

Válasz Dr. Hideg Éva, az MTA Doktora bírálataira

Szeretném megköszönni opponensemnek a dolgozat gondos átnézését, elismerő szavait, megjegyzéseit, érdekes szakmai kérdéseit.

Kritikai megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok: Megjegyzések:

A „crosstalk” magyar megfelelőjeként említett „áthallás” kifejezést másoktól is hallottam, igaz, én sem éreztem a legjobbnak, de egyelőre nem találtunk jobbat. Alighanem egyelőre maradunk az angol szó használatánál, hátha egyszer –sok más idegen eredetű szóhoz hasonlóan - ilyen formában épül majd be a magyar nyelvbe. A reaktív gyökök koncentrációjának emelkedésére a „felhalmozódás” kifejezés használata valóban elterjedt, anélkül alkalmazva, hogy belegondolnánk az említett molekulák rövid életidejébe, de a jövőben ezt is kerülni fogom, mind a magyar, mind az angol megfogalmazásban.

Az Irodalmi áttekintés fejezettel kapcsolatban csak két megjegyzés merült fel:

1. *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.).*

Az opponensemnek igaza van, az említett tanulmányban a dohány gyökerekben különböző Cd-koncentrációk hatását vizsgálva valóban megállapítható volt a Cd-felhalmozódás és a DNS-károsodás közötti összefüggés, míg a levelekben ez nem volt kimutatható. Ezt egy részről egy közvetlen hatásnak tulajdoníthatjuk, azaz a kadmium kötődése a guanin, adenin és timin bázisokhoz, de jelentős közvetlen hatásként felelős az antioxidáns rendszer leterheltsége, így a tiolos vegyületek mennyiségi csökkenése, mely a reaktív oxigénformák koncentrációjának emelkedéséhez vezetve okozhat károsodást.

2. *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.*

A megfogalmazás valóban helytelen. A Dobson-egység az ózon oszlopsűrűségének mértékegysége - azt mutatja meg, mennyi ózon van egy adott alapterületű levegőoszlopban a felszín felett, pl. ha 300 Dobson (ez a légköri átlag) esetén az összes ózon egy 3 milliméter vastag réteget képezne a felszínen 0 °C hőmérsékleten. A Föld egyes helyein eltérő mértékű az ózonpajzs elvékonyodása. Ha ez az érték 220 egység alá csökken, ózonlyuknak nevezik a kérdéses zónát.

Kérdések:

Az Anyag és módszer résszel kapcsolatos kérdések:

1. *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 szükségeseink külön nitrát kontrollok)? Hogyan viszonyul az alkalmazott kadmiumnitrát koncentráció az iparilag szennyezett környezetben található kadmium mennyiségéhez?*

A kadmium vegyületként való előfordulását számos tényező befolyásolja. Oxidatív körülmények között a kadmium főleg CdO , CdCO_3 és $\text{Cd}(\text{PO}_4)_2$ formában fordul elő, míg redukáló körülmények között a kadmium szulfid (CdS) a leggyakoribb forma. Lúgos környezetben főként az oxid forma fordul elő, míg savas közegben a mobilis Cd^{2+} forma van jelen. Savas talajokban a kadmium oldhatósága és hozzáférhetősége a szervesanyag-tartalomtól és az Al-, Fe-, Mn-hidroxidoktól is függ. A két legközönségesebb kadmiumvegyület a CdSO_4 és a CdCl_2 , de ezek a közetekben ritkán fordulnak elő, mivel könnyen oldódnak vízben, szemben a CdS dal, mely alig oldódik vízben, így a közetekben ez fordul elő leginkább.

A kadmium-nitrátot üveg és porcelán színezésére használják, valamint régen villanóporként a fényképezésben. Manapság a leginkább Ni-Cd elemekben fordul elő, így e termékek újrahasznosítása kiemelt jelentőségű. Ugyanakkor, bár ez utóbbi szennyezőanyagok megjelenését leszámítva, a talajokban természetesen, ebben a formában a kadmium nem jelenik meg, jó oldhatósága miatt az élettani vizsgálatok során a CdCl_2 mellett, gyakran használt vegyület.

Kísérleteinket hidropónikusan nevelt növényeken végeztük, ahol a tápoldat módosított Hoagland-oldat, illetve rizs esetén egy speciális tápoldat volt (Dolgozat: Táblázat 2 és 3). Mindkét esetben az összetevők között KNO_3 (búza: 0,3125 mM és rizs: 0,18298 mM koncentrációban), illetve $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (búza: 0,45 mN és rizs: 0,365 mM koncentrációban) is szerepelt. A kadmiumkezelések során a $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ -ot 50 μM , azaz 0,05 mM koncentrációban alkalmaztuk, mely az előbbi értékek összegéhez képest még a rizs esetében egy nagyságrenddel kevesebb. Így nem tartottuk szükségesnek a nitrát kontroll alkalmazását.

