 162. 120-128.
46. Chariou, P. L.-Dogan, A. B.-Welsh, A. G.-Saidel, G. M.-Baskaran, H. -Steinmetz, N. F.: 2019. Soil mobility of synthetic and virus-based model nanopesticides. *Nature nanotechnology*: 14. 712-718.
47. Chariou, P. L. -Steinmetz, N. F.: 2017. Delivery of pesticides to plant parasitic nematodes using tobacco mild green mosaic virus as a nanocarrier. *ACS nano*: 11. 4719-4730.
48. Chaudhary, C.-Sharma, N. -Khurana, P.: 2021. Decoding the wheat awn transcriptome and overexpressing Ta Rca1 β in rice for heat stress tolerance. *Plant Molecular Biology*: 105. 133-146.
49. Chawda, P. J.-Shi, J.-Xue, S. -Young Quek, S.: 2017. Co-encapsulation of bioactives for food applications. *Food Quality and Safety*: 1. 302-309.

50. Chen, C.-Zhang, G.-Dai, Z.-Xiang, Y.-Liu, B.-Bian, P.-Zheng, K.-Wu, Z. -Cai, D.: 2018. Fabrication of light-responsively controlled-release herbicide using a nanocomposite. *Chemical Engineering Journal*: 349. 101-110.
51. Chisholm, S. T.-Coaker, G.-Day, B. -Staskawicz, B. J.: 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*: 124. 803-814.
52. Chojnacka, K.-Michalak, I.-Dmytryk, A.-Wilk, R. -Gorecki, H.: 2014. Innovative natural plant growth biostimulants Houston, U.S.A: Studium Press LLC.
53. Chowdhury, S.-Basu, A. -Kundu, S.: 2017. Overexpression of a new osmotin-like protein gene (SindOLP) confers tolerance against biotic and abiotic stresses in sesame. *Frontiers in Plant Science*: 8. 410.
54. Conrath, U.-Beckers, G. J.-Langenbach, C. J. -Jaskiewicz, M. R.: 2015. Priming for enhanced defense. *Annual review of phytopathology*: 53. 97-119.
55. Cui, G.-Zhao, X.-Liu, S.-Sun, F.-Zhang, C. -Xi, Y.: 2017. Beneficial effects of melatonin in overcoming drought stress in wheat seedlings. *Plant Physiology and biochemistry*: 118. 138-149.
56. Curtis, H.-Noll, U.-Störmann, J. -Slusarenko, A. J.: 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and molecular plant pathology*: 65. 79-89.
57. Cutler, S. R.-Rodriguez, P. L.-Finkelstein, R. R. -Abrams, S. R.: 2010. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual review of plant biology*: 61. 651-679.
58. Cuzick, A.-Maguire, K. -Hammond-Kosack, K. E.: 2009. Lack of the plant signalling component SGT1b enhances disease resistance to *Fusarium culmorum* in *Arabidopsis* buds and flowers. *New Phytologist*: 181. 901-912.
59. de Abreu-Neto, J. B.-Turchetto-Zolet, A. C.-de Oliveira, L. F. V.-Bodanese Zanettini, M. H. -Margis-Pinheiro, M.: 2013. Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants. *The FEBS journal*: 280. 1604-1616.
60. de Jesús-Pires, C.-Ferreira-Neto, J. R.-Pacífico Bezerra-Neto, J.-Kido, E. A.-de Oliveira Silva, R. L.-Pandolfi, V.-Wanderley-Nogueira, A. C.-Binneck, E.-da Costa, A. F. -Pio-Ribeiro, G.: 2020. Plant thaumatin-like proteins: function, evolution and biotechnological applications. *Current Protein and Peptide Science*: 21. 36-51.
61. de Oliveira, J. L.-Campos, E. V. R.-Bakshi, M.-Abhilash, P. -Fraceto, L. F.: 2014. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises. *Biotechnology advances*: 32. 1550-1561.
62. de Souza, S. C. R.-Sodek, L.-Polacco, J. C. -Mazzafera, P.: 2020. Urease deficiency alters nitrogen metabolism and gene expression in urease-null soybean without affecting growth or productivity under nitrate supply. *Acta physiologiae plantarum*: 42. 1-11.

63. Decsi, K.-Hegedűs, G.-Kutasy, B. -Virág, E.: 2022. RNA-seq datasets of field rapeseed (*Brassica napus*) cultures conditioned by Elice16Indures® biostimulator. *Data in Brief*: 45. 108602.
64. Deng, Y. -Lu, S.: 2017. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants. *Critical reviews in plant sciences*: 36. 257-290.
65. Desoky, E.-S. M.-ElSayed, A. I.-Merwad, A.-R. M. -Rady, M. M.: 2019. Stimulating antioxidant defenses, antioxidant gene expression, and salt tolerance in *Pisum sativum* seedling by pretreatment using licorice root extract (LRE) as an organic biostimulant. *Plant physiology and biochemistry*: 142. 292-302.
66. Di, X.-Takken, F. L. -Tintor, N.: 2016. How phytohormones shape interactions between plants and the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in plant science*: 7. 170.
67. Dias, M. C.-Pinto, D. C.-Correia, C.-Moutinho-Pereira, J.-Oliveira, H.-Freitas, H.-Silva, A. M. -Santos, C.: 2018. UV-B radiation modulates physiology and lipophilic metabolite profile in *Olea europaea*. *Journal of plant physiology*: 222. 39-50.
68. Diretto, G.-Rubio-Moraga, A.-Argandoña, J.-Castillo, P.-Gómez-Gómez, L. -Ahrazem, O.: 2017. Tissue-specific accumulation of sulfur compounds and saponins in different parts of garlic cloves from purple and white ecotypes. *Molecules*: 22. 1359.
69. Divya, B.-Suman, B.-Venkataswamy, M. -Thyagaraju, K.: 2017. A study on phytochemicals, functional groups and mineral composition of *Allium sativum* (garlic) cloves. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*: 9. 42-45.
70. Dooner, H. K.-Robbins, T. P. -Jorgensen, R. A.: 1991. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annual review of genetics*: 25. 173-199.
71. Douchkov, D.-Johrde, A.-Nowara, D.-Himmelbach, A.-Lueck, S.-Niks, R. -Schweizer, P.: 2011. Convergent evidence for a role of WIR1 proteins during the interaction of barley with the powdery mildew fungus *Blumeria graminis*. *Journal of plant physiology*: 168. 20-29.
72. Du Jardin, P.: 2015. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*: 196. 3-14.
73. Du Jardin, P.-Xu, L. -Geelen, D.: 2020. Agricultural Functions and Action Mechanisms of Plant Biostimulants (PBs) an Introduction. *The Chemical Biology of Plant Biostimulants*. 1-30.
74. Dutta, P.: 2018. Seed priming: new vistas and contemporary perspectives. In *Advances in seed priming*: Springer. pp. 3-22.
75. e Santos, P. C.-Granero, F. O.-Junior, J. L. B.-Pavarini, R.-Pavarini, G. M. P.-Chorilli, M.-Zambom, C. R.-Silva, L. P. -da Silva, R. M. G.: 2022. Insecticidal activity of

Tagetes erecta and *Tagetes patula* extracts and fractions free and microencapsulated. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*: 45. 102511.

76. Elzaawely, A. A.-Ahmed, M. E.-Maswada, H. F.-Al-Araby, A. A. -Xuan, T. D.: 2018. Growth traits, physiological parameters and hormonal status of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sprayed with garlic cloves extract. *Archives of Agronomy and Soil Science*: 64. 1068-1082.

77. Emami, S.-Azadmard-Damirchi, S.-Peighambaroust, S. H.-Valizadeh, H. -Hesari, J.: 2016. Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *Journal of Experimental Nanoscience*: 11. 737-759.

78. Erb, M.: 2019. Plant biology: evolution of volatile-mediated plant–plant interactions. *Current Biology*: 29. R873-R875.

79. Erdayani, E.-Nagarajan, R.-Grant, N. P. -Gill, K. S.: 2020. Genome-wide analysis of the HSP101/CLPB gene family for heat tolerance in hexaploid wheat. *Scientific reports*: 10. 1-17.

80. Eyhorn, F.-Muller, A.-Reganold, J. P.-Frison, E.-Herren, H. R.-Luttikholt, L.-Mueller, A.-Sanders, J.-Scialabba, N. E.-H. -Seufert, V.: 2019. Sustainability in global agriculture driven by organic farming. *Nature Sustainability*: 2. 253-255.

81. Faraji, Z.-Shakarami, J.-Varshosaz, J. -Jafari, S.: 2020. Encapsulation of essential oils of *Mentha pulegium* and *Ferula gummosa* using nanoliposome technology as a safe botanical pesticide. *Journal of Applied Biotechnology Reports*: 7. 237-242.

82. Fenibo, E. O.-Ijoma, G. N. -Matambo, T.: 2021. Biopesticides in sustainable agriculture: A critical sustainable development driver governed by green chemistry principles. *Frontiers in Sustainable Food Systems*: 5. 619058.

83. Franzoni, G.-Cocetta, G.-Trivellini, A. -Ferrante, A.: 2019. Transcriptional regulation in rocket leaves as affected by salinity. *Plants*: 9. 20.

84. Fujita, M.-Fujita, Y.-Noutoshi, Y.-Takahashi, F.-Narusaka, Y.-Yamaguchi-Shinozaki, K. -Shinozaki, K.: 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in plant biology*: 9. 436-442.

85. Fujita, Y.-Fujita, M.-Shinozaki, K. -Yamaguchi-Shinozaki, K.: 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of plant research*: 124. 509-525.

86. Gao, S.-Gao, J.-Zhu, X.-Song, Y.-Li, Z.-Ren, G.-Zhou, X. -Kuai, B.: 2016. ABF2, ABF3, and ABF4 promote ABA-mediated chlorophyll degradation and leaf senescence by transcriptional activation of chlorophyll catabolic genes and senescence-associated genes in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*: 9. 1272-1285.

