

Akadémiai doktori értekezés bírálata**Dr. Várallyay Éva****Növényeket fertőző vírusok gazdanövényre gyakorolt hatásának vizsgálata, diagnosztikája és felhasználása a molekuláris biológiában****bíráló: Putnoky Péter DSc**

A növényi vírusok kutatása tradicionális része a magyar tudománynak. Bizonyítja ezt a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet hosszú ideje kiváló eredményeket felmutató kutató közössége, melynek több mint húsz éve eredményes tagja a jelölt is. Akadémiai doktori értekezését 11 rangos publikációra alapozva állította össze, melyek már megfeleltek a nemzetközi bírálók szigorú szempontjainak is.

A dolgozat vizsgálja, hogy hogyan változik a különböző típusú silencing represszor vírus fehérjék (VSR) jelenlétében a növényi védekezés két fontos eleme, a miR168 és az ARGONAUTE1 gének expressziója. Beszámol arról a munkáról, amiben a különböző típusú vírusfertőzések során a növényi gének expressziójának változásait mérték fel, és vizsgálták a fertőzött növények élettani reakcióit is.

Géncsendesítésre alkalmas (VIGS) vírus vektorok fejlesztésével, illetve alkalmazásukkal kapcsolatban is több eredményt ismertet, így egy búza lisztharmat rezisztencia kialakításának lehetőségéről is beszámol.

A munka másik, jelentős része azokat a kísérleteket foglalja össze, melyekben új generációs szekvenálási (HTS) eljárás és a hozzá tartozó bioinformatikai módszerek adaptálása után, egy nagy léptékű munkában felmérték a hazai szőlő ültetvények vírus és viroid fertőzöttségét. Számos növényi vírust először diagnosztizáltak hazánkban, és egy, Magyarországon Lehoczky János és munkatársai által még 1987-ben leírt vírus, a szőlő vonalas mintázottság vírus (grapevine line pattern vírus - GLPV) létezésének végső bizonyítékeként a teljes genomszekvencia meghatározásáról is beszámol a dolgozat. Ez mintegy keretezi és kiemeli a hazai növényi vírus kutatók sokéves eredményes munkáját.

A doktori dolgozat a hagyományos szerkezetet követi. Egy rövid *Bevezetés* után az *Irodalmi áttekintés* 17 oldalon összefoglalja a témához tartozó alapvető tudnivalókat, a növényi virológia rövid történetétől kezdve a vírusokkal szembeni molekuláris védekező mechanizmusok leírásán keresztül, a vírusvektorok különböző alkalmazási lehetőségeit is felvázolva. Ennek a résznek a második fele részletesen leírja azokat a fontosabb növényi vírusokat, melyek a dolgozatban említésre kerülnek, mindegyiknél megemlíti a genom felépítését is.

A Célkitűzések rész egy oldalban tömören összefoglalja a munka főbb céljait. Ezeket itt külön nem emelem ki, mert a bírálat további részében, mindegyik említésre kerül.

Az *Anyagok és módszerek* fejezet röviden bemutatja a legfontosabb alkalmazott módszereket, mindenütt hivatkozva arra, hogy a dolgozat alapjául szolgáló publikációkban részletesebb leírásokat talál az érdeklődő. Imponáló az a módszertani sokféleség, ami az egész munka során alkalmazásra került, a vírus vektorok különböző alkalmazásaitól a sokoldalú génexpressziós vizsgálatokig: Northern, Western, RT-PCR, microarray és kis RNS-ek tömeges szekvenálása, valamint mindezekhez a szükséges bioinformatika alkalmazása.

Az *Eredmények és értékelésük* rész közel 80 oldalon, gazdagon dokumentálva, részletes ábrákkal mutatja be az egyes kísérletek eredményeit.

1) Az első rész a MIR168 és AGO1 gének expressziójának viszonyát vizsgálva több modellen bemutatja, hogy vírus fertőzés hatására a miR168 indukció, az AGO1 mRNS transzlációs kontrollja miatt, az AGO1 fehérje szintjének csökkenését eredményezi. Ez kizárólag a miR168a gén fokozott működésének köszönhető. Különösen érdekes, hogy az eltérő hatásmechanizmussal a növény védekező reakcióját gátló virális represszor (VSR) fehérjék jelenléte általánosan indukálja a miR168 szintjét. Ez a hatás akkor is működik, ha pl. a p19 VSR fehérjét úgy módosítják, hogy az nem képes a siRNS-ek hatékony megkötésére.

Kérdésem, hogy milyen mechanizmus alapján lehetne magyarázni a különböző típusú VSR fehérjék azonos hatását a miR168 indukcióra?

