

## Bírálat

Király Lóránt

*„Életben maradni – sejthalál és reaktív oxigénszármazékok a növényi vírus – és lisztharmatrezisztenciában”*

címmel benyújtott MTA doktori értekezéséről

készítette: Várallyay Éva

Megtiszteltetésnek vettem és örömmel vállaltam Király Lóránt MTA doktori értekezésének bírálatát. Király Lóránt doktori értekezése a PhD kutatási eredményeire közvetlenül épülő, a fokozat megszerzése óta 1999-2021 között publikált kutatási eredményeket foglalja össze.

A doktori értekezés a téziszüzetben található információk alapján 11 szakcikk tudományos eredményeit foglalja össze. Király Lóránt e 11 szakcikkből 9 esetben meghatározó szerző: 4 esetben első, 5 esetben utolsó, 7 esetben levelező szerző. A szakcikk a szakma rangos folyóirataiban jelentek meg. A doktori értekezés a tézisektől függetlenül is életképes kell legyen, ezért nagyon hiányoltam az értekezésből a dolgozat témájával szolgáló szakcikk felsorolását és az eredmények bemutatásakor, az eredeti szakcikkre való hivatkozásokat. Az opponens feladata a dolgozat bírálat, függetlenül a tézisektől (a jelölt habitusát egy független fórum méri), az, hogy mely eredmény melyik publikációban került közlésre nagyon fontos információ lett volna.

Király Lóránt szakmai felkészültsége, publikációs aktivitása: Scopus 60 dokument, 1708 hivatkozás, Hirsch faktor: 23; kutatói teljesítménye elismerést érdemlő, és az, hogy a habituszvizsgálat zöld utat engedett a dolgozat bírálatának is ezt bizonyítja.

A doktori értekezés Király Lóránt azon kutatásait foglalja össze melyekben a HR-típusú nekrosis és a kórokozók elleni rezisztencia kialakulását, kapcsolt, vagy független jellegét vizsgálták. Az általuk mesterségesen előállított fajhibridben a két tulajdonság szétválasztható ezért e növények, illetve további, adott patogén válasza specielisan reagáló dohány fajok kiváló modelljei a kérdéskör megválaszolásának. A specielikus patogén válasz különböző kezeléseket követően (szulfáttöbblet, antioxidáns kapacitás módosítását befolyásoló kezeléseket) módosul, a gazdanövényben a kórokozó iránt mutatott rezisztenciájától függetlenül. A vizsgálatokat nemcsak vírus-, hanem gomba kórokozókval való fertőzés során is elvégezték. Eredményeik alapján a korai ROS felhalmozódás mind vírus, mint gomba fertőzés során kulcsfontosságú a fertőzés kimenetele és az okozott tünetei szempontjából.

A kutatás nagyon 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 megkönnyítette volna a komplex folyamatok megértését.

Az értekezés nyelvezete gördülékeny és precíz, ennek ellenére nagyon nehezen olvasható. A fejezetek hierarchikus elrendezése csak a betűtípusokban tükröződik, ami egy decimális számozással ellátva elegánsabb lett volna. Az ábrák összetettek, az alábrák betűkódokkal való jelölése szintén javította volna a koncepciót, megértést. A dolgozat tördelésével szintén lehetett volna segíteni az átláthatóságát, de sajnos ez nem sikerült jól, valószínűleg azért nem, mert az értekezés digitális formában került benyújtásra.

A következőkben a dolgozat olvasása közben felmerült megjegyzéseimet, kérdéseimet foglalom össze. A megjegyzéseknél amikor lehet, a könnyebb követhetőség kedvéért fejezetszámok hiányában az oldalszámokra hivatkozom:

Az értekezés logikája és nyelvezete sokszor nehezen követhető. A HR és a nekrosis nem felcserélhető fogalmak, mégis, a legnagyobb látható igyekezet ellenére néhol szinonimaként jelentkezik. Az ok és okozat összefüggések (emelkedett SA szint, PR-1 expresszió, szulfát ellátottság), is többször összezavarodnak, de ennek is az az oka, hogy valójában ezek nem tisztázott kérdések.