87. *García, M.-Donadel, O. J.-Ardanaz, C. E.-Tonn, C. E. -Sosa, M. E.:* 2005. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*: 61. 612-618.
88. *Garibaldi, L. A.-Pérez-Méndez, N.-Garratt, M. P.-Gemmill-Herren, B.-Miguez, F. E. -Dicks, L. V.:* 2019. Policies for ecological intensification of crop production. *Trends in ecology & evolution*: 34. 282-286.
89. *Gilmour, S. J.-Fowler, S. G. -Thomashow, M. F.:* 2004. *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant molecular biology*: 54. 767-781.
90. *Glazebrook, J.:* 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*: 43. 205-227.
91. *Glazebrook, J.-Chen, W.-Estes, B.-Chang, H. S.-Nawrath, C.-Métraux, J. P.-Zhu, T. -Katagiri, F.:* 2003. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal*: 34. 217-228.
92. *Godlewska, K.-Ronga, D. -Michalak, I.:* 2021. Plant extracts-importance in sustainable agriculture. *Italian Journal of Agronomy*: 16(2).
93. *Gong, Q.-Yang, Z.-Chen, E.-Sun, G.-He, S.-Butt, H. I.-Zhang, C.-Zhang, X.-Yang, Z. -Du, X.:* 2018. A phi-class glutathione S-transferase gene for *Verticillium* wilt resistance in *Gossypium arboreum* identified in a genome-wide association study. *Plant and Cell Physiology*: 59. 275-289.
94. *González-Diéguez, D. O. -Orozco, C.:* 2020. Identificación de marcadores moleculares (SNP) y genes candidatos asociados a la tolerancia genética al complejo mancha de asfalto en variedades nativas de maíz (*Zea mays* L.). *Ciencia, Tecnología y Salud*: 7. 218-235.
95. *González-Morales, S.-Solís-Gaona, S.-Valdés-Caballero, M. V.-Juárez-Maldonado, A.-Loredo-Treviño, A. -Benavides-Mendoza, A.:* 2021. Transcriptomics of biostimulation of plants under abiotic stress. *Frontiers in Genetics*: 12. 583888.
96. *Gortzi, O.-Lalas, S.-Chinou, I. -Tsaknis, J.:* 2007. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes. *Molecules*: 12. 932-945.
97. *Goyer, A.:* 2010. Thiamine in plants: aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*: 71. 1615-1624.
98. *Grabherr, M. G.-Haas, B. J.-Yassour, M.-Levin, J. Z.-Thompson, D. A.-Amit, I.-Adiconis, X.-Fan, L.-Raychowdhury, R. -Zeng, Q.:* 2011. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology*: 29. 644.

99. Guan, F.-Shi, B.-Zhang, J. -Wan, X.: 2023. Transcriptome analysis provides insights into lignin synthesis and MAPK signaling pathway that strengthen the resistance of bitter melon (*Momordica charantia*) to Fusarium wilt. *Genomics*: 115. 110538.
100. Gullner, G.-Komives, T.-Király, L. -Schröder, P.: 2018. Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. *Frontiers in plant science*. 1836.
101. Guo, X.-Liu, D. -Chong, K.: 2018. Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation. *Journal of integrative plant biology*: 60. 745-756.
102. Gutbrodt, B.-Dorn, S.-Unsicker, S. B. -Mody, K.: 2012. Species-specific responses of herbivores to within-plant and environmentally mediated between-plant variability in plant chemistry. *Chemoecology*: 22. 101-111.
103. Hála, M. -Žárský, V.: 2019. Protein prenylation in plant stress responses. *Molecules*: 24. 3906.
104. Han, Y.-Huang, K.-Liu, Y.-Jiao, T.-Ma, G.-Qian, Y.-Wang, P.-Dai, X.-Gao, L. -Xia, T.: 2017. Functional analysis of two flavanone-3-hydroxylase genes from *Camellia sinensis*: a critical role in flavonoid accumulation. *Genes*: 8. 300.
105. Hanachi, A.-Bianchi, A.-Kahn, C. J.-Velot, E.-Arab-Tehrany, E.-Cakir-Kiefer, C. -Linder, M.: 2022. Encapsulation of Salmon Peptides in Marine Liposomes: Physico-Chemical Properties, Antiradical Activities and Biocompatibility Assays. *Marine Drugs*: 20. 249.
106. Hao, G. P.-Zhang, X. H.-Wang, Y. Q.-Wu, Z. Y. -Huang, C. L.: 2009. Nucleotide variation in the NCED3 region of *Arabidopsis thaliana* and its association study with abscisic acid content under drought stress. *Journal of integrative plant biology*: 51. 175-183.
107. Harrison, M. A.: 2012. Cross-talk between phytohormone signaling pathways under both optimal and stressful environmental conditions. *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*. 49-76.
108. Hashem, A. H.-Abdelaziz, A. M.-Hassanin, M. M.-Al-Askar, A. A.-AbdElgawad, H. -Attia, M. S.: 2023. Potential Impacts of Clove Essential Oil Nanoemulsion as Bio Fungicides against *Neoscytalidium* Blight Disease of *Carum carvi* L. *Agronomy*: 13. 1114.
109. Hayat, S.-Ahmad, H.-Ali, M.-Hayat, K.-Khan, M. A. -Cheng, Z.: 2018b. Aqueous garlic extract as a plant biostimulant enhances physiology, improves crop quality and metabolite abundance, and primes the defense responses of receiver plants. *Applied Sciences*: 8. 1505.
110. Hayat, S.-Ahmad, H.-Ali, M.-Ren, K. -Cheng, Z.: 2018a. Aqueous garlic extract stimulates growth and antioxidant enzymes activity of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Scientia Horticulturae*: 240. 139-146.

111. Hayat, S.-Cheng, Z.-Ahmad, H.-Ali, M.-Chen, X. -Wang, M.: 2016. Garlic, from remedy to stimulant: evaluation of antifungal potential reveals diversity in phytoalexin allicin content among garlic cultivars; allicin containing aqueous garlic extracts trigger antioxidants in cucumber. *Frontiers in plant science*: 7. 1235.
112. Hincapié, C. A. L.-López, G. E. P. -Torres, R. C.: 2008. Comparison and characterization of garlic (*Allium sativum* L.) bulbs extracts and their effect on mortality and repellency of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Chilean Journal of Agricultural Research*: 68. 317-327.
113. Huang, Y.-Guo, Y.-Liu, Y.-Zhang, F.-Wang, Z.-Wang, H.-Wang, F.-Li, D.-Mao, D. -Luan, S.: 2018. 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3 regulates plant growth and enhances multi-abiotic stress tolerance in rice. *Frontiers in plant science*: 9. 162.
114. Humplik, J. F.-Bergougnoux, V. -Van Volkenburgh, E.: 2017. To stimulate or inhibit? That is the question for the function of abscisic acid. *Trends in Plant Science*: 22. 830-841.
115. Iuchi, S.-Kobayashi, M.-Taji, T.-Naramoto, M.-Seki, M.-Kato, T.-Tabata, S.-Kakubari, Y.-Yamaguchi-Shinozaki, K. -Shinozaki, K.: 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*: 27. 325-333.
116. Jain, D. -Khurana, J. P.: 2018. Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. In *Molecular aspects of plant-pathogen interaction*: Springer. pp. 265-281.
117. Jammes, F.-Song, C.-Shin, D.-Munemasa, S.-Takeda, K.-Gu, D.-Cho, D.-Lee, S.-Giordo, R. -Sritubtim, S.: 2009. MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proceedings of the National Academy of sciences*: 106. 20520-20525.
118. Jiang, J.-Ma, S.-Ye, N.-Jiang, M.-Cao, J. -Zhang, J.: 2017. WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *Journal of integrative plant biology*: 59. 86-101.
119. Jogaiah, S.-Singh, H. B.-Fernandes-Fraceto, L. -De Lima, R.: 2021. *Advances in nano-fertilizers and nano-pesticides in agriculture*: Elsevier.
120. Jones, J. D. -Dangl, J. L.: 2006. The plant immune system. *nature*: 444. 323-329.
121. Karny, A.-Zinger, A.-Kajal, A.-Shainsky-Roitman, J. -Schroeder, A.: 2018. Therapeutic nanoparticles penetrate leaves and deliver nutrients to agricultural crops. *Scientific Reports*: 8. 1-10.
122. Kasprzewska, A.: 2003. Plant chitinases-regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*: 8. 809-824.
123. Kemp, G.-Botha, A.-M.-Kloppers, F. -Pretorius, Z.: 1999. Disease development and β -1, 3-glucanase expression following leaf rust infection in resistant and susceptible near-isogenic wheat seedlings. *Physiological and Molecular Plant Pathology*: 55. 45-52.

124. Khatibi, S. A.-Misaghi, A.-Moosavy, M.-H.-Amoabediny, G. -Basti, A. A.: 2014. Effect of preparation methods on the properties of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil loaded nanoliposomes: characterization of size, encapsulation efficiency and stability. *Pharmaceutical Sciences*: 20. 141-148.
125. Kuettner, E. B.-Hilgenfeld, R. -Weiss, M. S.: 2002. The active principle of garlic at atomic resolution. *Journal of Biological Chemistry*: 277. 46402-46407.
126. Kumar, M.-Kesawat, M. S.-Ali, A.-Lee, S.-C.-Gill, S. S. -Kim, H. U.: 2019a. Integration of abscisic acid signaling with other signaling pathways in plant stress responses and development. *Plants*: 8. 592.
127. Kumar, S.-Nehra, M.-Dilbaghi, N.-Marrazza, G.-Hassan, A. A. -Kim, K.-H.: 2019b. Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. *Journal of Controlled Release*: 294. 131-153.
128. Kumar, S. -Singh, A.: 2015. Biopesticides: present status and the future prospects. *J Fertil Pestic*: 6. 1-2.
129. Kuromori, T.-Seo, M. -Shinozaki, K.: 2018. ABA transport and plant water stress responses. *Trends in plant science*: 23. 513-522.
130. Kutasy, B.-Decsi, K.-Hegedűs, G. -Virág, E.: 2023a. Dataset of conditioning effect of herbal extract-based plant biostimulants in pea (*Pisum sativum*). *Data in Brief*: 46. 108800.
131. Kutasy, B.-Decsi, K.-Kiniczky, M.-Hegedűs, G. -Virág, E.: 2022. Time-course gene expression profiling data of *Triticum aestivum* treated by supercritical CO₂ garlic extract encapsulated in nanoscale liposomes. *Data in Brief*. 108287.
132. Kutasy, B.-Kiniczky, M.-Decsi, K.-Kálmán, N.-Hegedűs, G.-Alföldi, Z. P. -Virág, E.: 2023b. 'Garlic-lipo'4Plants: Liposome-Encapsulated Garlic Extract Stimulates ABA Pathway and PR Genes in Wheat (*Triticum aestivum*). *Plants*: 12. 743.
133. Langmead, B. -Salzberg, S. L.: 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*: 9. 357-359.
134. Latef, A. A. H. A.-Alhmad, M. F. A. -Abdelfattah, K. E.: 2017. The possible roles of priming with ZnO nanoparticles in mitigation of salinity stress in lupine (*Lupinus termis*) plants. *Journal of Plant Growth Regulation*: 36. 60-70.
135. Latif, H. H.: 2014. Physiological responses of *Pisum sativum* plant to exogenous ABA application under drought conditions. *Pak J Bot*: 46. 973-982.
136. Lavanya, S. N.-Niranjan-Raj, S.-Jadimurthy, R.-Sudarsan, S.-Srivastava, R.-Tarasatyavati, C.-Rajashekara, H.-Gupta, V. K. -Nayaka, S. C.: 2022. Immunity elicitors for induced resistance against the downy mildew pathogen in pearl millet. *Scientific Reports*: 12. 4078.

