

Bírálat

Ördögné Kolbert Zsuzsanna

„A nitrogén-monoxid növekedésszabályozó,
toleranciafokozó és nitro-oxidatív stresszt kiváltó szerepei elemtöbbletek hatására növényekben”

címmel benyújtott MTA doktori értekezéséről

készítette: Várallyay Éva

Megtiszteltetésnek vettem és örömmel vállaltam Ördögné Kolbert Zsuzsanna MTA doktori értekezésének bírálatát. Kolbert Zsuzsanna 18 éve végzi kutatásait a Szegedi tudományegyetemen, ahol már a 2009-ben szerzett PhD értekezésében is a NO szerepét, keletkezését és forrásait vizsgálta. E megalapozott kutatások tették lehetővé, hogy azokra tovább építkezve az NO szerepét igen bonyolult, eddig nem vizsgált stresszfolyamatokban, mint az elemtöbbletek vizsgálja tovább. A doktori értekezés az ezekben a kutatásokban a PhD megszerzése óta végzett kutatásait, azok legfontosabb eredményeit foglalja össze.

A doktori értekezés a téziszüzetben található információk alapján 16 szakcikk tudományos eredményeit foglalja össze. Kolbert Zsuzsa e 16 szakcikk mindegyikében meghatározó szerző: hét esetben első (3 esetben megosztva), míg kilenc esetben levelező szerző. A szakcikkek a szakma rangos folyóirataiban jelentek meg. A doktori értekezés a tézisektől függetlenül is életképes kell legyen, ezért nagyon hiányoltam az értekezésből a dolgozat témájául 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.

Kolbert Zsuzsanna szakmai felkészültsége, publikációs aktivitása: Scopus 69 dokument, 2170 hivatkozás, Hirsch faktor: 28; kutatói teljesítménye elismerést érdemlő, és az, hogy a habitusvizsgálat zöld utat engedett a dolgozat bírálatának is ezt bizonyítja.

A doktori értekezés Kolbert Zsuzsanna azon kutatásait foglalja össze melyekben a NO fitohormonokkal és nem fitohormon jellegű komponensekkel való kapcsolatait és ezek szerepét mutatja be az elemtöbbletek által befolyásolt gyökérféjlődés során. Az értekezés ezen felül az NO reaktív oxigénformákkal való kapcsolatát az elemtöbbletekkel szembeni tolerancia kialakításában és a stresszjelátviteli folyamatban való szerepét is bemutatja.

A kérdés borzasztó érdekes és fontos, hiszen ezekről a folyamatokról még mindig keveset tudunk. A kérdés megválaszolására használt kutatási módszerek időszerűek, előre mutatóak.

A doktori értekezés hagyományos szerkezetű, melyben bevezető, irodalmi áttekintés, kutatási célok megfogalmazása után olvashatjuk a felhasznált anyagokat, módszereket, a kapott eredményeket, azok megvitatását és összefoglalását, majd az elért új tudományos eredményeket. 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.

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.

Általánosságban elmondható, hogy a dolgozat igen nagymennyiségű információt tartalmaz, talán kicsit kevesebb témakör részletesebb bemutatása és tárgyalása szerencsésebb lett volna. 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 kezelőszer, miért ez a mutáns volt a kontrol, miért ezen gének expresszióját vizsgálták.

A következőkben a dolgozat olvasása közben felmerült megjegyzéseimet, kérdéseimet foglalom össze. A megjegyzéseknél a könnyebb követhetőség kedvéért a dolgozat megfelelő fejezetszámaira hivatkozom:

5.1. A fémionkezelések hatására kialakuló stresszindukált morfogenetikus válasz, a SIMV, megjelenését vizsgálták különböző fémion akkumulációjára képes (toleráns) és nem képes (szenzitív) növényben. A SIMV a kezelések formájától, a növény fajtól és fémionszenzitivitásától függetlenül több esetben, kialakult. 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. Lehetséges-e, hogy a gyökérnövekedési változások egy más paraméterrel, pl gyökér frisstömeg méréssel jobban jellemezhetőek lennének?

5.2. A különböző szelénérzékenységű *Astragalus* fajok főgyökérhossza kezelés nélkül is nagyon különbözik: a toleráns fajé 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?