41.old. A *N. cleavelandi* CaMV-re való fokozott érzékenységét és a kialakuló nekrosist a *ccd1*/CaMV cell death gén határozza meg. Ennek azonosítása is Király Lóránt egy korai munkájához kapcsolódik (MPMI, 1999). Kiderült-e azóta, hogy mi ennek a génnek a funkciója, és ha igen vajon az mennyiben és hogyan magyarázza a nekrosis kialakulását? A *N. bigelovii* esetében a CaMV W260 és D4 törzsére adott reakciók hasonlóak, míg ezek a *N. cleavelandi* esetében markánsan különböznek. Vizsgálták-e azóta, hogy a *ccd1* mennyiben különbözik a 2 faj esetében? És esetleg molekuláris módszerekkel azt, hogy a D4 és W260 törzsek P6 fehérjéjének mely régiója az, ami különbözik és a *ccd1*-gyel kölcsönhatva felelős lehet a HR és SN kialakulásáért?

A HR és a rezisztencia független öröklődésének igazolására a *N. edwardsonii* var. Columbia fajhibridet a fogékony szülővel keresztezték vissza, majd az F1 generáció öntermékeny utódainál vizsgálták a tulajdonságok szegregálását. Miért volt szükség erre a visszakeresztezésre? Vajon a fajhibrid öntermékenyítésével kapott – az eredeti keresztezés F2 populációja nem ugyanezt az arányt mutatta volna? Vagy volt ennek valami más oka?

1 és 2 táblázat (42, 47.old): A táblázatok a sok lábjegyzet miatt nagyon nehezen érthetőek – egy oszlopdiagrammos bemutatás segíthette volna a gyorsabb befogadást. Szokatlan, hogy a Táblázat címe (2.táblázat), egy lábjegyzet (1.táblázat), vagy akár egy ábraalírással (sokszor) a táblázatból, kísérletből levonható következtetést is tartalmazza. Ezt nem tartom rossz ötletnek – külön segít annak, aki a szöveget nem olvassa el, de mivel ez sokszor a fő szövegben is szó szerint benne van, ismétlésnek hat.

4.ábra (49.old) A fotókon és RT-PCR-en bemutatott mintasorrend az ELISA-s blokkon felcserélődik, ami megzavarja a megértést.

49-50.old. A NEC növények emelkedett kötött SA szintje és fokozott NgPR-1 expressziója valóban jelentős különbségnek tűnik. Ez a tendencia fokozódik TNV és TMV fertőzés esetén is, bár az NgPR-1 esetén a szemikvantitatív RT-PCR nem alkalmas arra, hogy megállapítsuk, hogy a kezdeti fokozott NgPR-1 expresszió tovább nőtt-e a fertőzésekor vagy nem. Ugyan a PR-1-t a rezisztencia markerének tekintik, számomra ez nem egyértelmű, hiszen pont a TNV fertőzött NEC növényekben nem detektálható a szintje, ahol a vírus nem tud elszaporodni a növényben. A szabad és kötött SA mennyisége a TMV fertőzés során úgy tűnik, hogy sokkal nagyobb mértékben indukálódik, mint TNV fertőzés esetén, szinkronban a mért víruskoncentrációk alakulásával. Az 5. ábra alapján nekem úgy tűnik, hogy míg a PR-1 esetén nem lehet eldönteni, hogy van-e különbség a két fertőzés között, az SA kötött és szabad mennyisége is TMV fertőzés során sokkal nagyobb mértékben indukálódik a NEC

növényekben, ami esetleg összefügghet a nekrozis elmaradásával, még jelentős víruskoncentráció esetén is. Jelen kísérletben lehetséges-e az, hogy a mesterségesen előidézett szulfáttöbblet miatt nő meg a kötött SA szint, ami a fokozott NgPR-1 expressziót indukálja és gátolja a nekrozis kialakulását, de ez nem függ össze azzal, hogy az adott vírusra gazda, vagy nem gazda rezisztenciát mutat-e a növény. Nem lehetséges ez a magyarázat?