137. Lawson, L. D.: 1998. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. *Blood*: 179. 62.
138. Lei, W.-Huang, S.-Tang, S.-Shui, X. -Chen, C.: 2016. Determination of abscisic acid and its relationship to drought stress based on cowpea varieties with different capability of drought resistance. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*: 12. 79-85.
139. Leslie, J. F. -Summerell, B. A.: 2008. The Fusarium laboratory manual 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA: Blackwell Publishing.
140. Li, B. -Dewey, C. N.: 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*: 12. 1-16.
141. Liang, W.-Yu, A.-Wang, G.-Zheng, F.-Hu, P.-Jia, J. -Xu, H.: 2018. A novel water-based chitosan-La pesticide nanocarrier enhancing defense responses in rice (*Oryza sativa* L) growth. *Carbohydrate polymers*: 199. 437-444.
142. Lin, L.-Cui, H.-Zhou, H.-Zhang, X.-Bortolini, C.-Chen, M.-Liu, L. -Dong, M.: 2015. Nanoliposomes containing Eucalyptus citriodora as antibiotic with specific antimicrobial activity. *Chemical Communications*: 51. 2653-2655.
143. Liu, B.-Xue, X.-Cui, S.-Zhang, X.-Han, Q.-Zhu, L.-Liang, X.-Wang, X.-Huang, L. -Chen, X.: 2010. Cloning and characterization of a wheat β -1, 3-glucanase gene induced by the stripe rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Biology Reports*: 37. 1045.
144. Liu, Y.-C.-Wu, Y.-R.-Huang, X.-H.-Sun, J. -Xie, Q.: 2011. AtPUB19, a U-box E3 ubiquitin ligase, negatively regulates abscisic acid and drought responses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant*: 4. 938-946.
145. Liu, Y.-Schiff, M. -Dinesh-Kumar, S.: 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.
146. Livak, K. J. -Schmittgen, T. D.: 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods*: 25. 402-408.
147. Lopes, A. I.-Monteiro, M.-Araújo, A. R.-Rodrigues, A. R. O.-Castanheira, E. M.-Pereira, D. M.-Olim, P.-Fortes, A. G. -Gonçalves, M. S. T.: 2020. Cytotoxic plant extracts towards insect cells: Bioactivity and nanoencapsulation studies for application as biopesticides. *Molecules*: 25. 5855.
148. Lu, C.-A.-Lin, C.-C.-Lee, K.-W.-Chen, J.-L.-Huang, L.-F.-Ho, S.-L.-Liu, H.-J.-Hsing, Y.-I. -Yu, S.-M.: 2007. The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. *The Plant Cell*: 19. 2484-2499.
149. Lu, Q.-Lu, P.-M.-Piao, J.-H.-Xu, X.-L.-Chen, J.-Zhu, L. -Jiang, J.-G.: 2014. Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior. *LWT-Food science and technology*: 57. 686-695.

150. Lu, S.-Friesen, T. L. -Faris, J. D.: 2011. Molecular characterization and genomic mapping of the pathogenesis-related protein 1 (PR-1) gene family in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Genetics and Genomics*: 285. 485-503.
151. Lutikholt, L. -Mapusua, K.: 2021. Annual Report 2021 Charles-de-Gaulle-Strasse 5
53113 Bonn
Germany: IFOAM - Organics International.
152. Ma, Y.-Dias, M. C. -Freitas, H.: 2020. Drought and salinity stress responses and microbe-induced tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*: 11. 591911.
153. Mair, A.-Pedrotti, L.-Wurzing, B.-Anrather, D.-Simeunovic, A.-Weiste, C.-Valerio, C.-Dietrich, K.-Kirchler, T. -Nägele, T.: 2015. SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *elife*: 4. e05828.
154. Makkar, H. P.-Siddhuraju, P. -Becker, K.: 2007. Plant secondary metabolites, Vol 393 Humana Totowa, NJ: Springer.
155. Manchikanti, P.: 2019. Bioavailability and environmental safety of nanobiopesticides. *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives*. 207-222.
156. Marshall, J.-Zhang, H.-Khazaei, H.-Mikituk, K. -Vandenberg, A.: 2021. Targeted quantification of B vitamins using ultra-performance liquid chromatography-selected reaction monitoring mass spectrometry in faba bean seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*: 95. 103687.
157. Maruyama, K.-Sakuma, Y.-Kasuga, M.-Ito, Y.-Seki, M.-Goda, H.-Shimada, Y.-Yoshida, S.-Shinozaki, K. -Yamaguchi-Shinozaki, K.: 2004. Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal*: 38. 982-993.
158. Mattos, B. D.-Tardy, B. L.-Magalhaes, W. L. -Rojas, O. J.: 2017. Controlled release for crop and wood protection: Recent progress toward sustainable and safe nanostructured biocidal systems. *Journal of Controlled Release*: 262. 139-150.
159. Mattos, B. D.-Tardy, B. L.-Pezhman, M.-Kämäräinen, T.-Linder, M.-Schreiner, W. H.-Magalhães, W. L. -Rojas, O. J.: 2018. Controlled biocide release from hierarchically-structured biogenic silica: surface chemistry to tune release rate and responsiveness. *Scientific reports*: 8. 5555.
160. Mátyás, K. K.-Hegedűs, G.-Taller, J.-Farkas, E.-Decsi, K.-Kutasy, B.-Kálmán, N.-Nagy, E.-Kolics, B. -Virág, E.: 2019. Different expression pattern of flowering pathway genes contribute to male or female organ development during floral transition in the monoecious weed *Ambrosia artemisiifolia* L. (*Asteraceae*). *PeerJ*: 7. e7421.
161. Matyjaszczyk, E.: 2023. Legislative situation of botanicals used in plant protection in the European Union. *Journal of Plant Diseases and Protection*: 130. 443-447.

162. *Mauch-Mani, B. -Mauch, F.*: 2005. The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current opinion in plant biology*: 8. 409-414.
163. *Mayer, L. D.-Bally, M. B.-Hope, M. J. -Cullis, P. R.*: 1986. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chemistry and physics of lipids*: 40. 333-345.
164. *McWha, J. -Jackson, D.*: 1976. Some growth promotive effects of abscisic acid. *Journal of experimental botany*: 27. 1004-1008.
165. *Medina, J.-Catalá, R. -Salinas, J.*: 2011. The CBFs: three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate. *Plant Science*: 180. 3-11.
166. *Meng, X.-Xu, J.-He, Y.-Yang, K.-Y.-Mordorski, B.-Liu, Y. -Zhang, S.*: 2013. Phosphorylation of an ERF transcription factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance. *The Plant Cell*: 25. 1126-1142.
167. *Michalak, I.-Chojnacka, K.-Dmytryk, A.-Wilk, R.-Gramza, M. -Rój, E.*: 2016. Evaluation of supercritical extracts of algae as biostimulants of plant growth in field trials. *Frontiers in plant science*: 7. 1591.
168. *Michalak, I.-Chojnacka, K. -Saeid, A.*: 2017. Plant growth biostimulants, dietary feed supplements and cosmetics formulated with supercritical CO₂ algal extracts. *Molecules*: 22. 66.
169. *Miron, T.-Rabinkov, A.-Mirelman, D.-Wilchek, M. -Weiner, L.*: 2000. The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*: 1463. 20-30.
170. *Mohamed, M. H.-Badr, E. A.-Sadak, M. S. -Khedr, H. H.*: 2020. Effect of garlic extract, ascorbic acid and nicotinamide on growth, some biochemical aspects, yield and its components of three faba bean (*Vicia faba* L.) cultivars under sandy soil conditions. *Bulletin of the National Research Centre*: 44. 1-8.
171. *Mohammadi, M.-Haghirosadat, B. F.-larypoor, M.-Ehsani, R.-Yazdian, F.-Rashedi, H.-Jahanizadeh, S. -Rahmani, A.*: 2020. Synthesis, characterization and evaluation of liponiosome containing ginger extract as a new strategy for potent antifungal formulation. *Journal of Cluster Science*: 31. 971-981.
172. *Mohanty, B.*: 2022. Genomic architecture of promoters and transcriptional regulation of candidate genes in rice involved in tolerance to anaerobic germination. *Current Plant Biology*: 29. 100236.
173. *Moon, H.-Lee, B.-Choi, G.-Shin, D.-Prasad, D. T.-Lee, O.-Kwak, S.-S.-Kim, D. H.-Nam, J. -Bahk, J.*: 2003. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 100. 358-363.

174. Moon, S.-J.-Min, M. K.-Kim, J.-Kim, D. Y.-Yoon, I. S.-Kwon, T. R.-Byun, M. O. -Kim, B.-G.: 2019. Ectopic expression of OsDREB1G, a member of the OsDREB1 subfamily, confers cold stress tolerance in rice. *Frontiers in plant science*: 10. 297.
175. Mougou, I. -Boughalleb-M'hamdi, N.: 2018. Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affecting citrus orchards in Tunisia by using indigenous *Bacillus* spp. and garlic extract. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*: 28. 1-11.
176. Mozafari, M. R.: 2006. Nanocarrier technologies: frontiers of nanotherapy: Springer.
177. Mrowicka, M.-Mrowicki, J.-Dragan, G. -Majsterek, I.: 2023. The importance of thiamine (vitamin B1) in humans. *Bioscience Reports*: 43. BSR20230374.
178. Müller, M. -Munné-Bosch, S.: 2015. Ethylene response factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant physiology*: 169. 32-41.
179. Naz, R.-Bano, A.-Wilson, N. L.-Guest, D. -Roberts, T. H.: 2014. Pathogenesis-related protein expression in the apoplast of wheat leaves protected against leaf rust following application of plant extracts. *Phytopathology*: 104. 933-944.
180. Nguyen, H. M.-Hwang, I. C.-Park, J. W. -Park, H. J.: 2012. Photoprotection for deltamethrin using chitosan-coated beeswax solid lipid nanoparticles. *Pest management science*: 68. 1062-1068.
181. Nueda, M. J.-Tarazona, S. -Conesa, A.: 2014. Next maSigPro: updating maSigPro bioconductor package for RNA-seq time series. *Bioinformatics*: 30. 2598-2602.
182. Nuruzzaman, M.-Liu, Y.-Rahman, M. M.-Dharmarajan, R.-Duan, L.-Uddin, A. F. M. J. -Naidu, R.: 2019. Nanobiopesticides: Composition and preparation methods. In *Nano-biopesticides today and future perspectives*: Elsevier. pp. 69-131.
183. Nuruzzaman, M.-Rahman, M. M.-Liu, Y. -Naidu, R.: 2016. Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. *Journal of agricultural and food chemistry*: 64. 1447-1483.
184. Olusanmi, M. -Amadi, J.: 2010. Studies on the antimicrobial properties and phytochemical screening of garlic (*Allium sativum*) extracts. *Ethnobotanical leaflets*: 2009. 10.
185. Owens, D. K.-Crosby, K. C.-Runac, J.-Howard, B. A. -Winkel, B. S.: 2008. Biochemical and genetic characterization of *Arabidopsis* flavanone 3 β -hydroxylase. *Plant Physiology and Biochemistry*: 46. 833-843.
186. Panahi, Y.-Farshbaf, M.-Mohammadhosseini, M.-Mirahadi, M.-Khalilov, R.-Saghfi, S. -Akbarzadeh, A.: 2017. Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*: 45. 788-799.

