

Opponensi vélemény

Dr. Pál Magda

Poliaminok szerepe a stressztűrésben és kapcsolata más védővegyületekkel gabonanövényekben című akadémiai doktori értekezéséről

Az értekezés **témaválasztása talán még sohasem volt időszerűbb**: a környezeti hatásokban bekövetkező változások támasztotta kihívás a modern mezőgazdaság egyik legfontosabb, egyre súlyosbodó problémája. A gazdasági növények stresszérzékenység csökkentésének lehetőségeit a világ vezető laboratóriumai sokféle, különböző megközelítéssel próbálják elérni. A Pál Magda által választott megközelítés, a természetes anyagok, növényi metabolitok sztreessválaszt módosító hatásainak vizsgálata a modern környezettudatos szemlélet jegyében született, de ugyanakkor szervesen illeszkedik a martonvásári stresszélettan kutatások hagyományosan magas szintű és nemzetközileg elismert vonalába.

Az eredmények szigorú bírálati rendszerrel rendelkező rangos nemzetközi folyóiratokban kerültek publikálásra, így már a bírálóat elején előrebocsátom, hogy **ezeket mint jelentős, új tudományos eredményeket** természetesen én is **elismerem**. Kérdéseim a kísérletek néhány, a dolgozatban nem szereplő részlete mellett elsősorban az eredményekre felépíthető általános stresszélettani modellre vonatkoznak.

A doktori mű a **formai követelményeknek megfelel**, stílusa világos és csak csekély számú betűhibát tartalmaz (pl. a hidrogén-peroxid a magyar kémiai helyesírás szabályai szerint kötőjellel írandó). **Nyelvezetében** megfelelően kerül a labor zsargont, és törekszik az angol szakkifejezések magyar megfelelőinek használatára.

Utóbbi törekvést különösen dicséretesnek tartom, mindössze a „crosstalk” magyar megfelelőjeként említett „áthallás” kifejezést (9. és 128. oldalak) nem érzem teljesen megfelelőnek, mert az angol eredetivel szemben valamilyen passzív, véletlenszerű jelenséget sugall. Mivel a jelentést teljesen átadó magyar szakkifejezésre nincs ötletem, ebben az esetben inkább megtartanám az idegennyelvű eredetit; hiszen például a core protein, hiperakkumulál és „recovery” (bár ez idézőjelben) kifejezések is – egyszavas magyar megfelelők híján, szerintem helyesen – megmaradtak a dolgozatban. Amennyiben mégis szükségesnek látja a magyarítást, megfontolásra ajánlom a crosstalk során módosuló stressz válaszokra is utaló keresztérzékenység vagy kereszttolerancia szavak használatát.

Bár magyar nyelvű szakcikkekben és tankönyvekben is gyakran előfordul a reaktív gyökök koncentrációjának emelkedésére a „felhalmozódás” kifejezés használata (pl. 10. oldal, „A reakciót követően létrejövő elhalások általában a ROS-felhalmozódás káros hatásának következményei.”), ez a kifejezés rövid életidejű molekulák esetében véleményem szerint nem megfelelő.

A rövid **Bevezetés** fejezet pontosan és a szakterületben kevésbé járatos olvasó számára is érthetően vázolja a megválaszolandó problémát, indokolja és foglalja össze az alkalmazott kutatási megközelítést.

A tizennyolc oldalas **Irodalmi áttekintés** fejezet több mint 250 folyóirat közleményen alapul, melyek nagy része 1990 után íródott (csak elvétve, jellemzően módszerek időtálló referenciájaként található néhány sokkal régebbi közlemény), szerző tehát kiválóan ismeri a téma modern szakirodalmát. Ez a

fejezet bemutatja a poliaminok sokrétű szerepét, szöveti mennyiségük szabályozásának összefüggéseit a növényi hormonokkal, reaktív oxigén és nitrogén származékokkal; így a biológia más területeiről érkező olvasó számára is kellőképpen vezet el a kutatási célok megfogalmazásához. Az Irodalmi áttekintés fejezettel kapcsolatban csak két megjegyzésem van:

A kadmium okozta oxidatív stressz ismertetésekor még említésre méltónak találnám azt a megfigyelést, hogy a kadmium közvetlenül is okozhat DNS károsodást, amennyiben magas koncentrációt ér el a szövetekben (Gichner és mtsai., 2004, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 559: 49-57.).