2) A következő rész a vírus fertőzött gazdanövény génexpressziójának általános változásait vizsgálja akut és perzisztens fertőzések során. Microarray és RNS szekvenálási módszereket is alkalmaztak, és több esetben Northern blot és kvantitatív RT-PCR segítségével is igazolták a megfigyelt változásokat. A bemutatott kísérletek elvégzése és értékelése önmagában is elismerésre méltó, komplex feladat, hiszen több ezer gén működésének változásait kellett nyomon követni, két gazdanövény és összesen öt különböző vírus bevonásával. Az akut fertőzés, szemben a perzisztens fertőzésekkel tapasztaltakkal, nagyon sok gén működésére hatással volt, így a stresszgének indukciója, és a fotoszintézishez kapcsolódó gének gátlása volt megfigyelhető. Fontos megfigyelés, hogy az akut fertőzésekkel a hormon háztartással kapcsolatos gének is jelentősebb expressziós különbségeket mutatnak, ami nyilván a fotoszintézistől a növény növekedésén keresztül számos folyamatra hatással van, így eredményezve a súlyos tüneteket.

Mi lehet a tünetek közötti drasztikus különbség oka? Ahogy a bevezetőben láttam, például az akut fertőzést mutató CymRSV és crTMV, valamint a perzisztens TCV vírusnak is van VSR fehérjéje. Esetleg ez utóbbinál a represszor nem elég hatékony?

A további, p19 VSR hiányos vírusokkal végzett vizsgálatok is azt mutatják, hogy a háztartási gének tömeges lekapcsolása a nekrosis elmaradásakor is bekövetkezik.

3) Az eredmények következő része különböző, géncsendesítésre alkalmas vírus vektorok (VIGS vektorok) fejlesztéséről és felhasználásáról szól. Az első rész a *Medicago truncatula* szimbiotikus nitrogénkötésben használt modellnövényen alkalmazható VIGS vektor fejlesztését és tesztelését mutatja be. Az új vektorok képesek voltak endogén gének csendesítésére, mind *N. benthamiana* és *M. truncatula* növényben is, de eltérő hatásokkal. Pont *M. truncatula* esetében voltak kevésbé biztatóak az eredmények.

A következő rész témája lisztharmat-rezisztencia kialakítása búzán, ahol szintén a géncsendesítés módszerét alkalmazták, sikerrel. A téma gyakorlati jelentőségét nem kell ecsetelni. Árpánál ismert, hogy az *Mlo* gén mutációja rezisztenciát okoz. A hexaploid búzában hét *Mlo* gént írtak le. Irodalmi adatok ismeretében a kísérletekhez a *TaMlo1B* változatot célszerű használni. Több előkísérlet (alkalmas búzafajta kiválasztása, a csendesítés mértékének tesztelése) után kétféle, *Mlo* szekvenciát tartalmazó

konstrukcióval fertőztek. Mindkét vektorral működött a csendesítés, a fertőzött növényekben keletkezett Mlo specifikus sRNS, de a bonyolultabb konstrukció instabilabb volt. Egy biológiai tesztben a kezelt növények ellenállóbbnak bizonyultak a lisztharmat fertőzéssel szemben.

A fejezetben bemutatott további vizsgálatok arra utalnak, hogy a qRT-PCR során használt referencia gének expressziója növény-vírus kapcsolattól függően változhat. Több vírus-gazda rendszerben elemezték a lehetséges referencia gének expresszióját, ami nagyon vegyes képet mutatott. Tehát fontos előkísérleteket végezni egy adott rendszernél a megfelelő kontroll kiválasztásához. Eredményeik szerint a vektorba épített idegen DNS jelenléte (akár szekvenciától függetlenül) szintén befolyásolhatja a referencia gének működését.

Az eddigiek alapján lehet-e olyan további fejlesztéseket javasolni, melyek hatékonyabbá teszik a SHMV VIGS vektorokat? A szimbiotikus génekkel kapcsolatban történt-e próbálkozás a vektorok használatára?

A szövegből nem egyértelmű, hogy valóban a TaMlo1B szekvencia 3' végét használták a kísérletekben. Van-e folytatása a sikeres kísérleteknek? Esetleg alkalmazható-e ebben a bonyolult genomban a CRISPR génszerkesztés? (Ez utóbbi kérdésemre a „8. Következtetések, javaslatok” fejezetből már megkaptam a választ.)