187. Pang, L.-Gao, Z.-Feng, H.-Wang, S. -Wang, Q.: 2019. Cellulose based materials for controlled release formulations of agrochemicals: a review of modifications and applications. *Journal of Controlled Release*: 316. 105-115.
188. Pasini, L.-Bergonti, M.-Fracasso, A.-Marocco, A. -Amaducci, S.: 2014. Microarray analysis of differentially expressed mRNAs and miRNAs in young leaves of sorghum under dry-down conditions. *Journal of plant physiology*: 171. 537-548.
189. Pasquer, F.: 2005. Effects of plant protection compounds on wheat gene expression: University of Zurich.
190. Peng, X.-Wu, D.-Zhang, X.-Liu, Q.-Lu, Q. -Song, M.: 2022. Identification and Characterization of the HD-Zip Gene Family and Dimerization Analysis of HB7 and HB12 in *Brassica napus* L. *Genes*: 13. 2139.
191. Perczak, A.-Gwiazdowska, D.-Marchwińska, K.-Juś, K.-Gwiazdowski, R. - Waśkiewicz, A.: 2019. Antifungal activity of selected essential oils against *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and their secondary metabolites in wheat seeds. *Archives of microbiology*: 201. 1085-1097.
192. Perello, A. E.-Noll, U. -Slusarenko, A. J.: 2013. In vitro efficacy of garlic extract to control fungal pathogens of wheat. *Journal of Medicinal Plants Research*: 7.
193. Pfaller, M.-Messer, S.-Mills, K. -Bolmstrom, A.: 2000. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *Journal of Clinical Microbiology*: 38. 3359-3361.
194. Pieterse, C. M.-Zamioudis, C.-Berendsen, R. L.-Weller, D. M.-Van Wees, S. C. - Bakker, P. A.: 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*: 52. 347-375.
195. Pinilla, C. M. B. -Brandelli, A.: 2016. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. *Innovative food science & emerging technologies*: 36. 287-293.
196. Pinilla, C. M. B.-Thys, R. C. S. -Brandelli, A.: 2019. Antifungal properties of phosphatidylcholine-oleic acid liposomes encapsulating garlic against environmental fungal in wheat bread. *International Journal of Food Microbiology*: 293. 72-78.
197. Qiao, F.-Yang, X.-Xu, F.-Huang, Y.-Zhang, J.-Song, M.-Zhou, S.-Zhang, M. -He, D.: 2021. TMT-based quantitative proteomic analysis reveals defense mechanism of wheat against the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *BMC Plant Biology*: 21. 1-17.
198. Rakwal, R.-Agrawal, G. K. -Jwa, N.-S.: 2001. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman–Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. *Gene*: 263. 189-198.

199. Rapala-Kozik, M.-Wolak, N.-Kujda, M. -Banas, A. K.: 2012. The upregulation of thiamine (vitamin B1) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings under salt and osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. *BMC plant biology*: 12. 1-14.
200. Robinson, M. D.-McCarthy, D. J. -Smyth, G. K.: 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *bioinformatics*: 26. 139-140.
201. Rouphael, Y. -Colla, G.: 2020. Biostimulants in agriculture. *Frontiers in plant science*: 11. 40.
202. Rustérucci, C.-Aviv, D. H.-Holt III, B. F.-Dangl, J. L. -Parker, J. E.: 2001. The disease resistance signaling components EDS1 and PAD4 are essential regulators of the cell death pathway controlled by LSD1 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*: 13. 2211-2224.
203. Sah, S. K.-Reddy, K. R. -Li, J.: 2016. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in plant science*: 7. 571.
204. Sakuma, Y.-Liu, Q.-Dubouzet, J. G.-Abe, H.-Shinozaki, K. -Yamaguchi-Shinozaki, K.: 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*: 290. 998-1009.
205. Sani, I. K.-Pirsa, S. -Tađi, Š.: 2019. Preparation of chitosan/zinc oxide/*Melissa officinalis* essential oil nano-composite film and evaluation of physical, mechanical and antimicrobial properties by response surface method. *Polymer Testing*: 79. 106004.
206. Sarfraz, M.-Nasim, M. J.-Jacob, C. -Gruhlke, M. C.: 2020. Efficacy of allicin against plant pathogenic fungi and unveiling the underlying mode of action employing yeast based chemogenetic profiling approach. *Applied Sciences*: 10. 2563.
207. Sarić-Krsmanović, M.-Gajić-Umiljendić, J.-Radivojević, L.-Šantrić, L.-Đorđević, T. -Đurović-Pejčev, R.: 2023. Sensitivity of *Cuscuta* species and their hosts to *Anethum graveolens* essential oil. *Pesticidi i fitomedicina*: 38. 33-39.
208. Seiber, J. N.-Coats, J.-Duke, S. O. -Gross, A. D.: 2014. Biopesticides: state of the art and future opportunities. *Journal of agricultural and food chemistry*: 62. 11613-11619.
209. Seo, D. H.-Ahn, M. Y.-Park, K. Y.-Kim, E. Y. -Kim, W. T.: 2016. The N-terminal UND motif of the *Arabidopsis* U-box E3 ligase PUB18 is critical for the negative regulation of ABA-mediated stomatal movement and determines its ubiquitination specificity for exocyst subunit Exo70B1. *The Plant Cell*: 28. 2952-2973.
210. Šernaitė, L.: 2017. Plant extracts: antimicrobial and antifungal activity and appliance in plant protection. *Sodinink Daržinink*: 36. 58-68.
211. Šernaitė, L.-Rasiukevičiūtė, N. -Valiuškaitė, A.: 2020. The Extracts of cinnamon and clove as potential biofungicides against strawberry grey mould. *Plants*: 9. 613.

212. Shakiba, S.-Astete, C. E.-Paudel, S.-Sabliov, C. M.-Rodrigues, D. F. -Louie, S. M.: 2020. Emerging investigator series: polymeric nanocarriers for agricultural applications: synthesis, characterization, and environmental and biological interactions. *Environmental Science: Nano*: 7. 37-67.
213. Shang, A.-Cao, S.-Y.-Xu, X.-Y.-Gan, R.-Y.-Tang, G.-Y.-Corke, H.-Mavumengwana, V. -Li, H.-B.: 2019. Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.). *Foods*: 8. 246.
214. Shen, Q.-Chen, C.-N.-Brands, A.-Pan, S.-M. -Tuan-Hua, D. H.: 2001. The stress- and abscisic acid-induced barley gene HVA22: developmental regulation and homologues in diverse organisms. *Plant molecular biology*: 45. 327-340.
215. Sible, C. N.-Seebauer, J. R. -Below, F. E.: 2021. Plant biostimulants: A categorical review, their implications for row crop production, and relation to soil health indicators. *Agronomy*: 11. 1297.
216. Siitonen, A.-Nieminen, F.-Kallio, V.-Tuccillo, F.-Kantanen, K.-Ramos-Diaz, J. M.-Jouppila, K.-Piironen, V.-Kariluoto, S. -Edelmann, M.: 2024. B Vitamins in Legume Ingredients and Their Retention in High Moisture Extrusion. *Foods*: 13. 637.
217. Singh, B. -Kaur, A.: 2018. Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: A review. *LWT* 87, 93–101.
218. Slusarenko, A. J.-Patel, A. -Portz, D.: 2008. Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. *Sustainable disease management in a European context*. 313-322.
219. Soussan, E.-Cassel, S.-Blanzat, M. -Rico-Lattes, I.: 2009. Drug delivery by soft matter: matrix and vesicular carriers. *Angewandte Chemie International Edition*: 48. 274-288.
220. Staneloni, R. J.-Rodriguez-Batiller, M. J. -Casal, J. J.: 2008. Abscisic acid, high-light, and oxidative stress down-regulate a photosynthetic gene via a promoter motif not involved in phytochrome-mediated transcriptional regulation. *Molecular plant*: 1. 75-83.
221. Subba, R. -Mathur, P.: 2022. Functional attributes of microbial and plant based biofungicides for the defense priming of crop plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*: 34. 301-333.
222. Sun, J. -Li, C.: 2014. Cross talk of signaling pathways between ABA and other phytohormones. *Abscisic acid: Metabolism, transport and signaling*. 243-253.
223. Sun, M.-Qiu, L.-Liu, Y.-Zhang, H.-Zhang, Y.-Qin, Y.-Mao, Y.-Zhou, M.-Du, X. -Qin, Z.: 2022. Pto interaction proteins: critical regulators in plant development and stress response. *Frontiers in Plant Science*: 13. 774229.

224. Suteu, D.-Rusu, L.-Zaharia, C.-Badeanu, M. -Daraban, G. M.: 2020. Challenge of utilization vegetal extracts as natural plant protection products. *Applied Sciences*: 10. 8913.
225. Suzuki, N.-Koussevitzky, S.-Mittler, R. -Miller, G.: 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, cell & environment*: 35. 259-270.
226. Tan, D.-X.-Hardeland, R.-Manchester, L. C.-Korkmaz, A.-Ma, S.-Rosales-Corral, S. -Reiter, R. J.: 2012. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *Journal of experimental botany*: 63. 577-597.
227. Travaglia, C.-Reinoso, H.-Cohen, A.-Luna, C.-Tommasino, E.-Castillo, C. -Bottini, R.: 2010. Exogenous ABA increases yield in field-grown wheat with moderate water restriction. *Journal of Plant Growth Regulation*: 29. 366-374.
228. Tunc-Ozdemir, M.-Miller, G.-Song, L.-Kim, J.-Sodek, A.-Koussevitzky, S.-Misra, A. N.-Mittler, R. -Shintani, D.: 2009. Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant physiology*: 151. 421-432.
229. Uarrota, V. G.-Stefen, D. L. V.-Leolato, L. S.-Gindri, D. M. -Nerling, D.: 2018. Revisiting carotenoids and their role in plant stress responses: from biosynthesis to plant signaling mechanisms during stress. *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*. 207-232.
230. ul Haq, S.-Khan, A.-Ali, M.-Khattak, A. M.-Gai, W.-X.-Zhang, H.-X.-Wei, A.-M. -Gong, Z.-H.: 2019. Heat shock proteins: dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *International journal of molecular sciences*: 20. 5321.
231. Ulusoy, S. -Akçay, M.: 2018. Simultaneous determination of vitamins B1 and B2 in food samples by modified cloud point extraction method and HPLC-DAD. *Food analytical methods*: 11. 260-269.
232. Urano, K.-Maruyama, K.-Ogata, Y.-Morishita, Y.-Takeda, M.-Sakurai, N.-Suzuki, H.-Saito, K.-Shibata, D. -Kobayashi, M.: 2009. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *The Plant Journal*: 57. 1065-1078.
233. van Loon, L. C.-Rep, M. -Pieterse, C. M.: 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual review of phytopathology*: 44. 135-162.
234. van Staden, J. -Bornman, C. H.: 1969. Inhibition and promotion by abscisic acid of growth in *Spirodela*. *Planta*: 85. 157-159.
235. Venugopal, S. C.-Jeong, R.-D.-Mandal, M. K.-Zhu, S.-Chandra-Shekara, A.-Xia, Y.-Hersh, M.-Stromberg, A. J.-Navarre, D. -Kachroo, A.: 2009. Enhanced disease susceptibility 1 and salicylic acid act redundantly to regulate resistance gene-mediated signaling. *PLoS genetics*: 5. e1000545.

