

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

Az antioxidáns válaszok előhangolása (priming) megváltoztatja a növények abiotikus és biotikus stresszreakcióit

PhD értekezés tézisei

Mátai Anikó

Témavezetők:

Dr. Hideg Éva
egyetemi tanár

Dr. Jakab Gábor
egyetemi tanár

PÉCS, 2019

1. Tudományos előzmények

Korunk legnagyobb kihívásai közé tartozik a globális éghajlatváltozás és a nyersanyagforrások kiapadása. Megoldásként egyre többen hangoztatják, hogy egy poszt-fosszilis, vagy másképpen „bio-társadalom” irányába kell fejlődünk, melyben minden felhasznált szerves nyersanyag (élelmiszer, üzemanyag, stb.) növényi eredetű. Ehhez a jelenlegi növénytermesztési módszerekkel előállított biomassza nem elégséges, szükség van növényeink „újratervezésére”. Ezt végbevihetjük a szó szűkebb értelmében, modern molekuláris technológiák alkalmazásával, vagy a növényi genom által kódolt potenciál minél nagyobb mértékű kiaknázásával. Utóbbihoz nagyon fontos alaposan megismernünk a növények természetes élettani folyamatait.

Reaktív oxigén származékok (ROS) a növényi sejt természetes, alapvető élettani funkciókat ellátó működése során keletkezhetnek a kloroplasztiszban, a mitokondriumokban, a peroxiszómákban, a plazmamembránban, az apoplasztban, a sejtfalban vagy az endoplazmatikus retikulumban (Goraya és Asthir, 2016). Közéjük tartoznak: az O_2 energiaelnyelése során keletkező szinglett oxigén (1O_2), illetve elektronfelvétellel kialakuló szuperoxid aniongyök ($O_2^{\cdot-}$), hidrogén-peroxid (H_2O_2) és hidroxilgyök ($\cdot OH$) (Apel és Hirt, 2004). Az antioxidánsok közé sorolunk minden olyan enzimátikus és nem-enzimátikus molekulát, amely viszonylag alacsony koncentrációban is nagyobb affinitással lép reakcióba ROS-sal, mint a többi biomolekula (DNS, fehérje, lipid), így megelőzve azok károsodását (Gill és Tuteja, 2010).

Azokat a környezeti elemeket, melyek stresszválaszt váltanak ki, stresszoroknak nevezzük. A stresszorokat természetes és mesterséges tényezőkre szokás csoportosítani. Mesterségesnek tekintünk minden, emberi tevékenységhez kapcsolódó stresszort (pl.: légszennyezettség, nehézfém-szennyezés, savas eső, megnövekedett UV sugárzás, xenobiotikumok, stb.). A természetes stresszorok lehetnek biotikusak vagy abiotikusak. A biotikus tényezők közé a növények kórokozói (vírus, baktérium, gomba) és kártevői (rovarok, csigák, növényevő gerincesek) tartoznak, míg az abiotikus tényezők közé olyan faktorokat sorolunk, mint pl.: magas fény, fagy, hő, szárazság, só, tápanyaghiány.

Egyetlen környezeti tényező hatásaival szemben a növény lehet rezisztens/ellenálló vagy szenzitív/érzékeny. Azonban a növényekre természetes körülmények között egyszerre több tényező fejti ki a hatását. Két tényezőhöz való alkalmazkodás során keresztellenállóság vagy keresztérzékenység jöhet létre (Jansen és mtsai., 2019). Keresztellenállóság alatt azt a jelenséget értjük, amikor egy tényezőhöz való alkalmazkodás során egy másik tényezővel

szemben is tolerancia alakul ki. A keresztérzékenység ennek a jelenségnek az ellentéte. Indukált keresztellenállóságot úgy lehet elérni, hogy az egyik környezeti tényező aktivált állapotba hozza a növény védelmi rendszerét, ezzel felkészítve a másik tényező megjelenésére, mely az irodalomban primingként szerepel (Conrath és mtsai., 2006). Ezt az elvet követve lehetőségünk van természetes vagy mesterséges faktorok alkalmazásával környezetbarát növényvédelmi eljárások kialakítására (Wargent és mtsai., 2011).

