

Válasz Dr. Pál Magda opponensi véleményére

Szeretném mindenképp először megköszönni opponensem részletes, nagyon lelkiismeretes, lényegre törő bírálatát, amit MTA doktora pályázatomban készített értekezésemről állított össze.

Opponensem (és mellette Dr. Kocsy Gábor, másik bírálóm) jogosan jegyzi meg, hogy célszerű lett volna a doktori mű elejére beillesztenem egy az értekezésben használt rövidítések jelentését magyarázó listát, tehát rövidítések jegyzékét. Szívvel sajnálom, hogy a doktori mű összeállításánál nem éltem ezzel a lehetőséggel, ami megkönnyítette volna az értekezés olvashatóságát, érthetőségét. Azért nem gondoltam erre, mert az értekezés összeállításakor az lebegett a szemem előtt, hogy a doktori mű olvasói mindenképp a szűkebb szakterületem, tehát a növénykórtan művelői lesznek. Visszatekintve már nem kérdés, hogy ebben nagyot tévedtem.

A bírálatban megfogalmazott kérdésekre adott válaszaim:

1) Történt-e hasonló (epigenetikai) vizsgálat kutatásai során?

Egyrészt vírusindukált géncsendesítéssel (VIGS) tehát RNS-interferencia jelenségére épülő tranziens génextpressziós módszerrel fokoztuk *Arabidopsis* növények ellenállóságát *Alternaria brassicicola* kórokozó gombával szemben. Hasonlóképpen módosítottuk *N. benthamiana* fogékonyságát *Cercospora nicotianae* iránt a *Coronatine Insensitive 1 (COI1)* és az *Ethylene Insensitive 2 (EIN2)* gének RNS-interferencia alapú (epigenetikai szabályozás alapján működő) csendesítésével.

Furmint szőlő aszúsodásának genomikai vizsgálata kutatási pályázatunk megvalósítása során feltérképeztük a szőlősejtekben termelt mikro RNS-ek (miRNS) mintázatának változását. Ennek a vizsgálatnak az eredményeit még nem közöltük. Tizenhat olyan emelt szinten képződő szőlő mikro RNS-t sikerült azonosítanunk, melyeknek a szőlő örökítőanyagában kódolt saját célgénjei statisztikailag igazolható transzkriptumszint csökkenést mutattak Furmint nemesrothadása során. Meglepő módon az aszúsodott szőlőbogyókban magasabb aktivitást mutató mikro RNS-ek többségére nem volt jellemző, hogy a növény-gomba kölcsönhatáshoz szorosan köthető gének működését szabályozzák. A nemesrothadásban érintett bogyók fokozott aktivitást mutató mikro RNS molekuláinak célpontjai sokkal inkább az osztódó (merisztéma) szövetek képződését és a növényi szervek növekedését, fejlődését szabályozó gének jelentik. Az aszúsodás során megfigyelhető növényi mikro RNS aktivitás szerepe tehát feltehetőleg elsősorban a bogyók növekedésének és fejlődésének a gátlására irányul. További kutatásaim mikro RNS-ekhez kötődő elsődleges célja a fenti bekezdésben említett miRNS adatsor részletes értelmezése és tudományos közlése.

2) Miért gyűjtöttünk szőlőbogyó mintákat két időpontban? Van-e genetikai diverzitás a B05.10 B. cinerea referencia izolátum és a Mád környéki természetes Botrytis populáció között?

Furmint nemesrothadásának transzkriptom szintű vizsgálatához 2016 októberében és novemberében gyűjtöttük a mintáinkat 9 nap eltéréssel. Valóban négy különböző típusú szőlőbogyót gyűjtöttünk: ép bogyókat és az aszúsodás három különböző fázisában lévő nemesrothadt bogyókat. A két különböző gyűjtési időponttal az volt a célunk, hogy betekintést nyerjünk az eltérő gyűjtési időpontok

transzkripcióra gyakorolt hatásába. Főkomponens elemzésünk jól szemlélteti, hogy az eltérő gyűjtési időpontok transzkripcióra gyakorolt hatása eltöprel a nemesrothadás előrehaladtának hatásához képest (értekezés 24. ábrája).