A Vidékfejlesztési Minisztérium megbízásából a Terradegra projekt keretében (<http://okir-tdr.helion.hu/?diapie=4.4.7.>), egy 2011 évi őszi felvételezés során magyarországi különböző helyszínekhez kapcsolódóan, 0-30 cm-es rétegből vett mintákból végeztek toxikus elem vizsgálatokat. Ennek megfelelően a magyarországi talajok átlagos Cd tartalma a felső 30 cm-es rétegben átlag 0,5 mg/kg alatt van. Magyarországon a talajra megengedett kadmiumszennyezettségi határérték: 1 mg/kg száraztömeg, felszín alatti vizekre 5 $\mu\text{g/l}$ (a 6/2009 (IV. 14.) KvVM-EüM-FVM együttes rendelet alapján). Míg az Európai Unió 2008/105/EK direktívája alapján a felszíni vizekre vízkeménységtől függően 0,45- 1,5 $\mu\text{l/l}$ a meghatározott minőségi kritérium. Bizonyos területeken azonban pl. Budapesten a Csérytelepen, vagy a Balaton-felvidéken is a kommunális, illetve ipari jellegű veszélyes hulladékok felhalmozódása miatt, a talajmintában például a kadmium 25-szöröse is lehet a szennyezettségi határértéknek. A Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézet munkatársai által végzett vizsgálatok (Anton és Murányi, 2007) szerint a gyöngyösrósi Pb/Zn bánya környékének, a Toka patakhoz közeli szennyezett területén a talaj Cd, Cu, Pb és Zn koncentráció igen magas ($\geq 18,0$ mg/kg). A kísérleteinkben alkalmazott 50 μM Cd kezelés hidropónikus formában 5,62 $\mu\text{g/l}$ Cd koncentrációt jelent, ami éppen meghaladja a felszín alatti vizek szennyezettségi határérték és több mint háromszorosa (3,7 – 12,5-szöröse vízkeménységtől függően) a felszíni vizekre vonatkozó határértéknek.

2. *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-kezeltéknél $430 \mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ 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?*

Az irodalomban szereplő UV-B kísérletek eredményei meglehetősen sokfélék, mivel különböző növényfajok, a fejlődés különböző szakaszaiban és más-más nevelési körülmények (szántóföldi vagy mesterséges UV-fényviszonyok) között végezték. Mesterséges körülmények között az alkalmazott fényintenzitás értéket is figyelembe kell venni, esetünkben ez $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PPFD, ami alacsonyabb a természetes fényviszonyokhoz képest, így a kísérlet teljes mértékben nem összevethető a szabadföldi viszonyokkal. Ugyanakkor az eredmények összevetését az is nehezíti, hogy a tanulmányokban eltérő mértékegységekkel jellemzik az UV-B sugárzást. Ehhez nyújthat segítséget Czégény és mtsai. 2016-os összefoglaló cikkében (UV-B effects on leaves-oxidative stress and acclimation in controlled environments (2016) Plant Sci. 248:57-63.) javasolt átszámítási egyenletet. Az UV-B sugárzás mértéke változik a szélességi fokokkal, a magassági értékkel, de az évszak és a napszak, valamint a levegőszennyezés, felhőborítás függvényében is (Norsang et al., 2009). Új-Dél-Walesben (Ausztrália) az értékek megközelítőleg $3,5 \text{ W m}^{-2}$ -t értek el (Keller et al., 2003). Az UV-B sugárzást 50 helyszínen mérték Horvátországban, áprilisban ($1,18 \text{ W m}^{-2}$ - $1,36 \text{ W m}^{-2}$) júliusban ($1,88 \text{ W m}^{-2}$ - $2,06 \text{ W m}^{-2}$) és októberben ($0,81 \text{ W m}^{-2}$ - $0,98 \text{ W m}^{-2}$) (Pehneć et al., 2009). Magyarországon az UV-B sugárzás délben, tiszta égbolt körülmények között eléri a 2 W m^{-2} értéket. Tehát az általunk alkalmazott UV-B sugárzás, melyet Ocean Optics Flame-T-UC-VIS műszerrel mértünk ($430 \mu\text{W cm}^{-2}$, azaz $4,3 \text{ W m}^{-2}$) a természetben előforduló UV-B fizikai dózisa fölé esik, pl. a magyarországi kétszerese. Azonban az irodalomban előforduló kísérletekben alkalmazott sugárzási tartományon belül van ($0,5 - 20 \text{ W m}^{-2}$) (Shiu and Lee, 2005; Lidon et al., 2012; Hui et al., 2013; Sztatelman et al., 2015). Az általunk alkalmazott UV-B sugárzás napi biológiailag aktív dózisa a fent javasolt átszámítás szerint, 16 óra napi megvilágítás során: $19,11 \text{ KJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, mely fent említett reviewban kulcs referenciaként megadott tanulmányokban alkalmazott $8-49 \text{ KJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ tartományba esik.