2. Célkitűzések

A növények sikeres alkalmazkodását az őket körülvevő változó környezeti körülményekhez az antioxidánsok és prooxidánsok közötti egyensúly határozza meg. A növényi stresszválaszok értékeléséhez mindkét csoport vizsgálatára szükség van. A természetes válasz megismerése után, a védelmi jelátviteli útvonalak átfedésének kihasználásával lehetőség nyílna arra, hogy priming (az antioxidáns állapot egy előkezeléssel történő megváltoztatása) révén az azt követő stresszel szemben ellenállóbbá tegyük növényeinket. A fent vázolt összetett probléma megoldása túlmutat egy doktori disszertáció keretein, a jelen értekezésben bemutatott munkában a következő alapvető kérdésekre kerestük a választ:

1. A H_2O_2 , mint stresszt jelző molekula.

- 1.1. Gyors és költséghatékony spektrofotometriás módszer optimalizálása levélkivonatok H_2O_2 tartalmának meghatározásához.
- 1.2. Milyen szerepe van a H_2O_2 -nak a szőlő Bois noir fitoplazma betegségből való felépülésében?

2. A β -aminovajsav, a hatékonyabb antioxidáns válasz indukálója.

- 2.1. Felépül-e a szőlő β -aminovajsav kezelés hatására vírusos betegségből?
- 2.2. Módosítja-e a β -aminovajsav kezelés a dohánylevelek UV-B sugárzásra adott válaszát?

3. Az UV-B, a növényi stressztűrő képesség modulátora.

- 3.1. Az UV-B kezelés javít-e a dohánylevelek szárazságtűrő képességén?
- 3.2. Milyen hatása van az UV-B kezelésnek a fejlődő dohánylevelek szárazságtűrő képességére?

3. Anyagok és módszerek

Vizsgált növények és alkalmazott kezelések

A kontrollált környezetben végzett szárazság kezeléssel (10 napos vízmegvonással elért 40%-os tömegcsökkenés) egybekötött UV-B hatás vizsgálatokhoz *N. benthamiana* L., míg kombinált β -aminovajsav (BABA, egyszeri kezelés 290 μ M végkoncentrációban) és UV-B mérésekhez *N. tabacum* L. növényeket használtunk. A növénynevelő kamrákat hosszú nappalos időszak szerint állítottuk be: 16 óra, 175 μ mol/m²/s PAR, 25 °C és 8 óra, sötét, 20 °C, állandó 70%-os relatív páratartalom. Az alkalmazott UV-B 5,4 kJ/m²/d (BABA kezeléssel kísérelt esetben) vagy 6,9 kJ/m²/d (szárazság kezeléssel kísérelt esetben) biológiailag hatékony sugárzásnak felelt meg (számítás Flint és Caldwell 2003-as munkája alapján).

Szőlő levélsodródás vírus 1 (grapevine leafroll associated virus 1, GLRaV-1) fertőzött Olasz rizling, Korai piros veltelini és Leányka szőlőtőkéről (*Vitis vinifera* L.) származó kétrügyes fás dugványokat gyökerezettünk egyesével, 300 ml nedves perlitben üvegházi körülmények között. BABA kezelésüket az első levelek megjelenésekor kezdtük meg, amit hetente megismételtünk, és összesen 6 héten keresztül tartottuk fenn. A Bois noir fitoplazma fertőzés hatását egy Villány melletti magántulajdonban lévő Kékfrankos (*Vitis vinifera* L.) szőlő ültetvény egyedein vizsgáltuk. A tábla állományában természetes úton bekövetkezett fertőzöttséget 2014 őszén gyűjtött levélmintákból igazoltuk. Fő méréseinket 2015 nyarán és őszén végeztük el ugyanazon a 8 tőkén.