51.old és máshol: A rezisztencia mérésére a víruskoncentrációt használták (ELISA vagy qRT-PCR). Ez szisztémikus levelek esetén tényleg informatív. Inokulált levelek esetén viszont, ha valóban rezisztencia áll fenn, akkor annak a mértéke nem fog változni az időben. A változó – csökkenő víruskoncentrációnak nem lehet az az oka, hogy a vírus a kialakult nekrozis miatt nem tud további sejtekben replikálni, illetve a vírus RNS-ek védtelenek az RN-ázokkal szemben, és így folyamatosan lebomlanak – és a mért víruskoncentráció ezért csökken?

50.old/54.old/67.old (5. 7., 16. ábra) A szemikvantitatív RT-PCR eredményeinek „látása” nagyon nem könnyű, hiszen a megfelelő kontroll is mindig figyelembe kell venni. Nagyban segítette volna az értékelhetőséget, egy megfelelő arányszám szerepeltetése. Valószínűleg a cikk megjelenésekor ez még nem volt követelmény, ma már az.

Az SA-k mérése (5.ábra – 3dpi), a léziók számolása (6.ábra -2,4 dpi) és a NtGSTTau<sub>1</sub> és NtCATSAB expressziójának mérése (7. ábra – 3,6,12,24h) eltérő időpontokban történt. A GST korai indukciója (6,12h) 24h-ra eltűnik, pedig igen jól látszó különbséget mutat a -S és +S növényekben, ami okozhatja a nekrozis csökkent mértékét. Lehet esetleg, hogy ez az a különbség, ami a kisebb mértékű vírusreplikációt – léziót és csökkent vírusmennyiséget eredményezi?

57.oldal: A különböző kezelések hatása a nekrozis és a rezisztencia kialakulására kérdéskörben a növényekben többek között kataláz kezelés hatására figyelték meg a nekrotikus borítottság csökkenését TMV fertőzéskor. A 8. ábrán levő táblázat szerint (56.old) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés és a SOD+CAT kezelés kb. azonos mértékben csökkentette a nekrotikus borítottságot. Lehet ennek oka az, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> előkezeléskor megnő a kataláz szintje, és ez okozza a nekrotikus tünetek csökkenését?

66.old A szuperoxidok felhalmozódását 20 és 30 fokon tartott mock és TMV fertőzött *N. tabacum* cv Xanthi NN növényekben vizsgálták. Míg a szuperoxidok mennyiség 30 fokon kevesebb volt a 20 fokozathoz képest, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> felhalmozódása nem mutatott különbséget. A következtetések szerint a TMV rezisztencia 30 fokon visszaszorul, és ennek oka a szuperoxid szint csökkenése. Ugyan irodalmi források szerint a HR TMV fertőzött dohányban visszaszorul, hiányoltam annak bemutatását, hogy ez miben és milyen mértékben jelentkezett az aktuális kísérletben. Esetleg vannak adatok arra, hogy a vizsgált kísérletben (a mért szuperoxid és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szintekhez képest) hogyan változott a fertőzött levelek nekrotikus lézióinak, száma? Mivel a nekrozis és a rezisztencia egymástól független tulajdonságok, történt-e esetleg víruskoncentráció mérés ezekben a növényekben, amivel a rezisztencia változását korrelálni lehetne, hasonlóan a később, 68.oldalon bemutatott kísérletekhez? A megnövekedett TMV koncentráció és a rezisztencia csökkenése milyen mértékű volt? Esetleg volt hatással a vírus hosszabb távú mozgására? Vizsgálták esetleg a TMV fertőzés esetleges szisztémizálódását?

Kimutatták, hogy a korai ROS felhalmozódás fontos komponense a vírusfertőzés gátlásának és ezért a korai ROS felhalmozódásért a NADPH oxidázok fokozott aktivitása a felelős. Ismert-e, hogy a vírusfertőzés során milyen szignalizációs út vezet a NADPH oxidázok, és esetleg más, ROS akkumulációban szerepet játszó enzimek expressziójának, aktiválódásának a fokozásához? Van-e esetleg ebben transzkripció faktoroknak, illetve miRNS-eknek szerepe?

