

Válasz Dr. Papp István, az MTA Doktora bírálatára

Szeretném megköszönni opponensemnek az értekezésem gondos átnézést, elismerő szavait, értékes megjegyzéseit, kérdéseit. Kritikai megjegyzéseire az alábbiakban válaszolok.

A szakzsargonot esetenként túlzottan alkalmazza, az angol szakkifejezések helyett több helyen a magyar megfelelők is használhatóak lettek volna.

Több esetben a szóismétlések elkerülése végett használtam a szövegben a magyar kifejezés idegen megfelelőjét. Köszönöm a megjegyzést, és elismerem, hogy a magyar nyelvű tudományos szövegben helyénvalóbb a magyar nyelvű szakzsargon használata.

A Stresszindukált Morfogénikus Válasz (SIMV) esetében a szakirodalmi áttekintés szűkszavú. Itt a szerző saját (Kolbert 2016) publikációt is megad forrásként, ami nem szerencsés, hiszen ez a közlemény a tézisek alapjául szolgáló cikkek között is szerepel.

Meg kell jegyezmem, hogy a szakirodalmi áttekintés szűkszavúsága abból adódik, hogy a témában nagyon kevés (a dolgozat írásának időpontjáig 6 kutatási és 2 összefoglaló) közlemény született. Bár valóban nem szerencsés az önidézés a szövegben, mégis ezért gondoltam a kijelentéseket saját összefoglaló cikkekre való hivatkozással alátámasztani.

Az elemek műtrágya/lombtrágya formában történő kijuttatása szintén lehetséges forrása az elemtoxícitásnak, ami itt említhető lett volna.

A hagyományos nitrogén-foszfor-kálium műtrágyákban az általunk vizsgált fémek (Cu, Zn, Ni) és nemfémes elem (Se) elenyésző mennyiségben vannak jelen. A lombtrágyák között vannak mikroelem készítmények, melyekben az általunk vizsgált fémek közül a Zn van jelen releváns mennyiségben. A növények leveleken keresztüli érintkezését az elemtöbblettel valóban érdemes lett volna megemlíteni, bár ez nem kapcsolódik az értekezés kísérletes részének témájához.

Opponensem hiányolta a nanorészecskék mezőgazdasági hasznosításának legalább vázlatos bemutatását is, mivel az a kísérletekhez kapcsolódó, gyorsan fejlődő, igen perspektívikus alkalmazási terület.

A nanorészecskék esetén kutatásaink főként a negatív hatásokat vizsgálták, a mezőgazdaságban való alkalmazásuk azonban a pozitív hatásaikon alapul. A korlátozott oldalszám és a fejezetek arányossága miatt nem akartam lényegesen eltérni az értekezés fókuszától, ezért nem tértem ki -az egyébként valóban lényeges- információkra.

Opponensem kérdése a hiperakkumuláció kapcsán az, hogy a hiperakkumuláló fajok/genotípusok között ismertek-e olyanok, amikkel Magyarországon folynak fitoremediációs projektek?

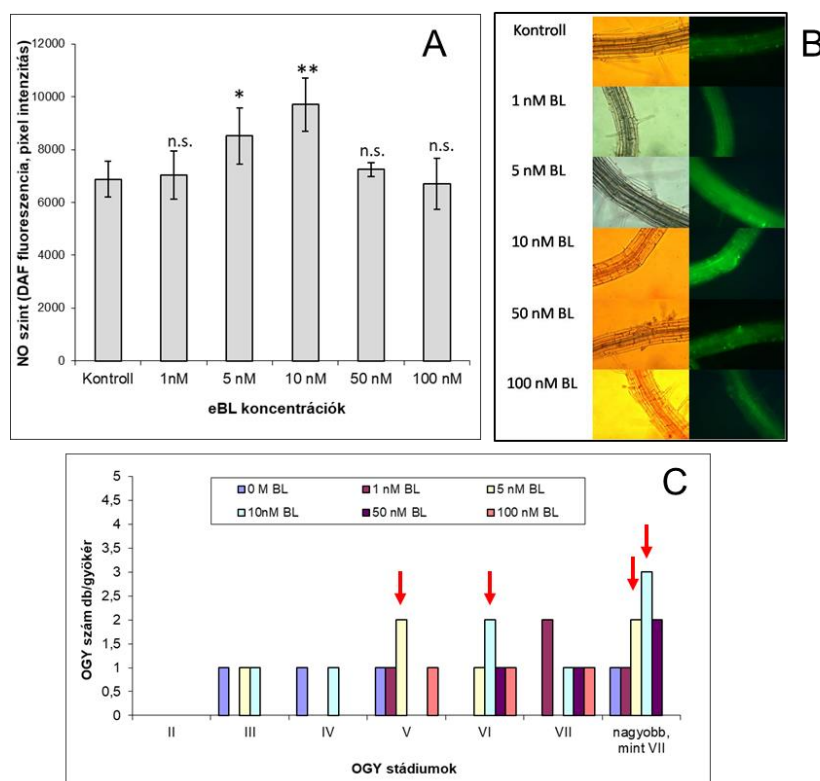
Magyarországon több fitoremediációs projekt futott az elmúlt évtizedekben. Egy ezek közül a 2004 és 2008 között a Növénybiológiai Tanszék vezetésével zajlott NKFP projekt „Környezetszennyező nehézfémek ártalmatlanítása növényekkel: a fitoremediáció, mint szennyezéscsökkentési program” címmel. Ebben a munkában főleg nagy biomasszát adó fűzekkel, napraforgóval és indiai mustárral dolgoztak. 2017 és 2021 között a Pannon Breeding agrár-innovációs projekt részfeladata volt a leghatékonyabb lág- és fűszárú növényfajok kiválasztása, és módszerek kidolgozása nehézfémekkel szennyezett talajok kezelésére. Ehhez szabadföldi fitoremediációs tartamkísérleteket állítottak be Debrecen környékén és tönkölybúzát, szudánifüvet, cirokot, fehér fűzet alkalmaztak, melyek szintén nagy biomasszaprodukciójú fajok. A hiperakkumuláló növényfajok többsége kisméretű és lassú növekedésű, ami korlátozza a fitoremediációs alkalmazhatóságukat. Érdekességként megjegyzem, hogy ennek a problémának a kiküszöbölése lehetséges azáltal, ha a hiperakkumuláló növény