A 19. oldal 3. sorában így kezdődik a mondat: „A sztratoszférikus ózonréteg elnyeli az UV-V és UV-C egészét, valamint az UV-B sugárzás alacsonyabb hullámhosszú részét, de az elvékonyodása, valamint az ózonlyukak miatt jelentős...” Az utóbbi kifejezés téves, az sztratoszférikus ózonréteg folytonossága szerencsére eddig még sehol nem szakadt meg, tehát nem keletkezik ózonlyuk, bár a köznyelv ezt a szót használja az elvékonyodásra is.

Az irodalmi áttekintést követően **tömören és világosan megfogalmazott kutatási célok** következnek: egyrészt az endogén poliamin szintek és a stressz tolerancia kapcsolatának vizsgálata, másrészt a külsőleg adagolt poliamin sztrepszvédő hatásának elemzése ozmotikus és kadmium stressz során. A második téma kiemelten kerül vizsgálatra a putreszcin kezelés és a kadmium jelenlétére adott válaszok kapcsán. Kiemelendő értéke a műnek az a törekvés, hogy a válaszokat nem csak metabolit szinten, hanem gén expressziós változások alapján is elemezze.

A kellőképpen **részletes és pontos Anyagok és módszerek fejezet** tizenhét oldalon mutatja be az alkalmazott eljárásokat, reprodukálhatóságot lehetővé tevő részletességgel. Ezzel a fejezettel kapcsolatban a következő kérdéseim merültek fel:

Kadmium kezelés kadmium-nitrát formájában történt. Ez a vegyület szennyezett talajokban általában megtalálható forma? A növényben találhatóhoz képest mekkora az így bevitt nitrát többlet mennyisége (tehát szükségesek külön nitrát kontrollok)? Hogyan viszonyul az alkalmazott kadmium-nitrát koncentráció az iparilag szennyezett környezetben található kadmium mennyiségéhez?

UV kezelés leírása (4.1.3.2. fejezet) egyrészt csak PAR megvilágított kontroll növényeket említ, másfelől azt írja, hogy „Az UV-B sugárzás dózisa a kontroll növények esetében $38 \mu\text{Watt}/\text{cm}^2$, míg az UV-B-kezelteknél $430 \mu\text{Watt} / \text{cm}^2$ volt.” Valóban történt UV megvilágítás a kontroll növények esetében? Hogyan történt az UV-B besugárzási teljesítmény mérése? Mekkora volt a kísérletek során alkalmazott UV-B dózis a napfényben tartalmazott UV-B-hez képest?

Fontosnak és az általános biológiai következtetések szempontjából helyesnek tartom, hogy többféle növényfajjal dolgozott, melyek mindegyike haszonnövény. Látható, hogy a sok szempontú megközelítés mellett további szakmai indokai is voltak a növényfaj választásnak, ezek azonban néhány kísérlet esetében nem szerepelnek. A liztharmat fertőzés kísérletekben az eltérő érzékenységtű tavaszi búza genotípusok használata jól indokolt. Hasonlóan megalapozott választás volt az alacsony hőmérsékleti stressz vizsgálatokat őszi búza és a magasabb putreszcin tartalmú további gabonafélékkel, illetve a kadmium kezelést különböző szalicilsav tartalmú búza vonalakkal végezni.

Mi indokolta az Emese búzafajta használatát az UV és a PEG hatás kísérletekben? Hasonló kérdés, hogy a putreszcin előkezelés védőhatását búza- és kukoricanövények ozmotikus stressz válaszaiban igazolva miért rizs növényekkel folytatta az előkezelés kadmium stressz választ módosító hatásának vizsgálatát (a rizs szárazság érzékenysége és a különböző kadmium érzékenységet mutató búza vonalak rendelkezésre állása ellenére)? Továbbá, a putreszcin előkezelés pozitív hatását búza- és kukoricanövények ozmotikus stressz válaszaiban igazolva, miért búza növényekben történt a putreszcin és abszcizinsav előkezelés védőhatásának összehasonlítása (5.2.4)?

Kiseb megjegyzés, de véleményem szerint a folyadékkromatográfiás méréshez használt Waters típusú HPLC készülék részegységeinek leírása elegendő lett volna egy helyen (40., 41. és 44. oldalon is szerepel).

A gabonanövényekben kiemelten vizsgált flavonolok a rutin, miricetin és a kvercetin (Függelék 2. és 3. táblázat). Mennyiségi arányaikban mennyire domináns fenolos vegyületek ezek a gabonafélékben? Klem és mtsai (2015, Plant Physiology and Biochemistry, 93: 74-83) például árpában a lutoarint és szaponarint találta mint legnagyobb mennyiségben jelen levő flavonoidokat. A kvercetin és a rutin (kvercetin-rutinozid) külön értékelése azért történt, mert az előbbi aglikonként is jelentős mennyiségben van jelen a levelekben?