236. Vlot, A. C.-Sales, J. H.-Lenk, M.-Bauer, K.-Brambilla, A.-Sommer, A.-Chen, Y.-Wenig, M. -Nayem, S.: 2021. Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist*: 229. 1234-1250.
237. Vogel, J. T.-Zarka, D. G.-Van Buskirk, H. A.-Fowler, S. G. -Thomashow, M. F.: 2005. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*: 41. 195-211.
238. Vogt, T.: 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*: 3. 2-20.
239. Vurro, M.-Miguel-Rojas, C. -Pérez-de-Luque, A.: 2019. Safe nanotechnologies for increasing the effectiveness of environmentally friendly natural agrochemicals. *Pest management science*: 75. 2403-2412.
240. Wang, J.-Hao, K.-Yu, F.-Shen, L.-Wang, F.-Yang, J. -Su, C.: 2022. Field application of nanoliposomes delivered quercetin by inhibiting specific hsp70 gene expression against plant virus disease. *Journal of nanobiotechnology*: 20. 1-16.
241. Wang, J.-Shine, M.-Gao, Q.-M.-Navarre, D.-Jiang, W.-Liu, C.-Chen, Q.-Hu, G. -Kachroo, A.: 2014. Enhanced disease susceptibility1 mediates pathogen resistance and virulence function of a bacterial effector in soybean. *Plant physiology*: 165. 1269-1284.
242. Weber, R. L. M.-Wiebke-Strohm, B.-Bredemeier, C.-Margis-Pinheiro, M.-de Brito, G. G.-Rechenmacher, C.-Bertagnolli, P. F.-de Sá, M. E. L.-Campos, M. d. A. -de Amorim, R. M. S.: 2014. Expression of an osmotin-like protein from *Solanum nigrum* confers drought tolerance in transgenic soybean. *BMC Plant Biology*: 14. 1-9.
243. Wingett, S. W. -Andrews, S.: 2018. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research*: 7. 1338.
244. Wojtasik, W.-Kulma, A.-Kostyn, K. -Szopa, J.: 2011. The changes in pectin metabolism in flax infected with *Fusarium*. *Plant Physiology and Biochemistry*: 49. 862-872.
245. Wu, S.-w.-Wang, H.-w.-Yang, Z.-d. -Kong, L.-r.: 2014. Expression comparisons of pathogenesis-related (PR) genes in wheat in response to infection/infestation by *Fusarium*, Yellow dwarf virus (YDV) aphid-transmitted and hessian fly. *Journal of Integrative Agriculture*: 13. 926-936.
246. Xie, M.-Sun, J.-Gong, D. -Kong, Y.: 2019. The roles of *Arabidopsis* C1-2i subclass of C2H2-type zinc-finger transcription factors. *Genes*: 10. 653.
247. Xing, D.-H.-Lai, Z.-B.-Zheng, Z.-Y.-Vinod, K.-Fan, B.-F. -Chen, Z.-X.: 2008a. Stress-and pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense. *Molecular plant*: 1. 459-470.
248. Xing, Y.-Jia, W. -Zhang, J.: 2008b. AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*: 54. 440-451.

249. Xu, Z.-Wang, C.-Xue, F.-Zhang, H. -Ji, W.: 2015. Wheat NAC transcription factor TaNAC29 is involved in response to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*: 96. 356-363.
250. Yakhin, O. I.-Lubyanov, A. A.-Yakhin, I. A. -Brown, P. H.: 2017. Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in plant science*: 7. 2049.
251. Yan, Q.-Cui, X.-Lin, S.-Gan, S.-Xing, H. -Dou, D.: 2016. GmCYP82A3, a soybean cytochrome P450 family gene involved in the jasmonic acid and ethylene signaling pathway, enhances plant resistance to biotic and abiotic stresses. *PloS one*: 11. e0162253.
252. Yan, S.-Hu, Q.-Li, J.-Chao, Z.-Cai, C.-Yin, M.-Du, X. -Shen, J.: 2019. A star polycation acts as a drug nanocarrier to improve the toxicity and persistence of botanical pesticides. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*: 7. 17406-17413.
253. Yang, F.-L.-Li, X.-G.-Zhu, F. -Lei, C.-L.: 2009. Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of agricultural and food chemistry*: 57. 10156-10162.
254. Ye, Y.-Cota-Ruiz, K.-Hernandez-Viezcas, J. A.-Valdes, C.-Medina-Velo, I. A.-Turley, R. S.-Peralta-Videa, J. R. -Gardea-Torresdey, J. L.: 2020. Manganese nanoparticles control salinity-modulated molecular responses in *Capsicum annuum* L. through priming: A sustainable approach for agriculture. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*: 8. 1427-1436.
255. Yi, G.-E.-Robin, A. H. K.-Yang, K.-Park, J.-I.-Hwang, B. H. -Nou, I.-S.: 2016. Exogenous methyl jasmonate and salicylic acid induce subspecies-specific patterns of glucosinolate accumulation and gene expression in *Brassica oleracea* L. *Molecules*: 21. 1417.
256. Yilar, M.-Bayan, Y.-Aksit, H.-Onaran, A.-Kadioglu, I. -Yanar, Y.: 2013. Bioherbicidal effects of essential oils isolated from *Thymus fallax* F., *Mentha dumetorum* Schult. and *Origanum vulgare* L.
257. Yoo, M.-Lee, S.-Kim, S.-Hwang, J.-B.-Choe, J. -Shin, D.: 2014. Composition of organosulfur compounds from cool-and warm-type garlic (*Allium sativum* L.) in Korea. *Food Science and Biotechnology*: 23. 337-344.
258. Zabihi, A.-Basti, A. A.-Amoabediny, G.-Khanjari, A.-Bazzaz, J. T.-Mohammadkhan, F.-Bargh, A. H. -Vanaki, E.: 2017. Physicochemical Characteristics of Nanoliposome Garlic (*Allium sativum* L.) Essential Oil and Its Antibacterial Effect on *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Quality & Hazards Control*: 4.
259. Zadoks, J. C.-Chang, T. T. -Konzak, C. F.: 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*: 14. 415-421.
260. Zandalinas, S. I.-Fichman, Y.-Devireddy, A. R.-Sengupta, S.-Azad, R. K. -Mittler, R.: 2020. Systemic signaling during abiotic stress combination in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 117. 13810-13820.

261. Zhang, J. -Davies, W.: 1990. Does ABA in the xylem control the rate of leaf growth in soil-dried maize and sunflower plants? *Journal of Experimental Botany*: 41. 1125-1132.
262. Zhang, M.-Pan, J.-Kong, X.-Zhou, Y.-Liu, Y.-Sun, L. -Li, D.: 2012. ZmMKK3, a novel maize group B mitogen-activated protein kinase kinase gene, mediates osmotic stress and ABA signal responses. *Journal of plant physiology*: 169. 1501-1510.
263. Zhang, W.-Yang, H.-You, S.-Xu, Y.-Ran, K. -Fan, S.: 2014. Cloning, characterization and functional analysis of the role MhNCED3, a gene encoding 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Malus hupehensis* Rehd., plays in plant tolerance to osmotic and Cd²⁺ stresses. *Plant and soil*: 381. 143-160.
264. Zhao, J.-Zhou, H. -Li, X.: 2013. Ubiquitin-specific protease16 interacts with a heavy metal associated isoprenylated plant protein27 and modulates cadmium tolerance. *Plant signaling & behavior*: 8. e25680.
265. Zhao, X.-Cui, H.-Wang, Y.-Sun, C.-Cui, B. -Zeng, Z.: 2017. Development strategies and prospects of nano-based smart pesticide formulation. *Journal of agricultural and food chemistry*: 66. 6504-6512.
266. Zheng, Y.-Schumaker, K. S. -Guo, Y.: 2012. Sumoylation of transcription factor MYB30 by the small ubiquitin-like modifier E3 ligase SIZ1 mediates abscisic acid response in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 109. 12822-12827.
267. Zoubiri, S. -Baaliouamer, A.: 2014. Potentiality of plants as source of insecticide principles. *Journal of Saudi Chemical Society*: 18. 925-938.

11. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK//2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kutasy Barbara
Doktori Iskola: Kerpely Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10048758

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (6)

1. **Kutasy, B.**, Kiniczky, M., Decsi, K., Kálmán, N., Hegedűs, G., Alföldi, Z. P., Virág, E.: 'Garlic-lipo'4Plants: liposome-Encapsulated Garlic Extract Stimulates ABA Pathway and PR Genes in Wheat (*Triticum aestivum*).
Plants-Basel. 12 (4), 1-18, 2023. ISSN: 2223-7747.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants12040743>
IF: 4
2. **Kutasy, B.**, Decsi, K., Hegedűs, G., Virág, E.: Dataset of conditioning effect of herbal extract-based plant biostimulants in pea (*Pisum sativum*).
Data in Brief. 46, 1-17, 2023. ISSN: 2352-3409.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2022.108800>
IF: 1
3. Decsi, K., **Kutasy, B.**, Hegedűs, G., Alföldi, Z. P., Kálmán, N., Nagy, Á., Virág, E.: Natural immunity stimulation using ELICE16INDURES plant conditioner in field culture of soybean.
Heliyon. 9 (1), 1-19, 2023. ISSN: 2405-8440.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e12907>
IF: 3.4
4. Decsi, K., Hegedűs, G., **Kutasy, B.**, Virág, E.: RNA-seq datasets of field rapeseed (*Brassica napus*) cultures conditioned by Elice16Indures® biostimulator.
Data in Brief. 45, 1-7, 2022. EISSN: 2352-3409.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2022.108602>
IF: 1.2
5. Decsi, K., **Kutasy, B.**, Kiniczky, M., Hegedűs, G., Virág, E.: RNA-seq datasets of field soybean cultures conditioned by Elice16Indures® biostimulator.
Data in Brief. 42, 1-7, 2022. EISSN: 2352-3409.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2022.108182>
IF: 1.2



6. **Kutasy, B.**, Decsi, K., Kiniczky, M., Hegedűs, G., Virág, E.: Time-course gene expression profiling data of *Triticum aestivum* treated by supercritical CO₂ garlic extract encapsulated in nanoscale liposomes.
Data in Brief. 42, 1-7, 2022. EISSN: 2352-3409.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2022.108287>
IF: 1.2

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

7. Virág, E., **Kutasy, B.**, Decsi, K., Hegedűs, G.: Time-course gene expression analysis of the effect of SC-CO₂ garlic extract encapsulated in nanoscale liposomes.
In: *Bioinformatics and Data Science in Genomic Studies : Book of abstracts, Debreceni Egyetem Metagenomikai Intézet, Debrecen, 8, 2022.*

További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (12)

8. Virág, E., Nagy, Á., Bartáné Tóth, B., **Kutasy, B.**, Pallos, J. P., Máthéné Szigeti, Z., Máthé, C., Kardos, G., Hegedűs, G.: Master regulatory transcription factors in B-Aminobutyric Acid-induced resistance (BABA-IR): a perspective on phytohormone biosynthesis and signaling in *Arabidopsis thaliana* and *Hordeum vulgare*.
Int. J. Mol. Sci. 25 (17), 1-23, 2024. ISSN: 1661-6596.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25179179>
IF: 4.9 (2023)
9. Virág, E., Kiniczky, M., **Kutasy, B.**, Nagy, Á., Pallos, J. P., Laczkó, L., Freytag, C., Hegedűs, G.: Supplementation of the Plant Conditioner ELICE Vakcina® Product with β -Aminobutyric Acid and Salicylic Acid May Lead to Trans-Priming Signaling in Barley (*Hordeum vulgare*).
Plants-Basel. 12 (12), 1-19, 2023. ISSN: 2223-7747.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants12122308>
IF: 4
10. Hegedűs, G., **Kutasy, B.**, Kiniczky, M., Decsi, K., Juhász, Á., Nagy, Á., Pallos, J. P., Virág, E.: Liposomal Formulation of Botanical Extracts may Enhance Yield Triggering PR Genes and Phenylpropanoid Pathway in Barley (*Hordeum vulgare*).
Plants-Basel. 11 (21), 1-22, 2022. EISSN: 2223-7747.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants11212969>
IF: 4.5



