

Köszönöm opponensemnek a doktori értekezésem bírálatára szánt idejét, építő szándékú felvetéseit, javaslatait! Hálás vagyok a második oldal első bekezdésében megfogalmazott eredményeinket méltató, elismerő megjegyzéseiért is.

A doktori mű ábráinak a minősége valóban rosszabb az elvárhatónál (mindhárom opponensem nehezményezte).

Az Eredmények fejezetet azért egészítettem ki két esetben a felfedezéseink tudományterületre gyakorolt hatásának alfejezeteivel, mert ezekkel igyekeztem segíteni az önálló tudományos teljesítményem megítélését az MTA Doktori Szabályzata doktori műre vonatkozó elvárásaival összhangban.

Opponensem véleményében 5 kérdést állított össze a doktori műben bemutatott eredményekkel kapcsolatban.

1) Miért csökkenhet a PAO5 poliamin-oxidáz gén expressziója az *A. brassicicola* gombával való fertőzés után (és miért nem tárgyalom ezt a jelenséget a doktori értekezésben)?

A PAO5 poliamin-oxidáz izoforma génkifejeződésének csökkenését, amit *Arabidopsis* növények *Alternaria* fertőzése után észleltünk, nem vizsgáltuk tovább. Ezt a döntésünket az indokolta, hogy nem tartottuk valószínűnek azt (bár nem lehet teljesen kizárni ezt a forgatókönyvet sem), hogy ha egy gén transzkripciója a gombafertőzés során csökken, a biológiai aktivitása a gén által kódolt fehérjének ugyanakkor mégis nő. Egyértelmű az, hogy a gombafertőzés markáns extracelluláris oxidatív anyagcsere növekedéssel párosul. Igyekeztünk tehát vizsgálatainkban a reaktív oxigén származékok (ROS) azon forrásaira fókuszálni, amelyek már mRNS szinten is egyértelműen aktiválódnak a gombafertőzést követően.

Mi állhat a PAO5 repressziójának a hátterében?

Zarza és munkatársai (2017) eredményeire támaszkodva látható, hogy a *pao5* mutáns *Arabidopsis* növények amellet, hogy jobban tolerálják a só kezelés okozta stresszt, jelentősen túltermelik a jázmonsav növényi hormont, aminek viszont meghatározó szerepe van a nekrotrof kórokozókkal szembeni növényi védekezésben is. Feltételezem tehát, hogy a PAO5 aktivitás és a jázmonsav termelés közötti fordított kapcsolat állhat az *Alternaria* fertőzött *Arabidopsis* növények csökkent PAO5 transzkriptum szintjének hátterében.

Zarza és mtsai (2017): Polyamine oxidase 5 loss-of-function mutations in *Arabidopsis thaliana* trigger metabolic and transcriptional reprogramming and promote salt stress tolerance. *Plant, Cell & Environment* 40, 527–542.

2) Hogyan jutottam arra a következtetésre, hogy az RBOHD fehérje által termelt extracelluláris ROS valószínűleg nem tölt be számottevő transzkripció aktivátor szerepet, inkább részleges negatív szabályozó hatással bír az *Arabidopsis* gének egy részére nézve?

A kórokozók által megtámadott növényekben termelődő ROS szerepével kapcsolatban az egyik feltételezés az volt, hogy ezek a szabadgyökök vagy molekulák transzkripciót szabályozó ágensek lehetnek (Lamb és Dixon 1997).

Amennyiben az RBOHD számottevő transzkripció aktivátor lenne, akkor feltételezem, hogy a mutáns genotípusban ki kellett volna rajzolódnia a cDNS chip-en képviselt gének egy olyan körének, melyek aktiválódása nem következik be a gombafertőzés hatására (ellentétben a vad típusú növényekkel, ahol ezek a gének fokozott működést mutatnának). Ilyet nem tapasztaltunk, az ellenkezőjét viszont igen, tehát az *rboh*d T-DNS mutánsban megnő egy sor biotikus stresszhez köthető gén expressziója.

Megállapításom ugyanakkor valószínűleg nem terjeszthető ki az RBOHD szerepére más biotikus és abiotikus stresszhelyzetekben, vagy a növényi szervezet fejlődésében.

Lamb és Dixon (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Review of Plant Biology 48, 251-275.