A 8. táblázatban a cél gének funkcióit is szerencsés lett volna feltüntetni, a témát nem kutató olvasó számára. Itt a referencia oszlopban a „tervezett” kifejezés tervezett saját közleményt jelent?

Az alkalmazott statisztikai módszerek megfelelőek, bár véleményem szerint a szerző és munkatársai által összegyűjtött nagyszámú adat további elemzéseket is lehetővé tett volna. Például a többféle kezelés hatásainak összehasonlítására a kontrollal történő kétmintás t-próbák sorozata mellett célszerű lett volna az ANOVA módszer alkalmazása. Hasznos lett volna továbbá a kétféle kezelést (pl. UV és Cd vagy UV és PEG, ozmotikus és alacsony hőmérséklet, putreszcin és PEG) alkalmazó kísérletek eredményeinek kétutas ANOVA módszerrel történő értékelése. Ez lehetővé tette volna az egyes faktorok hatásának a másik faktor háttérében történő elemzését, pl. az 5.2.2. fejezetben az előkezelés nélkül PEG kezelt és a putreszcin előkezelés után PEG kezelt minták statisztikai összehasonlítását.

Bár ezzel egyfajta formai előírásnak tesz eleget, a bíráló (és az olvasók) dolgát nehezíti, hogy az **Eredmények** ismertetése (48-103 oldal) és az **Eredmények megvitatása** (104-127 oldal) külön történik. Ez egy jó elrendezés szakcikkek esetében, egy disszertáció esetében azonban az ábrák így akár 30-50 oldalnyi távolságra is kerülhetnek az azokon szereplő eredmények diszkussziójától.

Az exogén poliamin kezeléssel kapcsolatos kérdésem az alkalmazott koncentrációk megválasztása. A vizsgálatok azt mutatták, hogy mindkét fajra (búza és kukorica) és mindkét vizsgált növényrészre (levelek, gyökerek) jellemző, hogy azok az endogén poliaminokat nem egyforma mennyiségben tartalmazzák. A kezeletlen kontroll növények szignifikánsan több, legalább 2-3-szor több spermidint tartalmaztak, mint putreszcin vagy spermint (27. és 28. ábra). Az endogén poliamin kezeléseket esetében mégis azonos koncentrációban alkalmazta az egyes vegyületeket. Mi indokolta ezt a kísérleti megközelítést például azzal szemben, hogy az endogén tartalom egy rögzített százalékát adagolja exogén poliaminként?

Egy megjegyzés az eredmények egyébként jól áttekinthető bemutatásával kapcsolatban: 12. -18. táblázatok (de különösen a komplex 17. táblázat) helyett az ábra szemléletesebb lett volna.

Továbbá, mivel a munka sokféle kezelés kombináció komplex hatását elemzi, véleményem szerint hasznos lett volna a diszkussziós fejezetekben a 43. ábrához hasonló, összefoglaló hatásmechanizmus ábrák készítése a többi kezelés kombináció esetében is.

Fotoszintézis adatok, a net CO_2 (Pn) és H_2O gázcsere (E) és sztóma konduktancia (gs) adatok mellett érdekes lehet vízhasznosítás hatásfokának (Pn/E) az elemzése is, különösen a szárazság (ozmotikus) stressz alatt álló növények esetében.

Az eredmények megvitatásában azt írja, „PA-ok magasabb szintje pozitív korrelációt mutatott az indukálódott antioxidánsokkal, így a feltételezhető, hogy a PA-felhalmozódás képes optimalizálni az anyagcsere folyamatok arányát...” (107. oldal). Van arra munkahipotézis, hogy ez milyen módon történik?

A kadmium kezelések eredményeinek megvitatásában azt írja, „A Cd kis mértékben befolyásolta csak a levél AAtartalmát, de csökkentette az AA/DHA arányt a TC-vonalak és az Mv 8 leveleiben, jelezve ezzel, hogy a Cd oxidatív stresszt indukált ezekben a genotípusokban.” (109. oldal). A magasabb oxidált aszkorbát / aszkorbát arány arra utal, hogy e megnövekedett mértékű aszkorbát oxidációval nem tud lépest tartani annak regenerációja. Történt ezekben a kísérletekben enzim aktivitás (DHAR vagy MDHAR) mérés ennek igazolására?

