

Válasz Dr. Várallyay Éva, az MTA Doktora bírálataira

Köszönöm opponensemnek az értekezésem gondos átnézést, értékes megjegyzéseit, kérdéseit. Kritikai megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

A doktori értekezés a tézisektől függetlenül is életképes kell legyen, ezért nagyon hiányoltam az értekezésből a dolgozat témájával szolgáló szakcikkek felsorolását és az eredmények bemutatásakor, az eredeti szakcikkekre való hivatkozásokat. Az opponens feladata a dolgozat bírálata, függetlenül a tézisektől (a jelölt habitusát egy független fórum méri), az, hogy mely eredmény melyik publikációban került közlésre nagyon fontos információ lett volna.

A saját cikkek felsorolása a dolgozat végén olyannyira megnövelte volna az oldalszámot, hogy az értekezés terjedelme átlépte volna a 150 oldalas limitet, ezért csak a szakmai rész kárára lehetett volna beletenni egy ilyen listát. Megjegyzem, hogy az általam olvasott értekezések nagy részében nincs saját cikklista, az csak a téziszüzetben kerül feltüntetésre. Az eredmények részben hagyományosan nem szokás saját cikkekre hivatkozni -Dr. Papp István ezt hibaként meg is jegyezte egy esetben-, bár a formai követelmények nem is tiltják. Abban igaza van Évának, hogy hasznos lett volna a saját cikkek feltüntetése, de az véleményem szerint formabontó lett volna, én pedig a hagyományos formátumhoz ragaszkodtam.

Az eredmények leírása és értékelése külön fejezetben történt. Mivel az MTA doktori értekezés formátuma nem kötött az eredmények és értékelésük együtt való tárgyalása nagyban megkönnyítette volna a komplex folyamatok megértését.

Ebben a tekintetben is a hagyományos felépítést követtem. Ugyanakkor utólag újraolvasva az értekezést, egyet kell értenem opponensemmel, miszerint megkönnyítette volna az értelmezést az eredmények és értékelésük összevonása.

Az értekezés nyelvezete gördülékeny és precíz, ennek ellenére nagyon nehezen olvasható. Ennek oka valószínűleg az, hogy a bemutatott összetett ábrák felvezetése és eredményeinek leírása általában fél oldalon történt, ami nem teszi lehetővé a részletes leírást. A kutatások kezelése során rengeteg, egymással nem szorosan összefüggő paramétert vizsgált, így nemcsak az eredmények értékelése, hanem sokszor a kísérleti beállítások is igen bonyolultak. A dolgozat tördelésével lehetett volna segíteni az átláthatóságát, de sajnos ez nem sikerült jól, valószínűleg azért nem, mert az értekezés digitális formában került benyújtásra.

Az értekezés három nagy témakör köré csoportosul (a NO-hormon kapcsolat, a NO toleranciafokozó hatása, a NO nitro-oxidatív stresszt kiváltó hatása). Ezekkel minél átfogóbban be szerettem volna mutatni az elmúlt csaknem húsz év kutatásait. Ugyanakkor megértem, hogy a többféle paraméter (többféle növényfaj/genotípus, elem, nevelési körülmény stb.) nehezen olvashatóvá teszik a dolgozatot. Ha most kellene megírnom az értekezést, valószínűleg az egyes témakörök esetén kevesebb kísérleti beállítást mutatnék be.

A kísérletek leírásakor az eredmények részben hiányoltam egy rövid információt a kezelőszerek és a mutánsok, a qRT-PCR-rel vizsgált gének kiválasztásáról (ezek sokszor csak rövidítésként jelennek meg (pl SA, pTCS:GFP, ERS, STR, ACC, AVG, GSNOR, GR24 – melyek feloldása néha a rövidítésjegyzékből is hiányzik), kérdést hagyva az olvasóban, hogy vajon mit csinál ez a kezelőszersz, miért ez a mutáns volt a kontrol, miért ezen gének expresszióját vizsgálták.

Az oldalszámkorlát miatt nem volt lehetőségem indokolni a kezelőszerek, a vizsgált mutánsok és gének kiválasztását. Az anyagok és módszerek fejezetben megadtam, hogy mire használatosak a kezelőszerek és a mutánsokról és a génekről is vezettem táblázatot, igaz azonban, hogy nem az aktuális kísérleteknél írtam ezekről.

Az értekezésben bemutatott eredményekből (1. táblázat) nem derül ki, hogy az alkalmazott koncentrációk melyikénél, és mennyi idő múlva alakult ki SIMV a vizsgált növényekben. A következtetés szerint a SIMV általánosan megjelenő válasz, noha a táblázat szerint ez a SIMV-nek jelölt gyökérnövekedési eltérés a 15 kísérleti felállás közül csak 6-ban volt tipikus.

Az 1. táblázatban az elemek többletének gyökérrendszerre kifejtett hatását foglaltam össze. A táblázat 4. oszlopában az elemkoncentráció és kezelési időtartam van feltüntetve, ami SIMV-et vagy más a kutatás szempontjából lényeges gyökérzetbeli változást okozott. Az alábbi táblázatban pirossal kiemeltem azokat az információkat, amelyek megadják, hogy az alkalmazott koncentrációk melyikénél, és mennyi idő múlva alakult ki SIMV a vizsgált növényekben.

Elem	Növényfaj	Elem-felhalmozási képesség	Az elem koncentrációja, kémiai formája, a kezelés időtartama	Kezelési közeg	Gyökérrendszerre kifejtett hatás
Réz (Cu)	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Col-0	nem akkumuláló	2,5 μM CuSO ₄ , 4 hét	táplódat	SIMV
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Col-0	nem akkumuláló	5 μM CuSO ₄ , 17 nap	táptalaj	SIMV
	<i>Brassica juncea</i> , <i>Brassica napus</i>	akkumuláló	10 μM CuSO ₄ , 7 nap	táplódat	SIMV
Cink (Zn)	<i>Brassica napus</i>	akkumuláló	50 μM ZnSO ₄ , 7 nap	táplódat	SIMV
	<i>Brassica juncea</i>	akkumuláló	50 μM ZnSO ₄ , 7 nap	táplódat	OGY-szám nő, FGY-hossz nem változik
	<i>Brassica juncea</i>	akkumuláló	50, 150, 300 μM ZnSO ₄ , 14 nap	táplódat	OGY-szám nő, FGY-hossz nem változik
Szelén (Se)	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Col-0	nem akkumuláló	10 μM Na ₂ SeO ₃ , 14 nap	táptalaj	SIMV (OGY _{kezd} - és OGY _{kif} -szám nő, FGY-hossz csökken)
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Col-0	nem akkumuláló	15 μM Na ₂ SeO ₃ , 7 nap	táptalaj	SIMV (OGY _{kezd} -szám csökken, OGY _{kif} -szám nő, FGY-hossz csökken)
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Col-0	nem akkumuláló	5 μM Na ₂ SeO ₄ , 14 nap	táptalaj	OGY-szám nő (OGY _{kezd} -szám nő, OGY _{kif} -szám nem változik), FGY-hossz nem változik
	<i>Astragalus bisulcatus</i>	hiperakkumuláló	100 μM Na ₂ SeO ₄ , 14 nap	táptalaj	OGY-szám nő, FGY-hossz nő
Nikkel (Ni)	<i>Astragalus membranaceus</i>	nem akkumuláló	100 μM Na ₂ SeO ₄ , 14 nap	táptalaj	OGY-szám csökken, FGY-hossz csökken
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Col-0	nem akkumuláló	50 μM NiCl ₂ , 7 nap	táptalaj	SIMV (OGY _{kezd} -szám csökken, OGY _{kif} -szám nő, FGY-hossz csökken)
	<i>Odontarrhena lesbiaca</i>	hiperakkumuláló	3000 mg/kg NiCl ₂ , 14 nap	talajos rizotron	FGY-hossz csökken, OGY-szám nem változik vagy csökken