3) Az RBOHD által termelt ROS inkább visszaszorítja a fertőzött növények sejtelhalását, a PRX33/34 peroxidázok által termelt ROS pedig nyilvánvalóan elősegíti a sejtek elhalását. Nincs ellentmondás a két kijelentés között?

Valóban ellentmondásos megállapításnak tűnik az, hogy az extracelluláris ROS két forrása a növényi sejtekben ellentétes módon szabályozza az *A. brassicicola* gombakórokozó által előidézett sejthalál folyamatát. Az ellentmondásosnak látszó jelenség legkézenfekvőbb magyarázatát a reaktív oxigén származékok koncentráció függő redox szabályozó szerepe nyújthatja. Az eukarióta sejtek sejtciklusát reaktív oxigén származékok által közvetített redox állapot változások szabályozzák (Burhans és Heintz 2009). A növények gyökércsúcaiban található merisztéma szövet differenciálódását szintén reaktív oxigén származékok által alkotott gradiensek szabályozzák (Zhou és munkatársai 2020). Az RBOHD fehérje ROS szintézisével kapcsolatban jól ismert az a jelenség, hogy hullámszerűen terjedő H₂O₂ (hidrogén-peroxid) gradienst képez különféle abiotikus stresszeknek (fény, hő, só, hideg, mechanikai sérülés) kitett növényi szövetekben (Gilroy és munkatársai 2014). Az RBOHD és a PRX fehérjék tehát feltehetőleg eltérő koncentráció tartományban juttatnak reaktív oxigén származékokat a növényi sejtközötti járataiba, és a két rendszer működése között időbeli eltérés is jelentkezhet, különösen amennyiben igaz az a feltevés, hogy az RBOHD fehérje az extracelluláris tér pH értékének a megemelésén és ez által a magasabb pH értéken aktiválódó peroxidázok (pl. PRX33 és PRX34) működésének bekapcsolásán keresztül fejti ki a hatását (Mur és munkatársai 2008).

A kérdésre adott válasz tehát összefoglalva az, hogy amennyiben az RBOHD és a PRX33/PRX34 sejtfal peroxidázok eltérő koncentráció tartományokban és (esetleg) más időzítéssel juttatják az általuk termelt ROS-t a növényi extracelluláris térbe, akkor lehet a sejtek elhalására gyakorolt hatásuk egymással ellentétes.

Burhans és Heintz (2009): The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. Free Radical Biology and Medicine 47, 1282-1293.

Zhou, Xiang, Li és Yu (2020): *Modulatory role of reactive oxygen species in root development in model plant of Arabidopsis thaliana. Frontiers in Plant Science 11, 485932.*

Gilroy és mtsai (2014): *A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. Trends in Plant Science 19, 623-630.*

Mur és mtsai (2008): *The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? Journal of Experimental Botany 59, 501-520.*

4) A hidegedzés hatását a Jelölt egy 1500 EST-t tartalmazó gén-chip segítségével vizsgálta, de az elemzés a reálisan elvárhatónál sokkal kevesebb eltérően kifejeződő transzkriptumot mutatott. Érdeemes lenne-e ezt újra megvizsgálni a microarray-nél fejlettebb RNS-szekvenálási technikával?

Igen, tényleg izgalmas lenne a hidegedzett gabona szövetek génkifejeződési mintázatának vizsgálata RNS-szekvenálási módszerrel. Először hidegedzett búza és árpa transzkriptom adatbázisokban elhelyezett adatsorainak meta-elemzésével közelíteném meg a kérdést, az elmúlt 10 évben számos közlemény született ezen a területen. Ilyenek egyebek mellett Zhang és munkatársai (2014), vagy Zhao és munkatársai (2019) közleményei.

Zhang és mtsai (2014): *Transcriptome characterization and differential expression analysis of cold-responsive genes in young spikes of common wheat. Journal of Biotechnology 189, 48-57.*

Zhao és mtsai (2019): *Integrated transcriptomics and metabolomics analyses provide insights into cold stress response in wheat. The Crop Journal 7, 857-866.*

5) Mennyire lehet összehasonlítni és következtetéseket levonni három szőlőfajta nemesrothadása és szürkerothadása során tapasztalt génexpressziós változásokból úgy, hogy ezek csak fényképek vagy leírások alapján hasonló fázisban lévő bogyókból vett mintákból származó adatok? Hiányolom az ép Furmint bogyók transzkriptom mintázatának és a korábbi (I.-II.) aszúsodott fázisok transzkriptom mintázatának átfogó összehasonlítását és egy modell felállítását. Nem lenne érdemes az adatokat újra elemezni és többféle bioinformatikai analízis módot alkalmazni, mint pl. a „functional interaction network” analízis vagy a „weighted gene coexpression network analysis” (WGCNA)?