90.old Kimutatták, hogy a cseresznyepaprikában megfigyelt tünetmentes lisztharmat rezisztencia oltással átvihető egy csemege fajtára. Folytatták-e ezt a kutatást annak céljából, hogy a rezisztenciáért felelős gént azonosítsák, vagy esetleg markert fejlesszenek a tulajdonság nemesítési programokban való azonosítására?

94-95.old. A funkcionális Mlo jelenléte létfontosságú a lisztharmatfertőzés létrejöttéhez. Az Mlo gén expresszióján kívül a fehérje működőképessége is fontos, vizsgálták-e, hogy a rezisztens paprika Mlo génjeiben vajon nincs-e olyan mutáció, ami funkcióvesztést okoz, akár az Mlo1-ban, akár az Mlo2-ben, ami esetleg e gén expressziójának csökkenésén kívül is hozzájárulhat a rezisztencia kialakulásához.

PVX és TMV fertőzést inkompatibilis rendszerekben vizsgálva (*N. tabacum* cv. Samsun NN-ben) a GST expressziója is és aktivitása is megnő. Utóbbi a nekrozissal kapcsolt fertőzéskor nőtt meg jelentősen, míg az extrém rezisztencia esetén ez a növekedés a fertőzés nagyon korai szakaszára korlátozódott, az expresszió ezután a normál szintre állt vissza. Kísérleteinkben, tüneteket mutató fertőzés esetén PVX és TMV fertőzött paradicsomot vizsgálva mi is hasonlót tapasztaltunk (Pesti et al, PLOS ONE, 2019). A GST-k expressziója TMV fertőzés esetén nagyon megnőtt, míg a sokkal enyhébb tüneteket mutató PVX fertőzéskor ez az indukció elmaradt. A vírusok mindkét esetben tudtak replikálódni, a fertőzés szisztemikus volt, és a vírusok nagy mértékben tudtak felhalmozódni. Nem lehetséges az, hogy ez is azt támasztja alá, hogy a rezisztencia és a tünetek/nekrozis kialakulása egymástól függetlenül szabályozódnak?? Mit gondol?

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

A 130.oldalon 6 pontban összefoglalt új tudományos eredményekkel egyet értek, azokat újként és a jelölt eredményeiként elfogadom.

Általános kérdéseim:

A növényvédelemben kulcsfontosságú a természetett növények kórokozó rezisztenciájának kialakítása. Amennyiben a rezisztencia során nekrozis történik, a termés annak ellenére eladhatatlan lesz, hogy a növény túlél. Ha a rezisztencia és a nekrozis egymástól független tulajdonságok és utóbbi gazdagénekhez, pl. *ccd1* génhez köthető mit gondol, van-e létjogosultsága ezen gazda faktorok genom editinggel történő módosításának annak érdekében, hogy a rezisztens növényeken ne alakuljon ki nekrozis. Mennyire konzervatívak ezen gének és a nekrozis kialakító tulajdonságuk a különböző patogén – gazda kapcsolatokban?

A nagy-áteresztőképességű szekvenálások, tömegspektrometriás mérések, metabolom analízisek olyan nagyáteresztőképességű módszerek, melyek kiválóan alkalmasak komplex folyamatok teljes szervezetre vonatkozó jellemzésére. Az értekezés fő kérdésének: a nekrozissal járó és a tünetmentes rezisztencia vizsgálatára készült-e vagy terveznek-e ilyen nagyáteresztőképességű módszereken alapuló vizsgálatot?

A vizsgált növényekben bizonyos kórokozókkal szemben extrém, másokkal szemben HR alapú rezisztencia áll fenn. A kórokozók új gazdanövény fertőzésekor extrém tüneteket is produkálhatnak, ami a vírus-gazda koevolúció során a tünetek mérséklése irányában változik. Mit gondol, az extrém, tünetmentes rezisztencia és a nekrozis alapú rezisztencia vajon egy ilyen evolúciós úton hol helyezkednek el és a folyamat elejét, vagy végét jelezhetik-e?

Ezúton nyilatkozom arról, hogy Király Lóránt 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 határozottan támogatom számára az MTA doktori cím odaítélését.

Gödöllő, 2024. szeptember 2.

Várallyay Éva

Dr. Várallyay Éva