Ólom (Pb)	<i>Arabidopsis thaliana, Col-0</i>	nem akkumuláló	25 μ M, PbNO ₃ , 14 nap	táptalaj	SIMV
	<i>Brassica juncea</i>	akkumuláló	25 μ M, PbNO ₃ , 7 nap	tápoldat	SIMV

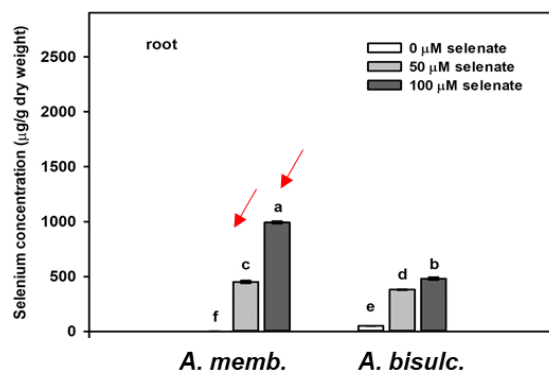
Értelmezésem szerint a SIMV általános jellegének nem követelménye, hogy minden kísérleti beállítás esetén megfigyelhető legyen. A SIMV általános jellegére abból következtettem, hogy többféle elem többlete esetén, többféle növényfajban és nevelési közegben megjelent. A 15 különböző kísérleti beállítás közül valóban nem minden esetben, de azok 60%-ában, összesen 9 esetben jelent meg a SIMV (lásd a táblázatban pirossal kiemelve).

Lehetséges-e, hogy a gyökérnövekedési változások egy más paraméterrel, pl gyökér frisstömeg mérésel jobban jellemezhetőek lennének?

A gyökérnövekedési válaszok vizsgálatára többféle paramétert választhatunk a céltól függően. A gyökérszövet friss tömegét a főgyökér és az oldalgyökerek összessége adja, vagyis ez a paraméter a gyökérnövekedési válaszok összességének vizsgálatára megfelelő lehet, de ezzel nem vizsgálható elkülönítve az oldalgyökérfejlődés. Ha a vizsgálatokkal részleteket szándékozunk feltárni, akkor a fő- és oldalgyökerek fejlődését elkülönítve célszerű tanulmányozni. Továbbá a primordiumok és a fejlett oldalgyökerek elkülönített vizsgálata lehetőséget ad arra, hogy az oldalgyökér-fejlődés egyes szakaszait érintő hatásokat elválasszuk egymástól.

5.2. A különböző szelénérzékenyséű Astragalus fajok főgyökérhossza kezelés nélkül is nagyon különbözik: a toleráns fajt jóval hosszabb. Az érzékeny fajnak viszont nagyon sok az oldalgyökere alapesetben. Lehetséges-e, hogy egy ilyen alapvetően más gyökérstruktúra eltérő mennyiségben képes az elemek felvételére és ezért érzékenyebb a fémiontúlsúlyra?

Érdekes a felvetés, és logikus a következtetés, hogy az elágazóbb gyökérrendszer több elemet képes felvenni, azzal esetlegesen túltelítődni. Az értekezésbe nem került bele, de megmértük az *Astragalus* fajok szelén (Se) koncentrációit a gyökérben is (1. ábra). Az *A. membranaceus* esetében nem volt detektálható mennyiségű Se a kontroll gyökérben, míg az *A. bisulcatus* gyökérében mérhető Se mennyiség volt. Vagyis kontroll körülmények között az eltérő gyökérszerkezet nem vezet több Se felvételéhez az *A. membranaceus*-ban. Külső Se terhelés esetén azonban az *A. membranaceus* gyökérében több Se halmozódott fel, mint az *A. bisulcatus*-ban (piros nyilakkal jelölve az 1. ábrán), aminek magyarázata lehet a bíráló által említett gyökérszerkezetbeli különbség. Egyéb mikroelemek esetén (Fe, Zn, Cu, B, Mn, Mo) nem tapasztaltunk hasonló eltérést a fajok között.



1. ábra Szelénkoncentráció a 0 (kontroll), 50 vagy 100 μ M nátrium-szelenáttal kezelt 14 napos *A. membranaceus* and *A. bisulcatus* gyökérében. A statisztikailag szignifikáns különbségeket különböző betűk jelzik a Duncan teszt alapján ($n = 3$, $P \leq 0.05$). (Kolbert és mtsi. 2018 PCP, módosítva).

Ismert-e annak az oka, hogy vajon miért képesek a Lesbos szigetén élő Odontarrhena fajok ilyen mértékű nikkelfelhalmozásra? És vajon mi lehet a magyarázat arra, hogy a nikkellekezelés a hajtásban kb 5-szörös, míg a gyökérben akár 40x-es nikkellkoncentráció különbséget okozott a kontrollhoz képest? Érdekes lett volna egy nikkelfelhalmozásra nem képes Odontarrhena faj kezelésre mutatott válaszát is tanulmányozni – bár nem tudom, hogy van-e ilyen?

Feltételezhető, hogy az elemek nagy mennyiségben történő felhalmozása egy ökológiailag előnyös képesség. Arra, hogy ez az előny miben áll, néhány hipotézis született az elmúlt évtizedekben. Az „elem allelopátia-hipotézis” szerint az évelő hiperakkumuláló növények magas fémtartalmú avar előállításával gazdagítják a lombkorona alatti felszíni talajt, hogy megakadályozzák a kevésbé fémtűrő fajok megtelepedését. Ennek a hipotézisnek a kísérletes tesztelése nem történt meg. Egy másik elképzelés szerint a felhalmozott fémek segítik a hiperakkumuláló fajokat a szárazság eltűrésében („szárazság tűrés-hipotézis”), bár kísérletesen nem tudták igazolni ezt a teóriát. A „védekezési-hipotézis” szerint a toxikus fémek felhalmozása a növények föld feletti részeiben védelmet biztosít a növényevő rovarok, csigák, és kórokozó gombák, baktériumok ellen. Ezt az elképzelést számos esetben sikerült kísérletesen igazolni Ni esetén is olyan hiperakkumuláló fajokkal, mint *Senecio coronatus* (Asteraceae), *Thlaspi montanum var. montanum* (Brassicaceae) és *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae) (Boyd 2004). A nikkelle hiperakkumuláló fajok tűrés mechanizmusának alapja a nagymennyiségű felvett nikkelle elkülönítése az aktív metabolizmustól. Az *Odontarrhena* fajok levelei sűrűn borítottak csillagszőrökkel, melyekben a nikkelle raktározódik (Broadhurst és mtsi. 2004). A nikkelle citráttal, maláttal komplexben a vakuólumokban is elkülönül, és a hiperakkumuláló fokozott reaktív oxigénformákat semlegesítő képessége szintén hozzájárul a nagyfokú elemtűrésükhöz (Van der Pas és Ingle 2019).