Az UV-B kísérlet során a kontroll és a járulékos UV-B sugárzást kapott növények az azonos nevelési körülmények biztosítása miatt ugyanazon kamra, ugyanazon asztal felületének két oldalán lettek nevelve, egymástól egy fehér, UV-álló, fényzáró poliészter rolóval elválasztva. A magyarázata annak, hogy a kontroll nevelési körülmények között is mérhető volt kismértékű UV-B sugárzás az az lehet, hogy a SYLVANIA F96T12/CW/VHO fénycsövek a lumineszcencia elvét hasznosítják szabályozott spektrum létrehozására, a lumineszcencia anyag a higany, s ennek köszönhetően valóban van egy kismértékű (átjutó) sugárzás az UV tartományban, azonban ez a gázkisüléses fényforrások működési elvéből adódik. A leadott teljesítmény legnagyobb része PAR tartományban mérhető.

- Chia-Tai Shiu, Tse-Min Lee, (2005) Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate-glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*, J. Exp. Bot., 56, 421, 2851–2865
- Hui, R., Li, X., Chen, C., Zhao, X., Jia, R., Liu, L. and Wei, Y. (2013) Responses of photosynthetic properties and chloroplast ultrastructure of *Bryum argenteum* from a desert biological soil crust to elevated ultraviolet-B radiation. *Physiol Plantarum*, 147: 489-501.
- Keller M., Rogiers S.Y., Schultz H.R. (2003) Nitrogen and ultraviolet radiation modify grapevines' susceptibility to powdery mildew. 42: 87-94.
- Lidon, F.J.C., Teixeira, M. and Ramalho, J.C. (2012) Decay of the chloroplast pool of ascorbate switches on the oxidative burst in UV-B-irradiated Rice. *J. Agron. Crop Sci.*, 198: 130-144.
- Norsang G., Kocbach L., Tsoja W., Stamnes J.J., Dahlback A., Nema P. (2009) Ground-based measurements and modelling of solar UV-B radiation in Lhasa, Tibet. *Atmospheric Environment* 43: 1498-1502.
- Pehneć G., Klasinc L., Sorgo G. (2009) Estimation of biologically effective UV radiation in Croatia. *Periodicum Biologorum* 111: 65-71.
- Sztatelman, O., Grzyb, J., Gabryś, H. et al. (2015) The effect of UV-B on Arabidopsis leaves depends on light conditions after treatment. *BMC Plant Biol* 15, 281.

3. *Opponensem fontosnak és az általános biológiai következtetések szempontjából helyesnek tartja, hogy többféle növényfajjal dolgoztunk, melyek mindegyike haszonnövény. Kérdése, hogy mi indokolta az Emese búzafajta használatát az UV és a PEG hatás kísérletekben? Valamint hasonló kérdése, hogy a putreszcin előkezelés védőhatását búza- és kukoricanövények ozmotikus stressz válaszaiban igazolva miért rizs növényekkel folytattuk 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?*