A *B. cinerea* B05.10 referencia izolátuma egy laboratóriumi *Botrytis* izolátum, ami szőlő ültetvényből származó olasz izolátum benomil kezeléssel előállított származéka (Büttner et al. 1994, Quidde et al. 1998). Egy-konídiumos tenyészetből származó, genetikailag egységes izolátum. Ez nyilván számos genetikai eltéréssel rendelkezik a tokaji természetes *B. cinerea* populációhoz képest. Fontos ugyanakkor és feltételezem, hogy opponensem kérdését is főként az a kíváncsiság ihlette, hogy vajon mennyiben különbözhet egymástól egy laboratóriumi *Botrytis* törzs és egy természetes, ültetvényből származó *Botrytis* populáció nemesrothadást előidéző képessége. Ennek a kérdésnek a megválaszolásához véleményem szerint hasznos tájékozási pontot jelent Fournier és munkatársai (2013) dolgozata, melyben Franciaország három különböző borvidékéről gyűjtöttek szürke- és nemesrothadást okozó *B. cinerea* izolátumokat. Tanulmányuk legfontosabb végkövetkeztetése az, hogy az azonos termőhelyről gyűjtött szürke és nemesrothadást okozó *Botrytis* izolátumok mikroszatellit mintázata nem tért el egymástól, tehát a kétféle tünettípust a populáció egyforma genetikai háttérrel rendelkező tagjai idézik elő. A tanulmány további lényeges megfigyelése volt még az a tény, hogy a három földrajzilag egymástól távol eső borvidék *Botrytis* izolátumai ugyan jól elkülöníthetőek voltak mikroszatellit mintázatuk alapján, azonban a szürke- vagy nemesrothadással végződő növény-gomba kölcsönhatásokat egy borvidéken belül a kórokozó azonos genetikai háttérrel rendelkező egyedei váltották ki. A két markánsan eltérő tünettípus okaként egyértelműen a nemesrothadást vagy éppen a szürkerothadást támogató mikroklimatikus feltételeket jelölték meg. Mindezek alapján feltételezem azt, hogy a laboratóriumunkban használt izolátum és az ültetvényben aktív *B. cinerea* populáció nemesrothadást kiváltó biológiai hatása nem tér el lényegesen egymástól.

Fournier és mtsai (2013): *The 'Dr Jekyll and Mr Hyde fungus': noble rot versus gray mold symptoms of Botrytis cinerea on grapes. Evolutionary Applications* 6, 960-969.

Quidde és mtsai (1998): *Detoxification of α -tomatine by Botrytis cinerea. Physiological and Molecular Plant Pathology* 52, 151-165.

Büttner és mtsai (1994): *Variations in ploidy among isolates of Botrytis cinerea: implications for genetic and molecular analyses. Current Genetics* 25, 445-450.

3) Miért ennyire eltérő a ROS-termelő enzim rendszerek transzkripcióját szemléltető 1. és 2. ábra? 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? Mit gondol az *AtPAO* fertőzésre adott expresszió csökkenése mivel lehet összefüggésben?

A ROS-termelő enzimek *A. brassicicola* fertőzésre bekövetkező transzkriptumszint változásait szemléltető 1. és 2. ábra azért tér el annyira egymástól, mert két különböző publikációhoz készültek 10 év különbséggel. Az első és második ábrán minden egyes adatpont a fertőzött és a kontroll (mock-inokulált) növények transzkriptumszintjeinek hányadosát jelöli.