Ahogy opponensem megjegyzi, a nikkellekezelés a hajtásban kb. 5-szörös, míg a gyökérben csaknem 40-szeres nikkellkoncentráció különbséget okozott a kontrollhoz képest. A nikkellekezelés a talajban történt, vagyis a nikkellefelvétel a gyökéren keresztül valósult meg. Ezért a nikkelle gyökérzetben való nagymértékű felhalmozódásának oka az lehet, hogy csak egy része transzlokálódott pl. hisztidin komplexek formájában a hajtásba, nagyrésze a gyökérben megkötődött. A kétértékű nikkelle-kationok megkötése lehetséges a sejtfali poligalakturonsavak és a hidroxifahéjsavak karboxil-csoportjain (Meychik és mtsi. 2014).

Az *Odontarrhena* (korábban *Alyssum*, Brassicaceae) nemzetség 62 hiperakkumuláló taxont foglal magában, melyek közül 48 Ni hiperakkumuláló (Reeves és mtsi. 2021). Ebből következően vannak a nemzetségnek olyan tagjai, amik nem hiperakkumuláló, például az *Alyssum montanum* és a *Thlaspi arvense* (Rosatto és mtsi. 2021). A görög együttműködő partnerünk vizsgálatainak középpontjában a hiperakkumuláló fajok ökotípusai állnak, így ő ezeket tudta rendelkezésünkre bocsájtani. De valóban érdekes lett volna egy hiperakkumuláló-nem akkumuláló összehasonlító rendszerben dolgozni, hasonlóan az *Astragalus*-fajokon végzett munkánkhoz.

Opponensem következő megjegyzése szerint hasonlóan a nikkelle hiperakkumuláló fajhoz, a Brassica fajokban történt cink nanopartikulummal végzett kísérleteinkben is a gyökérben történt felhalmozás. Kérdése, hogy lehet-e hasonló mechanizmus a magyarázat a két látszólag független esetben?

A cink nanopartikulumok esetén is a gyökér volt az a szerv, ami közvetlenül érintkezett a kezelőanyaggal, vagyis a felvétel itt történt. Az értekezésben nem szerepel, de részletesen megvizsgáltuk a gyökérsejtfali módosulásokat a 40 nm-es ZnO NP-ok hatására (Molnár és mtsi. 2020). A gyökerekben jelentős sejtfalösszetétel-beli változásokat indukált a ZnO NP-ok jelenléte, hiszen a pektin-, lignin/szuberin- és kallózsintek növekedtek. A pektin és a lignin/szuberin tartalom növekedését összefüggésbe tudtuk hozni a sejtfalakban detektált nanorészecskékkel, ami arra utal, hogy a pektin részt vesz a nanorészecskéből felszabaduló kétértékű cinkion megkötésében, a lignin/szuberin tartalom pedig a nanorészecskék sejtfalban való immobilizálását okozhatta. Összegezve tehát, a cink és a nikkelle kétértékű fémkationokként feltételezhetően hasonlóképpen működik, és a gyökérben való nagymértékű felhalmozódásuk oka lehet a sejtfali megkötésük.

Broadhurst CL, Chaney RL, Angle JS, Mangel TK, Erbe EF, Murphy CA (2004) Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes. *Environ Sci Technol* 38: 5797-5802.

Van der Pas L, Ingle RA (2019) Towards an understanding of the molecular basis of nickel hyperaccumulation in plants. *Plants* 8: 11, <https://doi.org/10.3390/plants8010011>

Rosatto S, Mariotti M, Romeo S, Roccotiello E (2021) root and shoot response to nickel in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator species. *Plants (Basel)* 10: 508, <https://doi.org/10.3390/plants10030508>

Molnár Á, Rónavári A, Béltéky P és mtsi. (2020) ZnO nanoparticles induce cell wall remodeling and modify ROS/ RNS signalling in roots of *Brassica* seedlings. *Ecotox Environ Saf* 206: 111158, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111158>

5.3.1. A rézterhelt lúdfűben vizsgált auxin és NO tartalom vizsgálatánál az auxin kimutatása a gyökércsúcsban történt, míg az NO-t a gyökér elongációs és merisztematikus zónájában vizsgálták. Változást azonban csak az elongációs zónában detektáltak. Vajon ebben az esetben tényleg van összefüggés az NO szint változás és az auxin szint között?

A NO és az auxin is mobilis jelek, ezért véleményem szerint az eltérő szöveti lokalizáció nem akadály a két molekula közötti kapcsolat lehetőségének. A NO gázhalmazállapota és töltés nélküli jellege miatt könnyedén diffundál a sejtek között és a citoplazmában is (itt valamivel lassabb). A NO auxin szintre gyakorolt hatása elsősorban a PIN-FORMED 1 (PIN1) efflux karrieren keresztül valósul meg. A NO megnövelt szintje a PIN1 expressziót nem, a fehérjemennyiséget viszont proteaszóma-független módon csökkentette. Ebből az következik, hogy a NO a PIN1 mennyiségét csökkenti, de nem proteaszómális lebontás révén (Fernández-Marcos és mtsi. 2011). A PIN1 a merisztémán kívül a megnyúlási zóna merisztémához közeli részén is kifejeződik (Omelyanchuk és mtsi. 2016), és feltételezhető, hogy a NO az itt található PIN1-eloszlásban okoz változást, ami kihat az auxin gyökércsúcsba irányuló transzportjára, a változás pedig a gyökércsúcsi auxinszintben jelentkezik. Új eredményeink szerint az exogén NO adagolására megfigyelhető gyökérrövidülés hátterében a ROP2 GTPáz NO általi S-nitrozilációja áll, ami szükséges a PIN1 és a lokális auxin maximum csökkenéséhez és így a főgyökér-rövidüléshez (Kénesi, Kolbert és mtsi. 2023).

Fernández-Marcos M, Sanz L, Lewis DR, Muday GK, Lorenzo O (2011) Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *PNAS* 108: 18506-18511.

Omelyanchuk N, Kovrizhnykh V, Oshchepkova E. és mtsi. (2016) A detailed expression map of the PIN1 auxin transporter in *Arabidopsis thaliana* root. *BMC Plant Biol* 16: 5, <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0685-0>

Kénesi E, Kolbert Zs, Kaszler N. és mtsi. (2023) The ROP2 GTPase participates in nitric oxide (NO)-induced root shortening in *Arabidopsis*. *Plants (Basel)* 12: 750, <https://doi.org/10.3390/plants12040750>

Az eredmények értékelésében szerepel, hogy az Arabidopsisban a kadmium és az arzén is SIMV-et okozott, hivatkozva a saját eredményeket (de a hivatkozás egy összefoglaló cikkre utal). Ez esetben fontos lett volna az eredeti kísérleti eredményeket bemutató munkára utalni, vagy ezen kísérleti eredményeket is beleszúrni a dolgozatba.

Az opponensem felvetése jogos, az eredeti, kutatási cikkekre kellett volna hivatkozni, mert akkor kiderül, hogy ezek az eredmények nem saját munkáinkból származnak. A hivatkozásokat itt megadom:

Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trend Plant Sci* 12: 98-105.

Hu YF, Zhou G, Na XF és mtsi. (2013) Cadmium interferes with maintenance of auxin homeostasis in *Arabidopsis* seedlings *J Plant Physiol* 170: 965-975.

Vitti A, Nuzzaci M, Scopa A és mtsi. Auxin and cytokinin metabolism and root morphological modifications in *Arabidopsis thaliana* seedlings infected with cucumber mosaic virus (CMV) or exposed to cadmium. *Int J Mol Sci* 14: 6889-6902.

Sofó A, Vitti A, Nuzzaci M és mtsi. (2013) Correlation between hormonal homeostasis and morphogenic responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings growing in a Cd/Cu/Zn multi-pollution context. *Physiol Plant* 149: 487-498.