biomasszaprodukcióját fokozzuk nehézfém-tűrő, növekedésserkentő baktériumokkal való kombinálással (pl. Zhang és mtsi. 2022). Számomra nem ismert olyan hazai fitoremediációs projekt, amelyben hiperakkumuláló növényfajt alkalmaznak önmagában vagy rhizobaktériumokkal kombinálva.

Zhang Y, Zhao S, Liu S és mtsi. (2022) Enhancing the phytoremediation of heavy metals by combining hyperaccumulator and heavy metal-resistant plant growth-promoting bacteria. *Front Plant Sci* 13, <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.912350>

Opponensem megjegyzi, hogy a „gyökérrendszert befolyásoló belső faktorok című fejezetben helyet érdemelt volna akár az abszcizinsav, de különösen a brassinoszteroidok. Utóbbi hormonok kapcsolata a nitro-oxidatív stresszel és gyökérnövekedéssel különösen izgalmas terület az utóbbi évek kutatási eredményei alapján.

Egyetértek a bírálómossal azzal kapcsolatban, hogy a brassinoszteroidok NO-dal való kapcsolata és a gyökérfejlődésben játszott szerepe izgalmas, újabb terület. A NO és a brassinoszteroidok kapcsolatát igazolták járulékos- és oldalgökyérfejlődés során uborkában és lúdfűben. Mindkét fajban a NO szint mérséklése (cPTIO gyökfóggóval vagy enzimgátlókkal) gátolta az epi-brassinolid (eBL) oldalgökyér-fejlődést indukáló hatását (Tossi és mtsi. 2013; Li és mtsi. 2020). A brassinoszteroid kezelés (1 μM vagy 10 nM eBL) NO szint fokozódást okozott a járulékos- és oldalgökyér primordiumokban (Della Rovere és mtsi. 2022). Ezzel egybehangzóan saját korábbi, kísérleteinkben az alkalmazott eBL koncentrációk közül az 5 és a 10 nM okozott szignifikáns NO szint emelkedést az oldalgökyérkezdeményekben a kontrollhoz képest (1. ábra AB). Érdekes viszont, hogy ezek az eBL koncentrációk nem a primordiumok, hanem a fejlettebb oldalgökyerek számát emelték meg (1. ábra C). Ez arra utal, hogy az eBL-indukált NO képződés megelőzi az oldalgökyér-indukáló hatást. Ezek az eredményeink egy szakdolgozatot gazdagítottak (*Sahin Natália, 2010, A növényi hormonok és a nitrogén-monoxid (NO) kapcsolata a gyökérfejlődés során*), publikálásra nem kerültek.



1. ábra (A) Epi-brassinolid (eBL) koncentrációk hatása a NO szintre oldalgökyér-kezdeményben. A statisztikailag szignifikáns különbségeket csillagok jelzik a Student-féle t-próba alapján (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, n.s.=nem szignifikáns). (B) Reprezentatív mikroszkópos felvételek (átesőfényes és fluoreszcens) eBL-dal kezelt lúdfű oldalgökyér-kezdeményeiről. (C) eBL koncentrációk hatása az egyes stádiumú oldalgökyerek számára. Az oldalgökyerek fejlettségi stádiumait Malamy és Benfey (1997, *Develop* 124:33-44, doi: 10.1242/dev.124.1.33.) alapján határoztuk meg. Az 5 és a 10 nM eBL indukáló hatását piros nyilakkal jelöltem.

A dolgozatomban ahhoz az elvhez ragaszkodtam, hogy a kutatás elméleti háttérét arra fókuszálva mutassam be, amivel a kísérleteinkben foglalkoztunk. Az említett hormonok hatását és NO-dal való kapcsolatát nem vizsgáltuk, ezért nem tárgyaltam. Az igaz, hogy így a gyökérfejlődés hormonális szabályozását nem ismerheti meg teljes egészében, viszont egy összpontosított, kevésbé szerteágazó és a dolgozat többi részével jobban kapcsolódó áttekintést kap az olvasó.

