

BÍRÁLÓI VÉLEMÉNY

Pogány Miklós:

„Nekrotróf és hemibiotróf gombakórokozók kölcsönhatásai modell- és haszonnövényekkel ”

c. akadémiai doktori értekezéséről

Általános jellemzés

Napjainkban egyre fontosabbnak látszik az elsősorban szempontunkból gazdasági növényeinkben a szélsőségesen változó környezeti hatásokra indukálódó élettani és molekuláris folyamatok, valamint az ezen hatásokhoz való alkalmazkodás vagy ellenük kialakuló rezisztencia háttérében álló komplex összefüggések megértése.

A növényi kórokozó gombák a növényekben ismert betegségek jelentős részéért felelősek, komoly termés kiesést, illetve minőség csökkenést okozva. A kórokozókkal szembeni rezisztencia különböző tényezők eredője, mint például a növény genetikai háttere, élettani állapota, agroökológiai és környezeti feltételek. A rezisztencia háttérében álló mechanizmusok pedig azzal is összefüggésben állnak, hogy a kórokozó gomba milyen életmód stratégiát folytat. A kórokozókkal szembeni védekezés a növényekben több szinten zajlik és komplex módon szabályozott a patogén molekuláris mintázat felismerésétől kezdve a többszintű jelátvitelen át a transzkripciós és metabolit szinten érzékelhető válaszokig. Az elmúlt évtizedben a növények immunitásával kapcsolatos ismereteink mind metabolomikai, mind genomikai szinten nagymértékben javultak. Pogány Miklós akadémiai doktori értekezésében a legújabb, elérhető technológiák segítségével kívánta feltárni a gazdanövények, mint modellszervezetek az *Arabidopsis* és dohány, valamint haszonnövények, mint az árpa és szőlő, és a mikrobák (nekrotróf és hemibiotróf gombakórokozók) közötti kölcsönhatás részleteit.

Az értekezés **irodalmi áttekintésének** első részében a jelenkori háttértudás jelenik meg a növények kórokozókkal szembeni védekezéséről, érintve az általános és a specifikus rezisztenciát és a gén a génnel szembeni modellt, a növényi hormonok, valamint a programozott sejthalál szerepét is a patogén gombák életmódbeli sajátosságainak figyelembe vételével. A második, rövidebb rész a kísérletek során használt két nekrotróf gombát mutat be, az *Alternaria brassicicola*-t és a *Botrytis cinerea*-t. Esetleg a *Cercospora nicotianae*-ről és

és a *Pyrenophora teres* f. *teres*-ről is bekerülhetett volna egy-egy fél oldalnyi összefoglaló. Az irodalmi bevezetés 12 oldalon, több mint 120 hivatkozáson keresztül értékeli a vonatkozó tudásanyagot és rávilágít a még vizsgálandó hiányosságokra. Kicsit hiányoltam egy rövidítések jegyzékét a dolgozat elejéről. A tartalomjegyzékben 3.5. pontban a kórokozó és gazdanövény teljes latin neve kiírásra kerülhetett volna, illetve a ROS rövidítés feloldásra került, de pl. az RBOH (respiratory burst oxidase homologs) nem. Az irodalmi áttekintésben is néhány ugyan nyilvánvaló rövidítést pl. NPR1 (Non-expressor of pathogenesis-related gene1), NIM1 (Non-inducible immunity1), stb. is fel lehetett volna oldani az első megjelenéskor.

A kutatás célja konkrét külön fejezetként nem jelenik be, de a Bevezetésben a dolgozat öt fő témájának felsorolásánál (a hozzájuk tartozó dolgozat alapjául szolgáló publikációkkal együtt) látható milyen főbb eredmények bemutatására kerül sor, illetve, hogy az összekötő kapocs a témák között a nekrotrófia jelenségének tanulmányozása, különböző kórokozók, gazdanövények és esetleg más környezeti körülmények együtt hatása során. Tehát a kutatások során többféle megközelítéssel találkozunk. A jelölt az oxidatív stresszt, az extracelluláris oxidatív robbanás forrásait és szerepét nemcsak nekrotróf gomba fertőzés során tanulmányozta, hanem mint az alacsony hőmérséklettel való kereszttolencia kialakulásában alapvető fontosságú folyamatot is. A Furmint szőlő esetében bemutatásra került a *Botrytis cinerea* mindkét „arca”, ez utóbbi kísérletekhez szorosan kapcsolódva egy szellemi tulajdon védelmi eljárás alatt álló technológiát is kidolgozott. Mind ezek mellett pedig, egy új, korábban nem hasznosított növény-gomba (*Cercospora nicotianae* - *Nicotiana benthamiana*) kölcsönhatás reprodukálható módszertani részleteit és a kölcsönhatás gyakorlati alkalmazhatóságát is kidolgozta.

