

Opponensi vélemény Várallyay Éva MTA doktori értekezéséről

Megtiszteltetésnek vettem, örömmel és várakozással fogadtam Várallyay Éva MTA doktori értekezésének bírálatát, mert ismert volt előttem szakmai tevékenysége. A Jelölt szerencsés volt abban a tekintetben, hogy munkáját egy új, jól felszerelt, kitűnő intézetben kezdhette el, és nemzetközi hírű, sikeres kutatásokba kapcsolódott be, melyet Burgyán József vezetett. Ez a környezet és a jelölt képességei voltak a biztosítékok arra, hogy egy magas szakmai színvonalú, értékes és nemzetközi tudományos fórumokon jól jegyzett munkával van dolgom.

A dolgozat első oldalain túljutva egy kicsit zavarban voltam, de tudatosult bennem, hogy a jelölt, valószínűleg a határidők miatt, nagy időhiánnyal küszködött. Ennek tulajdonítom a rengeteg gépelési, szerkesztési és itt-ott előforduló helyesírási hibát, melyek tételes felsorolásától eltekintek, de a dolgozatban jeleztem.

A disszertáció témáját tekintve három részre bontható: 1/a kis RNS interferencián alapuló rezisztencia vizsgálata, 2/ vírus vektorok tervezése és előállítása, 3/ nagy áteresztőképességű szekvenálás alkalmazása szőlő és kajszi tesztelésénél.

A dolgozat átolvasása után általános hibának tartom a rövidítések és mozaikszavak túlzott, illetve nem megfelelő használatát, mely sok esetben az érthetőség rovására ment. A tudományos elnevezések írása és toldalékolása sok helyütt helytelen (pl.: a vírusnevek esetében grapevine leafroll associated virus helyett *Grapevine leafroll associated virus*, carnation Italian ringspot virus helyett *Carnation Italian ringspot virus*, *Arabidopsist* helyett *Arabidopsis*-t stb. a helyes). A vírusoknál sok esetben csak az angol nevet adja meg, helytelenül leírva. A jelölt nem fordított kellő figyelmet az angol kifejezések magyar megfelelőjének használatára, így nagyon gyakran előfordulnak angol kifejezések, illetve azok magyar toldalékolásával születő öszvérmegoldások (pl. „pooloztuk”, „targetáltuk”, „depozitáltuk”, felregulálódott”, „kirekombinálódott”, „mimikál” stb.), míg más esetben a fordítást egyszerűen letudva „defecting interfering RNS” helyett „defektív interferáló RNS”-t ír. De gyakran előfordul a növényi gazda (host plant) használata gazdanövény vagy csak növény helyett. Az irodalmi hivatkozásoknál az ékezetes betűket következtelenül vagy nem használja. Például saját 2010-ben megjelent cikkére a szövegben ékezet nélkül írva hivatkozik, holott az eredeti helyen ékezettel van, de a Cseh et al. 2013 hivatkozás társszerzőinek neve az irodalom részben szinte felismerhetetlen.

Észrevételeimet továbbiakban az oldalak sorrendjében teszem meg.

A Tartalomjegyzékben nem szerencsés a rövidítések alkalmazása, a HTS helyett jobb lett volna kiírni a magyar megfelelőjét. A 6.2.3 és a 6.2.4 fejezetek esetén konklúziót írt, elég lett volna a cím.

Az irodalmi áttekintés nagyon egyenetlenre sikerült. A növényi virológia (rövid) története részt gyakorlatilag irodalmi hivatkozás nélkül tekintette át. Ebben a részben csupán két hivatkozás van, mindkettő az RNS interferenciával kapcsolatos.

A „HTS” részben 2 Massari et al hivatkozás szerepel, melyek közül az egyik helytelen dátummal, 2017 helyett 2018 szerepel.

A Növényeket fertőző vírusok és viroidok részben 4 irodalmi hivatkozás van, ezek mindegyike viroidra vonatkozik.

A növény védekezése a vírusfertőzésekkel szemben – RNS interferencia fejezet nagyon egyoldalú és hiányos. Nincsenek megemlítve a növényi rezisztencia (R) fehérjék, a hiperszenzitív reakció (HR), a szisztemikusan szerzett rezisztencia (SAR), a tünetmentes extrém rezisztencia (burgonya X vírus és burgonya kölcsönhatásban) vagy a reaktív oxigénformák. Érdekes lenne tárgyalni, hogy van-e valamilyen kapcsolat az RNS alapú rezisztencia és a fenti rezisztencia mechanizmusok között? Ebben a részben már 12 irodalmi hivatkozás szerepel.