Tossi V, Lamattina L, Cassia R (2013) Pharmacological and genetical evidence supporting nitric oxide requirement for 2,4-epibrassinolide regulation of root architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 8: e24712, <https://doi.org/10.4161/psb.24712>

Li Y, Wu Y, Liao W *et al.* (2020) Nitric oxide is involved in the brassinolide-induced adventitious root development in cucumber. *BMC Plant Biol* 20: 102, <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2320-y>

Della Rovere F, Piacentini D, Fattorini L (2022) Brassinosteroids mitigate cadmium effects in arabidopsis root system without any cooperation with nitric oxide. *Int J Mol Sci* 23: 825, <https://doi.org/10.3390/ijms23020825>

Bírálom megjegyzi, hogy a NO/etilén kölcsönhatás leírását annyiban kiegészítené, hogy az nemcsak gátló, de serkentő hatása is lehet. Ezt pl hypoxia stressz esetében, légjártok kialakulásánál és járulékos gyökerek képződésénél figyelték meg.

A bíráló által említett pozitív jelkapcsolat valóban lényeges, köszönöm a kiegészítést. A NO szerepét a hipoxia-indukált aerenchima képződésben Wany és mtsi. (2017) mutatták ki búzában. A hipoxiás körülmény a nitrát-reduktáz enzim aktiválódása révén NO képződést okozott a búza gyökerekben. Ennek a NO produkciónak a korlátozása jelentős csökkenést okozott a levegőztető alapszövet képződésében. A NO indukálta az ACC szintáz és ACC oxidáz etilénszintézis gének kifejeződését, ezáltal aktiválva az etilén-kapcsolt hatásokat az aerenchima képződés során. Ami a járulékosgyökér-fejlődést illeti, Jin és mtsi. (2017) igazolták, hogy az ethephon pozitív hatását a NO gyökfógó (cPTIO) gátolta, amiből szinergista kapcsolatra következtettek az etilén és a NO között.

Wany A, Kumari A, Gupta KJ (2017) Nitric oxide is essential for the development of aerenchyma in wheat roots under hypoxic stress. *Plant Cell Environ* 40: 3002-3017.

Jin X, Liao WB, Yu JH, Ren PJ, Dawuda MM, Wang M, Niu LJ, Li XP, Xu XT (2017) Nitric oxide is involved in ethylene-induced adventitious rooting in marigold (*Tagetes erecta* L.) *Can J Plant Sci* 97: 620–631.

Megjegyzések az értekezés eredmények részéhez:

Az 5.1 és 5.2 fejezetekben bemutatott kísérletek különböző fajok gyökérnövekedési válaszait összegzik elemtöbbletek esetén. A bemutatott kísérleti eredmények nézetem szerint nem adnak egyértelmű bizonyítékot arra, hogy a SIMV egy fajtól független, általános gyökérnövekedési válasz lenne, még a vizsgálatok körén belül sem.

A SIMV fajfüggetlen jellegét arra alapoztam, hogy az általam tanulmányozott többféle növényfajban és a mások által vizsgált növényfajokban is megjelenik a SIMV gyökérfenotípus az elemtöbbletek hatására. Ez azt jelenti, hogy többféle növényfaj is képes a SIMV kialakítására, és az én logikám szerint ez azt is jelenti, hogy a SIMV megjelenhet fajtól függetlenül (de nem jelenti azt, hogy minden növényfajban meg is jelenik). Ettől a kérdéskörtől elválasztanám a hiperakkumulálók speciális csoportját. Azok esetében a hipertűrészhez „átprogramozódó” vagy fennmaradó gyökérnövekedés társul, de klasszikus SIMV nem.

A 17. ábra A/ és C/ részében bemutatott eredményeknél a bírálóm megjegyzi, hogy a szelén kezelt vad típusú növények oldalgökér képzése eltérő értékeket mutat.

A kérdéses ábrákon bemutatott eredmények független kísérletekből származnak, ezért alakulhatott úgy, hogy az értékek eltérőek. Az egyik esetben átlagosan 2-2 OGY kezdemény és kifejlett OGY volt a szelén-kezelt vad típusban, a másik esetben ezek az értékek átlagosan 4 és 2. Ekkora szórás benne van a rendszerben.

A 20/A ábra adatai alapján szövegszerűen megfogalmazott eredmények szerint az NO szint növelése (GSNO-val) fokozta, visszafogása (cPTIO-val) pedig lecsökkentette a kifejlett oldalgyökerek számát vad típusú és *etr1* mutánsban egyaránt. A mutánsra nézve azonban a bemutatott adatok alapján a szelén + cPTIO kezelés nem változtatta meg a kifejlett oldalgyökerek számát szignifikánsan a csak szelénkezeltekhez képest. A GSNO kezelés adatai, és az egyéb kísérletek eredményei e nélkül is valószínűsítik a feltételezett fenti összefüggés helyességét.

Köszönöm az észrevételt. A szövegben valóban nem megfelelően jelenik meg az eredményleírás.

A 20/B ábrán bemutatott ACS8:GUS génexpressziós eredmények szerint a szelén vad típusú lúdfűben is indukálni látszik a promotert, míg a 18 ábra adatai alapján ez csak az *etr1* mutánsban figyelhető meg. Van-e esetleg számszerű érték a GUS gén kifejeződésére, illetve magyarázat az esetleges eltérésre?

A qRT-PCR módszerrel, teljes csíranövényben detektált ACS8 expresszió nem mutat Se-indukciót, míg a gyökérben X-Gluc festéssel, azaz hisztokémiai módszerrel detektált ACS8:GUS/GFP promotéraktivitás növekedést mutatott. Véleményem szerint az eltérést magyarázza a módszerek és a növényi objektum különbözősége. Általánosságban igaz, hogy az *in situ*, szerv/szövetszinten történő nagyobb felbontású detektálás kisebb változásokat is kimutathat, mint az organizmus-szintű detektálás.