Li P, Zhao C, Zhang Y és mtsi. (2016) Calcium alleviates cadmium-induced inhibition on root growth by maintaining auxin homeostasis in *Arabidopsis* seedlings. *Protoplasma* 253: 185-200.

A. Krishnamurthy, B. Rathinasabapathi (2013) Auxin and its transport play a role in plant tolerance to arsenite-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 36: 1838-1849.

Annak a következtetésnek a helyessége, hogy az elemtöbblet SIMV kialakító hatása csak alacsony elemkoncentrációnál, hosszú idő alatt jelenik meg, a bemutatott eredmények alapján nem vizsgálható, hiszen a bemutatott és hivatkozott táblázat csak a kísérleti felállásokat tartalmazza, a SIMV megjelenésnek idejére nincs benne adat. A táblázat szerint a kezelések általában egy koncentrációban történtek, ami alapján nem tudom mennyire helyes a SIMV megjelenésének koncentrációjára való következtetést levonni.

Az elemkezeléseket minden esetben több koncentrációban végeztük el. Itt egy táblázatban összegyűjtöttem, hogy az egyes kísérleti rendszerekben milyen elem dózisokat alkalmaztunk. Az értekezés 1. táblázat 4. oszlopában csak azt az időtartamot és koncentrációt tüntettem fel, ami SIMV-et vagy jellegzetes gyökérszövetbeli változást okozott (lásd kiemelve pirossal egy előző válasznál). Az, hogy „hosszabb idő alatt jelenik meg” a SIMV úgy értettem, hogy a gyökérrendszerbeli változások megjelenéséhez nem egy-két napos, hanem több napos/hetes időtartamú kezelésre van szükség. De ez valóban egy pontatlan megfogalmazás, aminek alátámasztására nem mutatok be adatot, valamint evidencia is.

Növényfaj-elem	Alkalmazott koncentrációk	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i> -Cu	1; 2,5; 5 μ M	Tugyi és mtsi. 2013
<i>Brassica juncea/napus</i> -Cu	10; 25; 50 μ M	Feigl és mtsi. 2013
<i>Brassica juncea/napus</i> -Zn	50; 150; 300 μ M	Feigl és mtsi. 2015
<i>Arabidopsis thaliana</i> -Se	5; 10; 15; 20 μ M	nem közölt
<i>Arabidopsis thaliana</i> -Ni	25; 50; 75; 100 μ M	Kolbert, Oláh és mtsai. 2020
<i>Arabidopsis thaliana/Brassica juncea</i> -Pb	10; 25; 50 μ M	Kolbert 2016

5.3.2. Szelénterhelt lúdfűben vizsgálták az auxin, etilén és citokininek felhalmozódását. A 11. ábrán bemutatott eredmények alapján a citokinin koncentráció a WT növényben is nő 2-7 nap között, és a 10 (vagy 20 ν M – az ábrafelirat és aláírás nem egyértelmű) szelén hatása nem tűnik gátlónak ebben az esetben. Ha jól értem az auxinnal és az etilénnel szemben (ahol hormonérzékenyen mutánsokat vizsgáltak), a citokininek vizsgálatakor, túltermelő növényben vizsgálták az NO szintet – és kaptak ellentétes eredményt. Nem lehet, hogy azért nőtt a vizsgált növényben az NO szint, mert a mutánsban nem csökkent, hanem nőtt a fitohormon szintje?

Elnézést kérek az elírásért, a 11. ábrán 0, 10 és 40 μ M Se kezelések hatása látható. A 7. napon a Se hatása valóban nem volt gátló a kontroll *ARR5:GUS* aktivitásához képest. A citokinin túltermelő *ipt-161* vonalban a Se nem okozott NO szint csökkenést, másszóval a vonal magas citokininszintje megakadályozta a NO szint Se általi csökkenését (12. ábra). Habár a szövegben úgy szerepel, hogy „a citokinitúltermelő *ipt-161* lúdfű gyökércsúcsában a NO-szint emelkedett a szelénkezelés hatására”, ez a kijelentés helyesbítésre szorul. Az *ipt-161* vonalban Se kezelés hatására nem nőtt szignifikánsan a NO szint, inkább azt mondhatjuk, hogy nem változott a kontrollhoz képest.

A NO szint mind a vad, mind a nitrát reduktáz mutáns növények esetében is csökkent (12, 15/A,B ábrák) a szelénkoncentráció növekedésével (párhuzamosan a citokinin túltermeléssel (13. ábra), de nőtt a citokinin túltermelő mutánsban (12. ábra). Nem ellentmondás ez?

A Se csökkentette a NO szintet a vad típusban citokininszint növekedés mellett, de a magas citokininszint az *ipt-161*-ben megakadályozta az NO szint csökkenését. Ez valóban ellentmondásnak

tűnik. Bár a mutánsal igazolni akartuk a vad típusban megfigyelt kapcsolatot, ez nem igazolódott. Pontosabb magyarázatot a jelentéségre akkor tudnánk adni, ha megvizsgálnánk a citokininszinteket, -metabolizmust, -formákat a szelenitterhelt *ipt-161*-ben, hiszen elképzelhető, hogy a citokinin endogén metabolizmusának változásai állnak a látszólagos ellentmondás hátterében.

A szelenitkezelés hatására megnőtt az etilénkoncentráció a gyökérben, párhuzamosan az NO csökkenéssel, noha ezt a két eredményt két különböző kísérletben vizsgálták – nem azonos (10,20vM, illetve 15vM szelenit koncentrációnál), Nem lehetett volna ugyanazon kezelésnél (ami a 17.ábrán van bemutatva) meghatározni az NO szintet is, így közvetlenül összekapcsolni az etilénkoncentrációt, az NO tartalommal és az oldalgöyéképképződéssel?

A 11.-12. ábrán bemutatott eredmények voltak az elsők, amik rámutattak a Se-indukált hormonális változásokra az *Arabidopsis* gyökérben. Erre alapozva folytattuk a részletesebb vizsgálatokat a Se-citokinin-NO és a Se-etilén-NO rendszerekben. Ezekhez a részletesebb vizsgálatokhoz új kísérleti rendszereket állítottunk fel, melyekben a Se kezelés időtartama és koncentrációja eltérő volt. A változtatás oka praktikus volt, és azt a célt szolgálta, hogy a részletesebb vizsgálatokból kapott eredményeket közölni tudjuk az előzőekben publikáltakkal minimális átfedésben.

Az etilén hatásmechanizmusát illetően levont következtetés szerint az etilén az auxinnal való szabályozó kölcsönhatása révén gátolja az oldalgöyéképképződést. Mire alapozza ezt a következtetést?

Az etilén-auxin kapcsolatra vonatkozó első publikációk 2008-ban jelentek meg, ahol megfigyelték, hogy az etilén emelt koncentrációja gátolja az oldalgöyéké-képzést, és ez a hatás legalább részben az etilén-stimulált auxin bioszintézistől és az Aux/IAA és ARF fehérjék működésétől függ (Ivachenko és mtsi. 2008). Ugyanebben az esztendőben Negi és mtsi. (2008) felismerték, hogy az etilén a poláris auxin transzport, különösen az AUX1 fehérje módosítása révén szabályozza az oldalgöyéké-képzést. Még később Lewis és mtsi. (2011) kimutatták, hogy a *PIN3* és *PIN7* expresszióját aktiválva az etilén fokozza az auxintranszportot, megakadályozza a lokális auxin maximum kialakulását és gátolja az oldalgöyéké-képződést. A legújabb eredmények szerint (Zhao és mtsi. 2023) az etilén válasz faktor (ERF1) az oldalgöyéké-kejlődés negatív szabályozója, mert a *PIN1* és *AUX1* indukciója révén fokozza az auxin transzportját, transzkripcionálisan represszálja az *ARF7*-et és alulszabályozza a „sejtfal remodelling” géneket az oldalgöyéké-kejlődés során.

