

Válasz Dr. Hegedűs Attila, az MTA Doktora bírálataira

Szeretném megköszönni opponensemnek alapos munkáját, a dolgozatban előforduló nyelvtani hibákkal, sarkított fogalmazással, pontatlanságokkal, valamint hiányosságokkal kapcsolatos megjegyzéseit, valamint elismerő szavait. A 14. oldalon néhány hivatkozás formátuma valóban eltér, és az említett a hivatkozás valóban hiányzik az irodalomjegyzékből. A Mendeley program többször is megviccelt a dolgozat készítése közben. Opponensemnek a magyar kutatókra vonatkozó hivatkozás hiánnyal kapcsolatban is igaza. A jövőben ezt is hangsúlyosabban figyelembe veszem.

Tételes fejezetenként felsorolt kritikai megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

Bevezetés és Irodalmi áttekintés:

Igyekeztem a dolgozatban a magyar nyelvnek megfelelő megfogalmazásokat használni, sajnos néhány esetben megmaradhatott az angol „high-low” jelzőnek megfelelő téves használat.

A „crosstalk” kifejezés használatával kapcsolatos kérdést Dr. Hideg Éva is felvetette, mivel erről megoszlanak tudományos körökben a vélemények, ezért a jövőben egyelőre inkább az eredeti angol kifejezést fogjuk használni, idézőjelben.

A lipid/fehérje arány és a tilakoid membránok fluiditása közötti összefüggést illetően Mullineaux és mtsai. (2009), kifejti, hogy a lipid/fehérje arány nagy hatással van a membránok tulajdonságaira, mivel ahogy ez az arány emelkedik, a fehérjekomplexek mobilitása is emelkedik a membránban. Guo és mtsai. (2019) tanulmánya szerint a membrán lipidösszetétele, valamint a membránfehérjék kölcsönhatása és aktivitása befolyásolja leginkább a membránpermeabilitást és fluiditást.

Mullineaux C.W., Kirchhoff H. (2009) Role of Lipids in the Dynamics of Thylakoid Membranes. In: Wada H., Murata N. (eds) Lipids in Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 30. Springer, Dordrecht

Guo Q, Liu L, Barkla BJ. Membrane Lipid Remodeling in Response to Salinity. International Journal of Molecular Sciences. 2019; 20(17):4264.

A dolgozatban valóban nem került kifejtésre az a tény, hogy a poliaminok kölcsönhatásba léphetnek a DNS-sel, RNS-sel, kromatinnal, transzkripciós faktorokkal és sok más fehérjével. Ezek a kölcsönhatások különböző szinteken befolyásolhatják a génexpressziót.

Például, a poliaminok elektrosztatikus kölcsönhatásba lépnek a DNS-sel, ami B-DNS forma stabilitását eredményezi. Ugyanakkor, különösen a tetra-és triaminok a nukleoszóma szerkezetét is stabilizálják, míg a hiszton és poliaminok acetilációja, mely egyszerre történhet a kromatin ugyanazon régiójában, szinergista módon a transzkripciónak kedvez (Morgan et al., 1987; Matthews, 1993). A poliaminok a DNS-metiláltságát is stabilizálhatják, a citozin demetiláció csökkentése révén (Kumar et al., 2012). A translációs folyamatot is modulálhatják a poliaminok, mivel befolyásolhatják a rRNS-ek stabilitását, a 16S rRNS konformációját, valamint *Escherichia coli*-ban a Shine – Dalgarno szekvencia és az mRNS iniciációs kodonja közötti térbeli helyzetet.

Másik fontos, de nem a polikationos tulajdonságból eredő szerep a hipuzin bioszintézis. Ilyenkor a spermidin butilamino-csoportjának felhasználásával történik az eukarióta transláció iniciációs faktor 5A (eIF5A) prekursorának poszttranszlációs módosítása, amely a lizint hipuzinné alakítja. A hipuzint tartalmazó eIF5A elengedhetetlen az eukarióta sejtek növekedéséhez.