Egyetértek a bírálóval a tekintetben, hogy a mikroszkópos felvételek kiegészítéseként a számszerűsített GUS-aktivitás fontos információt ad. A Blázquez (2007) által kidolgozott módszer szerint 4-metilumbelliferil β -D-glükuronid (4-MUG) szubsztrátot a GUS 4-metilumbelliferon (4-MU) fluorokrómmá hidrolizálja, melynek fluoreszcenciája mérhető, és a GUS-aktivitás annak mértékéből következtethető. Ennél egyszerűbb az Image J-alapú kvantifikálás Béziat és mtsi. (2017) alapján. Bár a mi rendszerünkben is precízebb lett volna a GUS promotéraktivitások számszerűsítése, sajnos nincs ilyen mérésünk. Ugyanakkor, a különbségek megfelelően nagyok ahhoz, hogy szabad szemmel láthatóak legyenek, így nem hagynak kétséget az olvasóban.

Blázquez M (2007) Quantitative GUS activity assay of plant extracts. Cold Spring Harb Protoc; <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4690>

Béziat C, Kleine-Vehn J, Feraru E (2017) Histochemical staining of β -Glucuronidase and its spatial quantification. In: Kleine-Vehn, J., Sauer, M. (eds) Plant Hormones. Methods in Molecular Biology, vol 1497. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6469-7_8

Bírálóm egy további kritikai megjegyzése szerint zavaró hiányosságként jegyezhető meg az, hogy az eredmények szöveges megfogalmazása és a bemutatott 26/B ábra adatai nem felelnek meg teljes mértékben.

A 26. B ábra adatai alapján azt a megállapítást tettem, hogy a NO eltávolítása súlyosbította az 5 és a 25 μ M réz hatását. Ez véleményem szerint nem hibás, mert a cPTIO kezelést nem kapott mintához képest, a cPTIO adagolása alacsonyabb életképességet eredményezett az 5 és a 25 μ M rézkezelés mellett.

A cinkstressznek kitett *Arabidopsis*-szal kapcsolatban felmerült kérdés, hogy milyen megfontolás alapján választottuk ki a génexpresszió szintjén vizsgált két tioredoxin gént?

Célunk volt egy S-nitrozoglutation-reduktáz-független denitrozilációs útvonalat találni, ami magyarázhatta a S-nitrozotiol szintek kontrollját a rendszerünkben. Kneeshaw és mtsi. (2014) kimutatták, hogy a TRXh5 protein SNO-redukciós aktivitást mutat, vagyis jó jelölt volt a génszintű vizsgálatra. Mellette több élettani folyamatban vizsgálták a TRXh3-at, amit így mi is vizsgálat alá vontunk.

Kneeshaw S, Gelineau S, Tada Y, Loake GJ, Spoel SH (2014) Selective protein denitrosylation activity of Thioredoxin-h5 modulates plant immunity. Mol Cell 56: 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.003>

Az APX mellett lehetséges-e a nitrozilált fehérjék valamelyikének (laktát/malát DH, GA3P-DH, riboszomális fehérjék, RubisCo kis alegység) ismert funkcióit a nitro-oxidatív stressz válaszhoz kapcsolni?

A többi detektált fehérjét, melyek alap metabolizmusban érintett fehérjék, nem tudtuk egyértelműen a nitro-oxidatív stresszválaszhoz kötni.

Opponensem megjegyzi, hogy a bemutatott adatok alapján a gyökérmerisztéma életképessége nem feltétlenül adekvát jelzője a növekedési potenciálnak. Ezzel kapcsolatban kérdezi, hogy a gyökérmerisztéma sejtek életképesség értékei mennyire korreláltak gyökérnövekedés mértékével más kísérletek során? Melyik érték lehet jobb jelzője a gyökér funkcióképességének?

A merisztémasejtek életképessége összefügg az osztódóképességükkel (Kolbert, Molnár és mtsi. 2023). Ily módon a gyökérnövekedés gátlásának lehet okozója a merisztémasejtek életképességének csökkenése, de több esetben mégsem láttunk korrelációt a kettő között. A dolgozatban nem bemutatott kísérleti rendszereinkben is előfordult az, hogy pl. életképes gyökérmerisztéma-sejtek mellett rövidülés volt megfigyelhető (pl. cinkhiány, Arabidopsis, Oláh és mtsi. 2023, és doktori disszertáció). Ennek az lehet a magyarázata, hogy a gyökérmegnyúlást hormonális folyamatok is szabályozzák, és a hormonszintekben a stresszhatásra bekövetkező változások nagyban felelősek lehetnek a gyökérmegnyúlás-gátlásért. A változatlan életképesség dacára rövidülő gyökérzetben kimutattuk az auxin- és a citokininszintek csökkenését és az etilénszint növekedését cinkhiányos lúdfűben (Oláh Dóra doktori disszertáció).

Az elemtöbbletek esetén véleményem szerint a gyökérmegnyúlás-gátlás a jobb jelzője az érzékenységnek, vagy ha úgy tetszik a gyökér funkcióképességének. A gyökérhossz persze fajoként, fajtánként és genotípusonként változhat, de az elemterhelés-indukált rövidülésnek a mértékét ki lehet számítani, és tolerancia indexként feltüntetni (pl. Tamaoki és mtsi. 2008).

