

Válasz Dr. Barna Balázs, az MTA Doktora bírálatára

Köszönöm Dr. Barna Balázs elismerő és kritikus észrevételeit, s hogy időt szánt a dolgozat részletes átnézésére.

Megjegyzések, kérdések

Az Irodalmi áttekintés részben hivatkozott saját cikkek vagy összefoglaló jellegű munkák, vagy pedig részben kutatási előzménynek tekinthetők. Ezek a cikkek az eredmények részbe ténylegesen nem kerültek bele.

A helyesírási/gépelési hibákat próbáltam többszöri átnézéssel kiszűrni. Utólag már én is furcsának találom, hogy Nebraskát c-vel írtam.

1) *Az 5.1.1. részben hiányzik a 3. ábrára hivatkozás.*

Valóban, az 5.1.1. fejezetből kimaradt a 3. ábrára való hivatkozás. Az egész fejezet ezt az ábrát tárgyalja, az egész oldalas ábra közvetlenül követi a fent említett fejezetet, s az ábraszöveg alapján az ábra köthető a fejezethez. Ez ugyan nem menti a kimaradt hivatkozást, de talán így is összeköthető az ábra a szöveggel, bár lényegesen egyszerűbb lenne ez hivatkozással.

2) *A hideg stressz, illetve a SA kezelés ACC akkumulációra gyakorolt hatása teljes korrelációban volt, az értekezésben nem szereplő, közvetlen etilén mérés eredményeivel? Esetleg a korreláció bizonyos hiányából az ACC oxidáz enzim aktivitás változásaira is lehet következtetni?*

A dolgozatban ismertetett kísérletből nem történt etilén mérés, csak az ACC-t illetve az MACC-t mértük. Korábban viszont történtek mérések 1 napos 6 °C-os hidegkezelést követően kukoricanövények leveléből. Az etiléntermelés SA hatására nevelési hőmérsékleten kb. két és félszerese volt a kontroll növényének. Az ACC tartalom nem változott kontroll körülmények között a SA-kezelt növényekben. Hideg hatására az etilén mennyisége a nem kezelt növények esetében nagymértékben megnőtt (kb. hétszeresére), míg a SA-kezelt növényeknél csak kb. háromszoros volt, tehát nem sokkal több, mint csak SA kezelés hatására. Az ACC tartalomnál is megfigyelhettük, hogy a SA-kezelt növényekben sokkal kisebb mértékben emelkedett meg 1 napos 4 °C-os hidegkezelés alatt, mint a nem kezelt növényekben, tehát mondhatjuk azt, hogy levelekben az etiléntermelés és az ACC felhalmozódás között teljes korreláció figyelhető meg. A gyökerek esetében sajnos nincs adatunk erről, mivel gyökerekből nem történt etilén mérés.

Az alábbi táblázatban található az etiléntermelés adatai (nl etilén g(FW)⁻¹ h⁻¹) fiatal kukoricanövényben 1 napos hidegkezelés (6 °C) után 5·10⁻⁴ M szalicilsav jelenlétében és anélkül. (n = 4; ns: nem szignifikáns; **: szignifikáns p ≤ 0,01 szinten a nem hidegkezelt értékekhez képest).

Kezelés	24 °C	1d 6°C
Kontrol	0,638 (±1,276)	4,394 (±1,180) **
5·10 ⁻⁴ M SA	1,584 (±1,995)	1,988 (±1,442) ^{ns}

3) *Az értekezés 5.1.2, 5.1.3, 5.1.4 és a SA magáztatásos kísérletek fejezetéből nekem hiányzik a szemmel látható tünetek leírása. Ezekből lehet következtetni a biokémiai változásokra és azok okaira. Még akkor is plusz információt jelentenek, ha az adott kezelés(ek) semmiféle szemmel látható tünetet nem okoz(tak).*

Valóban kimaradtak a tüneti leírások. A védés során az előadásban erre figyelmet fogok fordítani.