Ivachenko MG, Muday GK, Dubrovsky JG (2008) Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 55: 335-347.

Negi S, Ivachenko MG, Muday GK (2008) Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 55: 175-187.

Lewis DR, Negi S, Sukumar P, Muday GK (2011) Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development* 138: 3485-3495.

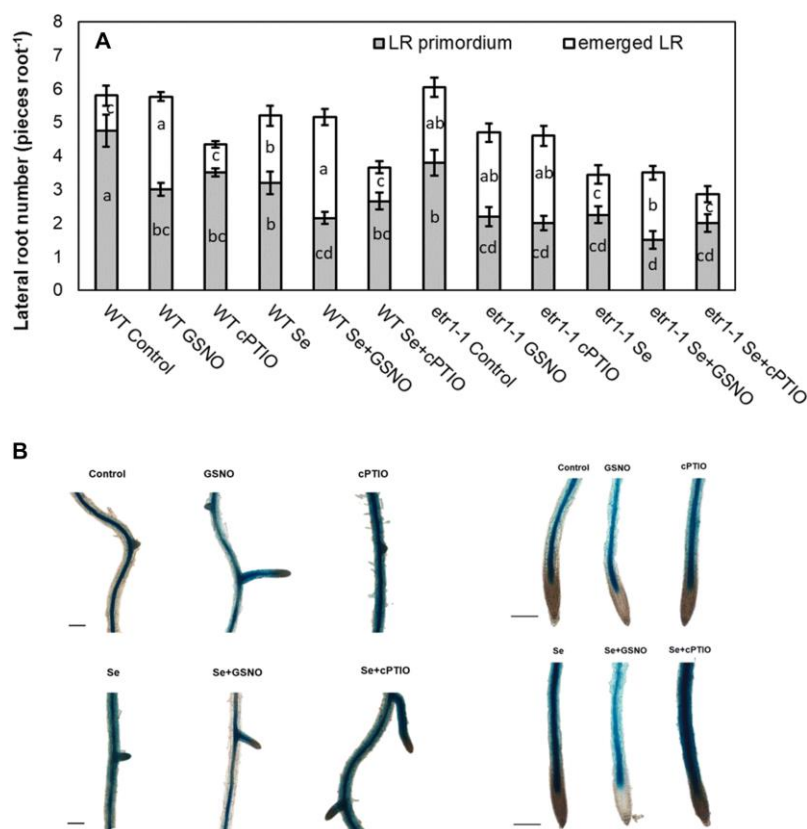
Zhao P, Zhang J, Chen S és mtsi. (2023) ERF1 inhibits lateral root emergence by promoting local auxin accumulation and repressing ARF7 expression. *Cell Rep* 42: 112565, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112565>

*A szelenitkezelés oldalgöyékérszámra való hatásánál arra a következtetésre jut, hogy az NO szint növelése fokozta az oldalgöyékerek számát mind a wt, mind az *etr1-1* mutáns növényben. A 20. ábrán bemutatott eredmények alapján a növényekben minden kezelés hatására (akár NO szint növekedést, akár csökkenést indukálta) csökkent ez a szám. Lehetséges, hogy én nem értem jól, esetleg kaphatnék ehhez magyarázatot?*

A 20. ábra esetén az volt a megállapításom, hogy a GSNO kezelés növelte a kifejlett oldalgöyékerek számát a vad típusban és az *etr-1-1*-ben is. A mondatba nem fogalmaztam bele, hogy a csak szelénnel kezelt növényekhez képest nőtt a kifejlett oldalgöyékérszám GSNO hozzáadására, ezért nem volt világos a következtetés. Elnézést a pontatlan megfogalmazásért.

Az etilénnel kapcsolatos kísérletek során az NO szintet is alternálták, de csak a szelénkezeléssel együtt. Nem végeztek esetleg kísérleteket, melyben csak az NO szintet alternálták farmakológiai szerekekkel, hogy megfigyeljék az milyen hatással van a gyökérféjlesztésre?

A GSNO és cPTIO kezeléseket szelén nélkül is alkalmaztuk, és az eredményeket közöltük (Feigl és mtsi. 2019). A vad típusban a GSNO és a cPTIO hatása ellentétes volt a kifejlett oldalgyökérszám tekintetében, míg az etilénjelátvitel hibás növényben a NO szint módosítása nem volt hatással az oldalgyökérféjlesztésre. Ez arra utal, hogy működő etilénjelátvitel szükséges a NO oldalgyökérféjlesztésre kifejtett hatásához egészséges növényben. A GSNO csökkentette az etilénszintet, a cPTIO növelte, ami antagonistá kapcsolatot feltételez a NO és az etilén között a gyökérben stresszmentes körülmények között (2. ábra). Az értekezésbe egy egyszerűsített ábrát készítettem, melyen csak az NO-szint módosítás szelén jelenlétében kifejtett hatását mutattam be. Erre azért volt szükség, hogy az olvasó figyelmét a fő következtetést alátámasztó adatokra irányítsam.



2. ábra (A) Oldalgyökér-kezdemények és kifejlett oldalgyökerek száma 7 napos vad típusú és *etr1-1* mutáns *Arabidopsis thaliana*-ban. A különböző betűk a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a Duncan-teszt alapján ($P \leq 0,05$, $n=20$). (B) X-Gluc jelölt ACS8::GUS/GFP *A. thaliana* oldal- és főgyökereiről készített mikroszkópos felvételek. A kezelési koncentrációk az előzőeknek megfelelőek voltak. Mércék= 500 μm. (Feigl és mtsi. 2019).

Feigl G, Horváth E, Molnár Á. és mtsi. (2019) Ethylene-nitric oxide interplay during selenium-induced lateral root emergence in *Arabidopsis*. *J Plant Growth Regul* 38: 1481–1488.

5.3.3. *A strigolaktonok vizsgálatakor a GSNOR enzim aktivitásában csökkenést mutattak ki, köszönhetően a csökkent fehérjeexpresszióknak. A génexpresszió változását is megvizsgálták, de nem találtak különbséget. Szerintem a bemutatott ábrán látszik génexpresszió csökkenés mindkét gén esetében, ami a Max2-1 esetében kifejezettebb. Ez a változás nem elegendő a csökkenő fehérjemennyiség és aktivitás magyarázatára?*

A *GSNOR1* expresszió a *max1-1* esetén nem különbözött szignifikánsan a vad típus értékétől. A *max2-1* esetében a kapott csökkenés statisztikailag szignifikáns volt. De véleményem szerint csak a statisztikát nem lehet alapul venni a PCR adatok tekintetében, mert megbízható statisztikai kezelést

nehéz létrehozni. A normalizálás előtti nyers adatok ismeretében a kisebb különbségeket nem tekintettük szignifikánsan különbözőnek.