Kolbert Zs, Molnár Á, Kovács K és mtsi. (2023) Nitro-oxidative response to internalized multi-walled carbon nanotubes in *Brassica napus* and *Solanum lycopersicum*. *Ecotox Environ Saf* 267: 115633, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115633>

Oláh D, Kondak S, Molnár Á és mtsi. (2023) Suboptimal zinc supply affects the *S*-nitrosoglutathione reductase enzyme and nitric oxide signaling in *Arabidopsis*. *Plant Stress* 10: 100250, <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100250>

Tamaoki M, Freeman JL, Pilon-Smits EAH (2008) Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenite resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146: 1219–1230.

A ZnO nanorészecskék hatásait vizsgáló rendszerben a RNF-k indukcióját a GSNOR hidrogén-peroxid kiváltotta inaktivációjával indokolta B. juncea-ban. A 49/C ábra alapján azonban a B. juncea GSNOR aktivitása 25 mg/L ZnO kezelésnél magasabb volt, mint a B. napus-é ugyanilyen ZnO kezelés mellett, ezért ez a magyarázat további kiegészítést igényel.

A natív gélben nem volt kimutatható a GSNOR aktivitás a *B. napus* kivonatokban. Természetesen többször ismételtük a mérést, és próbáltuk optimalizálni a detektálás körülményeit, de mégsem sikerült aktivitást kimutatni (fehérjemennyiséget detektáltunk). Azt gondolom, hogy a módszer nem volt megfelelő, és spektrofotometriás mérésre lett volna szükség az enzimaktivitás kimutatásához. Ennek hiányában a *B. napus*-ra vonatkozóan nem lehet megfelelő következtetést levonni.

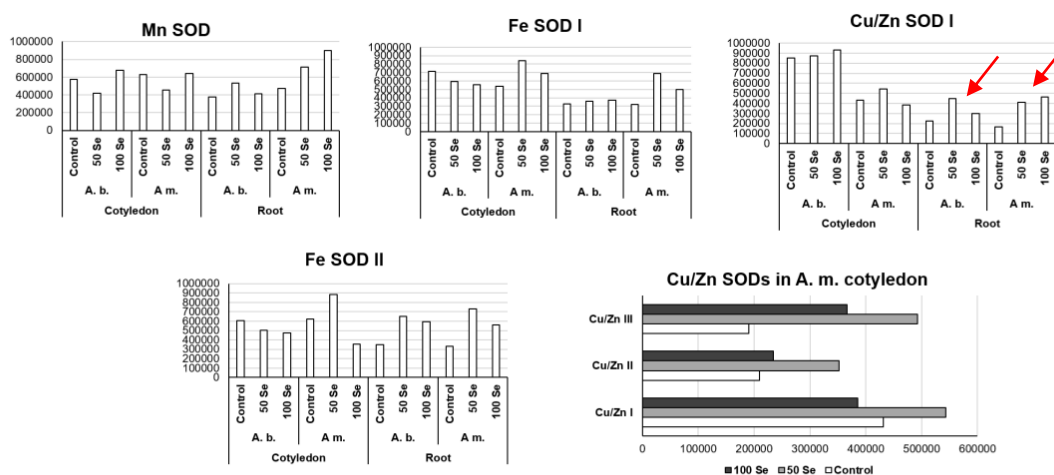
Ezután a dolgozat a szelén toxicitás vizsgálatára tér át, amit B. juncea fajon vizsgál. Az elem két formája közül a reaktívabb szelenitet mérgezőbbnek találta a szelénátnál. A reaktív oxigén és nitrogén fajták között is különbségeket talál, mind a szelén formák, mind azok koncentrációja tekintetében. Az 52/A ábrán bemutatott kísérleti eredmények esetében viszont szükség lenne a kétféle kezelés kontroll értékei közötti eltérés magyarázatára.

A kontroll értékek közötti eltérést magyarázza, hogy független kísérletek zajlottak, külön kontrollokkal a kétféle szelénkezeléshez. Az egyik kontrollcsoport esetén átlagosan ~450 a pixel

intenzitás, a másik kontroll-csoport esetén pedig ~300 ez az érték. Ez kismértékű eltérésnek számít, és a rendszerben van ekkora szórás.

Az 54. ábrán a SOD esetében közölt gélfotó nem túl részletgazdag, a látható jelek között a Cu/Zn SOD aktivitás számomra nem tűnik egyértelműen erősebbnek az *A. bisulcatus* esetében.

A szövegben (99. oldal) az áll, hogy a gyökérben mindkét szeléndózis fokozta a Mn SOD, Fe SOD és a Cu/Zn SOD izoenzim aktivitását az *A. bisulcatus* esetén, de ez az indukció nagyobb mértékű volt az *A. membranaceus*-ban (54. ábra G). Az aktivitássávok denzitását GelQuant programmal mértük (lásd Suppl Fig 4), de az értekezésben nem mutattam be az adatokat. Látható, hogy a gyökérben mindkét szeléndózis növelte a denzitást az *A. membranaceus*-ban, és ez a hatás kisebb mértékű volt az *A. bisulcatus*-ban. A vonatkozó ábrarészt piros nyilakkal jelöltem.



Suppl Fig 4 Quantification of SOD in gel activities using Gelquant software. The values of the individual isoforms are depicted on separate graphs except Cu/Zn SOD isoforms in *A. membranaceus* cotyledon.