Az alkalmazott módszerek: az eredmények sokrétű és komplex molekuláris biológiai, analitikai, mikroszkópos, bioinformatikai és mikrobiológiai eszköztár alkalmazásával valósultak meg. Messzemenően megfelelnek a kitűzött céloknak. A kísérletekbe vont növényfajok és genotípusok, mutánsok sokasága mutatja azt a törekvést, hogy az eredmények egyrészt minél pontosabbak és megalapozottak, ugyanakkor általánosabb érvényűek legyenek, valamint az eltérő, sőt ellentétes hatásokra is rámutasson. Csak megemlítem, hogy az anyag módszer fejezet felépítésére nézve nem szokványos, bár ezt a jelölt előre jelzi is. A növényanyag, kórokozó, kísérleti beállítások és módszerek rövid bemutatása mind az öt témához külön-külön bekezdésben történik meg, összesen 9 oldalon. Azonban a tagolás miatt nehezen alakul ki a kísérleti beállítás teljes átláthatósága. Pl. 20 oldalon 3.1. Az extracelluláris ROS szerepének vizsgálatához használt anyagok és módszere

fejezetben: a növény anyag leírása alfejezetben ez a mondat szerepel: „A PRX33/PRX34 sejtfa peroxidáz gének vizsgálatához T-DNS mutánsok mellett dohány rattle vírus (TRV) vektorba épített géncsendesítő konstrukciókat is használtunk...”. Majd egy bekezdéssel lejjebb már a kísérleti rendszer beállítása alfejezetben jelenik meg csak, hogy NADPH-oxidáz mutánsokat is használtak. Meg kell említeni, hogy a téziszűzetben a vonatkozó rész sokkal jobb felépítésben szerepel. A későbbiek is előfordul, hogy 1-1 újabb információ „elrejtve” jelenik meg később, nem az igényelt helyen, pl. 28.oldalon a kísérleti rendszer leírása részénél csak annyi szerepel, hogy metil-viologén és hidrogén-peroxid kezeléssel szembeni rezisztencia vizsgálata során vezetőképesség-mérés vizsgálatot alkalmaztak, majd a kutatási módszerek részénél kerül leírásra, hogy 1 cm-es levél darabokot áztattak a fenti vegyületek oldatában. A kísérletek részletei azonban az eredmények részben, mely felosztása teljesen követi az anyag módszer felépítését, ezáltal könnyedén követhetővé teszi, teljesen világossá válik az adott kísérlet.

Az eredményeket 41 ábrában, és 3 táblázatban kapjuk kézhez mintegy 67 oldalon keresztül, melyeket függelék is kiegészít. Az eredmények a már fentebb említett beosztásnak megfelelően kerültek bemutatásra. Az ábrák és táblázatok angolul szerepelnek, szebb lett volna, ha magyar tengelycímek szerepelnek, de jól illeszkednek a szövegbe, jól értelmezhetők. Az ábra aláírások teljesek és magyarázóak (néhol túlságosan is, pl. anyag módszerbe illő leírásokkal). Azonban a 12., 13., 14., 20b, 36. és 39. ábra, valamint az 1. és 3. táblázat minősége nem megfelelő, elmosódott.

Az eredmények megvitatása, mint külön fejezet nem jelenik meg, de maga az eredmények fejezet felépítése ezt megmagyarázza. Ugyanis utóbbi olyan részletes, az öt kutatási témának megfelelően tagolt, hogy itt világosan kiderül mi volt a hipotézis, milyen irodalmi hiányosságra kereste a választ, majd a tényleges eredményeket az irodalmi adatokkal szembevetve írja le az összefüggések, és összefoglalásként minden alfejezet végén megjelenik egy külön alfejezet arról, hogy az eredmények milyen hatást gyakoroltak a témához köthető tudományterületre, a publikált eredményekre vonatkozó hivatkozásokkal.

Ezt követi 4 oldalas **összefoglalás**, majd a pontokba szedett **új tudományos eredményeket** is tartalmazza.

Az értekezés több mint **300 irodalmi hivatkozást** tartalmaz.

Az értekezés **Tézisei** tartalmazza a megkívánt fejezeteket, és követi az értekezés szerkezeti felépítését.