A 3.8 fejezetben írja „A molekuláris vizsgálatokat legtöbbször ELISA tesztekkel végzik...”, itt valószínűleg diagnosztikai vizsgálatokra gondolt.

Az irodalmi áttekintés fejezetek többi része megfelelő, világos és jó áttekintést ad a témában. A jelölt világosan elmagyarázza az RNS interferencia, a DICER fehérjék, a RISC fehérjekomplex és a géncsendesítést gátló virális fehérjék szerepét a növények vírusokkal szembeni rezisztenciájában. A szerző ezen a területen otthonosan és magabiztosan mozog.

A kutatásokban szereplő vírusok áttekintésénél nagyon jól szemlélteti a genomszerveződést, de jó lett volna egységesen minden ábrán feltüntetni a viriont is. A vegetatív szaporítást bemutató 3. ábrát elhagytam volna, mivel az nem való MTA disszertációba. A szőlőt fertőző vírusok részben nagyon helyesen tünetcsoportokat állított fel, azonban ebből a felsorolásból hiányzik a sárga foltok, mozaik tünettípus, holott ide tartoznak olyan jelentős szőlőpatogén vírusok tünetei, mint a szőlő króm mozaik vírus, a paradicsom fekete gyűrűsfoltosság vírus, vagy a szőlő fertőző leromlás vírus és az Arabisz mozaik vírus sárga törzse és az érsárgulás törzse.

A továbbiakban a bírálónak könnyű dolga van, mert a jelölt eredményeiről neves külföldi szaklapokban számolt be, ahol azok valóságát nemzetközileg elismert szakemberek hitelesítették.

Az Anyagok és módszerek részben a szerző szavaival élve „dióhéjban” foglalta össze a molekuláris technikákat, ami esetünkben elfogadható, mert megadta a hozzáférhetőséget is. Több puffer összetételét megadja, kivéve a „kisRNS” puffert. Használja a „mock fertőzés” fogalmát, holott ez mock inokuláció.

Az eredmények bemutatása meggyőző, ami természetes annyi jó helyen megjelent publikáció után. A jelölt használja az akut és perzisztens vírusfertőzések fogalmát, ami véleményem szerint nem fejezi ki a valós helyzetet. Kísérletei során kompatibilis gazda-parazita kapcsolatokat vizsgál, melyeknél mindkét esetben a kapcsolat tartósan fennáll (tehát perzisztens). A betegség lefolyása egyik esetben gyors (akut), a másik esetben lassú (az akut ellentéte a krónikus). Bár ezek a fogalmak elsősorban a humán gyógyászatban használatosak, a növényvirológiában hazánkban V. Németh Mária használta ezeket a vírustünetek és a betegség lefolyásának jellemzésére.

A bemutatott ábrák általában áttekinthetők és jól demonstrálják a kapott eredményeket. Sok esetben az ábrák túlzott kicsinyítése miatt azok nehezen vagy egyáltalán nem olvashatók. A levéltünetek nem láthatók a 40., 45., 56., 61. és 63. ábrán, a 68. és 69. ábra nincs kellőképpen megmagyarázva, a 85. és 86. ábrán a felirat eltolódott és a Northern hibridizációt bemutató

panelek az esetek nagy részében nem vagy alig értékelhetők. A filogenetikai elemzéseket megjelenítő ábráknál jó lett volna feltüntetni, hogy a különböző génbanki azonosítók, kódszámok mit takarnak. Sajnos az ábráknál általában nem szerepel, hogy milyen szekvenciák vagy szekvencia részletek lettek összehasonlítva. A 103. ábra és az aláírás külön oldalra került.

A 46. oldalon ír a glutation-S-transzferáz, a „patogén kapcsolt”(PR), SAR és hősokk (HSP) gének vizsgálatáról. Itt nem világos, hogy melyik géneket vizsgálta, hiszen a GST géneket, a kórfolyamathoz kapcsolt (PR) géneket és a HSP géneket is nagy géncsaládok kódolják, a SAR pedig nem egy gén hanem egy rezisztencia forma.

A 47. oldalon a vírustünetek felsorolásánál hiányzik a nekrózis, illetve a levél méretének csökkenése helyett inkább növekedésgátlás figyelhető meg.

Nagy értéke a disszertációnak, hogy a VIGS vektorok előállításánál a gyakorlati alkalmazást is szem előtt tartotta. Így a búza liszttharmat-ellenállóságát alakította ki a géncsendesítés módszerével a búza *Mlo* ortológiát felhasználva. Hatékony fertőzési és festési eljárást dolgozott ki a búzafajták ellenállóságának vizsgálatára. Kár, hogy az 56. ábrán a képek – a túlzott kicsinyítés miatt - nem jól láthatók. Kérdésem, hogy a betegség tünetek (levélfelület liszttharmat borítottsága) is csökkentek-e a géncsendesítés következtében, továbbá a gátlás tartós volt vagy csak késleltette a fertőzés lefolyását?