A liztharmat kísérlet előzményeként 42 búza genotípust teszteltünk, szalicilsav-, illetve poliamin-tartalomra nézve. Az ott kapott eredmények alapján választottunk ki 2 magasabb, illetve 2 alacsonyabb szalicilsav-tartalommal rendelkező genotípust, az ott feltett kérdés megválaszolása érdekében: van-e összefüggés a szalicilsav- és poliamin-tartalom kezdeti vagy fertőzés hatására bekövetkező mennyiségi különbségek és a rezisztencia mértéke között. A továbbiakban az UV-B, ozmotikus és kadmium stressz teszteléséhez viszont mind a szalicilsav, mind a poliamin-tartalmat illetően egy közepes értéket mutató genotípust, az Mv Emesét választottuk. A putreszcin védő hatásának igazolásakor ozmotikus stressz esetén, az alacsony hőmérsékleti stressznél is alkalmazott Mv Hombár és TC 33 genotípusokkal kezdtük a vizsgálatokat, de az Mv Hombár TC 33-hoz viszonyított viszonylagos nagyobb ozmotikus toleranciája miatt a TC 33 mellé inkább másik növény fajt, kukoricát választottunk. Ezek után is búzával folytattuk a poliamin védő hatás vizsgálatát kadmiumstressz során (Mv Emesével), de mivel ezen eredmények teljes egészében a PhD hallgatóm dolgozatát képezik, az én dolgozatomból kimaradtak, csak a diszkusszióban kerültek említésre. A doktori eljárásom megkezdése után érvénybe lépett új szabályozás szerint pedig ez már nem is tehető meg. (A megjelent publikáció: Tajti J. et al., (2018) Comparative study on the effects of putrescine and spermidine pre-treatment on cadmium stress in wheat. Ecotoxicol. Environ. Saf. 148: 546-554.).

A putreszcin- és abszcizinsav-kezelések összehasonlító vizsgálatához szintén a szárazságra érzékeny TC 33 genotípust választottam, és nem a kukoricával dolgoztunk tovább, mivel az előtte leközlött eredmények szerint a búza jobban reagált a putreszcin előkezelésre ozmotikus stressz során, mint a kukorica, valamint a búza esetében microarray eredmények is rendelkezésre álltak, melyek alapján felmerült a putreszcin- és abszcizinsav-kezelés, illetve a PEG hatásainak/átfedésének vizsgálata. A microarray analízis elvégzését csak megemlítettem a dolgozat megvitatás részében, mert az eredmények bemutatását a dolgozat terjedelmére vonatkozó követelmények nem tették lehetővé. (A megjelent publikáció: Pál et. al., (2018) The effects of putrescine are partly overlapping with osmotic stress processes in wheat. Plant Sci. 268: 67-76.)

4. *Kisebb megjegyzés, a folyadékkromatográfiás méréshez használt Waters típusú HPLC készülék részegységeinek leírása elegendő lett volna egy helyen.*

Opponensemnek igaza van, de mivel a HPLC készülék több egységből áll (detektorok, pumpák), s nem mindig azonos konfigurációt használunk minden méréshez, ezért tartottam szükségesnek ismertetni az egyes elválasztásokhoz használt részegységeket.

5. *A gabonanövényekben kiemelten vizsgált flavonolok a rutin, miricetin és a kvercetin. Mennyiségi arányaikban mennyire domináns fenolos vegyületek ezek a gabonafélékben? Klem és mtsai (2015, Plant Physiology and Biochemistry, 93: 74-83) például árpában a lutorarint 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?*

Dr. Szalai Gabriella és Dr. Gondor Orsolya Kinga munkatársaim tanulmányozták korábban különböző szalicilsav kezelések hatását a flavonol metabolizmusra metabolit és génexpressziós szinten is (Gondor et al., (2016) Salicylic acid induction of flavonoid biosynthesis pathways in wheat varies by treatment. Front. Plant Sci. 7:1447.). Megállapították, hogy a fent említett flavonolok naringeninből kiinduló szintézisében változások indukálódtak. Mivel az eltérő fagytoleranciájú gabonafajták vizsgálata során egyik kulcskérdésünk a szalicilsavval összefüggésbe hozható változások voltak, így a hozzá kapcsolódó, egymással szoros szintézisutat mutató flavonolokat (kaempferol, kvercetin, miricetin és rutin) vizsgáltuk és nem a flavonokat.

6. *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?*

A célgének funkcióit valóban érdemes lett volna feltüntetni, esetleg a rövidítések jegyzéke nyújthat segítséget erre a hiányosságra. A „tervezett” kifejezés arra utal, hogy PhD hallgatóm, Tajti Judit tervezte és ellenőrizte a primerek megbízhatóságát.

7. *Opponensem véleménye szerint 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.*