Megjegyzések és kérdések

1. Nekrotróf gombákkal szembeni növényi rezisztencia fejezetben, a **19. oldalon** említi, hogy a nekrotróf kórokozókkal szembeni növényi védekezésnek van egy markáns epigenetikai iránya. Mi a véleménye az ott említett hivatkozásokról, történt-e hasonló vizsgálat kutatásai során, hogyan lehetne ezt a lehetőséget további kutatásaihoz felhasználni, látja ennek hasznosíthatóságát?

2. Anyagok és módszerek. 24.oldalon, a transzkriptum szintű vizsgálatához használt szőlőbogyókat két időpontban, 2016 október végén és november elején gyűjtötték a négyféle fázisban lévő bogyókat. Mind a négyféléből mindkét időpontban, ha igen, mi indokolta, hogy 2 időpontban szedtek?

A 26. oldalon azt írja, hogy *Botrytis cinerea* B05.10 referencia izolátummal permezték a leszüretelt Furmint fürtöket, van-e genetikai diverzitás az előző oldalon említett Mád környéki természetes *Botrytis* populációhoz képest?

3. 32. oldalon, az 1. és 2. ábra mutatja be a ROS-termelő enzim rendszerek transzkripcióját. Miért ennyire eltérő a két kép megjelenítése (színek, „x” tengely nulla pontja)? A „mock” fertőzött mintákhoz lett nulla időpontban hasonlítva a fertőzött minta? A 3. ábra a poliamin oxidáz gén expresszióját mutatja be, de itt csak 24 óra elteltével mért adatokkal, itt nem történt más időpontban mérés? Az *Arabidopsis* 5 PAO gén közül az *AtPAO5* expresszióját figyeltek meg a teljes növényi testben a növekedés különböző szakaszaiban, ellentétben a többi génekkel, melyek főleg virágban és gyökérben expresszálódnak, és korai fejlődési szakaszban, valószínűleg ez lehet az oka, hogy alpból elég alacsony expressziót mértek jelen kísérletben is. Mit gondol az *AtPAO* fertőzésre adott expresszió csökkenése mivel lehet összefüggésben?

4. 34. oldalon, a jelölt azt írja: „a kísérletben egy virulensebb *Alternaria brassicicola* izolátummal dolgoztunk (MUCL 20297) mint az első RBOHD kísérletben (CBS125088), ezért a tünetek ez utóbbi kísérletben minden genotípus esetében egyöntetűen erősebbek voltak.” Mi indokolta ezt a döntést?

5. 36. oldalon, a 8. ábra esetében is a gomba biomassza a gomba és a növényi DNS arány alapján lett megállapítva? Ez nem világos az ábra leírásából, mértékegység sincs.

6. 42. oldalon, A szalicilsav-analóg acibenzolar-S-metillel történő kezelés fokozta az RBOHD-re jellemző extracelluláris oxidatív robbanás mértékét és a gomba által előidézett sejthalállal járó tüneteket mind a vad típusú, mind az *rboh*d mutáns növényekben.” a mikroszkópos eredmények alapján. Kérdésem, ha a mutáns növényekben is serkentette az RBOHD-re jellemző oxidatív robbanást, mennyire tekinthető ez RBOHD specifikusnak, esetleg van-e szerepe a szalicilsav maga indukálta önerősítő ROS termelő körnek?

7. 14. ábra, a szabad szalicilsav tartalom 3 nappal a fertőzést követően lett mérve, mik a tapasztalataik, mikortól érdemes mérni a SA tartalmat, jelentkezik-e egy csúcs a fertőzést követően, milyen lassú, van-e ezt követően csökkenés (etilén esetében 0-96 órán keresztül követték nyomon a változást)? A 13. ábrán az etilén tartalom változása a nulla időponthoz képest látható, a 14. ábrán a SA tartalom változása a „mock” fertőzéshez képest van megjelenítve, hogyan kell tehát értelmezni?

8. 15. ábra, az erecta SALK_04410 valamint az erecta SALK_066455C mutánsok fényképe látható, alatta a SALK_066455C-re tesz megállapítást, hogy erősen gátolt a H₂O₂ termelése, ezért az ERECTA fehérje működése szükséges a ROS termeléshez, mi mondható el a másik mutáns eredményei alapján?