Egymástól több ezer kilométer távolságra található borvidékekről származó, különböző fajtájú és más évszámú szőlőminták eredményeinek összehasonlítása valóban komoly kételyeket ébreszthet. Megjegyzem azonban, hogy ültetvényekből vagy szántóföldön termesztett (tehát nem szabályozott klímájú, zárt termesztő, növénynevelő berendezésekben előállított) növényi minták adatainak értelmezésekor gyakran megfogalmazódhatnak hasonló kételyek. Saját kísérleti rendszerünk esetében még inkább nehezítette a helyzetet az a két tény, hogy nemesrothadt szőlőből készült borokat csak néhány helyen állítanak elő a világon, illetve az hogy nemes- és szürkerothadt szőlőmintákat nem lehet egyszerre gyűjteni az ültetvényekben, mert egy adott szüreti időpontban vagy az egyik van jelen az ültetvényben vagy a másik, a kettő egyszerre nem jellemző. Ezért olyan mintákkal tudtuk csupán összehasonlítni a saját adatainkat, ami hozzáférhető volt a szakirodalomban. Áruklodó az is, hogy az általunk összehasonlítás alapként használt négy közlemény is ugyanilyen módon, tehát ugyanebből a körből már korábban publikált másik 1-2 dolgozatot használja referenciaként (Kelloniemi és munkatársai 2015, Blanco-Ulate és munkatársai 2015, Agudelo-Romero és munkatársai 2015, Lovato és munkatársai 2019).

Ha figyelembe veszem azonban azt, hogy az általunk Furmint fajtában nemesrothadás során feltárt 1524 aktiválódott gén 78 %-a szintén megnövekedett génkifejeződést mutat kaliforniai nemesrothadt Semillon mintákban, akkor ez arra enged következtetni, hogy a tokaji nemesrothadt szőlőminták adatai viszonylag jól összehasonlíthatóak a kaliforniai Napa-völgyben gyűjtött minták adataival.

Az aszúsodott és ép bogyók mRNS mintázatának összehasonlítására azért nem fektettem munkámban nagyobb hangsúlyt, mert az ép bogyókhoz képest eltérően kifejeződő transzkriptumok jelentős része a már mRNS szinten elég jól feltárt növény-*Botrytis* kölcsönhatásra jellemző változásokat tükrözte vissza, másrészt pedig a nemesrothadás a szőlő-*Botrytis* növény-kórokozó kapcsolatnak egy rendkívül sajátos megnyilvánulása, tehát a növénykórtan iránt érdeklődő szakemberek számára leginkább izgalmasnak tűnő kérdés valóban az, hogy milyen molekuláris biológiai folyamatok állhatnak ugyanannak a növény-kórokozó kölcsönhatásnak két ennyire eltérő megnyilvánulása mögött.

Opponensem által javasolt rendszerbiológiai módszerekkel valóban célszerű lenne a szőlő transzkriptom adataink további elemzése.

Kelloniemi és mtsai (2015): Analysis of the molecular dialogue between gray mold (Botrytis cinerea) and grapevine (Vitis vinifera) reveals a clear shift in defense mechanisms during berry ripening. Molecular Plant-Microbe Interactions 28, 1167-1180.

Blanco-Ulate és mtsai (2015): Developmental and metabolic plasticity of white-skinned grape berries in response to Botrytis cinerea during noble rot. Plant Physiology 169, 2422-2443.

Lovato és mtsai (2019): Specific molecular interactions between Vitis vinifera and Botrytis cinerea are required for noble rot development in grape berries. Postharvest Biology and Technology 156, 110924.

Agudelo-Romero és mtsai (2015): Transcriptome and metabolome reprogramming in Vitis vinifera cv. Trincadeira berries upon infection with Botrytis cinerea. Journal of Experimental Botany 66, 1769-1785.

Szeretném végül megköszönni, hogy értekezésem tartalmának ismeretében opponensem támogatja az MTA doktora cím odaítélését számomra.

University Park, 2023. augusztus 18.



Dr. Pogány Miklós

tudományos főmunkatárs

ATK Növényvédelmi Intézet