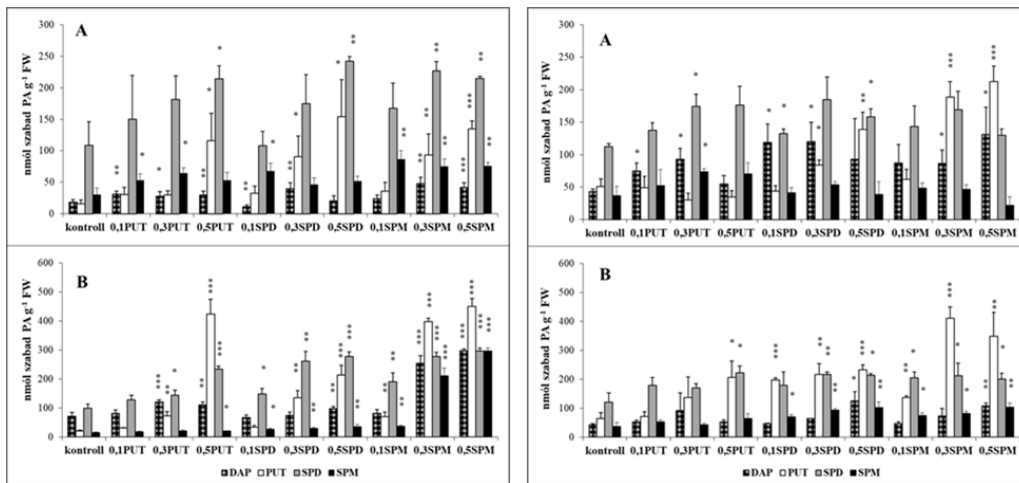
Valóban a dolgozat elején szereplő eredmények bemutatása során pl. liztharmat fertőzés során a 4 genotípus esetén, még csak a genotípusokon belül a megfelelő kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltérések voltak jelölve, *,** vagy *** csillaggal a szignifikanciaszintnek megfelelően. A későbbiek során azonban, igaz, nem minden esetben, a kezelések közötti összehasonlítás is megtörtént. Ennek ellenére a szöveges értékelésben a kifejezett különbségek leírásra kerültek.

Az eredmények résszel kapcsolatos kérdések:

8. *Az exogén poliamin kezeléssel kapcsolatban felmerül a kérdés az alkalmazott koncentrációk megválasztásáról. A vizsgálatok azt mutatták, hogy mindkét fajra (búza*

és kukorica) és mindkét vizsgált növényrészre (levelek, gyökök) jellemző, hogy azok az endogén poliaminokat nem egyforma mennyiségben tartalmazzák. A kezetlen kontroll növények szignifikánsan több, legalább 2-3-szor több spermidint tartalmaztak, mint putreszcint vagy spermint (27. és 28. ábra). Az endogén poliamin kezelések 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?

A poliamin-kezelés nem egyszerű kérdés, mivel a felvett poliaminok a poliamin-ciklusban tovább-, illetve visszaalakulhatnak, valamint a lebontásuk is megtörténhet, emiatt nem biztos, hogy célravezető lett volna a százalékos megközelítés. Az említett 27-28. ábrán pont ez látszik:



Az egyforma koncentrációk alkalmazásával próbáltuk felhívni a figyelmet arra, hogy a poliaminok hatásai eltérőek attól függően, hogy di-, tri- vagy tetraaminokról van szó.

9. Opponensem megjegyzése a 12. -18. táblázatok 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.

Való igaz, az ábrák általában szemléletesebbek, mivel azonban táblázat formájában több adatot tudtam bemutatni, ezt a formát választottam.

A poliamin-kezelések hatását vizsgáló második részben a 42. ábra diszkussziós ábra a búza és kukorica esetén tapasztalt hatások összehasonlítására, míg a putreszin- és abszcizinsav-kezelések összehasonlítása során kapott legérdekesebb eredményeket a 44. ábra mutatja be. A rizs esetében kapott eredményeket bemutató összegző ábrát az előadásban mutatom majd be.

10. Érdekes lehet vízhasznosítás hatásfokának (Pn/E) az elemzése is, különösen a szárazság (ozmotikus) stressz alatt álló növények esetében.

Köszönöm az észrevételt! A jövőbeli kísérleteknél figyelembe veszem ezt a javaslatot.

11. Opponensem kérdése, hogy mi a hipotézisünk, arról, hogy a PA-ok magasabb szintje és az indukálódott antioxidánsok között pozitív korrelációt mutatottunk ki.

A poliaminok direkt módon maguk is antioxidánsok, de metabolizmusa összefüggésben van a GABA-val és a prolinnal is, melyek szintén antioxidáns szerepet is játszanak (Li et al., 2016; Liang et al., 2013). A poliaminok visszaalakulásuk során és terminális katabolizmusuk során is hozzájárulnak a hidrogén-peroxid szintjének megemelkedéséhez, ezzel közvetve is hathatnak az antioxidáns enzimekre.

A poliaminok által szabályozott antioxidáns rendszer átprogramozását írja le nehézfémstressz esetén Paul és mtsai. (2018) egy összefoglaló cikkben, melyben az antioxidáns vegyületek mennyiségének emelkedésére, az antioxidáns enzimek indukciójára, valamint az antioxidáns enzimek génexpressziós szintű aktivációjára világít rá a poliamin kezelésekkkel összefüggésben.