A 6.4.2 fejezet az Anyag és módszer részbe tartozik. Nem tartom szerencsésnek a begyűjtött minták kódszámozását és módszerét. A leírásból nem derül ki, hogy a random begyűjtött minták esetén feljegyezték-e a táblaszámot, a sor és tőke számát az esetleges ismételhetőség miatt. A korábbi felmérések során szokás volt a minták jelölését úgy végezni, hogy az utaljon a mintavétel helyére is (például BB - Balatonboglár, S- Sopron, To – Tokaj, Ta – Tarcál, P – Pécs, Sze - Szekszárd stb), ami jelentősen növelte az érthetőséget. A továbbiakban javasolnám Lehoczky János mintagyűjtési és kódszámozási módszerének átvételét, amellyel a mintagyűjtés pontosan megismételhető. A kevert mintákból sokszor nem mutatható ki vírus, de egyedi mintákból igen. Hány minta keverhető össze, hogy biztosan detektálható legyen a vírus? A vírusok között van-e különbség ebben a tekintetben?

A szőlőültetvények vírushordozóit vizsgáló tapasztalatait és az eredmények összefoglalását a 6.4.2.27 (Szőlő sárga foltosság viroid) fejezetben tárgyalja. Ez megért volna egy külön fejezetet is. Ebben a részben írja „Így sikerült leírunk számos hazánkban újonnan megjelent virális kórokozót, melyek meglepő módon országszerte széles körben elterjedtek voltak, és az egyes újonnan megjelenő vírusok variánsai esetében nagymértékű genetikai variabilitást tapasztaltunk.” Az újonnan megjelent vírusok között felsorolja a *Grapevine rupestris vein feathering virus*- t is, melyet a 12DF 100 éves ültetvényről is kimutatott. Mikor és hogyan kerülhetett oda?

A szőlő alanyültetvények virológiai felmérésénél 30 fajtáról gyűjtöttek mintát, de nem írja le, hogy melyek voltak azok. A 98. oldalon hibásan hivatkozik a 9. ábrára, itt valójában a 12. ábráról van szó.

Az új, nagyteljesítményű RNS-szekvenálási módszer alkalmazásával minőségi szintet lépett a szőlő vírusdiagnosztika. Az egész országra kiterjedt felmérések során hazánkban elsőként 3 új vírus előfordulását igazolta. Az újonnan kimutatott vírusok kórtani szerepe azonban nem tisztázott. Nem ismert, hogy okoznak-e tüneteket és azokra mi jellemző. Az új kórokozók

leírása esetén elvárt Koch posztulátumok teljesülésének igazolása is várat magára. Vizsgálatai ugyanakkor bizonyítják, hogy a korábban leggyakrabban előforduló és a legtöbb gondot okozó szőlő fertőző leromlás vírus nem mutatható ki, tehát a vírusmentesítési program hatékony volt.

A disszertáció nagy értékének tartom, hogy a korábban Lehoczky János által izolált új vírus (szőlő vonalas mintázottság vírus, *Grapevine line pattern virus*) elsődleges szerkezetét és rendszertani helyét meghatározta. Javasolnám a továbbiakban Lehoczky János által a világon először izolált szőlő króm mozaik vírus elsődleges szerkezetének meghatározását is. Az eredeti izolátum átváltozva megtalálható volt a kecskeméti gyűjteményben.

A doktori értekezés és a tézisek címe nem egyezik.

Várallyay Éva doktori értekezése magas szakmai színvonalú, számos magas impaktfaktorú közleményre épül. A jelölt a legkorszerűbb molekuláris technikákat használta kísérletei során. Imponáló mennyiségű kísérleti munkát végzett nagy felkészültséget igénylő módszerekkel, mint a klónozás, Northern hibridizálás és Western blotolás, géncsendesítési vektorok létrehozása és a korszerű nagyteljesítményű RNS szekvenálás. Nagyon sajnálatos, hogy ezt a szép munkát kissé felületes módon prezentálta.

A dolgozat új tudományos eredményének fogadom el az általa felsorolt 10 pontot.

Várallyay Éva tudományos eredményei alapján az MTA doktora cím odaítélését javaslom.

Dr. Tóbiás István

MTA doktora

Budapest, 2021. február