A bemutatott öt *poliamin-oxidáz* izoforma génkifejeződésének működését valóban csak egy időpontban, 24 órával az *A. brassicicola* gombával végzett inokuláció után határoztuk meg. Ennek egyrészt az volt a magyarázata, hogy a 24 órás időpont kulcsfontosságúnak tűnt a másik két extracelluláris ROS termelő rendszer transzkripció aktivitásának vizsgálata során (mind az *RBOHD*,

mind a *PRX33* és *PRX34* gének mRNS szintű kifejeződése 24 órával a fertőzés után éri el a legmagasabb értéket). Korábbi időpontokat ezután azért nem vizsgáltunk, mert a 24 órás eredmények nem mutattak transzkripció aktivitás emelkedést egyik izoforma esetében sem, ugyanakkor a két sejtfal peroxidáz gén expressziója látványosan megnőtt a gombafertőzés hatására, ezért ígéretesebbnek tartottuk azt, ha a figyelmünket és az időnket ezeknek a vizsgálatára összpontosítjuk.

Leszögezhetem ugyanakkor, hogy mivel a *PAO* izoformák szerepének a feltárását csak transzkripció szinten figyeltük meg, ráadásul ezt is csupán egy időpontból gyűjtött minták adatai alapján, ezért mégsem zárható ki annak a lehetősége, hogy a poliamin-oxidázok is hozzájárulnak a sejtközi járatok oxidatív robbanásához a vizsgált növény-gomba kölcsönhatásban. Igyekeztem a doktori művemben ennek a kérdésnek a tárgyalásakor mértéktartóan fogalmazni.

Mi állhat a *PAO5* repressziójának a hátterében?

Ezt a kérdést a következőképpen válaszoltam meg Dr. Bánfalvi Zsófia bírálatára adott válaszomban: Zarza és munkatársai (2017) eredményeire támaszkodva látható, hogy a *pao5* mutáns *Arabidopsis* növények mellett, 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.

4) Miért dolgoztunk kétféle *Alternaria brassicicola* izolátummal?

Korábbi *Arabidopsis* növényeken végzett kísérleteimben, melyekben az *rbohD* és *rbohF* mutánsok *Alternaria brassicicola* iránti fogékonyságát vizsgáltam, még kevés tapasztalatom volt az *Arabidopsis* növényeket fertőző gombakórokozókkal. Ekkor kaptam segítséget Dongó Anitától, a Veszprémi Egyetem Ph.D. hallgatójától, aki megosztotta velem az általa káposztáról gyűjtött *A. brassicicola* izolátumot (CBS125088), ezt használtam az első néhány évben. Később, amikor több tapasztalatom lett az *Arabidopsis*-gomba kölcsönhatásokat alkalmazó kutatócsoportok tevékenységével kapcsolatban, sikerült hozzájutnom az MUCL20297 referencia izolátumhoz. Erről kiderült az, hogy nagyobb mennyiségben képez konídiumokat burgonya-dextróz táptalajon, mint az általam korábban használt izolátum, egyúttal virulensebb is *Arabidopsis* növényeken, mint a régi izolátumunk. Ezért döntöttünk az új izolátum használata mellett a későbbi, *prx33-prx34* sejtfal peroxidáz hiányos növények vizsgálatára irányuló kísérleteinkben.

5) 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.

A 7. és a 8. ábrán látható vizsgálatokban a levelekben kimutatható *A. brassicicola* gomba biomassza mennyiségét valóban eltérő módon határoztuk meg és szemléltettük. Mind a két vizsgálat kvantitatív, valós-idejű PCR módszerrel valósult meg. A 7. ábra esetében azonban lehetőségem volt táptalajon tenyésztett gomba micéliumból DNS-t kivonni, ebből hígítási sort előállítani, majd kalibrációs görbe segítségével meghatározni a mintákban felhalmozódott gomba DNS abszolút mennyiségét egységnyi

növényi DNS-re vonatkoztatva. A 8. ábrán szemléltetett adatok esetében relatív mennyiségi meghatározást végeztünk a referencia primer pár által amplifikált növényi DNS szakasz ciklusszámának és az *A. brassicicola* kiválasztott DNS szakaszát felszorzó primer pár által képzett amplikon ciklusszámának a különbségét alkalmazó képlet segítségével (Livak és Schmittgen 2001). Az ábrán a PRX-hiányos növényekben mért *A. brassicicola* gomba biomassza értékeket a vad típusú, illetve az üres TRV-GFP konstrukcióval kezelt növények gomba biomassza értékeihez viszonyítottuk.