Fotoszintézis mérések és levélpigment analízis

Infravörös gáz analizátor (IRGA) segítségével mértünk fotoszintetikus aktivitást (A , μ mol CO₂/m²/s), vízpára veszteséget (E , mmol H₂O/m²/s), sztóma konduktanciát (g_s , mol H₂O/m²/s), intercelluláris CO₂ koncentrációt (C_i , μ mol CO₂/mol) és vízhasznosító képességet (WUE, μ mol CO₂/mmol H₂O). Változó klorofill fluoreszcencia (PAM) alapján a II fotokémiai rendszer (PSII) sötét adaptálás után mérhető maximális kvantum hatásfokát (F_v/F_m), a fényhez alkalmazkodott levelek PSII fotokémiai hatékonyságát ($Y(II)$), a szabályozott nem fotokémiai kioltást ($Y(NPQ)$) és a nem szabályozott nem fotokémiai kioltást ($Y(NO)$) Klughammer és Schreiber (2008) munkája alapján számoltuk ki. A levelek klorofill és flavonoid tartalmának becslésére DUALEX® Scientific nem invazív optikai műszert használtunk (Goulas és mtsai., 2004).

Hidrogén-peroxid tartalom meghatározás

Levélkivonatok H_2O_2 tartalmának meghatározására kálium-jodid (KI), 3,3'-diaminobenzidin (DAB) és xylenol orange (XO) alapú spektrofotometriás módszereket hasonlítottunk össze, melyeket a korábban leírtaknak megfelelően készítettünk el (Velikova és mtsai., 2000; Šnyrychová és mtsai., 2009; Sigma-Aldrich Technical Bulletin, 2013). Az abszorpciós tulajdonságok leírására, illetve a mérhető tartomány meghatározásához 1-100 nM H_2O_2 koncentrációsorot készítettünk 100 μL desztillált vízben, 100 mM kálium-foszfát pufferben, 70% (v/v) etanolban vagy 6% (v/v) TCA-ban (triklórecetsav) oldva.

A módszerek összehasonlító elemzése alapján (Mátai és Hideg, 2017) saját mintáink H_2O_2 tartalmának megállapításához 100 mg friss tömegű levélkorongokat 1 mL 6% TCA-val dörzsmozsárban jégen eldörzsöltük. A kivonatokat azonnal 10 percig 4 °C-on 15.000 x g-n centrifugáltuk, majd a felülúszókból 100 μL -t mértünk 1 mL XO oldatba, 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, végül az abszorpciós maximumot 560 nm-en mértük.

Teljes és specifikus antioxidáns kapacitás mérések

Az ABTS^{•+} (2,2'-azino-bisz-(3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav)) kationgyök) redukcióján alapuló Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilkromán-2-karboxilsav) ekvivalens teljes antioxidáns kapacitás (TEAC) mérését a korábban leírtaknak megfelelően végeztük el (Majer és Hideg, 2012). A minták elektron átadáson alapuló teljes antioxidáns kapacitását vasredukáló képességük (FRAP, ferric reducing antioxidant power) alapján állapítottuk meg (Szöllősi és Szöllősi-Varga, 2002).

$^1\text{O}_2$ semlegesítő képesség méréséhez a metilénkék és a DPBF (2,5-difenil-3,4-benzofurán) vörös fény hatására bekövetkező reakcióját használtuk fel 40/60% (v/v) metanol/víz közegben (Majer és mtsai., 2014). Nem-enzimatis H₂O₂ semlegesítő képesség vizsgálatakor a levélkivonatokhoz kálium-foszfát pufferben (100 mM, pH 7,0) oldott KI-t és H₂O₂-t (Csepregi és Hideg, 2016), illetve a mérést befolyásoló enzimek aktivitását megakadályozandó 20% (v/v) etanolt adtunk (Mátai és mtsai., 2019b). $^{\bullet}\text{OH}$ semlegesítő antioxidáns kapacitás mérésekor a levélkivonatokat 50 mM foszfát pufferben tereftálsavval elegyítettük, $^{\bullet}\text{OH}$ forrásként EDTA, FeSO₄, aszkorbát és H₂O₂ tartalmú oldatot használtunk (Šnyrychová és Hideg, 2007).

Szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitás méréséhez NBT-t (nitroblue tetrazolium) és riboflavint tartalmazó kálium-pufferhez (50 mM, pH 7,5) adtunk a kivonatokból Song és mtsai., 2007-es tanulmánya alapján. A minták peroxidáz (POD) aktivitásának elemzéséhez

OPD-t (orto-feniléndiamin) (Fornera és Walde, 2010) (*N. benthamiana*) vagy ABTS-t (Childs és Bardsley, 1975) (*N. tabacum*) használtunk.