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 nikkellekoncentráció különbséget okozott a kontrolhoz képest? Érdekes lett volna egy nikkelfelhalmozásra nem képes *Odontarrhena* faj kezelésre mutatott válaszát is tanulmányozni – bár nem tudom, hogy van-e ilyen? Hasonló felhalmozási különbséget figyeltek meg a *Brassica* fajokban történt cink nanopartikulummal végzett kísérleteikben is. A cink felhalmozás ott is jellemzően a gyökérben történt. Lehet-e hasonló mechanizmus a magyarázat a két látszólag független esetben?

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 merisztomatikus 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?

Az eredmények értékelésében szerepel, hogy az *Arabidopsis*-ban 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 belerakni a dolgozatba. 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.

5.3.2. Szelénterhelt lúdfűben vizsgálták az auxin, etilén és citokinin felhalmozódását. A 11. ábrán bemutatott eredmények alapján a citokinin koncentráció a WT növényben is nő 2-7 nap között, és a 10 (vagy 20vM – az ábrafelirat és aláírás nem egyértelmű) szelén hatása nem tűnik gátlónak ebben az esetben. Ha jól értem az auxinnal és az etilénnel szemben (ahol hormonérzékeny mutánsokat vizsgáltak), a citokinin vizsgálatok, 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?

A citokinin koncentráció szelénit túlsúlyban való vizsgálatáról két ábra is szól, de míg a 11. ábrán 2 és 7 napon, addig a 13. ábrán a 4. napon történt a vizsgálat. Ebből, ha jól látom az derül ki, hogy a citokinin koncentráció jelentős mértékben csak a 40vM kezelés hatására nőtt meg a gyökérben, ahol a 4. napon és 7. napon 10/20vM kezelés esetén is a kontrolhoz hasonló koncentrációt mutat.

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 szelénkezelés 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 szelén 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 oldalgöyökképződéssel?

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

A szelénkezelés oldalgöyökképződésre való hatásánál arra a következtetésre jut, hogy az NO szint növelése fokozta az oldalgöyökek 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?

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 göyökképződésre?

5.3.3. A strigolaktin vizsgálatok a GSNOR enzim aktivitásában csökkenést mutattak ki, köszönhetően a csökkent fehérjeexpressziónak. 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?

5.4.3. A cinkkezelés és az NO kapcsolatának vizsgálatok 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 kontrolhoz képest minden esetben nőtt. Hogyan kell elképzelnünk ezt a szabályzást?

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 sejteti az ember, hogy elírás történt. A bemutatott eredmények alapján azonban a leírt következtetés nem érthető.

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

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* cinktűrést 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?

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 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 sofwerrel 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?

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.

A felmerült kérdések a dolgozat értékét nem befolyásolják, csupán néhány kérdés pontosítását teszik lehetővé.

A 8. fejezetben összefoglalt új tudományos eredményekkel egyet értek, azokat újként és a jelölt eredményeiként elfogadom.

Általános kérdéseim:

1/ A SIMV jelenlétének megállapítására a gyökérszet 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 kiváltot stressz hatásait a hajtásban vizsgálni?

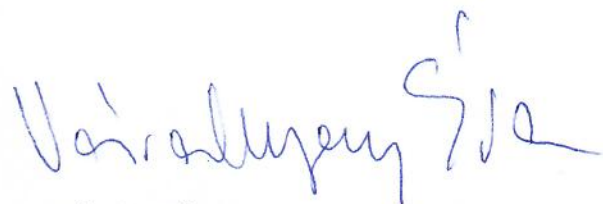
2/ Az NO szabályozás feltárásának igen sokféle aspektusát tárgyalták. A bonyolult kapcsolatok további vizsgálatát nagyban segítené az NO szint változására közvetlenül válaszoló gének azonosítása. Ezek ismeretében génexpressziós változásaik különféle kezelésekre hatására is lehetséges lenne. Terveznek-e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

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

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

Ezúton nyilatkozom arról, hogy Ördögné Kolbert Zsuzsanna MTA doktori értekezésében megfogalmazott új tudományos eredményeit, elfogadom. A jelöltet és a munkáját alkalmasnak tartom a cím megszerzéséhez, a doktori értekezés nyilvános védésének kitűzését javaslom. Sikeres védés esetén pedig a legmesszebbmenően támogatom számára az MTA doktori cím odaítélését.

Gödöllő, 2023 július.24.



Várallyay Éva