Livak és Schmittgen (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25, 402-408.

6) „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?

Az értekezés 42. oldaláról opponensem által idézett mondatot és az erre vonatkozó kérdést elolvasva szembesültem vele, hogy a mondatot hibásan fogalmaztam meg a doktori műben. Egyrészt a szalicilsav-analóg acibenzolar-S-metil tényleg fokozta a gomba által előidézett sejthalállal járó tüneteket az *rboh*d mutáns növényekben is, tehát a mondat második fele továbbra is megállja a helyét. A mondat első állítása azonban nyilvánvalóan téves, hiszen a szalicilsav-analóg nem fokozhatta az *rboh*d mutánsban az RBOHD-re jellemző oxidatív robbanás mértékét. Maga a mondat az értekezés 12. ábráján bemutatott adatok szövegek közötti tárgyalása során olvasható.

Az ellentmondás feloldásának kulcsa a következő, amelyhez vissza kell nyúlni a 10. ábrán látható eredményekhez: a 10. ábrán közölt megfigyelésekből világossá válik az, hogy az *rboh*d mutáns növények *Alternaria* fertőzés után nem termelnek extracelluláris ROS-t. Ez nem jelenti azt, hogy az *rboh*d mutánsban egyáltalán nincs kimutatható ROS képződés, mert a kloroplasztiszokban továbbra is képződik (egy darabig még) ROS a gombafertőzött, sejthalált elszenvedő szövetekben.

Így már érthetővé válik az, hogy a 12. ábrán miért figyelhető meg az *rboh*d mutáns növényekben fokozott ROS termelődés az acibenzolar-S-metillel való kezelés után. Ez nem RBOHD-re jellemző oxidatív robbanás, hanem az RBOHD kiesése miatti fokozott sejthalállal együtt járó ROS képződés a kloroplasztiszokban.

A szalicilsav (illetve a szalicilsav-analóg acibenzolar-S-metil) egyébként abban az esetben fokozhatja a sejthalállal járó tüneteket az *rboh*d mutáns növényekben is (úgy, hogy közben a jelenség mégis specifikus az RBOHD fehérje működésére), ha a szalicilsav a folyamatot szabályozó jelátviteli hálózatban az RBOHD mellett még más (általában nem vizsgált) molekuláris faktorokra is serkentő hatást gyakorol.

Az *Arabidopsis-Alternaria* kölcsönhatásra kidolgozott modellünket közelebbről szemlélve a kölcsönhatás későbbi-előrehaladottabb szakaszában látok hasonlóságot a reaktív oxigén származékok (ROS) és a szalicilsav általunk javasolt, feltételezett egymásra gyakorolt hatásában és a pozitív visszacsatolást és kölcsönös önerősítést feltételező szalicilsav-ROS ciklust leíró modell között (Mittler és munkatársai 2004, Pogány és munkatársai 2009, Miura és Tada 2014). Figyelemre méltó még az is, hogy az általunk készített modellhez hasonlóan az önerősítő szalicilsav-ROS ciklus modellekben is

gyakran visszaköszön résztvevő partnerként az RBOHD fehérje (mint ROS forrás) és az etilén (mint mobil szignál), illetve az általunk nem vizsgált kalcium (Ca^{2+}).

Mittler és mtsai (2004): *Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science* 9, 490-498.

Pogány és mtsai (2009): *Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an Arabidopsis-Alternaria pathosystem. Plant Physiology* 151, 1459-1475.

Miura és Tada (2014): *Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. Frontiers in Plant Science* 5, 4.

7) 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? 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?