4) *A rengeteg mérési adatból végül levonható-e általános következtetés, hogy a SA előkezelés növeli vagy csökkenti a Cd toxicitást, illetve a Cd felvételét a növénybe?*

A szalicilsav védő illetve károsító hatása sok tényezőn múlhat, ezek közül kiemelném az alkalmazott koncentrációt és a kezelés módját. Magáztatás során egyértelműen védő hatást állapíthattunk meg, míg a tápoldatos kezelésnél már ambivalens a hatás. Magáztatásnál kimutattuk, hogy a mag által felvett SA nagyrészt a magban marad és kötött formává alakul, míg az epikotilban tapasztalható megnövekedett SA szint *de novo* szintézis eredménye. Ezt nem csak izotópos jelöléses kísérletek, hanem későbbiekben végzett génexpressziós vizsgálataink is alátámasztották (az eredmények a Journal of Plant Physiology-ban lettek publikálva, 168: 213-219, 2011). Tápoldatos kezelésnél jól látható, hogy a gyökerek életképességét maga a SA kezelés is legalább annyira lecsökkentette, mint a Cd, de a leveleknél védte a membránokat még magasabb Cd szintnél is.

5) *Elképzelése szerint mi lehet az oka annak, hogy a SA előkezelés hideg stressz ellen véd ugyanakkor az ozmotikus stressz hatását fokozza? Mi a helyzet só stressz esetében?*

A szalicilsav védőhatását alacsony hőmérsékleten $5 \cdot 10^{-4}$ M koncentrációnál tudtuk kimutatni, az ennél kisebb koncentráció hatástalan volt, míg a magasabb koncentráció már rövid időn belül károsította a kukoricanövényeket. Ez a koncentráció viszont 1 napos tápoldatos szalicilsav előkezelésnél normál hőmérsékleten már látható károsodást okozott, a gyökerek szürkessé váltak és veszítettek turgorukból, de a hajtáson még nem tapasztaltunk semmilyen tünetet. Tekintettel arra, hogy a szalicilsav gyenge sav ($pK_a = 2,98$), a nevelő közeg pH-ját lecsökkenti. Felmerül a kérdés, hogy ez a pH csökkenés okozhatja-e a gyökereknél tapasztalt károsodást. Kísérleti tapasztalataink alapján azonban önmagában ez nem játszik szerepet az előbb említett károsodási tünetek kialakulásában, mivel ha a közeg pH-ját sósavval állítjuk be ugyanarra a pH értékre, amit az alkalmazott szalicilsav koncentrációnál kapunk ($5 \cdot 10^{-4}$ M szalicilsav koncentráció mellett $pH = 3,3$), semmiféle károsodási tünet nem lép fel. Ezzel szemben, ha a szalicilsavval kezelt oldat pH-ját emeljük fel a kontrol oldat pH-jára ($pH = 5$), akkor a növény még elpusztulhat.

Bár szalicilsav jelenlétében a fiatal kukoricanövény hidegkárosodási tünetei kisebbek, exogén szalicilsav adagolása normál nevelési hőmérsékleten azonban - különösen magas koncentráció esetén fényben - a növény számára stresszként jelentkezik, ami előbb-utóbb pusztuláshoz is vezethet. Sötétben a szalicilsav még magas ($5 \cdot 10^{-3}$ M) koncentrációban sem okozott látható károsodást. A fényben bekövetkező károsodás jellemző látható tünete pl. az antociánképződés a levelekben. A nettó fotoszintézis, a gázcsere nyílások vezetőképessége, valamint a transpiráció már egy nap után is jelentősen lecsökken. A fotoszintetikus aktivitás csökkenése nem elsősorban a 2. fotokémiai rendszerben bekövetkező károsodásból ered, mert az F_v/F_m paraméter alig változott egy nap kezelés után. Exogén szalicilsav hatására bekövetkező transpirációcsökkenést már más esetekben is megfigyeltek, számos fenol típusú vegyületről azonban azt is kimutatták, hogy képes az abszcizinsav indukálta sztómazáródást meggátolni,

így megnő a gázcserenyílasok vezetőképesége. Szalicilsav esetében azonban ezen hatás koncentrációfüggő is: alacsony koncentráció esetén a sztómák általában zártabbak, mint a kontrol növényeknél, vagy nagy koncentrációjú szalicilsav alkalmazása esetén. A gázcserenyílasok vezetőképeségének csökkenése nemcsak szalicilsav, hanem számos stresszhatás, pl. hidegstressz vagy hőstressz következtében is fellép. Emiatt feltételezhető, hogy az általunk alkalmazott minden mérési fényintenzitás (fényteltett, fénylimitált, valamint sötét) mellett tapasztalt gázcserenyílasvezetőképeség-csökkenés a szalicilsav indukálta stresszhatás másodlagos következménye is egyben.