A vizsgálatok egyik következtetése, hogy „a Cd-, PEG- és UV-B-kezelés önmagában is károsodást okozhat, de a hatásmechanizmusuk eltér” (111. oldal). Véleményem szerint az általánosítást nehezíti a különböző kezelések által előidézett stressz hatások mértékének összehasonlítása. Ez nem csak a disszertáció, hanem az összehasonlító stresszélettani kutatások általános problémája. Ezzel kapcsolatban kérdezem a véleményét: milyen élettani paraméter változásával jellemezzük a stressz mértékét? Pl. fotoszintetikus gázcsere abszolút értékével, relatív hatékonyságával (Pn/gs), a teljes friss tömeggel?

Milyen mechanizmust tart lehetségesnek az UV-B kezelés hatására a gyökerekben megfigyelt változások magyarázatára?

A 6.1.4. fejezetben az UV-B kezelés ozmotikus stressz enyhítő hatásainál mint lehetséges magyarázatot említi a sztóma nyitottság UV-B indukált csökkenését. Történtek erre irányuló mérések? A javasolt indirekt, hormon közvetítette sztóma záródási mechanizmust több szerző tapasztalatai is alátámasztják. Mivel más fajokkal ellentétben, a gabonafélékben nagy az esély a gázcsere nyílások közvetlen UV-B kitettségre, lehetségesnek tart közvetlen UV-B - sztóma hatást is?

A 115. oldalon azt írja, „búzában a PEG-kezelés sztómazáródást és a nettó fotoszintézis csökkenését okozta, ahogyan azt a kukoricában is észleltük, de az $\Delta F/F_m'$ csökkenése és az intercelluláris CO_2 koncentrációjának növekedése nélkül, ami arra enged következtetni, hogy az ozmotikus stressz a búzában kevésbé volt súlyos, mint a kukoricában.” Az intercelluláris CO_2 csökkenés nélkül bekövetkező nettó fotoszintézis csökkenés véleményem szerint arra utal, hogy a fotoszintézis teljes folyamatában (fény- és sötétreakciók) a zártabb sztómák ellenére nem az elérhető belső CO_2 mennyiség a limitáló tényező, hanem az elektron transzport hatékonysága.

A 105. oldalon azt írja: „bár néha szoros, pozitív korrelációt találtunk a SA- és PA-szintek között, valamint az antioxidáns enzimaktivitások között, - amelyek mindegyike fontos szerepet játszhat a védekező mechanizmusokban - nem találtunk közvetlen összefüggést ezen paraméterek változásai és a liztharmat-rezisztencia között (Pál és mtsai. 2013).” Ezen a ponton, és a poliamin tartalom és a hidegtűrés kapcsolatával kapcsolatban fogalmazódott meg bennem az a kérdés, ami a többféle stressz-poliamin relációban is érdekes lehet: Amennyiben azonosíthatunk egy biomolekulát, aminek kulcs szerepe van a stressz kivédésében, akkor véleménye szerint a tolerancia szempontjából melyik tulajdonság a meghatározó: (1) a stressz bekövetkezése előtti szöveti koncentráció? Vagy inkább a stresszválasz során bekövetkező (2) abszolút vagy (3) relatív koncentrációnövekedés? A disszertációban alkalmazott korrelációs analízisek minden esetben az abszolút értékekre vonatkoztak. Lehetséges, hogy az indukált változások mértékei (és nem abszolút értékei) között fennálló korrelációk keresése további lehetséges összefüggésekre mutathat.

Összességében Pál Magda akadémiai doktori értekezését részletes és megbízható kísérleti alapokon nyugvó, jól illusztrált munkának tartom. A benne foglalt, színvonalas nemzetközi folyóiratokban is publikált új tudományos eredmények bemutatják a poliaminok stressz-indukált mennyiségi és minőségi változásait, illetve ezek kapcsolatát más stressz-metabolitokkal. Az endogén poliamin metabolizmus feltárása, és az exogén poliamin kezelések hatásainak elemzése a stresszélettani felfedező kutatásokon túl mezőgazdasági alkalmazási lehetőségekhez is utat nyitnak.

Fentiek alapján az MTA doktori cím odaítélését feltétlenül támogatom.

Pécs, 2020. január 27-én



Dr Hideg Éva

PTE TTK Növénybiológiai Tanszék, tanszékvezető egyetemi tanár
az MTA doktora