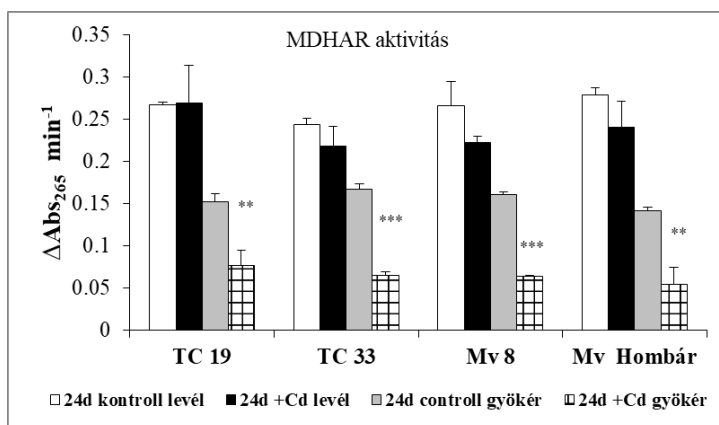
Liang X., Zhang L., Natarajan S. K., Becker D.F.(2013) Antioxidants & Redox Signaling. 19: 998-1011.

Li, Z., Yu, J., Peng, Y. et al. (2016) Metabolic pathways regulated by γ -aminobutyric acid (GABA) contributing to heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). Sci Rep 6, 30338.

Paul S., Banerjee A., Roychoudhury A. (2018) Role of Polyamines in Mediating Antioxidant Defense and Epigenetic Regulation in Plants Exposed to Heavy Metal Toxicity. In: Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M. (eds) Plants Under Metal and Metalloid Stress. Springer, Singapore

12. A kadmium kezelések eredményeinek megvitatásával kapcsolatban említi opponensem, hogy a magasabb oxidált aszkorbát / aszkorbát arány arra utal, hogy e megnövekedett mértékű aszkorbát oxidációval nem tud lépést tartani annak regenerációja. Történt ezekben a kísérletekben enzim aktivitás (DHAR vagy MDHAR) mérés ennek igazolására?

A kísérlet során csak mono-dehidro-aszkorbát-reduktáz aktivitásának a mérése történt, ez az ábra a cikkbe nem került be, mivel így is túl sok adat volt, valamint mivel a levélben a kadmiumkezelés során nem indukálódott az enzim egyik genotípusban sem, így nem magyarázta az ASC/DHA arányokban tapasztalt különbségeket a toleránsabb és érzékenyebb genotípusok levelében kadmium kezelést követően:



13. 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

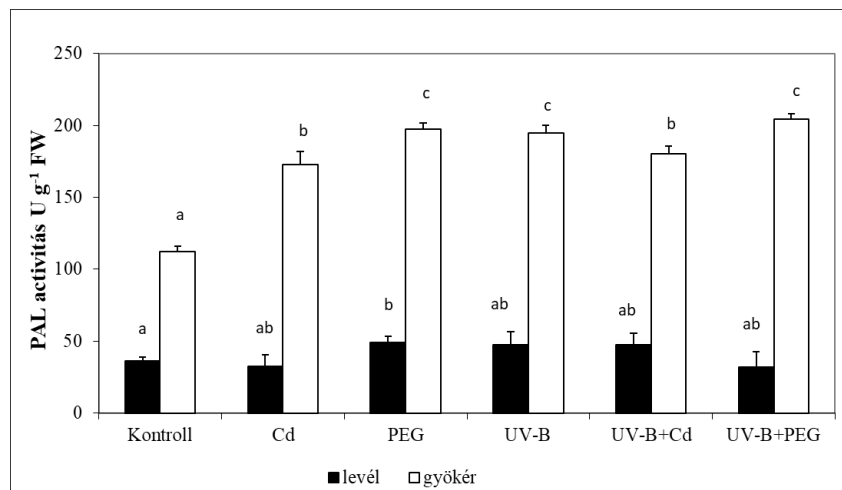
stresszélettani kutatások általános problémája. Ezzel kapcsolatban kérdezem a véleményét: milyen élettani paraméter változásával jellemezzük a stressz mértékét? Pl. fotoszintetikus gázcsere abszolút értékével, relatív hatékonyságával (Pn/gs), a teljes friss tömeggel?