4) Az eredmények utolsó fejezetében – a vírus fertőzött gazdanövények génexpressziós vizsgálataihoz hasonlóan – ismét egy nagy léptékű vizsgálat sorozatot mutat be, amely elsősorban szőlő, kisebb részben kajszli ültetvények vírus fertőzöttségét kívánta felderíteni, a kis RNS-ek nagy-áteresztőképességű szekvenálása (HTS) segítségével. Ennek az új vírusdiagnosztikai módszernek az optimalizálása után 9 hazai borvidék összesen 14 ültetvényéről származó mintában határozták meg az sRNS szekvenciákat, és ezek elemzése révén állították össze az ültetvényeken fellelhető vírusok (viroidok) szekvenciáit. Ezeket az eredményeket RT-PCR reakciókkal cDNS-eket készítve, és azok szekvenciáit meghatározva, igazolták az egyes vírus genomok jelenlétét. A fejezet részletesen leírja az egyes vírus fajták hazai előfordulását, és a meghatározott szekvenciák filogenetikai elemzését is bemutatja, összevetve az adatbázisokban található ismert szekvenciákkal. Összesen 15 féle szekvencia elemzéséről van szó, több esetben először detektálták ezeket a hazai ültetvényeken. Több esetben kiderült, az azonos ültetvényről származó egyes vírus variánsok filogenetikai elemzése alapján, hogy azok jelentősen eltérnek egymástól. Ez arra utal, hogy a fertőzések a szaporítóanyaggal kerülhettek be a területre.

A szőlő vonalas mintázottság vírus (GLPV) genom szekvenciájának meghatározása az utolsó rész tárgya. Az összeállított szekvenciákból kiderült, hogy a GLPV az Anula vírusok csoportjába tartozik. Sikert a genom mindhárom RNS-ét RT-PCR segítségével felsokszorozni, és a hagyományos Sanger szekvenálással pontosabban meghatározni. Ennek ismeretében egy rövid, cirkuláris RNS-t is kimutattak, amely az RNS2 szekvenciából keletkezhetett. Ennek valóságát további kísérletekkel igazolták. A vírus fertőzött mintákban a cirkuláris RNS-ről sok sRNS keletkezett. Az RNS2 szekvenciában találtak egy 9 bázis hosszúságú ismétlődő szekvenciát, aminek szerepe lehet a cirkuláris RNS keletkezésében. Hasonló, ismétlődő szekvenciát találtak rokon vírusoknál is. Ennek kapcsán

felmerült, hogy az ilyen típusú vírusok – mivel nem kódolnak VSR fehérjét – ilyen cirkuláris RNS-t alkalmaznak silencing represszorként.

A sRNS HTS technika nem túl munkaigényes és költséges ahhoz, hogy elfogadott diagnosztikai rutin eljárás legyen? Kell-e tudnunk rutin szinten (nem alapkutatás szinten), hogy az adott növényben milyen vírusszerű szekvenciák fordulnak elő?

Az, hogy az azonos helyről származó egyes vírus variánsok jelentősen eltérnek egymástól, jelentheti azt, hogy a szaporítóanyaggal kerülhettek be a területre. Kérdés, hogy a variánsok egy fajta különböző egyedeiről származnak, vagy különböző fajtákban azonosították azokat? Ez utóbbi talán jobban magyarázza, hogy a fertőzés forrása a különböző földrajzi eredetű szaporítóanyag volt.

Elemezték-e utólag a GLPV szekvenciák meglétére az ültetvényekről származó HTS adatokat?

A GLPV esetében hogyan lehetne igazolni, hogy a felfedezett cirkuláris RNS valóban egy silencing represszor molekula? Esetleg az egyik ismétlődő szekvenciát meg lehet változtatni alternatív kodonokat alkalmazva?

Új tudományos eredmények:

- 1/ Igazolták, hogy a nem rokon VSR fehérjék képesek a miR168 gén indukciójával gátolni a növény AGO1 aktivitását.
- 2/ Kimutatták, hogy a p19 VSR fehérje miR168 indukáló hatása független az sRNS kötő képességétől.
- 3/ Kimutattuk, hogy akut fertőzés során a gazdagének igen nagy részének expressziós állapota változik. A fotoszintézis gének nagymértékű expressziós változását fiziológiai mérésekkel megerősítették. Perzisztens vírusfertőzések során ezek a változások nem következnek be.
- 4/ Különböző vírus vektorokat (VIGS) készítettek illetve alkalmaztak géncsendesítési folyamatok vizsgálatára. Kimutatták, hogy a búza *Mlo* gén csendesítése lisztharmat ellenállóságot eredményez. Elterjedt VIGS vektorokat alkalmazva különböző növényeken kimutatták, hogy referenciának használt gének expressziós szintje a vizsgálati rendszertől függően jelentősen változhat, ezért a kontrollok használata nagy odafigyelést igényel.
- 5/ Kis RNS-ek nagy áteresztőképességű szekvenálását (HTS) adaptálták, és sikerrel alkalmazták virológiai felmérésre szőlő és kajszi ültetvényeken. Több vírus jelenlétét elsőként írták le hazánkban. A hazánkban leírt szőlő vonalas mintázottság vírus (GLPV) genom szekvenciáját is sikerrel határozták meg, így bizonyították, hogy a vírus valóban létezik.