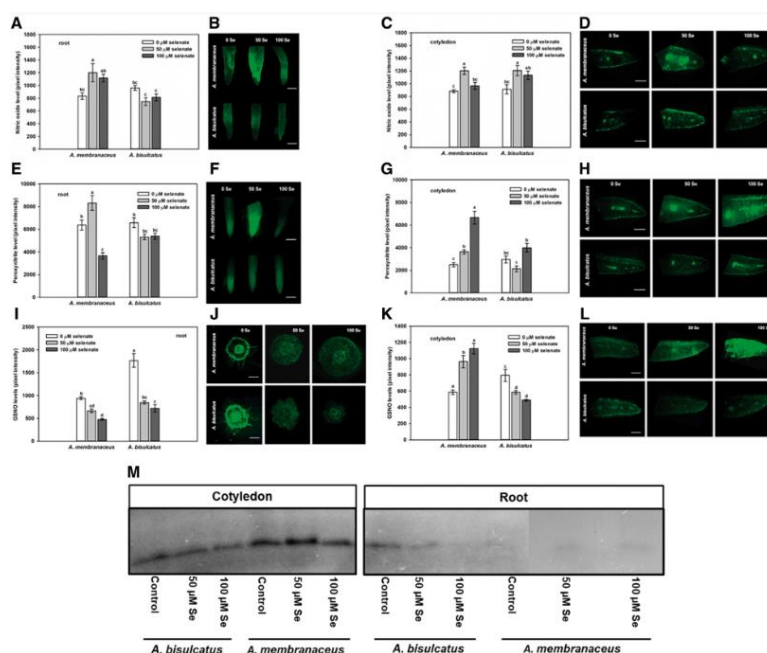
A számos lehetőség közül, ahogyan szuperoxid-gyökönion képződhet, miért éppen a NOX enzimaktivitást vizsgálta? Volt valamilyen utalás ennek a kiemelt jelentőségére szelén terhelés mellett?

A NADPH-oxidáz enzim, mint ROF forrás vizsgálatát arra alapoztuk, hogy Chen és mtsi. (2014) kimutatták ennek az enzimnek részvételét a szelén-indukált ROF képződésben *Brassica rapa* gyökerekben. Háromféle gátlószert (difenilén-jodónium, piridin, imidazol) alkalmaztak, melyek jelenlétében a szelén-indukált ROF képződés és a gyökértoxicitás mérséklődött. A szelén és a NADPH-oxidáz közötti kapcsolatra utal az is, hogy a szelénkezelés indukálta a *BrRbohA-J* gének kifejeződését.

Chen Y, Mo H-Z, Hu L-B, Li Y-Q, Chen J, Yang L-F (2014) The endogenous nitric oxide mediates selenium-induced phytotoxicity by promoting ROS generation in *Brassica rapa*. PLoS ONE 9: e110901, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110901>

A GSNOR aktivitás leírása (101. oldal) és az 56/E ábra nincsenek összhangban, az ábrán a fajok jelölése felcserélődhetett.

Köszönöm ezt az észrevételt is, sajnos akaratomon kívül felcseréltem az ábrán a feliratokat. Az eredeti -publikációban megjelentetett- ábrát itt csatolom.



A nikkeltűrő Odontarrhena lesbiaca különböző Ni szintet felhalmozó ökotípusainak összehasonlításával kapcsolatos bírálói kérdés a következő: A szenzitív ökotípus vártól elmaradó fehérjenitrációját a proteom alacsony nitrációs érzékenysége magyarázza. A proteom milyen különbségei okozhatják ezt? Ismert-e olyan példa, ahol akár bioinformatikai eszközökkel ilyen összefüggést alá tudtak támasztani?

A relatív Ni-tűrő Ampeliko ökotípusban a nitrált fehérjék mennyisége csökkent a kontroll növényekhez képest, az érzékenyebb Loutra ökotípusban pedig változatlan maradt. Ez véleményünk szerint a proteaszómális degradáció fokozódásának lehet a következménye, amely összefüggést mutat az *Odontarrhena* (korábban *Alyssum* fajok) nikkeltűrésével és hiperakkumulációjával (van Hoewyk és mtsi. 2018). Feltételezésünk szerint a tűrőbb fajban a fokozottabb proteaszóma-aktivitás csökkenti a nitrált fehérjék mennyiségét, a szenzitív fajban ez kontroll-szerű értéket eredményez. Ennek a hipotézisnek az alátámasztására további kísérleteket kell beállítani. Ebben az értelemben az általam alkalmazott megfogalmazás nem volt szerencsés, mert nem alacsonyabb nitrációs érzékenységről, hanem fokozottabb detoxifikálásról lehet szó. A fehérje tirozinnitráció jóslására van lehetőség szoftverekkel (pl. GPS-YNO2, iNitroTyr stb. összefoglalva Kolbert és Lindermayr 2021), de hiperakkumuláló fajokkal kapcsolatban nem találkoztam ilyen bioinformatikai elemzéssel.

Van Hoewyk D, Taskin MB, Yaprak AE, Turgay OC, Ergul A (2018) Profiling of proteasome activity in *Alyssum* species on serpentine soils in Turkey reveals possible insight into nickel tolerance and accumulation. *Plant Physiol Biochem* 24:184-189, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.01.022>

Kolbert Zs, Lindermayr C (2021) Computational prediction of NO-dependent posttranslational modifications in plants: Current status and perspectives. *Plant Physiol Biochem* 167: 851-861.