5.4.3. A cinkkezelés és az NO kapcsolatának vizsgálatakor a GSNOR1 túltermelő növényekben változatlan transzkripció mellett detektáltak emelkedett fehérjeexpressziót, de az enzim aktivitása cink jelenlétében nagyon szignifikánsan csökkent. Utóbbira azt a magyarázatot kapjuk, hogy ennek oka a megemelkedett H₂O₂ enzimaktivitást gátló hatása, ami glutation hozzáadásával csökkenthető volt. A bemutatott ábrán (36.ábra) azonban én úgy látom, hogy a H₂O₂ szint a kontrollhoz képest minden esetben nőtt. Hogyan kell elképzelnünk ezt a szabályzást?

Mivel cink hatására nem csökkent a GSNOR fehérjemennyiség, de csökkent az aktivitás, a gátlás hátterében poszttranszlációs szintű szabályozást sejtettünk. Ismert volt, hogy a hidrogén-peroxid gátolja a GSNOR-aktivitást azáltal, hogy a fehérjében oxidálja a katalitikus cinket koordináló ciszteineket (Cys 47 és Cys177), ami ezáltal cinkfelszabaduláshoz és gátolt aktivitáshoz vezet (Kovács és mtsi. 2016). A 36. ábra A részében a cink H₂O₂ szintet növelő hatását igazoltuk mindkét vonalban. Az ábra C részén mutatom be, hogy a cink jelenlétében fokozódó H₂O₂ szintet glutation adásával kontrollszintre mérsékeljük mindkét vonalban. A H₂O₂ képződés mérséklése azt eredményezte, hogy a cinktöbblet által csökkentett GSNOR aktivitás kontroll-szerűre állt vissza vagy szignifikánsan megnőtt. (36. ábra D). Ebből azt a következtetést vontam le, hogy a cink-indukált H₂O₂ képződés szükséges a GSNOR-aktivitás csökkenéséhez, vagyis a Kovács és mtsi. (2016) által leírt poszttranszlációs szabályozás működhet a cinktöbblet esetén.

Kovács I, Holzmeister C, Wirtz M és mtsi. (2016) ROS-mediated inhibition of s-nitrosoglutathione reductase contributes to the activation of anti-oxidative mechanisms. *Front Plant Sci* 10: 1669, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01669>

5.5.1. A fehérjék S-nitrozilációjának kimutatása egy új módszerrel RSNO-RAC technikával történt. A leírásból nem egyértelmű számomra, hogy a tömegspektrometria a gélből tisztított mintákon, vagy az egész csíranövényből affinitáskromatográfiával tisztított fehérjéken történt. Kaphatnék erről egy kis magyarázatot? A módszer alapján azonosított APX fehérje mennyiségét is vizsgálták, de a hivatkozott ábra aláírásában (38.ábra) GSNOR szerepel és a használt ellenanyag sincs feltüntetve, így csak sejtetheti az ember, hogy elírás történt. A bemutatott eredmények alapján azonban a leírt következtetés nem érthető.

Az RSNO-RAC esetén a tömegspektrometriás azonosítás gélből tisztított mintákon történt. A tisztítást és a tömegspektrometriás analízist a müncheni Helmholtz Centrum metabolomikai és proteomikai laboratóriumának (Core Facility Metabolomics and Proteomics) munkatársai végezték. A 38. ábra az APX fehérje mennyiséget mutatja, elnézést a félrevezető elírásért. Az APX fehérjemennyiséggel kapcsolatban azt a következtetést vontam le, hogy a vad típusban és a *gsnor1-3*-ban csökkent a cink hatására, a GSNOR túltermelő vonalban pedig kisebb mértékben változott. A bemutatott denzitásértékek alapján valóban nem egyértelmű, hogy mire gondoltam. A vad típusú és a *gsnor1-3* vonalak esetén mindhárom detektált APX sáv denzitását csökkentette a cinkkezelés, míg a GSNOR-túltermelő esetén egy sáv denzitása nőtt, egyé nem változott, egyé pedig csökkent. Erre alapozva jelentettem ki, hogy kisebb mértékben változott az APX mennyiség a GSNOR-túltermelő vonalban.

A fehérjégeleken mutatott nitrozilációs szignál jelek nem tűnnek túl szignifikánsnak. Mennyire megbízható ez a módszer?

Az RSNO-RAC (resin-assisted capture of SNO proteins) módszer a biotin switch eljárásához hasonló. Ez utóbbi elve az, hogy a mintában lévő szabad SH-csoportok blokkolását követően az SNO-csoportokat aszkorbát hozzáadásával redukáljuk, majd ezeket az újonnan képződő SH-csoportokat jelöljük biotin-HPDP-vel. A detektálás anti-biotinnal történik. Az RSNO-RAC első két lépése hasonló a biotin switch-éhez, de biotin-HPDP helyett agaróz-kötött aktivált diszulfidot használ, ami megköti az SH-csoportokat. A módszer verifikálása céljából a növényi fehérjekivonatot GSNO-val kezeltük aszkorbát

jelenlétében, és itt az *S*-nitrozilált fehérjék feldúsulását/intenzív nitrozilációs szignált tudtuk detektálni. A GSNO kezelés aszkorbát hozzáadása nélkül sokkal csekélyebb nitrozilációs jelet eredményezett. Ezek a kontrollok igazolják, hogy a RSNO-RAC módszer alkalmas növényi minták esetén a *S*-nitroziláció kimutatására. Az, hogy a cinkkezelt mintában a nitrozilációs jel a kontrollhoz képest enyhén fokozódik csupán, annak lehet a következménye, hogy az alkalmazott cinkkezelés mértéke ($250 \mu\text{M ZnSO}_4$) enyhe volt; ezt mutatja a csíranövény friss tömegek enyhe, statisztikailag nem szignifikáns csökkenése (Kolbert és mtsi. 2019).

Kolbert Zs, Molnár Á, Oláh D és mtsi. (2019) *S*-nitrosothiol signaling is involved in regulating hydrogen peroxide metabolism of zinc-stressed Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 60: 2449–2463.

5.5.1.3. A cink-oxid nanopartikulummal végzett vizsgálataikat két Brassica fajban végezték, melyek cinkérzékenysége a bemutatott adatok alapján nem egyértelmű. A 83.oldalon az szerepel, hogy a B. juncea cinktürelést mutatott, míg a B. napus nem, de a hivatkozott 1.táblázatban mindkét faj akkumulálónak van feltüntetve. Mivel a két faj több kísérleti beállításra eltérően reagált fontos lenne tudni, hogy vajon mi alapján lettek kiválasztva?

A *B. juncea* relatív cinktürelő; erre az utal, hogy az életképességvesztése cink jelenlétében minimális és a főgyökérmegnyúlása nem gátódik. A *B. napus* relatív cinkérzékenysége az utal, hogy a cink növekvő koncentrációi főgyökérrövidülést és életképességvesztést okoztak. A Brassica nemzetség több fajáról, így a *Brassica juncea*-ról és a *Brassica napus*-ról is ismert, hogy képesek fémakkumulációra (Mourato és mtsi. 2015), ezért tüntettem fel ezeket akkumulálóként az 1. táblázatban. A lúdfüvel egy családba tartozó repce (*Brassica napus*) egy fontos gazdasági növényünk, vizsgálata ezért volt fontos. A *Brassica juncea*, mint kísérleti objektum kiválasztását a fakultatív metallofita jellege indokolta, ami azt jelenti, hogy jól tűri többféle fémion jelenlétét. Az eltérő cinkérzékenységük miatt választottuk a két faj összehasonlítását a cink nanorészecske hatásainak tanulmányozásához is.

Mourato MP, Moreira IN, Leitão I, Pinto FR, Sales JR, Martins LL (2015) Effect of heavy metals in plants of the genus Brassica. *Int J Mol Sci* 16: 17975–17998.