9. 19. ábra, a búza esetében látható a desztillált vizes, a metil-viologénes, valamint a H₂O₂ kezelés hatása is a vezetőképességre, de az árpa esetében a H₂O₂ kezelés adatai lemaradtak, igaz a szövegben utalt arra, hogy ott csak a paraquat kezeléssel szemben tette ellenállóbá a növényeket a hidegedzés? (Bár a tézisfüzetben az szerepel: „Búza és árpanövények hidegedzésével vissza tudtuk szorítani az oxidatív stresszt okozó paraquat és hidrogén-peroxid kezelések szövetkárosító hatását a növények leveleiben.”

A DDH₂O kezeléshez képest szignifikáns változásokat jelöli az ábrán a csillag? Valamint szintén ide kapcsolódóan, mi az oka, hogy a továbbiakban csak az árpán folytatták a további biotikus stresszel kapcsolatos kísérleteket?

Általában...

Az értekezés gondosan kivitelezett munka, gépelési hibák elvértve akadnak. A szöveg, kivétel az anyag módszer rész, a korábban említett tagolása miatt, olvasmányos, jól érthető. Apró hiányosságok elvértve fordulnak elő, pl. 78. oldalon, a további *WRKY* gének tárgyalásánál hiányzik a hivatkozás, bár említi, hogy ezek tárgyalásra nem kíván kitérni.

Új eredmények:

- 1) Az RBOHD NADPH-oxidáz és PRX33 és PRX34 sejtfa peroxidázok egyaránt hozzájárulnak a nekrotróf *Alternaria brassicicola* fertőzése nyomán fellépő extracelluláris oxidatív robbanáshoz *Arabidopsis* növények leveleinek sejtközötti járataiban, továbbá működésük segíti a nekrotróf *A. brassicicola* kolonizációját *Arabidopsis* gazdanövényen. **(Itt két pontot összevontam.)**
- 3) Az RBOHD által termelt reaktív oxigén származékok (ROS) gátolják, a PRX33/34 peroxidázok által termelt ROS viszont fokozzák a gomba által okozott sejthalál folyamatot.
- 4) Az RBOHD az etilénnel, a szalicilsavval és az ERECTA Ser/Thr protein kinázzal kölcsönhatásban fejt ki a sejthalál szabályozásában betöltött szerepét.
- 5) Hidegedzés fokozza a gabonafélék ellenállóságát különböző oxidatív stresszt okozó kémiai kezelésekkel szemben és **árpában** a nekrotróf *Pyrenophora teres* f. *teres* gombakórokozóval szemben. **(Itt az „árpában” szóval kiegészítettem.)**
- 6) A *Nicotiana benthamiana* a hemibiotróf gombakórokozó *Cercospora nicotianae* gazdanövénye és ez a növény-gomba kölcsönhatás molekuláris növénykórtani kutatások céljára használható új modell rendszer.
- 7) Több szürke- és nemesrothadás elkülönítésére alkalmas illékony szerves komponens képződését azonosítottam Furmint szőlőbogyókból.
- 8) Furmint szőlő aszúsodása során az abszcizinsav mennyisége és az abszcizinsavhoz köthető növényi gének transzkripciója már a nemesrothadás korai szakaszában jelentősen megemelkedik, ezért az abszcizinsav feltehetőleg fontos szereppel bír az aszúsodás kialakulásában.
- 9) Azonosítottam több redox állapothoz köthető, illetve redox szabályozott szőlőgén aktiválódását Furmint aszúsodása során.

Összegzés

Pogány Miklós akadémiai doktori értekezése sok hasznos és hasznosítható adatot tartalmaz nektróf gomba-növény kölcsönhatásban fontos szerepet játszó extracelluláris ROS képződéssel, az aszúsodás transzkriptom, illatanyag és redox szintű folyamataival, valamint a gomba-növény kölcsönhatások növényi hormonokkal összefüggő, és általuk szabályozott folyamataival kapcsolatban. Az értekezés témakörében munkatársaival számos közleményt jelentetett meg IF-os nemzetközi folyóiratokban. A nemzetközi megmérettetés, valamint az jelen értekezés kritikus bírálata után kijelenthető, hogy Pogány Miklós hiteles adatokkal alátámasztott, eredeti tudományos eredményekkel gyarapította a tudomány szakot, hozzájárult a tudomány továbbfejlődéséhez.

Mindezek alapján Pogány Miklós akadémiai doktori értekezésének elfogadását, a nyilvános vita kitűzését, és sikeres védés után az MTA Doktora fokozat odaítélését javaslom.

Martonvásár, 2023. március 23.



Dr. Pál Magda
MTA doktora
Tudományos tanácsadó
ATK MGI Növényélettani és Metabolomikai Osztály