Amarantos, I., Zarkadis, I.K. and Kalpaxis, D.L. (2002) The identification of spermine binding sites in 16S rRNA allows interpretation of the spermine effect on ribosomal 30S subunit functions. Nucleic Acids Res. 30, 2832–2843.

- Childs, A.C., Mehta, D.J. and Gerner, E.W. (2003) Polyamine-dependent gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1394–1406.
- Igarashi, K. and Kashiwagi, K. (2010) Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 506–512.
- Kumar M., Bijo A.J., Baghel R.S., Reddy C.R.K., Iha B. (2012) Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidants and DNA methylation. *Plant Physiol. Biochem.* 51: 129-138.
- Morgan, J.E., Blankenship, J.W. and Matthews, H.R. (1987) Polyamines and acetylpolyamines increase the stability and alter the conformation of nucleosome core particles. *Biochemistry*, 26, 3643–3649.
- Matthews, H.R. (1993) Polyamines, chromatin structure and transcription. *BioEssays*, 15, 561–566.
- Park M.H., Nishimura K., (2010) Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes, *Amino Acids*, 38 491-500.
- Yoshida, M., Meksuriyen, D., Kashiwagi, K., Kawai, G. and Igarashi, K. (1999) Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA). Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation

Anyagok és Módszerek:

Opponensem kérdése, hogy miért került bemutatásra, hogy a búzavonalak mely levélrozsdá-rezisztencia géneket hordozták. Nem volt muszáj bemutatni, de ez is hozzátartozik az teljességhez. Az itt bemutatott eredmények háttérében a következők álltak: 2010-ben szántóföldi kísérletben vizsgáltunk különböző levélrozsdá-rezisztencia géneket tartalmazó 42 búza genotípust, és meghatároztuk a szalicilsav- és poliamin-tartalmakat fertőzés előtt. Ezek után a Szent-László patak áradása miatt a fertőzött minták vételezése lehetetlenné vált. A következő évben, az előző évi eredmények alapján 22 genotípussal folytattuk a vizsgálatokat, de a mesterséges levélrozsdá-fertőzés kevés tünetet mutatott, ugyanakkor megjelent a lisztharmat-fertőzés. Következő évben ezért üvegházi kísérletet terveztünk, azonban a levélrozsdá fertőző anyagot nem sikerült felszaporítani, így módosítottunk a kísérleten és lisztharmattal dolgoztunk tovább. Viszont kórtannal foglalkozó kutatók számára érdekes információ lehet a rozsdarezisztencia mértéke is, így ezeket az információkat is megadtuk a cikkhez.

A Hoagland tápoldat eredeti hivatkozása valóban hiányzik.

Hoagland and Arnon (1938). The water-culture method for growing plants without soil (Circular (California Agricultural Experiment Station), 347. ed.). Berkeley, Calif. : University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station. Retrieved 1 October 2014.

A rizstápoldat forrását az egyik kínai együttműködő partnerünk a Sanghaji Akadémia rizsnemesítő professzora, Dr. Hanwei Mei ebben a formában bocsátotta rendelkezésünkre mint az általuk eredményesen használt módszert. A rizsnövényeknek teljesen más igényeik vannak, mint a búzának, kezdve azzal, hogy eltérő arányokban igénylik a mikroelemeket, viszont nagy mennyiségben szükséges a nátrium-szilikát alkalmazása, (melyet más növény nem igényel), illetve a savas pH beállítása is fontos volt.

A 8. táblázatban a primerek esetében a „tervezett” kifejezés arra utal, hogy osztályunkon Tajti Judit végezte az adott gén esetében a primer tervezését, illetve optimalizálta a módszert. Az alábbi táblázatban a hiányzó adatokat is feltüntettem:

Gén		Primer szekvenciák (5' → 3')	amplifikált fragmentum (bp)	tapadási hőmérséklet (°C)
<i>TaADC</i>	Forward	TCTACCCCGTCAAGTGCAAC	128	60
	Reverse	GACGAGGCAGCTCATGGT		
<i>TaODC</i>	Forward	CGTGCGTGGAGGTGATAGG	141	60
	Reverse	AGCTGAGGGTGCCGTAGA		
<i>TaOAT</i>	Forward	TGATGATCGCTCGGCTTTACA	93	60
	Reverse	CAGTAGCACCCATTGTTGCAG		
<i>TaP5CS1</i>	Forward	AGGCTGGGTATGAGAGTGC	215	60
	Reverse	TAAGGCATCAGGTCGGGAC		
<i>TaSAMDC</i>	Forward	ACAGCCTTCTCCACACAAGA	195	60
	Reverse	TCCAGACCAGTCATGCACA		
<i>TaSPDS</i>	Forward	AGGTATTCAAGGGTGGCGTG	125	60
	Reverse	TGGGTTCACAGGAGTCAGGA		
<i>TaNCED</i>	Forward	CCTCGAAGCCCAGCACTAAT	74	60
	Reverse	GAGAGCGAGAGGTCCAATGG		

A rizsnél valóban az ubikvitin gén volt a referencia, mivel irodalmi adatok szerint ez mutatja a legkisebb expressziós változékonyságot különböző szövetek, fejlődési állapotok és genotípusok összehasonlító vizsgálata során. Búzánál viszont korábbi tapasztalatok alapján a Ta30797 (foszfolükonát-dehidrogenázhoz hasonló fehérje) gént használtuk.

Pabuayon, I.M., Yamamoto, N., Trinidad, J.L. et al. (2016) Reference genes for accurate gene expression analyses across different tissues, developmental stages and genotypes in rice for drought tolerance. Rice 9, 32.

A statisztikai elemzések során a korreláció arra a kérdésre ad választ, hogy van-e kapcsolat két vagy több mennyiségi változó között, és ha igen, az mennyire szoros. Az ismérvek együttes változását a Pearson-féle korrelációs együttható jellemzi, jele: r . A korrelációs együttható előjele a kapcsolat irányára utal. Ez mutatja meg azt, hogy az összefüggést jellemző egyenes emelkedő, vagy süllyedő jellegű-e. Ennek említése valóban kimaradt a dolgozatból.

Eredmények:

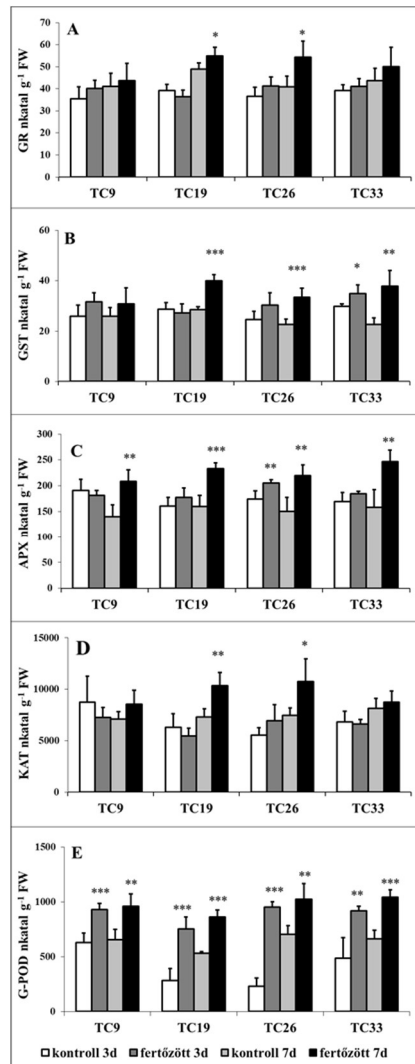
Opponensem 7. ábrával kapcsolatos megjegyzése, hogy a szignifikanciaszintek a különböző genotípusok kontrolljai között nincsenek jelölve. Valóban, a dolgozat elején szereplő eredmények bemutatása során pl. lisztharmat-fertőzés során a 4 genotípus esetén még csak a genotípusokon belül a megfelelő kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérések voltak jelölve, *, ** vagy *** csillaggal a szignifikanciaszintnek megfelelően. Azonban a cikk bírálata során az egyik bíráló kérésének megfelelően az ezen eredményekre vonatkozó statisztikai elemzést is elvégeztük a szövegben, ahogy itt a dolgozatban is jellemeztük, de az ábrán külön nem jelöltük. A későbbiek során a legtöbb esetben áttértünk a betűjeles megkülönböztetésre, a Student-féle t -próba szerint.