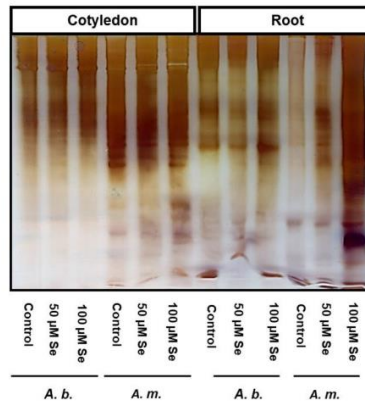
Ugyanezen kísérleteknél a SOD enzim aktivitásának változásakor magas koncentrációnál szignifikáns növekedést írnak le, noha ez a bemutatott ábrán 46./D nem igazán látszik, ahogy a 25mn/L koncentrációnál történő aktivitás csökkenés sem. Mi az, ami a szignifikáns növekedésre utal?

A 46. D ábra esetén véleményem szerint az adatok értelmezése és azok megfogalmazása helyes. A 25 mg/L ZnO NP által okozott SOD aktivitás csökkenés mindkét fajban statisztikailag szignifikáns volt. A 100 mg/L ZnO NP által kiváltott SOD aktivitás növekedés pedig csak a *B. juncea* esetén volt szignifikáns.

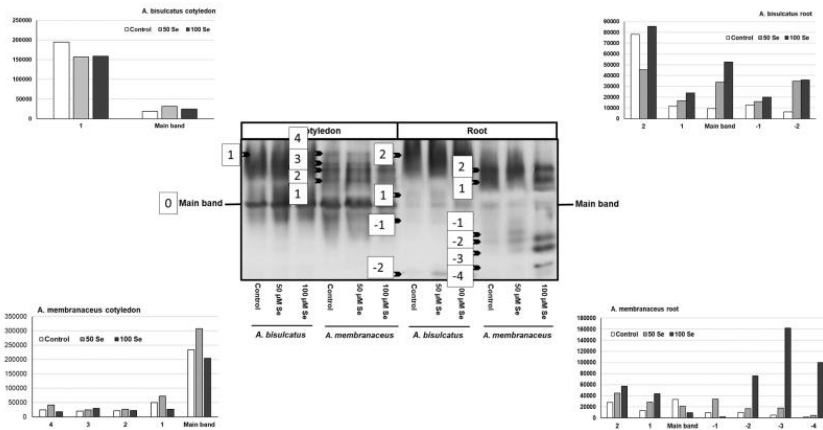
A natív gélek aktivitásfestése mennyire megbízható módszer? A bemutatott eredmények egy részénél szerepel aktin „loading” bemutatása, de ez hiányzik pl a 46. és 54/D és G ábránál. A többi helyen sokszor az aktin mennyisége szemmel láthatóan nem egyenletes, ami nem gond, de ilyenkor egy képanalizáló sofverrel végzett összehasonlítás alapján készült normalizált értékeket bemutató oszlopdiagram az, ami alapján eldönthető az aktivitásban történt változás. Ez szabad szemmel nagyon nehezen látható. Nem készültek ezekhez a gélekhez ilyen elemzések?

A natív gélek aktivitásfestése esetén a proteinkivonatokat ezüstfestését szoktuk „loading” kontrollként elvégezni. Az aktivitás sávok denzitását GelQuant szoftverrel számszerűsítjük. Ezeket a kontrollméréseket a publikációink „Supplementary material” anyagai között szoktuk közzétenni általában, de nem minden esetben.

Például az 54. D ábra esetén ezüstfestett natív gélt állítottunk elő kontrollként (Suppl Fig 2), és a NADPH-oxidáz aktivitásgélen GelQuant-tal mértük a sávok denzitását (Suppl Fig 3).

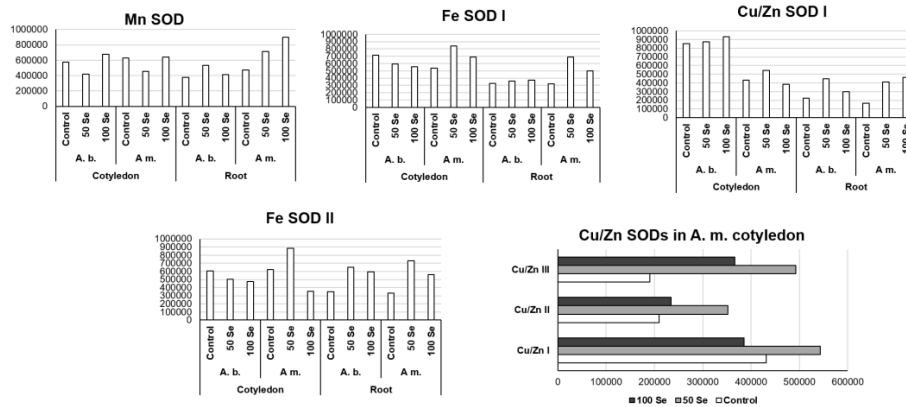


Suppl Fig 2 Silver-stained native (10%) gel as a control for NADPH oxidase activity gel. The gel shows a good run-off, and major protein bands do not show any greater decomposition in the protein extract. It has to be noted; however, that in 100 µM Se-treated *A. membranaceus* root, the formation of selenoproteins may trigger protein turnover.



Suppl Fig 3 Quantification of NADPH oxidase in gel activities using Gelquant software. Because of the several isoforms the position of “the main band” was determined as “0”. The isoforms which are slower compared to the main band are labelled with positive numbers, while the faster isoforms are indicated with negative numbers in order to indicate their position within the gel. The obtained intensities are depicted in graphs.

Az 54. ábra G esetén GelQuant-tal mértük a sávok denzitását (Suppl Fig 4).



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.

Ilyen „loadig” bemutatásra kerül a 49.ábrán a GSNO enzimaktivitás natív gélben való vizsgálatakor. Ezen az ábrán szerencsésebb lett volna a „Natív PAGE” helyett a szubsztrátot, a „western blot” helyett a használt ellenanyagot (vagy a kimutatott fehérjét) feltüntetni a gél jobb oldalán.

Az ábra jobb átláthatósága miatt valóban jobb lett volna az opponensem által javasolt feliratozást alkalmazni, köszönöm az észrevételt.

Általános kérdések:

1/ A SIMV jelenlétének megállapítására a gyökérszövet módosult növekedését vizsgálták. Van-e esetleg a SIMV-nek a hajtásra jellemző megnyilvánulása, ami hasonlóan vizsgálható? Ha nincs, akkor vajon miért a gyökérben nyilvánul meg, ha van, akkor esetleg tervezik-e az elemtöbblet által kiváltott stressz hatásait a hajtásban vizsgálni?

A hajtáson jelentkező SIMV tünetei a csökkent levélterület, nagyobb levélvastagság, gátolt szármegnyúlás és fokozott oldalhajtás képzés. Ezek a morfogénikus válaszok UV-B sugárzás és mechanikai behatás esetén ismertek (összefoglalva Potters és mtsi. 2007). Az elemtöbbletek esetén valószínűleg azért nem ismert a SIMV megjelenése a hajtásban, mert a gyökér van közvetlen kapcsolatban az elemekkel, sok esetben itt történik felhalmozás, valamint a gyökérstruktúra sokkal inkább plasztikus. Megfigyelve a kezelt növényeink hajtásait, azoknál az elem dózisoknál ahol a gyökér SIMV-et mutatott a hajtásban nem volt szemmel látható morfogénikus változás. Azok az elemkoncentrációk, amik a hajtásra hatást fejtettek ki, a gyökérre nézve gátlók voltak. Ebből arra következtethetünk, hogy az elemtöbbletek esetén a gyökérszövet érzékenyebb a hajtáshoz képest, ennek oka pedig a nagyobb fokú, közvetlen kitettség és a nagyobb mértékű elemfelhalmozás.

Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trend Plant Sci* 12: 98-105.

2/ Az NO szabályozás feltárásának igen sokféle aspektusát tárgyalták. A bonyolult kapcsolatok további vizsgálatát nagyban segítené az NO szint változására közvetlenül válaszoló gének azonosítása. Ezek ismeretében génexpressziós változásaik különféle kezelések hatására is lehetséges lenne. Terveznek-e ilyen irányú vizsgálatokat nagy-áteresztőképességű szekvenálás felhasználásával, vagy más módon?

Örülök a kérdésnek, mert bennem is felmerült az a teljesen jogos igény, hogy a NO-dal közvetlen kapcsolatban álló géneket ismerjünk meg, hiszen ezáltal válhat lehetővé új kutatási irányok kijelölése. A nemrégiben indult MTA Lendület projekt keretében NO-kapcsolt gének felfedezésére teszünk kísérletet genetikai szűréssel. Ehhez a Rigó és mtsi. (2017) által fejlesztett kondicionális cDNS túlexpresszázó rendszert (COS) fogjuk használni, aminek segítségével cDNS klónok random bevitele és kifejeztetése történt meg Arabidopsis-ban. A cDNS könyvtár a só-, ozmotikus- és oxidatív stressztűrő *Lepidium crassifolium*-ból származott. A COS rendszerrel 40 000 transzgenikus Arabidopsis vonalat állítottak elő, amelyeket NO érzéketlenségre vagy hiperszenzitivitásra fogunk szűrni, az ígéretes vonalakat pedig részletes molekuláris-genetikai analízisnek vetjük alá.

Rigó G, Valkai I, Faragó D, Kiss E, Van Houdt S, Van de Steene N, Hannah MA, Szabados L (2016) Gene mining in halophytes: functional identification of stress tolerance genes in *Lepidium crassifolium*. *Plant Cell Environ* 39: 2074-2084.

3/ A rézterhelés és a NO kapcsolatát modellszervekben vizsgálták. A biogazdálkodás során a szerhasználat nagymértékben korlátozódik a réztartalmú szerek használatára, ami olyan növények esetében mint a szőlő (ahol igen nagyszámú permetszés történik) lokálisan igen nagy elemtöbbletet eredményez. Terveznek-e kísérleteket gazdaságilag fontos növényeken?

Osztom opponensem véleményét, miszerint a réztartalmú permetszerek gazdasági növényekben is aktuálisak teszik a kutatásokat. Az elmúlt pár évben vizsgálataink fókuszát elmozdult a nanoanyagok irányába, és legújabb kutatásainkban ezek növényekre gyakorolt előnyös, mezőgazdasági gyakorlatban kihasználható tulajdonságait tanulmányozzuk. Egy ilyen tervezett vizsgálatunkban plazma-aktivált

folyadékot dúsítunk réz-oxid nanorészecskékkel, és ezt alkalmazzuk lúdfű és paradicsom magjainak edzésére. A réz-oxid nanorészecskék plazma-aktivált folyadékban való alkalmazásának kettős célja van. A réz-oxid nanorészecskéknek ismert az antimikrobiális hatása, és az is, hogy a növények kórokozókkal szembeni ellenállását fokozzák. Továbbá a plazma-aktivált folyadékban képződő reaktív nitrogén- és oxigénformák stabilitását megnöveli a nanoréz, így reményeink szerint fokozódik a magedző hatás.

4/ Kísérleteik során vizsgálták és bizonyították az NO stresszenyhítő tulajdonságát elemtűlsúly használatakor, kimutatva az NO és a ROF koncentráció antagonistán módon való változását. Vannak-e esetleg arra vonatkozó adatok, hogy a NO (a ROF-ok csökkentésén keresztül) csökkentheti a növénypatogének fertőzése során kialakuló káros tüneteket? Lenne-e/lát-e lehetőség az NO növényvédelemben való felhasználására?

Ez a témakör kapcsolódik az előző kérdésre adott válaszomhoz. A közeli jövőben tervezett vizsgálataink arra fókuszálnak, hogy a reaktív nitrogén- és oxigénformákban dús plazma-aktivált folyadékok, a kitozánba csomagolt *S*-nitrozoglutation NO donor és a *S*-nitrozotiolokat felszabadító nanolemezek csökkentik-e a növénypatogének fertőzése során kialakuló káros tüneteket, avagy fokozzák-e a növényi védekezést. Ezekkel a NO-ot felszabadító nanoanyagokkal magokat edzünk, és kísérleteinkkel szeretnénk megalapozni az antimikrobiális magkezelő eljárások mezőgazdasági alkalmazását. Munkahipotézisünk azon alapul, hogy a NO aktív jelmolekula a kórokozókra adott növényi válaszokban. Opponensem kérdése arra irányult, hogy a NO a ROF-ok csökkentésén keresztül enyhítheti-e a patogénfertőzés során nyomán megjelenő károsodásokat. Meglepően kevés kutatási eredményre bukkantam olyan kísérleti rendszerekben, ahol a fertőzött növényt NO donorkezelésnek tették ki és tanulmányozták a ROF szinteket/metabolizmust. Például egy ilyen paradicsom-*Botrytis* pathorendszerben végzett vizsgálat kimutatta, hogy a külső NO kezelés csökkentette a H₂O₂ tartalmat a SOD, APX és KAT enzimek aktivitásának módosítása nélkül, de a redukált H₂O₂ tartalom nem csökkentette, hanem fokozta a növény fogékonyságát a fertőzéssel szemben (Małolepsza és Rózska 2005). Ami a patogénfertőzésre endogén képződő NO-ot illeti, az a lokális és a szisztémás válaszokban is szabályozó molekula. A lokális válaszokban a hiperszenzitív reakció során lejátszódó programozott sejthalál kialakításában van szerepe a H₂O₂-dal együtt. Ebben a védelmi folyamatban azonban a NO nem csökkenti a ROF/ H₂O₂ szintet, hanem egymás szintjét pozitívan szabályozzák, így a két molekula túlprodukciója programozott sejthalált vált ki proteázok aktiválása, oxidatív és nitrozatív fehérje, nukleinsav és lipidmódosítások révén (Kahn és mtsi. 2023). A hiperszenzitív reakció limitációja pedig egy negatív feedback mechanizmussal valósul meg, amiben a megemelkedett NO/SNO szintek *S*-nitrozilálják a NADPH-oxidázt, így csökkentve annak ROF-generáló aktivitását (Yun és mtsi. 2011).


Małolepsza U, Rózska S (2005) Nitric oxide and hydrogen peroxide in tomato resistance. Nitric oxide modulates hydrogen peroxide level in o-hydroxyethylrutin-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant Physiol Biochem* 43: 623-635.

Khan M, Ali S, Al Azzawi TNI, Saqib S, Ullah F, Ayaz A, Zaman W (2023) The key roles of ROS and RNS as a signaling molecule in plant-microbe interactions. *Antiox* 12: 268, <https://doi.org/10.3390/antiox12020268>

Yun BW, Feechan A, Yin M. és mtsi. *S*-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nat* 478: 264–268.

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

Szeged, 2023. 11. 17.


Ördögné Kolbert Zsuzsanna