Feltehetőleg érdemes lett volna az *rboh*d T-DNS mutáns szabad szalicilsav tartalmát az *A. brassicicola* gombával való fertőzés korábbi időpontjaiban is megmérni, nem csupán 72 órával az inokuláció után. Mazumder és mtsai (2013) az *Alternaria brassicicola* fertőzés után 24 órával már magasabb szabad szalicilsav (SA) tartalmat mértek *Brassica* és *Sinapis* fajokban, mint a fertőzetlen növényekben. *Brassica* növények esetében tovább emelkedett az SA tartalom 72 óráig, *Sinapis* esetében pedig 24 óra után némileg csökkent, majd a 72 órás minta esetében kissé ismét nőtt a szabad szalicilsav tartalom. Saját HPLC méréseimet a rendelkezésemre álló szűkös időkeret miatt kellett a 72 órás időpontra korlátoznom.

Az etilén mérés esetében is leolvashatóak a 72 órás időponthoz tartozó mock inokulált minták adatai az *A. brassicicola* gombával fertőzött minták adatai alatt (13. ábra), csakúgy mint a SA esetében (14. ábra). A szalicilsavra vonatkozóan nem volt lehetőségem további (korábbi) időpontok elemzésére, szemben az etilén mérésével, ami sokkal egyszerűbb, mintaelőkészítést nem igénylő gázkromatográfiás vizsgálat.

Mazumder és munkatársai (2013): *Salicylic acid-mediated establishment of the compatibility between Alternaria brassicicola and Brassica juncea is mitigated by abscisic acid in Sinapis alba. Plant Physiology and Biochemistry* 70, 43-51.

8) Az *erecta* SALK_04410 valamint az *erecta* SALK_066455C mutánsok fényképe látható, alatta a SALK_066455C-re tesz megállapítást, hogy erősen gátolt a H_2O_2 termelése, ezért az ERECTA fehérje működése szükséges a ROS termeléshez, mi mondható el a másik mutáns eredményei alapján?

A SALK_04410 (helyesen SALK_044110, az értekezésben és a kéziratunkban hibásan szerepel) *erecta* mutánst mindössze az *Alternaria brassicicola* gombával végzett tüneti szintű fogékonysági vizsgálathoz használtuk. A fogékonysági vizsgálat során törekedtünk arra, hogy lehetőleg mind a 11 tanulmányozni kívánt lókuszt két-két eltérő T-DNS mutáns több egyedének a fertőzésével értékeljük. Tekintettel arra, hogy a SALK_044110 genotípus egy kevésbé jól jellemzett *erecta* mutáns, ezért a ROS szöveti felhalmozódásának kimutatásához már nem használtuk fel. A SALK_066455C *erecta* mutáns egy ellenőrzött, a T-DNS inszerciót hordozó lókuszt nézve egyértelműen homozigóta genotípus.

9) 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 ellenállóbbá a növényeket a hidegedzés?

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?

A 19. ábrán a hidegedzett és az előzetes hidegedzésben nem részesült növények átlagainak statisztikai összehasonlítására használtuk a csillagokkal történő jelölést.

Az ábrát szemügyre véve és az ábrához tartozó szöveges eredmény leírást végigolvasva megállapítható, hogy a két kalászos gabonafaj közül a búza esetében kifejezettebb a hidegedzés hatására fellépő oxidatív stresszel szembeni védelem. Ésszerű lett volna tehát a későbbi növénykórtani és genomikai vizsgálatokat inkább búza növényekkel folytatni árpa helyett. Azért esett mégis a választásom árpára, mert a müncheni laboratóriumunkban árpa EST szekvenciákat tartalmazó gén-chip (microarray) transzkriptom vizsgálati rendszer állt rendelkezésemre. Érdeemes lenne ezt az elemzést búza növényeken megismételni transzkriptom szekvenálás segítségével.

Köszönöm végül opponensemnek az értekezésemmel és az MTA doktora pályázatommal kapcsolatos támogató állásfoglalását!

University Park, 2023. augusztus 18.



Dr. Pogány Miklós

tudományos főmunkatárs

ATK Növényvédelmi Intézet