A 10. táblázat, illetve a 15. ábra B eredményeivel kapcsolatban, opponensemnek igaza van, sarkos megállapításokat tettem, a kivétel említése nélkül.

Válaszaim opponensem kérdéseire:

- 1. A lisztharmatfertőzést követően a KAT és GR antioxidáns enzimek aktivitás-változása igen hasonló tendenciát mutatott (10. A és D ábra), miközben az APX és GR enzimek aktivitása között több különbség volt megfigyelhető. Mi magyarázhatja ezt, miközben az APX és a GR enzimek ugyanannak a folyamatnak, az aszkorbinsav-glutation ciklusnak a tagjai?*

A 10. ábrán bemutatott GR, GST, APX és KAT aktivitások véleményem szerint hasonló mintázatot mutattak, mind a négy genotípus közötti minimális különbségeket illetően, mind a döntően csak 7 napos fertőzést követő aktivitásnövekedést illetően, mely csak az APX esetén volt mind a négy genotípus esetén szignifikáns. Sokkal inkább kifejezett az a különbség az előbbi négy enzimhez képest, amit a G-POD esetén tapasztaltunk, hiszen a kezdeti aktivitásszint jelentős különbségeket mutatott, ugyanakkor már 3 nap elteltével kifejezett emelkedés volt kimutatható valamennyi genotípusban. Ennek megfelelően, a Függelék 1. táblázatban a korrelációs adatok szoros összefüggést mutattak valamennyi enzim között, így a GR és APX között is.



2. A 7 napos 50 μ M kadmiumkezelés hatására az Mv Hombár búzafajta gyökerében szignifikánsan megnövekedett az AA/DHA arány (20B. ábra). Más vonalak levelében éppen ezzel ellentétes változás volt megfigyelhető, ami jól magyarázható a Cd okozta oxidatív stressz következményeivel. Mi lehet a magyarázata a redukált aszkorbinsav megnövekedett arányának az Mv Hombár búzafajta gyökerében 7 napos Cd-kezelést követően?

Az alábbi táblázat volt PhD hallgatóm eredményeiként kerültek bemutatásra a Kovács et al., 2014 cikkben. Látható, hogy bár az APX aktivitása nem változott, a GSH mennyisége, a GSH/GSSG aránya, valamint a GR aktivitása is emelkedett a toleránsabb martonvásári genotípusokban. Ez a kedvezőbb redox állapot eredményezhette a nagyobb AA/DHA arányt:

leaf	Cd (mM)	nkatal g ⁻¹ FW					AA	AA/DHA	GSH	GSH/GSSG	γ-EC
		GR	G-POD	CAT	APX	GST	(nmol g ⁻¹ FW)	ratio	(nmol g ⁻¹ FW)	ratio	(nmol g ⁻¹ FW)
TC 19	0	33.9±3.6	572.3±109.2	9168.6±1954.2	84.6±14.3	15.3±2.0	435.3±83.6	19.9±1.4	14.9±4.7	18.0±11.8	1.6±0.2
	50	30.5±0.2	777.1±22.1 *	9476.3±313.3	95.4±4.3	15.5±0.7	300.6±4.7	2.1±1.4 ***	10.1±3.8	10.9±4.4	2.1±0.5
TC 33	0	28.0±5.1	387.8±70.2	6548.2±560.0	52.1±9.6	10.8±2.8	283.0±40.3	16.7±2.1	10.1±4.2	10.6±2.6	1.2±0.3
	50	19.4±6.6	470.6±159.8	7568.8±1785.0	56.0±21.0	9.1±2.6	312.0±21.0	5.3±2.0 ***	8.6±7.6	12.1±7.6	2.2±0.7
Mv8	0	30.5±1.7	404.7±98.6	10986.2±518.5	76.8±7.5	11.6±1.8	493.3±6.4	13.8±3.7	6.8±4.0	16.7±7.2	1.0±0.3
	50	29.1±1.2	574.7±112.0	11624.6±666.4	90.0±6.0	9.1±1.0	575.5±72.8	7.8±3.0	9.3±1.9	26.3±11.8	1.2±0.4
Mv Hombár	0	41.3±4.2	415.5±38.0	10374.6±1364.0	78.6±1.6	15.0±1.5	535.6±73.5	12.8±2.2	10.4±2.0	12.1±4.0	1.2±0.2
	50	33.8±4.5	560.9±95.6	11207.9±213.1	79.3±2.9	8.2±1.4 **	469.0±17.0	13.8±4.0	10.7±1.4	17.0±5.6	1.1±0.3
root	Cd (mM)										
TC 19	0	6.9±0.5	928.2±162.9	1100.9±218.8	65.8±13.9	5.0±0.4	46.7±2.5	1.5±0.2	19.8±13.0	16.7±6.4	0.3±0.1
	50	7.4±1.2	967.8±106.5	493.1± 125.1***	62.4±42.4	9.5±0.6 ***	96.0±16.6 *	4.1±2.8	35.3±15.9	23.4±8.0	1.2±0.4 **
TC 33	0	7.9±0.7	1169.1±73.8	711.0±189.5	83.2±5.3	8.2±1.0	51.7±14.9	2.6±1.6	43.2±16.5	23.3±4.2	0.3±0.1
	50	7.0±0.9	945.4±47.8 *	412.8± 114.2***	80.6±21.5	14.2±2.2 *	81.0±10.8 *	2.8±3.7	57.4±17.1	28.3±5.2	1.8±0.5 **
Mv8	0	5.1±1.1	1015.5±134.6	527.5±64.1	83.1±8.1	7.8±2.0	45.0±4.0	2.9±1.6	14.5±3.0	5.6±0.2	0.3±0.1
	50	7.8±0.4 *	968.0±36.3	378.4± 58.4 **	78.7±11.3	15.9±1.1 **	99.5±13.4 **	4.5±2.7	64.4±36.2 *	24.6±7.0 ***	1.7±0.9 *
Mv Hombár	0	4.4±0.02	1255.9±295.7	114.7±51.9	80.8±16.9	6.3±2.4	57.0±7.0	2.5±0.8	10.9±3.0	6.8±2.4	0.3±0.1
	50	9.1±0.6 **	1117.0±110.1	401.4± 49.8 ***	90.9±20.1	17.6±4.3 *	127.0±1.4 ***	5.4±1.5 *	36.5±21.7 *	20.2±6.0 **	1.6±0.3 ***

3. *Véleménye szerint hány év múlva juthatunk el oda, hogy a poliamin-metabolizmust befolyásoló vegyületek célzott kijuttatásával elérhető legyen a gazdasági növények stressztoleranciájának fokozása?*

Intézetünk Növénytermesztési Osztályával együttműködésben évek óta folynak kísérleteink a természetben előforduló vegyületek, mint pl. a szalicilsav és a poliaminok védőhatásának tesztelésére szántóföldi körülmények között. Ezen kísérletekben a védővegyületeket magáztatás formájában alkalmaztuk. Ezen módszer a legegyszerűbbnek tűnik, mégsem egyszerű. A magáztatás időtartama, a visszaszárítás időtartama ugyanolyan fontos tényező, mint az alkalmazott koncentráció. A kereskedelemben egyre több növényi kivonatot alkalmaznak főleg lombtrágyaként, de egyre inkább csávázószerként is alkalmazva, ezen oldatok főleg növényi hormonokat tartalmaznak. Az elmúlt években több pályázatot is adtunk be, melyekben különböző cégekkel, amelyek pont ilyen biostimulátor készítmények forgalmazását végzik, terveztünk együttműködést, azonban egyik sem nyert. Egy ilyen típusú együttműködés lehetősége gyorsan megnyitná az utat a gyakorlati alkalmazás felé.

Szeretném még egyszer megköszönni Dr. Hegedűs Attila professzor szakmai megjegyzéseit, valamint eredményeim új tudományos eredményként való elfogadását.

Martonvásár, 2020. 02. 24.



/Pál Magda/