11. Mutuku, C., **Kutasy, B.**, Urbán, P., Melegh, S., Herczeg, R., Gazdag, Z., Virág, E.: Plasmid sequence dataset of multidrug-resistant Enterobacterales isolated from hospital effluents and wastewater treatment plant.
Data in Brief. 45, 1-9, 2022. EISSN: 2352-3409.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2022.108736>
IF: 1.2
12. Hegedűs, G., Nagy, Á., Decsi, K., **Kutasy, B.**, Virág, E.: Transcriptome datasets of Beta-Aminobutyric acid (BABA)-primed mono- and dicotyledonous plants, *Hordeum vulgare* and *Arabidopsis thaliana*.
Data in Brief. 41, 1-7, 2022. EISSN: 2352-3409.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2022.107983>
IF: 1.2
13. Virág, E., Hegedűs, G., **Kutasy, B.**, Decsi, K.: Transcriptome profiling dataset of different developmental stage flowers of soybean (*Glycine max*).
Data in Brief. 43, 1-8, 2022. EISSN: 2352-3409.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2022.108426>
IF: 1.2
14. **Kutasy, B.**, Farkas, Z., Kolics, B., Decsi, K., Hegedűs, G., Kovács, J., Taller, J., Tóth, Z., Kálmán, N., Kazinczi, G., Virág, E.: Detection of Target-Site Herbicide Resistance in the Common Ragweed: Nucleotide Polymorphism Genotyping by Targeted Amplicon Sequencing.
Diversity. 13 (3), 1-16, 2021. EISSN: 1424-2818.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/d13030118>
IF: 3.029
15. Székvári, K., Szabolcsi, Z., **Kutasy, B.**, Hegedűs, G., Virág, E.: New complete mitogenome datasets and their characterization of the European catfish (*Silurus glanis*).
Data in Brief. 38, 1-8, 2021. ISSN: 2352-3409.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2021.107418>
16. **Kutasy, B.**, Takács, Z., Kovács, J., Bogaj, V., Razak, S. A., Hegedűs, G., Decsi, K., Székvári, K., Virág, E.: Pro197Thr Substitution in Ahas Gene Causing Resistance to Pyroxsulam Herbicide in Rigid Ryegrass (*Lolium Rigidum* Gaud.).
Sustainability. 13 (12), 1-10, 2021. EISSN: 2071-1050.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/su13126648>
IF: 3.889
17. Kolics, É., Parrag, T., Házi, F., Szepesi, K., Heltai, B., Mátyás, K., **Kutasy, B.**, Virág, E., Taller, J., Orbán, L., Kolics, B.: An Alternative, High Throughput Method to Identify Csd Alleles of the Honey Bee.
Insects. 11 (8), 1-12, 2020. EISSN: 2075-4450.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/insects11080483>
IF: 2.769



18. Mátyás, K. K., Hegedűs, G., Taller, J., Farkas, E., Decsi, K., **Kutasy, B.**, Kálmán, N., Nagy, E., Kolics, B., Virág, E.: Different expression pattern of flowering pathway genes contribute to male or female organ development during floral transition in the monoecious weed *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asteraceae).

PeerJ. 7, 1-40, 2019. EISSN: 2167-8359.

DOI: <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.7421>

IF: 2.379

19. Nagy, E., Hegedűs, G., Taller, J., **Kutasy, B.**, Virág, E.: Illumina sequencing of the chloroplast genome of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.).

Data in Brief. 15, 606-611, 2017. ISSN: 2352-3409.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2017.10.009>

Egyéb folyóiratközlemények (1)

20. Decsi, K., **Kutasy, B.**, Hegedűs, G., Alföldi, Z. P., Kálmán, N., Nagy, Á., Virág, E.: Corrigendum to "Natural immunity stimulation using ELICE16INDURES plant conditioner in field culture of soybean" [*Heliyon* 9 (1), (January 2023) Article e12907].

Heliyon. 9 (3), 1, 2023. EISSN: 2405-8440.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13954>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 41,066

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):

12

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.02.17.

12. NYILATKOZATOK

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Kerpely Kálmán Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2025. 07. 16.

.....

Kutasy-Takács Barbara Júlia jelölt

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy Kutasy-Takács Barbara Júlia doktorjelölt 2023-2025 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2025. 07. 16.

.

Dr. Virág Eszter Andrea PhD témavezető

13. MELLÉKLETEK

M1. táblázat. Egy egységnyi dózis a négy *Fusarium* faj átlagában. Növényi-alapú biostimulátorok (Garlic-lipo, EliceVakcina és Garlic-oil) antifungális hatása mikrodilúció toxicitás teszt szignifikancia vizsgálata

Négy <i>Fusarium</i> faj átlagolt értéke:						
Garlic-oil						
átlag	0,94375	0,62745	0,80125	0,87235	0,9022	0,91608
szórás	0,05441	0,05172	0,02125	0,03727	0,05116	0,05916
elemszám	4	4	4	4	4	4
megbízhatóság	0,05332	0,05068	0,02082	0,03653	0,05013	0,05798
konfidencia intervallum	0,89043	0,57677	0,78043	0,83582	0,85207	0,8581
	0,99707	0,67813	0,82207	0,90888	0,95233	0,97405
Garlic-lipo						
átlag	0,909	-0,1612	0,503	0,7759	0,88675	0,87405
szórás	0,04027	0,03403	0,0394	0,05138	0,06311	0,07253
elemszám	4	4	4	4	4	4
megbízhatóság	0,03947	0,03335	0,03861	0,05035	0,06184	0,07107
konfidencia intervallum	0,86953	-0,1946	0,46439	0,72555	0,82491	0,80298
	0,94847	-0,1278	0,54161	0,82625	0,94859	0,94512
EliceVakcina						
átlag	0,954	0,11755	0,59015	0,97285	0,9852	0,9419
szórás	0,03594	0,05129	0,06107	0,08626	0,04708	0,06756
elemszám	4	4	4	4	4	4
megbízhatóság	0,03522	0,05026	0,05985	0,08453	0,04613	0,06621
konfidencia intervallum	0,91878	0,06729	0,5303	0,88832	0,93907	0,87569
	0,98922	0,16781	0,65	1,05738	1,03133	1,00811

alfa: 5%

alfa: 5%

alfa: 5%

M2. táblázat. *T. aestivum* Top50 DEG Garlic-lipo magas dózisú kezelés összehasonlítása a kezeletlen mintával

Kontig azonosító (Contig ID)	Enzim leírása (Gén neve)	GO nevek	Referencia (Uniprot)
Felül szabályozott 15 min			
TRINITY_DN699_c0_g1	heavy metal-associated isoprenylated plant protein 27-like (HIP27)	P:response to stimulus; F:metal ion binding; C:plasma membrane	Q67ZW1 ARATH
TRINITY_DN4723_c0_g1	homeobox-leucine zipper protein 22 (HOX22)	P:transcription, transcription regulation, F:DNA-binding	Q01IK0 ORYSI
TRINITY_DN7677_c0_g1	homeobox-leucine zipper protein HOX24-like (HOX24)	P:transcription, transcription regulation, F:DNA-binding	A2X7U1 ORYSI
TRINITY_DN5332_c0_g1	zinc finger protein ZAT12-like (ZAT12)	P:cellular response to hypoxia,cold acclimation,hyperosmotic salinity response, photosynthetic acclimation,response to chitin,response to cold, response to heat, response to light stimulus,response to oxidative stress, response to UV-B,response to wounding; F:DNA-binding transcription factor activity,transcription cis-regulatory region binding; C:nucleus	Q42410 ARATH
TRINITY_DN897_c0_g1	U-box domain-containing protein 19-like (PUB19)	P:protein ubiquitination, regulation of seed germination; F:ubiquitin-protein transferase activity, C:nucleus,cytoplasm	O80742 ARATH
TRINITY_DN2432_c0_g1	transcription factor MYBS1 (MYBS1)	P:positive regulation of DNA-templated transcription,response to gibberellin, response to sucrose; F:DNA-binding transcription factor activity; C:nucleus,cytoplasm	Q8LH59 ORYSJ
TRINITY_DN2829_c0_g1	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase chloroplastic-like (NCED3)	P:9-cis epoxycarotenoid cleavage activity, ABA biosynthesis from carotenoids,response to water stress	Q9LRR7 ARATH
Felül szabályozott 24h			
TRINITY_DN10251_c0_g1	Pathogenesis-related protein 1.1 (PR-1.1)	P:defense response,response to vitamin B1,response to water deprivation,systemic acquired resistance; C:apoplast,extracellular space,secretory vesicle	P33154 ARATH
TRINITY_DN425_c0_g1	aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	P:response to ABA, response to desiccation, response to salt stress; F:aldehyde dehydrogenase (NAD ⁺) activity	Q9SYG7 ARATH
Felül szabályozott 48h			
TRINITY_DN1325_c0_g1 TRINITY_DN1150_c0_g1 TRINITY_DN595_c0_g1	glucan endo-1,3-beta-glucosidase PR2	P:defense response, carbohydrate metabolic process; F:glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase activity, C:extracellular region, plasma membrane	O65399 ARATH
TRINITY_DN4265_c0_g1	pathogenesis-related protein 1-4	P:defense response	
TRINITY_DN82_c0_g1	wheatwin-2 (PR4B)	P:defense response to bacterium, defense response to fungus, killing of cells of another organism, plant-type hypersensitive response; F:RNA nuclease activity	O64393 WHEAT

Kontig azonosító (Contig ID)	Enzim leírása (Gén neve)	GO nevek	Referencia (Uniprot)
TRINITY_DN967_c0_g1 TRINITY_DN1844_c0_g1	thaumatin-like protein PWIR2 PR5	P:defense response, response to biotic stimulus,	P27357 WHEAT
TRINITY_DN601_c0_g1	acetylserotonin O-methyltransferase 1-like (ASMT)	P:defense response to fungus, response to osmotic stress, response to mannitol, regulation of stomatal closure; F:O-methyltransferase activity	Q9T003 ARATH
TRINITY_DN7152_c0_g1	tricetin 3',4',5'-O-trimethyltransferase (OMT2)	P:aromatic compound biosynthetic process, flavonoid biosynthetic process, lignin biosynthetic process, methylation, F:O-methyltransferase activity, protein dimerization activity, S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity	Q38J50 WHEAT
TRINITY_DN287_c0_g1	flavanone 3-hydroxylase (FH3)	P:flavonoid biosynthetic process, F:L-ascorbic acid binding, metal ion binding, naringenin 3-dioxygenase activity	Q7XR84 ORYSJ
TRINITY_DN3137_c0_g1	UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase 7-like (GT7)	F:transferase activity	A0A481S1J2 WHEAT
TRINITY_DN1195_c0_g2	alpha-amylase/trypsin inhibitor (ATI)	P:negative regulation of peptidase activity, F:alpha-amylase inhibitor activity, serine-type endopeptidase inhibitor activity	P32936 HORVU
TRINITY_DN8284_c0_g1	chaperone protein ClpB1		
Alul szabályozott 48h			
TRINITY_DN2226_c0_g1	Bowman-Birk type trypsin inhibitor-like	P:negative regulation of endopeptidase activity, F:serine-type endopeptidase inhibitor activity	P81713 WHEAT