Kérdések a kísérleti eredményekhez és lehetséges hasznosíthatóságukhoz:

Milyen géntechnológiai módszert lát alkalmasnak az értekezés tudományos eredményeiben szereplő, az elemtöbblet toleranciával kapcsolatos ismeretek alapján haszonnövények elemtűrésének javítására? Ismertek-e ilyen szakirodalmi példák a tolerancia növelésére, és ezek között van-e olyan, amelyeknek gazdasági szempontból jelentősége lehet?

A dolgozatban szereplő eredmények tükrében háromféle megközelítést tartok elképzelhetőnek:

- 1) A gyökérrendszer manupilációja génbevitellel vagy kiütéssel a fokozott oldalgöyökképzés elősegítése céljából egy jó megközelítés lehet arra vonatkozólag, hogy javítsuk a haszonnövények elemtűrését.

Például Wang és mtsi. (2017) CRISPR/Cas9 rendszerrel kiütötték az argináz génjeit (*GhARG*) az A és a D kromoszómákon az allotetraploid gyapot növényben. Ennek következtében fokozódott a genetikailag módosított gyapot oldalgöyökkéfejlődése alacsony és magas nitráttartalmú talajban is. Az argináz az argininből kiinduló NO szintézis kompetitora, ennek megfelelően az argináz mutáns gyapot NO tartalma megemelkedett. A szerzők a NO oldalgöyökkéfejlődésben játszott pozitív szabályozó szerepét feltételezték a fokozott oldalgöyökképzés hátterében.

- 2) A NO jelátvitel módosítása pl. a GSNOR kiütése vagy túltermeltetése révén.

A SIGSNOR túltermeltetése Agrobaktérium-mediált transzformációval paradicsomban fokozott ellenállást okozott az *Alternaria solani* patogén gombával szemben (Rasool és mtsi. 2021). Ugyanakkor a *NtGSNOR1a/1b* kiütése dohányban fokozta az N gén-mediált rezisztenciát a dohánymozaik vírussal szemben, de csökkentette az ellenállóképességet a *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000-el szemben (Li és mtsi. 2021).

Elemtöbbletek esetén kadmiumra (Cd) és vasra (Fe) vannak adatok GSNOR-módosított modellnövényekben. A GSNOR túltermelése (*GSNOR^{OE3}* és *GSNOR^{OE5}*) csökkenést okozott a hajtás és a gyökér Cd tartalmában azáltal, hogy alulszabályozta az IRT transzportert. A transzgenikus növények gyökerében a Cd által okozott toxicitás kisebb mértékű volt, köszönhetően a mérsékelt felvételnek (Guan és mtsi. 2019). A GSNOR knock out *hot5-2* és *hot5-4* Arabidopsis vonalakban az emelt Fe-koncentráció fokozott toxicitást okozott a vad típushoz képest, amiből arra következtethetünk, hogy a GSNOR működése szükséges a nagy vaskoncentrációk eltűréséhez (Li és mtsi. 2019).

Rasool G, Buchholz G, Yasmin T, Shabbir G, Abbasi NA, Malik SI (2021) Overexpression of *SIGSNOR* impairs *in vitro* shoot proliferation and developmental architecture in tomato but confers enhanced disease resistance. *J Plant Physiol* 261: 153433, <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153433>

Li Z-C, Ren Q-W, Guo Y, Ran J, Ren X-T, Wu N-N, Xu H-Y, Liu X and Liu J-Z (2021) Dual roles of GSNOR1 in cell death and immunity in tetraploid *Nicotiana tabacum*. *Front Plant Sci* 12: 596234, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.596234>

Guan MY, Zhu YX, Liu XX, Jin CW (2019) Induction of S-nitrosoglutathione reductase reduces root cadmium uptake by inhibiting Iron-regulated transporter 1. *Plant Soil* 438: 251-262.

Li B, Sun L, Huang J. *et al.* (2019) GSNOR provides plant tolerance to iron toxicity *via* preventing iron-dependent nitrosative and oxidative cytotoxicity. *Nat Commun* 10: 3896, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11892-5>

- 3) Hiperakkumuláló növényekből származó elemtűrésért/felhalmozásért felelős gének kifejeztetése haszonnövényekben.

Egy klasszikus példa ilyen munkára LeDuc és mtsi. (2004) tanulmánya, melyben a hiperakkumuláló *Astragalus bisulcatus*-ból származó, a méregtelenítésben szereplő szelenocisztein-metiltranszferáz (SMT) gént kifejeztették Arabidopsis-ban és *Brassica juncea*-ban Agrobaktérium-mediált transzformációval. Az SMT a szelenocisztein metilációját katalizálja, ezáltal létrehozva a metil-szelenociszteint, ami az aktív metabolizmusból kivonódik, így a szelenociszteinnel ellentétben nem toxikus. A transzgenikus növények fokozott szeléntűrészt mutattak (gyökérmegnyúlást alapul véve határozták meg), és a szelénfelhalmozásuk is jelentősen növekedett a vad típushoz képest különösen szelenit jelenlétében. Annak érdekében, hogy a szelenát fitoremediációját növelni tudják, LeDuc és mtsi. (2006) létrehoztak egy dupla transzgenikus mustár vonalat, ami túlexpresszálja az ATP szulfuriláz (APS) génjét is az SMT mellett. Ezekben a növényekben jelentősen növekedett a szelenát felhalmozási képesség a csak SMT-t túlexpresszáló vonalhoz képest.