Mint a fentiekből látszik, a dolgozat nagyon sok eredményt foglal magába. Ez mindenképpen elismerésre méltó teljesítményt takar, de azt a véleményemet sem hallgathatom el, hogy szerintem elég lett volna kevesebbet bemutatni, illetve, például a vírusfertőzött növények génexpressziós vizsgálatainál, vagy a szőlőültetvények fertőzöttségi vizsgálatairól szóló fejezetekben kevesebb ábrával illusztrálni. Az összesen 117 ábra között talán lehetett volna szelektálni, hiszen úgyis képtelenség minden kísérleti eredményt bemutatni.

A dolgozat nyelvezete, stílusa jól segíti az elvégzett munka megértését. Gépelési hibák és, ritkábban, helyesírási hibák azért előfordulnak benne. Úgy látszik elmaradt a kész dolgozat végső ellenőrzése, pedig a szövegszerkesztő program helyesírás ellenőrző funkciója jó szolgálatot tett volna.

További megjegyzések:

Van néhány elnagyolt megfogalmazás: „Olyan gének funkciója is vizsgálható, melyek letálisak” (12 old., 5. és 6. sor), vagy „a vizsgált gén hiánya az egész növényen megfigyelhető” (13. old., 2. sor). Nyilván nem a gén letális, és nem a gént tünteti el a kezelés ...

Bár a hozzáértők tudják, hogy mit takar a HTS, legalább egyszer ki lehetett volna írni.

Gondolom, ez az állítás inkább a csendesítés hatékonyságára vonatkozik: „a hatékony fertőzésnek köszönhetően a vírus csak kis mennyiségben van jelen” (53. old., 27. sor).

Néhány ábra elég nehezen olvasható, túl kicsi (pl. 31., 33., 34., 86. ábra). Talán ezek közül is ki lehetett volna hagyni néhányat, egyes eredmények részletesebb ismertetésével együtt. Nem jellemző példaként megemlítem, hogy az 52. ábra (62. old.) magyarázata kissé hiányos. Mit jelentenek a számok? Gondolom, ebben a kísérletben 6-6 fertőzött egyed lett vizsgálva a vírus jelenlétére. Mi okozhatja a különbséget? Lehet-e a fertőzés hatékonysága (technikai) az oka, vagy az egyedek közötti genetikai különbség?

Az 55. ábra (62. old.) alatt sincs magyarázat. A számozás itt el is csúszott. Az ábra körüli szövegben az áll: BSMV: MLOA esetén ez 75% (8 növényből 6), a BSMV: PDS: MLOA esetében ez csak 62,5% (8 növényből 5 fertőződött) Az ábra pedig mindkét esetben 5-5 növény fertőzöttségét mutatja. Később utalás van arra, hogy az Mlo specifikus sRNS jelenlétét is mutatja az ábra. Ezt én nem találok.

A 6.3.2.3. fejezetben (62. old.) a publikációra elég lett volna csak a szokásos módon hivatkozni, nem pedig a teljes szerzői névsor, cím ... stb. megadásával. A fejezet elején található módszer leírása az Anyagok és módszerek részhez illik inkább.

Gondolom, ez a rész: „majd meghatároztuk az aminosav-szekvenciát „(75. old., 9. sor) inkább azt jelenti, hogy a szekvencia alapján prediktálták az aminosav sorrendet.

A GPGV vírussal kapcsolatban a 87. oldal 11. sorában ez olvasható: „a látens csoportba tartozik, amelynek képviselői MP végükön rövidebbek 6 aminosavval”. A 98. oldal elején pedig ez: „a tüneteket okozó variánsok mozgási fehérjét kódoló ORF egy hat aminosavval rövidebb fehérjét kódol” A 20. oldal alján a vírus ismertetésekor viszont ez szerepel: „a tünetmentes szőlő mintából származó izolátum MP-t kódoló szakasza 6 nukleotiddal hosszabb”. Melyik a helyes?

Összefoglalva: Dr. Várallyay Éva dolgozata nemzetközi szinten is elismerésre méltó kutatási teljesítményt tartalmaz, amit publikációs listája is alátámaszt. Javaslom a MTA Doktora tudományos cím elnyeréséhez szükséges nyilvános vita kitűzését, és sikeres védelem esetén a cím odaítélését.



2021. 03. 04.

Dr. Putnoky Péter egyetemi tanár

PTE TTK Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék