

OPPONENSI VÉLEMÉNY

Király Lóránt „Életben maradni – sejthalál és reaktív oxigénszármazékok a növényi vírus- és liztharmat rezisztenciában” című MTA doktori értekezéséről.

Opponensi véleményemet az MTA Doktori Szabályzatának megfelelően az alábbiakban foglalom össze.

A Jelölt dolgozatának tagolódása, annak tartalmi és szerkezeti felépítése, az egyes részfejezetek egymáshoz viszonyított aránya megfelel a tudományos disszertációkkal szemben támasztott követelményeknek. A dolgozat 152 oldal terjedelmű, 36 jól szerkesztett, mutatós ábrát és 3 táblázatot tartalmaz. Az ábrák értelmezését megkönnyíti az ábrák címe után következő magyarázó szöveg.

A dolgozat igényesen, gondosan és precízen összeállított munka, csak néhány apróbb hiba, pontatlanság található benne.

Megjegyzésem az ábrákhoz: Sajnos nagyon sok esetben az ábra címe és magyarázó szövege a következő oldalra került, ezt a szöveg szerkesztésével a legtöbb esetben orvosolható lett volna.

Az értekezés címe

Az értekezés címe igen találó egyértelműen kiderül a dolgozat témaköre a rezisztencia kérdése vírusok és a liztharmat esetében, ugyanakkor a cím utal a reaktív oxigénszármazékok hatására a növényi védekezésben, a sejthalálban és a növények életben maradásában, vagy pusztulásában is.

Tartalomjegyzék

Alapvetően fő fejezeteket különít el, nincs decimális számozás a fejezeteknél és azon belül sem.

Megjegyzés a tartalomjegyzékhez: A tartalomjegyzékben pl. az anyag és módszer fejezetben nem található meg a fejezeteken belüli alfejezetek, és az azokon belüli részek sem. Ezért szerencsésebb lett volna a decimális számozás. Szerencsés lett volna ha a dolgozat rövidítések jegyzékét is tartalmazna.

Bevezetés és kutatási cél

A Bevezetésben a Jelölt röviden ismerteti a problémakört, megfogalmazza azokat a kutatási célokat és a tudományosan fontos kérdéseket, amelyekre munkája során választ keres. Célkitűzései megfogalmazásakor támaszkodik a témakörrel kapcsolatban már korábban elért

eredményekre. Két fő cél mellett 6 hat alpontot jelöl meg. Az első fő pont a vírusokhoz, a második a liztharmatokhoz kapcsolódik. A hiperszenzitív rezisztencia HR esetén elválasztható-e egymástól a rezisztencia és a sejthalál. Milyen szerepe van a növényi védekező rendszer egyes elemeinek a vírusfertőzés által kiváltott HR-t alkotó rezisztenciára és nekrozisra. A HR-rel járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia – milyen különbségek vannak a védekezési gének és antioxidánsok aktiválódásában. Milyen szerepe van a reaktív oxigénszármazékok (ROS) korai/késői termelődésének a rezisztencia, ill. sejthalál kialakításában. A szuperoxid korai felhalmozódásának milyen szerepe van a biotróf gombakórokozók, pl. liztharmattal szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciában, illetve a szuperoxid felhalmozódásnak meghatározó szerepe van-e a paprika liztharmattal (*Leveillula taurica*) szembeni, oltással átvihető tünetmentes rezisztenciában.

Ennél a fejezetnél egy észrevételem van: Nagyon fontos tisztázni, hogy a betegségek ellen nem tudunk védekezni és a növények sem védekeznek. A kórokozók ellen lehetséges csak a védekezés. Nem helyes kifejezés a betegség ellenállóság, sem a betegségekkel szembeni rezisztencia, még akkor sem, ha sokszor a szakirodalomban így szerepel. Így pl. a betegség nem fertőző, mert a betegség a kórokozó a környezet és a gazdaszervezet kölcsönhatásának eredménye. Csak a kórokozó lehet fertőző. A betegség nem terjed, vagyis nem mobilis: csak a kórokozó terjedhet. A betegség a megtámadott szervezet életműködési zavara, melynek következtében az adott szervezet külső felületén vagy belsejében elváltozások jönnek létre. A betegség okozat, melyet betegségek, vagy kórok váltanak ki és amelyek a tünetekkel jellemezhetők.

Irodalmi áttekintés

Ahogy a Pályázó a fejezet bevezetőjében írja a teljesség igénye nélkül elsősorban a doktori értekezésben ismertetett saját kutatások témájának szempontjából (sejthalál és reaktív oxigénszármazékok a növényi rezisztenciában, vírus- és liztharmat-fertőzéseknél) a növényi betegség rezisztencia fő formáit és az ezeket kialakító fontosabb biokémiai tényezőket mutatja be. Az egyik fő fejezet a növényi betegségrezisztencia fő formáit, a veleszületett (*innate*), általános (*nem-specifikus*) rezisztenciát. Ezen belül a nemgazda rezisztenciát, a nem rassz-specifikus mlo-rezisztenciát. Majd részletezi a veleszületett (*innate*), specifikus rezisztenciát. Ezen belül a „Gén-génnel szembeni” rezisztenciát, az RNS által közvetített kórokozó rezisztenciát. Majd ezek után a növények két védelmi vonala (általános és specifikus rezisztencia) közötti kapcsolatot, a szerzett (*acquired*) rezisztenciát, ezen belül a szisztémikus szerzett rezisztenciát, az indukált szisztémikus rezisztenciát. Majd a tünetmentesség és hiperszenzitív sejthalál a növényi betegség rezisztenciában fejezet található, ezen belül pedig a tünetmentes és HR-rezisztencia gombás fertőzéseknél, a tünetmentes és HR-rezisztencia baktériumos fertőzéseknél és a tünetmentes és HR-rezisztencia vírusfertőzéseknél alfejezeteket. Ezt követően fő fejezetként a növényi betegség rezisztencia fontosabb biokémiai faktoraik témakört tárgyalja. A patogenezissel kapcsolatos fehérjéket, a glutation, glutation-S-transzferázokat, a szalicilsav szerepét, a reaktív oxigénszármazékokat és antioxidánsokat. A pályázó igen részletesen mutatja be a fent említett témaköröket, nagyon jó összefoglalóját adja az eddigi kutatási eredményeknek, amelyeket nagyon sok szakirodalmi hivatkozással támaszt alá. Ez a rész nagyon értékes, nagyon tömör, de ugyanakkor olvasmányos fejezete a dolgozatnak.

Megjegyzés: A Pályázó azt írja (6. oldal), hogy az ún. I. típusú nemgazda ellenálló képesség. A nem-adaptált patogén által megtámadott növény ilyenkor nem mutat látható (makroszkopikus) tüneteket, feltehetően azért, mert a kórokozó gyorsan és hatékonyan gátlódik, elsősorban a növényben indukálódó első védelmi vonal (PTI vagy bazális rezisztencia) aktiválódása miatt. Ugyanakkor pár sorral lejjebb azt írja, hogy a nemgazda rezisztencia általában akkor tünetmentes (I. típusú), amikor az adott kórokozó gazda- és nemgazda növénye közötti filogenetikai távolság nagy (pl. dohány és árpa) és ezért a fertőzést beindító kórokozó fehérjék (effektorok) feltehetően nem tudnak kapcsolódni a megfelelő növényi célfehérjékhez. Ezek így ellentmondó megállapítások, akkor is ha a jelölt úgy fogalmaz később, hogy egyelőre nem ismert olyan általános biokémiai, élettani mechanizmus, amely a tünetmentes (I. típusú) és a HR-tünetekkel járó (II. típusú) nemgazda rezisztencia minden esetére magyarázatot adhat. Ahhoz, hogy egy patogén meg tudjon támadni egy szervezetet, – legyen egyszerű esetben egy növényi vírus – akkor tud, ha bizonyos vírusfehérjék együtt tudnak működni növényi fehérjével/fehérjékkel. De ugyanígy az is megkérdőjelezhető és viszonylagos, hogy mekkora filogenetikai távolságot jelent a kórokozó gazda és nem gazdanövénye közötti genetikai távolság. Nem feltétlenül a gazdanövény számít, hanem maga a kórokozó genetikai állománya, tulajdonságai, képes-e megfertőzni egy adott növényt, vagy sem. Erre példa az uborka mozaik vírus (*Cucumber mosaic virus*, CMV) és a paradicsom magtalanság vírus (*Tomato aspermy virus*, TAV). Míg a CMV-nek több ezres gazdanövényköre van, fajok és fajták, addig a TAV csak néhány növényt tud megfertőzni, a két vírus pedig nagyon közeli rokonságban áll egymással. A bennük található genetikai különbségek azok, amik a vírus replikáció-, sejtről-sejtre terjedés, vagy a vírus hosszútávú mozgásának a lehetőségeit határozzák az adott gazdanövényben. Egy másik példa a szilva himlő vírus (*Plum pox virus*, PPV). A vírus örökítő anyaga, működése nagyon ősi kialakulásra enged következtetni, mint általában a potyvírusoké. A vírus okozta tüneteket és a kórokozót először szilváról írták le az első világháború után Bulgáriából, addig nem volt ismert a vírus, bár egyes források szerint Macedóniában már az 1910-es években megfigyelték. Valószínűleg addig csak lágyszárú növényeket fertőzhetett meg, de mutáció hatására már képes volt a csonthéjasok megfertőzésére, és innen terjedt el a vírus később a világ döntő részén az emberi tevékenység hatására. Nem helyes az a kifejezés, hogy „szisztémikus növényi szövetek” (13. oldal). Az indukált szisztémikus rezisztenciát (*Induced Systemic Resistance*, ISR) bemutatásakor (13. oldal) említi a növényi növekedést serkentő baktériumok között a *Streptomyces* fajokat, de azt nem szabad elfelejteni, hogy ezek antibiotikumot termelő fajok. Hasonló a helyzet amikor a növényi növekedést serkentő gombák között említi a *Trichoderma* fajokat, amelyek viszont hiperparazita gombák. A kórokozókkal szembeni fogékonyság, nem igazán jó kifejezés (22. oldal), a kórokozóval szemben ellenálló, vagy rezisztens.

Anyagok és módszerek

Az Anyag és módszer fejezet a reprodukálhatóság követelményeinek megfelelően tartalmazza a felhasznált anyagokat és módszereket, melyeket irodalmi hivatkozásokkal is alátámaszt, vagy ahol módosítás történt azt is korrekten, megismételhetőséget biztosítva közli.

Megjegyzés: A tartalomjegyzékben 'és' nélkül szerepel az Anyag és Módszer fejezet. A PVX rezisztencia gént egységesen kell jelölni itt *RXI* és az *StRXI*-ként, kétféle képpen van jelölve.

A °C különböző képpen szerepel, a tizedes vessző helyett néhol pont található. Az 1. táblázatot miért jelöli 0-1. táblázatnak, utána az eredményekben található egy 1. táblázat. A vírusok kimutatásánál használt ELISA vizsgálat leírásánál nem szerepel, hogy mikor tekintették pozitív eredménynek a kapott abszorbancia értékeket. A génkifejeződés vizsgálatához, ill. vírus kimutatáshoz a növényi RNS mintában reverz transzkripciót végeztek. Az RT során negatív kontrollként egy növényi RNS-t tartalmazó, de reverz transzkriptázt nem tartalmazó mintát alkalmaztunk (36. oldal). A negatív kontrollnál miért nem használtak reverz transzkriptázt? Minek a negatív kontrollja volt ez a beállítás? A 0-1 táblázat alatt a rövidítések értelmezésére nincs szükség, azok a szövegrészben is megtalálhatók. A PCR termék hossza bázispár mértékegység a táblázat fejlécében szerepelhetne (PCR hossza bázispár).

Eredmények

A dolgozat legterjedelmesebb része az eredményeket rendkívüli alaposággal leíró 55 oldalas fejezet, mely hat részből áll:

- A növényi vírusfertőzésekkel szembeni hiperszenzitív reakcióban (HR) a rezisztencia és a nekrosis (sejt/szövethalál) egymástól függetlenül öröklődhet.
- A növényi védekezés fokozása – eltérő hatások a vírusfertőzésekkel szembeni HR-t alkotó rezisztenciára és nekrosisra (sejt/szövethalálra).
- A HR-rel (sejt/szövethalál) járó, ill. tünetmentes (extrém) növényi vírus rezisztencia – különbségek a védekezési gének és antioxidánsok aktiválódásában.
- Tünetmentes nemgazda rezisztencia biotróf gombakórokozókkal (pl. lisztharmat) szemben – a szuperoxid (O_2^-) korai felhalmozódásának szerepe.
- A paprika lisztharmattal (*Leveillula taurica*) szembeni, oltással átvihető tünetmentes rezisztenciája – a szuperoxid (O_2^-) felhalmozódásának meghatározó szerepe.

Az eredmények a Jelölt két és fél évtizedes munkájának eredményeit tükrözik, amelyeket egy kiváló intézményben a Növényvédelmi Kutatóintézetben végzett. Sikeres munkájának legjobb bizonyítéka az, hogy eredményeit a nemzetközi szinten a terület legrangosabb folyóirataiban publikálta, mint a *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *Journal of General Virology*, *Phytopathology*, *Plant Physiology Biochemistry*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*.

Megállapították, hogy a *N. edwardsonii*, illetve *N. edwardsonii* var. Columbia fajhibridek vizsgálatával, a CaMV W260-ra adott, HR-típusú rezisztenciáját két független tulajdonság határozza meg: a rezisztencia a *N. glutinosa*-ból, míg a nekrosis (sejt/szövethalál) a *N. clevelandii*-ből származik. Amit megerősített a vírus egy másik izolátumával végzett kísérletek. Tehát a két tulajdonság elválasztható egymástól a HR-t alkotó rezisztencia és nekrosis az utódokban függetlenül öröklődik.

A két *Nicotiana edwardsonii* fajhibridet, valamint két vírust, a dohány nekrosis vírust (*Tobacco necrosis virus*, TNV) és dohány mozaik vírust (*Tobacco mosaic virus*, TMV) használva bizonyította, hogy a vírusfertőzések által kiváltott HR típusú nekrosis visszaszorulása nem mindig jár együtt a rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával. Kimutatta, hogy a növényi védekező rendszer egyes elemeinek (szalicilsav, glutation, PR gének, antioxidáns kapacitás)

fokozott indukciója eltérően hat a vírusfertőzés által kiváltott HR-t alkotó rezisztenciára és lokális nekrozisra.

Bizonyította, hogy a *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN, dohány mozaik vírusra HR típusú rezisztenciát mutató növényben az optimális szulfát ellátottság (megnövekedett glutation és cisztein tartalom) által biztosított emelt szintű hiperszenzitív vírusrezisztencia – a HR-típusú nekrozis visszaszorulása mellett, nagyobb mértékben fokozódott a rezisztencia.

Megállapította, hogy két vírust, a TMV-t és a burgonya x vírust (*Potato virus x*, PVX) felhasználva a TMV által indukált HR-nél egyes védekezési gének és antioxidánsok fokozott expressziója megnőtt, míg a PVX által kiváltott tünetmentes extrém rezisztencia esetén (ER) ezek a védekezési folyamatok korán, ill. átmenetileg indukálódnak vagy alig voltak detektálhatóak, összhangban az ER rendkívül korai kialakulásával.

Bizonyította, sokféle kísérlettel, hogy dohányban a vírusfertőzések által kiváltott tünetmentes (ER), illetve HR-rel (lokális sejt/szövethalál) járó rezisztenciánál a reaktív oxigénszármazékok (ROS, elsősorban szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$), hidrogén-peroxid $/H_2O_2/$ és hidroxilgyök $/OH^{\cdot}/$) korai termelődésének meghatározó szerepe van a (tünetmentes) rezisztencia kialakításában, míg a késői ROS termelődés elsősorban a sejthalálért felelős.

Kimutattuk, hogy árpában a szuperoxid ($O_2^{\cdot-}$)korai felhalmozódásának meghatározó szerepét a biotróf gombakórokozókkal (pl. lisztharmatok, rozsdák) szembeni tünetmentes nemgazda rezisztenciában is. A búzalisztharmattal (*B. graminis* f. sp. *tritici*) fertőzött árpa (*Hordeum vulgare*) három, közel izogén vonalában a tünetmentes nemgazda rezisztenciát egy kombinált hősokek és antioxidáns kezelés részben visszaszorította, és gyenge lisztharmatos tüneteket, ill. HR-típusú léziókat eredményezett.

Elsőként igazolták, hogy a szuperoxidnak meghatározó szerepe van a paprika lisztharmattal szembeni, oltással átvihető tünetmentes rezisztenciájában. A lisztharmat-rezisztens Szentesi fajta cseresznyepaprikában (*Capsicum annuum* var. *cerasiforme*) mért, NADPH-oxidáz enzimaktivitással összefüggő fokozott szuperoxid felhalmozódásával az oltványokban a nemes, az eredetileg fogékony fajta tünetmentes rezisztenciában nyilvánult meg.

Megjegyzés: Az eredmények fejezet tartalmaz néhány olyan részletet, ami az Anyag és módszer fejezetben is megtalálható. Néhány mondat megfogalmazása megnehezíti az érthetőséget, pl. „...az optimális szulfát ellátottság, ill. a glutation és a PR gének által meghatározott növényi védekezés jelentősen indukálódik akkor is, ha a HR-típusú lokális nekrozis visszaszorulása nem jár együtt a vírus rezisztencia hasonló mértékű fokozódásával (a HR-típusú nekrozis visszaszorulásánál a rezisztencia nagyobb mértékben fokozódik).”

Eredmények megvitatása

Az eredmények megvitatása fejezetben a Jelölt végig veszi azokat a pontokat, amit az eredmények fejezetben megtalálhatóak, ezeket kiegészíti és összeveti a szakirodalommal.

Összefoglalás

Az összefoglalás 6 pontja az új tudományos eredményekben (a következő fejezetben) megfogalmazott 6 pont részletesebb kifejtését, illetve az eredményekben megfogalmazottak bizonyítási lépéseit tartalmazza.

Új tudományos eredmények

Ebben a fejezetben a Jelölt 6 pontban foglalja össze az új tudományos eredményeit, amelyek mindegyike ebben a formában elfogadható.

Hozzá kell tenni, hogy az itt summásan megfogalmazott 6 pont igen szerény szám ahhoz képest, amit az eredmények fejezet bizonyításai, megállapításai tudományos eredményei tartalmaznak. Hatalmas munka áll emögött a 6 pont mögött.

Irodalomjegyzék

Ebben a fejezetben az idézett 485 publikáció felsorolása található. A fejezet tanúságot tesz a Jelölt igen széleskörű szakirodalmi tájékozottságáról. Tartalmazza a legfrissebb szakirodalmakat is.

Az irodalomjegyzékkel kapcsolatban csak egy észrevételem van: A folyóiratok rövidítése nem konzekvens, van ahol nincs rövidítés, van ahol részleges, a rövidítés után hol van pont, hol nincs.

A felsorolt és fel nem sorolt apróbb hibák semmit nem vonnak le a munka és az eredmények, valamint a dolgozat értékéből.

Kérdések:

1. Mi az oka, illetve háttere a bab xantomónászos betegségénél (kórokozó: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) a nekrotikus foltok körül kialakuló sárga udvarnak, más esetekben, más kórokozóknál pedig a haragoszöld udvarnak?

2. Egyes szakirodalmak a vírusok és a növények kapcsolat lehetséges formáinál más terminológiát használnak. Megkülönböztetnek immunis és fertőzhető növényeket. Immunis akkor a növény, ha nincs vírus replikáció a vírusnak nem gazdanövénye az adott szervezet. Fertőzhető növény esetén lehet rezisztens (helyi replikáció), vagy fogékony (szisztémikus terjedés, illetve replikáció). Rezisztencia esetén lehet hiperszenzitív reakció, ahol van vírusreplikáció az elsődlegesen fertőzött és a környező sejtekben, a növényen lokális lézió alakul ki. Más rezisztencia formák lehetnek azok, ahol a vírus rövidtávú (sejtről-sejtre) terjedése, vagy hosszútávú mozgása gátolt és ez nem feltétlenül növényi rezisztencia gének, vagy faktorok hatása, hanem inkompatibilitás. Illetve vannak fogékony növények, ahol a vírus fertőzés szisztémizálódik. A virológia részt illetően főleg a növényi oldal, a növények válaszai a kiemelték, pedig nem feltétlenül növényi válaszreakciók állnak a háttérben. A vírusok elleni

rezisztencianemesítés genomszerkesztéssel is ebbe az irányba tart. Hogyan illeszthető be irodalmi ismeretei alapján a rezisztenciáról kialakított képbe?

3. Ismert-e hogy mi az a genetikai különbség a karfiol mozaik vírus (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) két izolátuma, a W260 és a D4 között, ami magyarázatot ad arra, hogy míg a W260 a *N. clevelandii*-ben HR-t és szisztemikus nektrózist okoz, addig a D4 ugyanennél a gazdanövénynél lokális klorózist és szisztemikus mozaikot vált ki és a D4 vírus koncentrációja – az inokulált és felső, szisztemikus levelekben egyaránt – kétszer-háromszor akkora, mint a W260 titer?

4. A reaktív oxigénszármazékok, ROS hullámok kialakulásánál, ahogy a dolgozatban is szerepel „nem a ROS diffúzióját jelenti, hanem a szomszédos sejtekben a „ROS érzékelés, termelés, transzport” állapot tovaterjedését. Hogyan érzékelik a sejtek, mi a molekuláris mechanizmusa. Csak sejtről sejtre nem terjedhet az lassú a 8,5 cm perc sebességhez, szisztemikusan kell, hogy terjedjen a növényben a szállítószövetekben, mi lehet a hírvivő molekula?

Összefoglalva a Jelölt disszertációjával kapcsolatos véleményemet megállapítom, hogy a doktori mű, a korábbi PhD fokozat megszerzését – az Amerikai Egyesült Államok, Missouri Egyetemen – követően számos új, eredeti tudományos eredménnyel gazdagította a tudományt, és hozzájárult annak tovább fejlődéséhez. A disszertáció hiteles adatokat tartalmaz. A doktori munka tudományos eredményei elegendőek az MTA doktori cím megszerzéséhez. Mindezek alapján az értekezést minden szempontból alkalmasnak tartom a nyilvános vitára, és sikeres védelem esetén javaslom az MTA doktori cím odaitélését.

Budapest, 2024. augusztus 14.



Palkovics László