A kérdés megválaszolását nehezíti az a körülmény, hogy az eltérő stresszfaktorok eltérő mértékben befolyásolják az egyes stresszmarkereket, pl. az ozmotikus stressz vízháztartás közvetlenebb befolyásolása révén nagyobb mértékben hat a friss tömegre, mint a száraztömegre, míg a kadmium – koncentrációtól függően – általában mindkét értéket negatívan befolyásolja. A gyökérhosszra kismértékű ozmotikus stressz még serkentőleg is hathat, a Cd viszont szintén cc.-tól függő módon és mértékben általában jelentősebben csökkenti. A klorofilltartalom változása sem mindig mérvadó, van, hogy a kadmium- vagy UV-B-stressz miatt kisebb biomasszával rendelkező növényekben nem volt kimutatható szignifikáns különbség a kontrollhoz viszonyítva, vagy akár alacsony Cd koncentráció serkentőleg hatott. A fluoreszcencia indukciós paraméterek változása alkalmas volt a kadmiumstressz esetén, de az ozmotikus stressz esetén már csak akkor, amikor a hervadás olyan mértékű volt, hogy a növény nem volt használható további vizsgálatokhoz, ellenben a gázcsere-paraméterek közül a sztómakonduktancia csökkenése a stressznek egy korai jele. Hasonlóan, a lipidperoxidáció vizsgálata megfelelő volt a kadmiumstressz esetén, de az ozmotikus stressznél nem annyira. Ezért mindig az adott kísérletben kell eldönteni, hogy milyen stresszmarker vizsgálatát végezzük, és amennyiben lehetséges érdemes többfélét is vizsgálni.

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

A növények UV-B-vel szembeni, az evolúció során régóta kialakult védekező képességéről tanúskodik az UVR8 (UV Resistance Locus 8) fehérje meglete *Arabidopsis*-ban és más fajokban. Ez nemcsak az UV-B-specifikus jelátviteli komponense, hanem egy fotoreceptor is, ami különféle gének expressziós szabályozásán keresztül befolyásolja az UV-védelmet (Hideg et al., 2013). Az UVR8 gén expressziója folyamatos minden növényi szövetben, igaz eltérő mértékben, de még a gyökérben is, mely közvetlenül nincs UV sugárzásnak kitéve (Wan et al., 2018). *Arabidopsis*-ban azt is kimutatták, hogy a flavonoidok és antociánok UV-B indukálta szintézisét is az UVR8 receptor szabályozza (Morales et al., 2013). A gyökér UVB érzékeny 1 (rus1) *Arabidopsis* mutánsban azt is kimutatták, hogy ezen genotípusok UV-B hiperérzékenysége során a gyökerek, s nem más szervek érzékelik az UV-B jelet. A genetikai és molekuláris elemzések megerősítették, hogy ez a többi ismert növényi fotoreceptortól függetlenül történik (Tong et al., 2008).

Kísérletünk során a flavonolok mennyisége az UV-B kezelés során a gyökérben is megemelkedett (igaz kisebb mértékben, mint a levélben), mely összefüggésben lehetett azzal, hogy a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) enzim aktivitása (mely kulcsfontosságú a fenolos vegyületek szintézisében) is megemelkedett a gyökérben. Mivel azonban ez utóbbi enzim aktivitása a levélben nem emelkedett meg, lehetséges, hogy a gyökérben szintetizálódott flavonolok a hajtásba transzlokálódtak. A PAL-aktivitás eredményei nem kerültek be a dolgozatomba, mert a volt PhD hallgatóm dolgozatának részét képezik.



- Hideg É., Jansen M.A.K., Strid A., (2013) UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? Trends in Plant Science, 18, 107-115.
- Morales L.O., Brosché M., Vainonen J., Jenkins G. I., Wargent J. J., Sipari N., Strid Å., Lindfors A. V., Tegelberg R., Aphalo P. J. (2013) Multiple roles for UV RESISTANCE LOCUS8 in regulating gene expression and metabolite accumulation in *Arabidopsis* under solar ultraviolet radiation. Plant Physiol. 161 (2) 744-759;
- Tong H., Leasure C.D., Hou X., Yuen G., Briggs W., He Z.H. (2008) Role of root UV-B sensing in *Arabidopsis* early seedling development. Proc Natl Acad Sci USA 105: 21039-21044.
- Wan J, Zhang P, Wang R, Sun L, Wang W, Zhou H and Xu J (2018) UV-B radiation induces root bending through the flavonoid-mediated auxin pathway in *Arabidopsis*. Front. Plant Sci. 9:618.

15. 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 gázcseré nyílások közvetlen UV-B kitettségére, lehetségesnek tart közvetlen UV-B - sztóma hatást is?