LeDuc DL, Tarun AS, Montes-Bayon M. *et al.* (2004) Overexpression of selenocysteine methyltransferase in Arabidopsis and Indian mustard increases selenium tolerance and accumulation. *Plant Physiol* 135: 377-383.

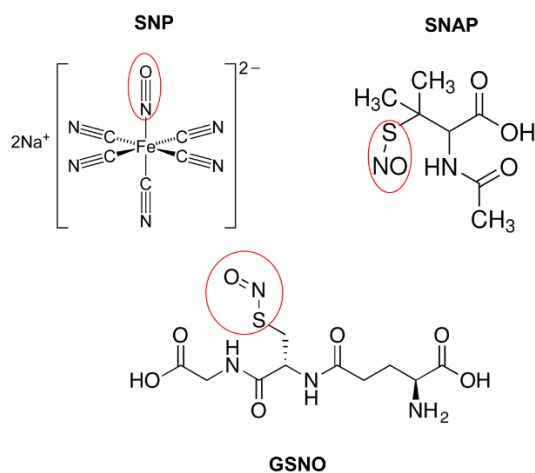
LeDuc DL, AbdelSamie M, Mántes-Bayon M, Wu CP, Reisinger SJ, Terry N (2006) Overexpressing both ATP sulfurylase and selenocysteine methyltransferase enhances selenium phyto remediation traits in Indian mustard. *Environ Pollut* 144: 70-76.

A kísérletek elsősorban csíranövény gyökerek illetve sziklevek élettani és molekuláris jellemzését célozták. A sziklevek (fajfüggő mértékben) tartalékoló szerepet is betöltenek, ezért biokémiai és élettani folyamataikban nem feltétlenül tükrözik a valódi levelek válaszait. Az eredmények között melyek azok, amik legnagyobb biztonsággal megfelelhetnek a kifejlett növény viselkedésének?

A felvetés érdekes, köszönöm. Kísérleteinkben sokszor rövidtávú kezeléseket és csíranövényeket használtunk, annak érdekében, hogy minél egyszerűbb, megfelelően reprodukálható és standardizálható kísérleti rendszert tudjunk felállítani. Vizsgálataink a gyökérrendszerre koncentráltak, de néhány esetben sziklevekben és levelekben is történtek mérések. Nem végeztünk összehasonlító vizsgálatokat sziklevek és a levelek válaszai között, ezért nem tudjuk megmondani, hogy a sziklevekben megfigyelt változások a levelekben jelentkezők-e.

A kísérleti rendszerekben különböző NO donorokat használtak (SNP, SNAP, GSNO). Tapasztaltak-e ezek között bármilyen különbséget, vagy mennyire esetleges volt a kiválasztásuk?

A donorok kiválasztása tudatos volt. A kezdeti kísérleteinkben a nátrium-nitroprusszidot (SNP) használtuk, mert ennek alkalmazása bevett volt a növénybiológiai kutatásokban. A tudományos gondolkodás azonban megváltozott, és egyre többen hívták fel a figyelmet az SNP hidrogén-cianidot felszabadító hatásának eredményeket befolyásoló voltára, valamint arra, hogy a NO felszabadításhoz szükséges megvilágítás nem kívánt módon befolyásolhatja a növényi mintákat (Gupta és mtsi. 2019). Ekkor a *S*-nitrozo-*N*-acetilpenicillamint (SNAP) kezdtük alkalmazni, de szeretnénk volna áttérni egy mesterséges vegyszerről egy természetes NO donorra, a növényi szövetekben megtalálható *S*-nitrozoglutationra (GSNO), ezért legutóbbi vizsgálatainkban ezt a molekulát alkalmaztuk a növényi szövetek NO tartalmának emelésére. Jelenlegi kutatásainkban nano NO donorokat alkalmazunk (pl. kitozánba csomagolt *S*-nitrozoglutation), melyek a hagyományos donorokhoz képest nagyobb stabilitással, kiegyenlítettebb és lokalizált NO felszabadítással rendelkeznek, és alacsonyabb koncentrációban hatásosak (Seabra és mtsi. 2022).



A kísérleteink során alkalmazott NO donor molekulák szerkezete.
Pirossal a NO felszabadulásáért felelős csoportokat jelöltem.

Gupta KJ, Hancock JT, Petrivalsky M, Kolbert Zs *et al.* (2020) Recommendations on terminology and experimental best practice associated with plant nitric oxide research. *New Phytol* 225: 1828-1834.

Seabra AB, Silveira NM, Ribeiro RV *et al.* (2022) Nitric oxide-releasing nanomaterials: from basic research to potential biotechnological applications in agriculture. *New Phytol* 234: 1119-1125.

Néhány további észrevétel...

Köszönöm a hibák jelzését opponensemnek. Legjobb szándékom ellenére sajnos ezek benne maradtak a szövegben. A 38. ábra az APX fehérje mennyiségét mutatja.

Végül még egyszer köszönöm Dr. Papp István megjegyzéseit, érdekes szakmai kérdéseit és kérem eredményeim új tudományos eredményként való elfogadását.

Szeged, 2023. 11. 17.



Ördögné Kolbert Zsuzsanna