Alacsony hőmérsékleten csökkent transpiráció mellett valószínűleg kisebb problémát okoz, hogy a károsodott gyökerek kevésbé tudják biztosítani a növény vízellátását, s az ebből adódó problémák nem jelentkeznek annyira markánsan, mint normál nevelési hőmérsékleten, inkább a szalicilsav által okozott védelem kerül előtérbe. Ozmotikus stressz esetében, ahol a hőmérséklet azonos a nevelési hőmérséklettel, s ahol különösen fontos lenne a növény minél jobb vízellátottsága, a gyökerek károsodásából adódó plusz terhelést már nem tudja ellensúlyozni a szalicilsav egyéb védekező mechanizmusokat aktiváló jótékony hatása, így a károsodás még hatványozottabban jelentkezhet a kezelt növényekben.

Ezek a hatások viszont nem jelentkeznek, ha a szalicilsavat nem a tápoldathoz adagoljuk, hanem a magvakat kezeljük, ezért is tértünk át erre a módszerre, mivel a gyökérkárosodást nem tudtuk kivédeni. Valamint a gyakorlat számára is jobban hasznosítható ez a módszer, hisz szántóföldi körülmények között elég nehézkes lenne a növények tápoldatos nevelése, öntözéssel viszont nem eléggé kontrollálható a szalicilsav koncentrációja a kezelés során, hisz kötődhet a talajhoz, valamint a növényenkénti adagolás is nehézkes.

Sóstressz esetében nem végeztünk szalicilsavkezeléses kísérleteket, csak az endogén szalicilsavszintet mértük, de valószínűleg hasonló problémákkal szembesültünk volna, mint ozmotikus stressz esetén a gyökérkárosodás miatt. Irodalmi adatok alapján rizsnél, ahol egyébként is magas az endogén szalicilsav mennyisége, a szalicilsavkezelés fokozta a sóstressz okozta károsodási tüneteket. Más növényfajoknál, mint pl. paradicsom az alacsony koncentrációjú szalicilsavkezelés mérsékelte a tüneteket.

6) *Véleménye szerint a sokféle alkalmazott abiotikus stressz esetében melyikeknél lehet fontos szerepe az antioxidánsoknak?*

Az elsődleges stresszhatások, mint pl. a szárazság, só, alacsony és magas hőmérséklet, kémiai szennyeződés, gyakran egymással átfednek, károsítják a sejteket és másodlagos stresszt (ozmotikus- és oxidatív stressz) váltanak ki. A szárazság-, só-, alacsony- és magas hőmérsékleti, valamint az oxidatív stressz gyakran együttjárnak, és nagyon hasonló változásokat indukálnak a növényekben. Pl. a szárazság és sóstressz elsődlegesen ozmotikus stresszként jelenik meg, mely a homeosztázis és az ionháztartás zavarával jár. Az oxidatív stressz, mely általában minden abiotikus stressz kísérője, a strukturális és funkcionális fehérjék denaturációját okozhatja. Az általunk vizsgált összes stressz során megfigyelhető volt az antioxidáns enzimek aktivitásának fokozódása, valamint a glutation szint is megemelkedett. A legtöbb esetben o-hidroxi-fahéjsav felhalmozódás is történt, mely vegyület szintén antioxidánsnak is tekinthető. Az általunk vizsgált stresszek közül a Cd és a NaCl közvetlenül oxidatív stresszt is okoz, míg alacsony hőmérsékleten már alacsonyabb fényintenzitáson is felléphet fotoinhibíció, mely szintén növeli a reaktív oxigén formák (ROS) mennyiségét a sejtekben. Tehát itt különösen fontos az antioxidánsok szerepe.

Az is ismert, hogy a ROS mennyisége nemcsak a stressz folyamán, hanem a visszaállás alatt is magas lehet, tehát a növénynek e periódus alatt is magasabb antioxidáns kapacitással kell rendelkeznie. Számos tanulmány van arról, hogy citológiai és biokémiai károsodások

léphetnek fel az abiotikus stresszfolyamatot követő visszaállás során. Esetünkben is sóstresszt követően az aszkorbát-peroxidáz, a guajakol-peroxidáz és a glutation-reduktáz aktivitása magasabb volt a visszaállás során az előzőleg stressznek kitett növényekben, mint a kontrollban. Irodalmi adatokból is ismert, hogy a GR aktivitás a visszaállás során magasabb volt, mint a stressz alatt.

Még egyszer szeretném megköszönni Barna Baláznak, hogy az akadémiai doktori értekezésemben leírt tudományos eredményeimet pozitívan értékelte.

Martonvásár, 2011-04-28

/Szalai Gabriella/