Sajnos ilyen mérések nem történtek. A levelek ozmotikus stressz indukálta sodródását felvételeztük (O'Toole and Cruz, 1980).

He et al., (2013) tanulmánya szerint *Arabidopsis*-ban a G fehérje Gα egységének esszenciális szerepe van a zárósejtekben UV-B sugárzás indukálta jelátvitelben, sztóma zárásban. A G protein számos stimulusra ad választ, így a növényi hormonokra, mint az abszcizinsav, valamint H₂O₂ -ra vagy NO-ra is.

Ugyanakkor, Tossi et al., 2014, szintén *Arabidopsis*-ban kimutatta, hogy az UV-B sugárzás következtében indukáló sztómazáródást az UVR8 jelátviteli útvonal szabályozza, a H₂O₂ és NO produkció stimulálásán át.

- He J.M., Ma X.G., Zhang Y., Sun T.F., Xu F.F., Chen Y.P., Liu X., Yue M. (2013) Role and interrelationship of Gα protein, hydrogen peroxide, and nitric oxide in ultraviolet B-induced stomatal closure in *Arabidopsis* leaves. Plant Physiol. 161 (3) 1570-1583.
- O'Toole, J.C., Cruz, R.T., (1980) Response of leaf water potential, stomatal resistance, and leaf rolling to water stress. Plant Physiol. 65, 428-432.
- Tossi V., Lamattina L., Jenkins G. I., Cassia R. O. (2014) Ultraviolet-B-induced stomatal closure in *Arabidopsis* is regulated by the UV RESISTANCE LOCUS8 Photoreceptor in a nitric oxide-dependent mechanism. Plant Physiol. 164 (4) 2220-2230.

16. 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 CO₂ koncentrációjának növekedése nélkül, ami arra enged következtetni, hogy az ozmotikus stressz a búzában kevésbé volt súlyos, mint a kukoricában.” Az intercelluláris CO₂ 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 CO₂ mennyiség a limitáló tényező, hanem az elektron transzport hatékonysága.

Opponensemnek igaza van, erre is gondoltunk. A belső elérhető CO₂ mennyisége csökkent, azaz csak az elektrontranszport hatékonysága volt a limitáló, ami a kukorica esetén meg is mutatkozott.

17. A 105. oldalon írtak alapján megfogalmazódott kérdése opponensemnek: Amennyiben azonosíthatunk egy biomolekulát, aminek kulcs szerepe van a stressz kivédésében, akkor mi a véleményem, a tolerancia szempontjából melyik tulajdonság a meghatározó: 1.) a stressz bekövetkezése előtti szöveti koncentráció, vagy inkább a stressz válasz során bekövetkező, 2.) abszolút vagy 3.) relatív koncentrációnövekedés?

Kísérleteink során első hipotézisként a kezdeti szalicilsav-, illetve poliamin-tartalomban való eltéréseket vizsgáltuk. Különböző gabonafajok esetén, kimutattuk, hogy a kezdeti értékekben mérhető különbségek nem voltak összefüggésben a liztharmat rezisztencia, a kadmium, az ozmotikus stressz vagy a fagytolerancia mértékével. A legtöbb tanulmányozott védővegyület mennyisége, minden genotípusban megemelkedett az adott stressz során. Bizonyos esetekben azonban egyértelműen kimutatható volt az adott vegyület, pl. abszcizinsav vagy fitokelatin szintjének mennyiségi változása hidegkezelés vagy kadmiumstressz során és a tolerancia foka közötti kapcsolat. Ezért egyetlen egy biomolekula azonosítása, melynek kulcs szerepe van magában, nem valószínűsíthető. Vizsgálataink során a különböző poliamin-vegyületeket is eltérő hatásukon keresztül szeretnénk volna bemutatni, mégpedig úgy, hogy a metabolizmusukkal összefüggést mutató pl. prolint és fitokelatinokat is, illetve a növényi hormonokkal való egymásra hatása miatt, pl. az abszcizinsav- és szalicilsavtartalmat is mértük. A dolgozatban a korrelációs eredmények valóban az abszolút értékekre vonatkoztak, és lehetséges, hogy ha az indukált válaszok mértékét vizsgálnánk, további összefüggéseket állapíthatnánk meg.

Végül még egyszer szeretném megköszönni Dr. Hideg Éva elismerő szavait, megjegyzéseit, érdekes szakmai kérdéseit és kérem eredményeim új tudományos eredményként való elfogadását.



Martonvásár, 2020. 02. 19.

/Pál Magda/