Összehasonlított könyvtárak t_G240_C vs. t_G240_15/24/48. A kontigok annotációja az Omicsbox BioBam program, NCBI blast program és az UniProt referencia fehérjék alapján lett meghatározva

M3. táblázat. *P. sativum* Top50 DEG összehasonlítása az EliceVakcina kezelt és a kezeletlen mintával

Kontig azonosító (Contig ID)	Enzim leírása (Gén neve)	GO nevek	Referencia (Uniprot)
Felül szabályozott E20			
TRINITY_DN146_c0_g1	glucan endo-1,3-beta-glucosidase PR2	P:carbohydrate metabolic process; F:glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase activity; C:anchored component of plasma membrane	O65399 ARATH
TRINITY_DN9_c0_g1	pathogenesis-related protein-4-like PR4	P:defense response to bacterium; P:defense response to fungus; P:RNA phosphodiester bond hydrolysis; F:ribonuclease activity	P50698 AVESA
TRINITY_DN416_c0_g1	glutathione S-transferase L3 (GSTL3)	P:glutathione metabolic process; P:protein glutathionylation; F:glutathione transferase activity	Q9LZ06 ARATH
TRINITY_DN70_c0_g1	chalcone synthase (CHS)	P:flavonoid biosynthetic process; F:naringenin-chalcone synthase activity; F:chalcone synthase activity	P13114 ARATH
TRINITY_DN153_c0_g1	secoisolariciresinol dehydrogenase	F:(+)-borneol dehydrogenase activity	C6TEB5 SOYBN

Kontig azonosító (Contig ID)	Enzim leírása (Gén neve)	GO nevek	Referencia (Uniprot)
Felül szabályozott E20			
TRINITY_DN99_c0_g1	isoflavone synthase (CYP93C)	P:cellular oxidant detoxification; F:peroxidase activity; F:iron ion binding; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, NAD(P)H as one donor, and incorporation of one atom of oxygen; F:heme binding; F:2-hydroxyisoflavanone synthase activity; C:membrane	Q7XAU5 PEA
TRINITY_DN131_c0_g1	catalase 1 (CAT1)	P:response to hydrogen peroxide; P:hydrogen peroxide catabolic process; P:cellular oxidant detoxification; F:catalase activity; F:heme binding; F:metal ion binding; C:peroxisome; C:plasma membrane	Q96528 ARATH
TRINITY_DN417_c0_g1	heat shock cognate 70kDa protein 2-like (HSP70)	P:cellular response to unfolded protein; P:protein refolding; P:chaperone cofactor-dependent protein refolding; F:ATP binding; F:ATP hydrolysis activity; F:heat shock protein binding; F:protein folding chaperone; C:cytoplasm	P22954 ARATH
TRINITY_DN6931_c0_g1	heat shock factor 24 (HSF24)	P:regulation of transcription by RNA polymerase II; P:response to heat; P:negative regulation of DNA-templated transcription; F:RNA polymerase II cis- regulatory region sequence- specific DNA binding; F:DNA- binding	P22335 SOLPE
TRINITY_DN6136_c0_g1	heat shock 22kDa protein, mit. (HSP22)	C:mitochondrion	Q9FWJ7 ARATH
TRINITY_DN53_c0_g1	17.6kDa class I heat shock protein-like (HSP17.6)	P:protein folding; P:response to heat; P:response to salt stress; P:response to hydrogen peroxide; P:protein complex oligomerization; F:protein self- association; F:unfolded protein binding; C:cytoplasm	Q9XIE3 ARATH
TRINITY_DN66_c0_g1 TRINITY_DN14_c0_g1	17.9kDa class II heat shock protein (HSP17.9)	P:protein folding; P:response to heat; P:response to salt stress; P:response to hydrogen peroxide; P:protein complex oligomerization; F:protein self- association; F:unfolded protein binding; C:cytoplasm	O81822 ARATH
TRINITY_DN125_c0_g1	17.5kDa class I heat shock protein (HSP17.5)	-	A5A8T6 TRIDC
TRINITY_DN17_c0_g1 TRINITY_DN19_c0_g1	class I heat shock protein	P:protein folding; P:response to heat; P:response to salt stress; P:response to hydrogen peroxide; P:protein complex oligomerization; F:protein self- association; F:unfolded protein binding	Q9XIE3 ARATH

Kontig azonosító (Contig ID)	Enzim leírása (Gén neve)	GO nevek	Referencia (Uniprot)
TRINITY_DN20_c0_g1	22.7 kDa class IV heat shock protein (HSP22)	P:protein folding; P:protein phosphorylation; P:response to heat; P:response to salt stress; P:response to hydrogen peroxide; P:protein complex oligomerization; F:protein serine/threonine kinase activity; F:protein self-association; F:unfolded protein binding; C:endoplasmic reticulum lumen	P19244 PEA
TRINITY_DN443_c0_g1	heat shock 70kDa protein (HSP70)	P:cellular response to unfolded protein; P:protein refolding; P:chaperone cofactor-dependent protein refolding; F:ATP binding; F:ATP hydrolysis activity; F:heat shock protein binding; F:protein folding chaperone;	P22954 ARATH
TRINITY_DN258_c0_g1	ubiquitin 10	F:mRNA binding	F4KJ37 ARATH
TRINITY_DN197_c0_g1	polyubiquitin containing 7 ubiquitin monomers	F:mRNA binding; C:nucleus; C:cytoplasm	A6N0E8 ORYSI
TRINITY_DN281_c0_g1	BAG family molecular chaperone regulator 6 (BAG6)	P:protein folding; F:chaperone binding	O82345 ARATH
TRINITY_DN7231_c0_g1	chaperone protein dnaJ11 (ATJ11)	-	A0A1J6KZT8 NICAT

Felül szabályozott E240			
Kontig azonosító (Contig ID)	Enzim leírása (Gén neve)	GO nevek	Referencia (Uniprot)
TRINITY_DN1185_c0_g1	caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCOAMT)	P:lignin biosynthetic process; P:methylation; F:caffeoyl-CoA O-methyltransferase activity; F:metal ion binding	O49499 ARATH
TRINITY_DN484_c0_g1	ethylene-responsive transcription factor 5 (ERF5)	P:regulation of DNA-templated transcription; F:DNA binding; F:DNA-binding transcription factor activity; C:nucleus	O82339 ARATH
TRINITY_DN6614_c0_g1	isoflavone 3'-hydroxylase (CYP81E9)	F:iron ion binding; F:heme binding; F:isoflavone 3'-hydroxylase activity; C:endoplasmic reticulum membrane; C:integral component of membrane	Q6WVQ9 MEDTR
TRINITY_DN451_c0_g1	BAG family molecular chaperone regulator 6-like (BAG6)	P:protein folding	O82345 ARATH
TRINITY_DN19_c0_g1	class I heat shock protein	P:protein stabilization; F:identical protein binding; C:cytoplasm; C:protein-containing complex	Q9XIE3 ARATH
TRINITY_DN417_c0_g1	heat shock cognate 70 kDa protein 2-like (HSP70)	P:cellular response to unfolded protein; P:protein refolding; P:chaperone cofactor-dependent protein refolding; F:ATP binding; F:ATP hydrolysis activity; F:heat shock protein binding; F:protein folding chaperone; C:cytoplasm	P22954 ARATH
TRINITY_DN1188_c0_g1	S-adenosylmethionine synthetase (SAM)	P:S-adenosylmethionine biosynthetic process; P:one-carbon metabolic process; P:protein ubiquitination; F:methionine adenosyltransferase activity; F:ubiquitin protein ligase activity; C:cytoplasm	P23686 ARATH
TRINITY_DN258_c0_g1	ubiquitin 10 (UBC10)	F:mRNA binding	F4KJ37 ARATH

Kontig azonosító (Contig ID)	Enzim leírása (Gén neve)	GO nevek	Referencia (Uniprot)
TRINITY_DN4090_c0_g1	F-box/kelch-repeat protein (KIB)	P:protein ubiquitination; F:ubiquitin-protein transferase activity; F:calcium ion binding; F:kinase activity; F:transferase activity; F:acyltransferase activity; F:ubiquitin protein ligase activity; C:chloroplast; C:photosystem II; C:chloroplast thylakoid membrane; C:thylakoid; C:photosystem II oxygen evolving complex; C:membrane; C:extrinsic component of membrane	Q9SU05 ARATH
Alul szabályozott E240			
TRINITY_DN2678_c0_g1	flavonoid 3'-monooxygenase (CYP5B1)	F:monooxygenase activity; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; C:integral component of membrane	Q9SD85 ARATH

Összehasonlított könyvtárak p_C vs. p_E20/E240. A kontigok annotációja az Omicsbox BioBam program, NCBI blast program és az UniProt referencia fehérjék alapján lett meghatározva

M4. táblázat. *B. napus* Top50 DEG összehasonlítása az EliceVakcina kezelt és a kezeletlen mintával

Kontig azonosító (Contig ID)	Enzim leírása (Gén neve)	GO nevek	Referencia (Uniprot)
Felül szabályozott			
TRINITY_DN3516_c0_g1	chaperone protein dnaJ A6 (DJA6)	P:response to stress, response to abiotic stimulus, P:response to light stimulus; F:methyltransferase activity; F:O-methyltransferase activity C:chloroplast;	Q9SJZ7 ARATH
TRINITY_DN544_c0_g1 TRINITY_DN267_c0_g1	late embryogenesis abundant protein 46 (LEA46)	P:response to stress, response to abiotic stimulus, response to cold, osmotic stress, water deprivation, response to ABA, response to chemical	Q9FG31 ARATH
TRINITY_DN3823_c0_g1	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme 3 (SAMDC3)	P: adenosylmethionine decarboxylase activity, spermidine and spermine biosynthetic process, polyamine biosynthesis	Q9LSU6 ARATH
TRINITY_DN3257_c0_g1	UDP-glycosyltransferase 74D1-like (UGT74D1)	F: transferase activity, glucosylates JA and JA derivatives, activity of indole-3-acetic acid (IAA), 4-coumrate, cinnamate and caffeate	Q9SKC5 ARATH
TRINITY_DN21_c0_g1 TRINITY_DN7896_c0_g1 TRINITY_DN6363_c0_g1	dehydrin Rab18-like (RAB18)	P:response to stress, response to abiotic stimulus, response to chemical, response to endogenous stimulus, response to water deprivation, cold acclimation	P30185 ARATH
TRINITY_DN150_c0_g1	protein phosphatase 2C 3 (PP2C3)	P: signal transduction, negative regulation of ABA-activated signaling pathway, response to chemical, response to endogenous stimulus	Q9LNW3 ARATH
TRINITY_DN3427_c0_g1	low-temperature-induced 65 kDa protein-like (LTI65)	P: signal transduction: ABA-activated signaling pathway, response to stress, response to abiotic stimulus, response to ABA, cold, salt stress, water deprivation, response to chemical, response to endogenous stimulus	Q04980 ARATH

Kontig azonosító (Contig ID)	Enzim leírása (Gén neve)	GO nevek	Referencia (Uniprot)
TRINITY_DN1139_c0_g1	cytochrome P450 81F1-like (CYP81F1)	F:monooxygenase activity; F:iron ion binding; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; F:heme binding	O65790 ARATH
Alul szabályozott			
TRINITY_DN3116_c0_g1	rubber elongation factor/stress related protein particle like superfamily (REF/SRPP)	P:response to stress, response to abiotic stimulus, response to chemical	O82246 ARATH
TRINITY_DN6094_c0_g1	protein COLD-REGULATED 15B (COR15B)	P:response to stress, response to external stimulus, response to biotic and abiotic stimulus, response to ABA, response to endogenous stimulus, response to chemical	Q9SIN5 ARATH
TRINITY_DN4614_c0_g1	methionine sulfoxide reductase B5-like (MSRB5)	P:response to stress, defense response against fungus induced by methyl JA; response to oxidative stress	F4JGY0 ARATH

Összehasonlított könyvtárak b_C vs. b_E240. A kontigok annotációja az Omicsbox BioBam program, NCBI blast program és az UniProt referencia fehérjék alapján lett meghatározva

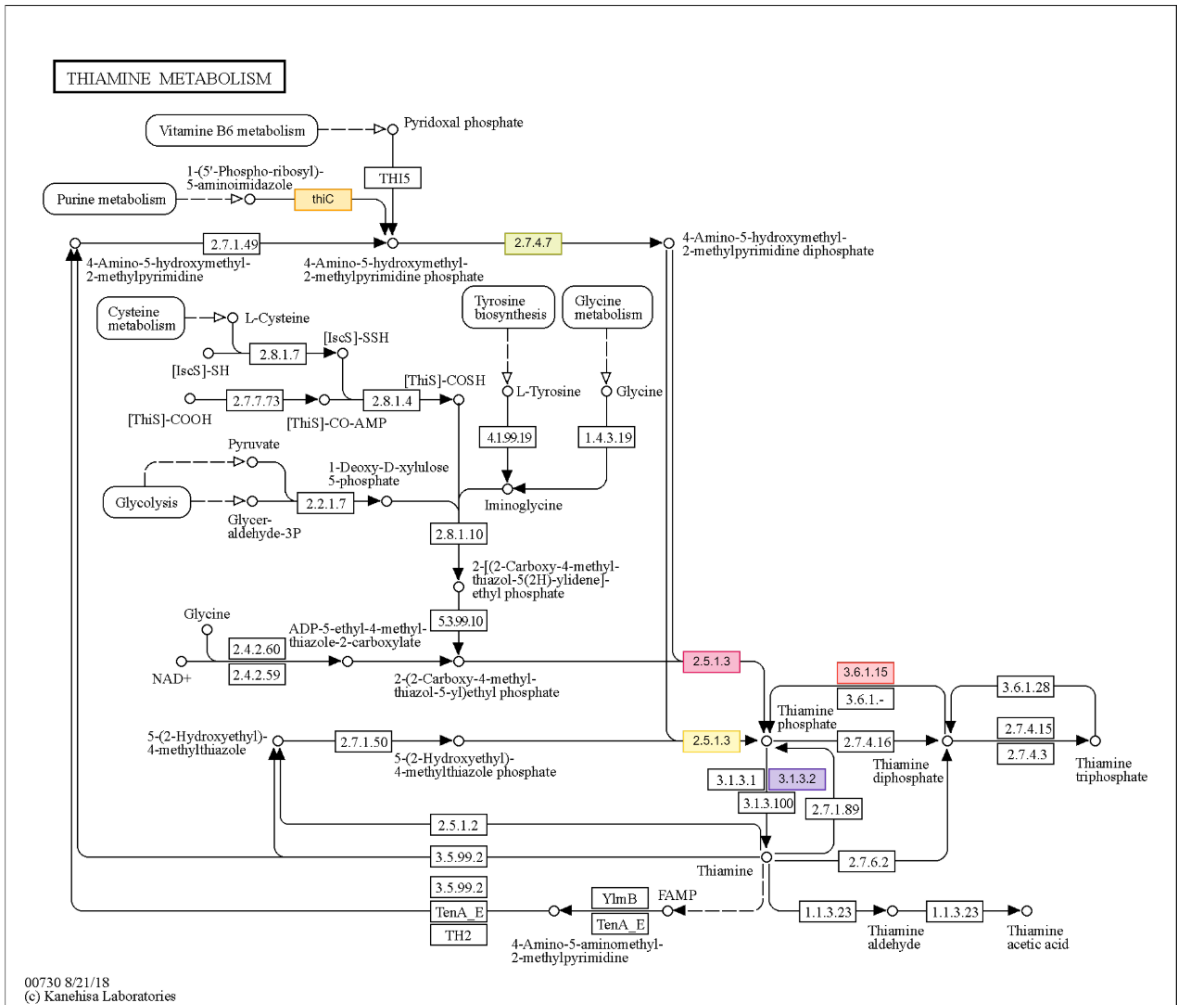
M5. táblázat. *G. max* Top50 DEG összehasonlítása az EliceVakcina kezelt és a kezeletlen mintával

Kontig azonosító (Contig ID)	Enzim leírása (Gén neve)	GO nevek	Referencia (Uniprot)
Felül szabályozott E20			
TRINITY_DN9412_c0_g1 TRINITY_DN1758_c0_g1	Cytochrome P450 82A3	P:defense response to other organism; F:monooxygenase activity; F:iron ion binding; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; F:heme binding; C:membrane	O49858 GLYMA
TRINITY_DN4084_c0_g1	glutathione S-transferase (GST)	P:glutathione metabolic process; P:response to heat; P:response to auxin; P:response to cytokinin; P:response to abscisic acid; P:response to gibberellin; P:response to metal ion; F:glutathione transferase activity; C:cytoplasm	Q6NLB0 ARATH
TRINITY_DN18512_c0_g1	urea-proton symporter (DUR3)	P: response to stress, cellular response to nitrogen starvation, urea transmembrane transport; F:urea transmembrane transporter activity; C:plasma membrane	F4KD71 ARATH
TRINITY_DN9491_c0_g1	heavy metal-associated isoprenylated plant protein 26 (HIP26)	P: response to stress, response to abiotic stimulus, heat acclimation, response to stimulus; F:metal ion binding	Q9SZN7 ARATH

Kontig azonosító (Contig ID)	Enzim leírása (Gén neve)	GO nevek	Referencia (Uniprot)
TRINITY_DN12162_c0_g1	WRKY transcription factor 48 (WRKY48)	P:regulation of DNA-templated transcription, response to biotic stimulus, defense response to bacterium, response to external stimulus; F:DNA-binding transcription factor activity; F:sequence-specific DNA binding; C:nucleus	Q9FGZ4 ARATH
Alul szabályozott E20			
TRINITY_DN16361_c0_g1	Scopoletin glucosyltransferase (TOGT)	F:UDP-glycosyltransferase activity (aromatic substrates of the phenylpropanoid), resistance to virus	Q9AT54 NICTA

Felül szabályozott E240			
TRINITY_DN15169_c0_g1 TRINITY_DN8812_c0_g1	AAA-ATPase	P:response to stress, response to abiotic stimulus, response to cold, to salt stress, to water deprivation, response to endogenous stimulus, response to abscisic acid; F:ATP binding; F:ATP hydrolysis activity	Q9FLD5 ARATH
TRINITY_DN7113_c0_g1	ABC transporter C family member 4 (ABCC4)	P:transmembrane transport; P:response to stress, response to water deprivation, response to wounding, F:ATP binding; F:ABC-type transporter activity; C:membrane,	AB4C ARATH
TRINITY_DN18369_c0_g1	U-box domain- containing protein 19 (PUB19)	P:protein ubiquitination, response to ABA; F:ubiquitin-protein transferase activity; C:nucleus; C:cytoplasm	O80742 ARATH
TRINITY_DN18382_c0_g1	UDP-glycosyltransferase 79A6 (FG2)	F:UDP-glycosyltransferase activity, flavonol-3-O-glucoside L-rhamnosyltransferase activity	I1LC18 GLYMA
TRINITY_DN3846_c0_g1	galactinol synthase 2 (GOLS2)	P:galactose metabolic process; P:response to stress, response to ABA, cold, oxidative stress, salt stress, water deprivation; F:inositol 3-alpha-galactosyltransferase activity; C:cytoplasm	Q9FXB2 ARATH
TRINITY_DN18556_c0_g1	protein argonaute 4 (AGO4)	P: response to stress, defense response to bacterium and virus, regulation of DNA-templated transcription; P:brassinosteroid mediated signaling pathway; F:nucleic acid binding; F:DNA-binding transcription factor activity; C:ribonucleoprotein complex	Q9ZVD5 ARAH

Összehasonlított könyvtárak g_525_C vs. g_525_E20. A kontigok annotációja az Omicsbox BioBam program, NCBI blast program és az UniProt referencia fehérjék alapján lett meghatározva



M2. ábra. Tiamin metabolizmus útvonalhoz tartozó differenciáltan expresszálódó gének az EliceVakcina kezelés után repcében (KEGG map00730)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Virág Eszter Andrea tudományos főmunkatársnak, a Gyógynövénykutató Intézet Kft. tudományos igazgatójának, aki fáradhatatlanul kísérte végig tanulmányaimat mindig támogatva, buzdítva, jó tanácsokkal ellátva. Rengeteget tanultam az eltelt idő alatt.

Kutatásaimat Dr. Pallos József és Dr. Kiniczky Márta, a Gyógynövénykutató Intézet Kft. vezetői tették lehetővé, az Intézetben zajló fejlesztésekbe bevontak és rendelkezésemre állították kísérleti eredményeiket. Hálás köszönet érte. Valamint az Intézet munkatársai, Nagy Ágnes, Kállai Máté, Weingart Csaba, Kovács Bettina, Andor Kata, Sebők Erzsébet és Plank Ágota is segítségemre voltak szakterületük magas szintű ismeretével.

A *Fusarium* kísérleteket Prof. Dr. Pócsi István tette lehetővé, köszönöm a bizalmát. A kísérletek Pákozdi Klaudia és a Debreceni Egyetem Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék munkatársai segítségével készültek, köszönöm munkájukat.

Külön köszönet Hegedűs Géza informatika, statisztika területen nyújtott segítségének.

Köszönöm a sok segítséget a Kerpely Kálmán Doktori Iskola oktatóinak és munkatársainak, valamint a bírálók, dr. Karaffa Erzsébet Mónika, dr. Cernák István és a bírálóbizottság munkáját.

A növényélettani elemzésekben Szaszkoné Dr. Decsi Kincső és a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem munkatársai segítettek.

Köszönet Horváthné Dr. Baracsi Éva és Dr. Tóth Endre tanulmányaim kezdetétől mutatott támogatásáért, akik példaértékű szakmai elhivatottságukkal mellettem álltak.

És köszönet népes családomnak.