Polimeráz lánreakció (PCR) alapú mérések

Fitoplazma fertőzöttség kimutatására teljes DNS tartalom tisztítása után, az Európai és Mediterrán Növényvédelmi Egyesület javaslatára (EPPO, 2007) nested PCR-t alkalmaztunk. Az első reakcióhoz az alábbi programot futtattuk le: 1. 92 °C 90 sec, 2. 92 °C 40 sec, 3. 55 °C 40 sec, 4. 72 °C 70 sec, 5. GO TO 2 29x, 7. END. A PCR termékeket 1000x-re hígítottuk. A második reakcióhoz a következőképpen állítottuk be a programot: 1. 92 °C 90sec, 2. 92 °C 40 sec, 3. 55 °C 40 sec, 4. 72 °C 70 sec, 5. GO TO 2 34x, 6. 72 °C 120 sec, 7. END.

GLRaV-1 vírussal való fertőzöttség kimutatásához teljes RNS tartalom tisztítása és a köpenyfehérjét kódoló génre tervezett primerrel való cDNS szintézist követően az alábbi PCR programot használtuk: 1. 94 °C 4 min, 2. 94 °C 30 sec, 3. 53 °C 45 sec, 4. 72 °C 1 min, 5. GO TO 2 29x, 6. 72 °C 5 min, 7. END.

A vírusfertőzés hatására bekövetkező növényi védelmi válaszreakciók aktivitásának ellenőrzésére teljes RNS tartalom tisztítása és Oligo(dT)₁₈ primerrel való cDNS szintézist követően a GST1 (glutation-S-transzferáz), a HSR1 (hiperszenzitív reakció), a PR1 (patogenezishez köthető fehérje 1) és a PR4 (patogenezishez köthető fehérje 4) markergének expresszióját elemeztük, kontrollként a β -aktint alkalmaztuk. Mindegyik gén expressziójának elemzésekor az alábbi PCR programot használtuk: 1. 94 °C 4 min, 2. 94 °C 30 sec, 3. 56 °C 45 sec, 4. 72 °C 1 min, 5. GO TO 2 34x, 6. 72 °C 5 min, 7. END.

Statisztikai elemzések

A mért élettani és biokémiai paramétereket a különböző kezelési csoportokban $n=3-5$ biológiai ismétlésben mértük. A csoportátlagok páronkénti összehasonlítására Student-féle kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Különbözőnek két csoport átlagot a nullhipotézis $p<0,05$ valószínűsége esetén tekintettünk.

A kétféle kezelés kombinált hatásának elemzéséhez kétutas ANOVA-t alkalmaztunk négy növénycsoport (1-1 faktor külön, a két faktor együttesen, és kezeletlen kontroll) átlagait összehasonlítva. Amennyiben a teszt nullhipotézise (minden csoportátlag egyenlő) $p<0,05$ valószínűséggel elvetethető volt, post-hoc tesztként Tukey-próbát alkalmaztunk az egyes faktorok hatásainak, illetve a két faktor interakciójának igazolására, ezeket $p<0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

A t-próba kivitelezésére az MS Excel Analysis ToolPak (2007-es verzió, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), az ANOVA vizsgálatokhoz a PAST 3.20 programot használtuk (Hammer és mtsai., 2001).

4. Eredmények és megvitatásuk

H₂O₂-tartalom meghatározása speciális (spektrofotometriás) megközelítést igényel

Az irodalomban leggyakrabban előforduló spektrofotometriás metodikákban KI-ot, DAB-t vagy XO-t használnak. Ezeket a módszereket az optimális eljárás kiválasztása érdekében három lépésben végeztük el, mindegyik lépésben szűkítettük azoknak a kromofór és izoláló oldat kombinációknak a számát, melyek tényleg megfelelnek a levélkivonatok H₂O₂ tartalmának meghatározására. Először az oxidált kromofór abszorpciós tulajdonságait vizsgáltuk, másodsor a mérhető H₂O₂-koncentráció tartományát állapítottuk meg, harmadszor pedig azt elemeztük, hogy más anyagcseretermékek zavarják-e a mérést. Végezetül a levélkivonatokhoz H₂O₂-ot adtunk, melynek a visszamérhetőségét kívántuk tesztelni.

Elvégzett kísérleteink alapján a három kromofór közül a XO felelt meg minden kitételnek legjobban a levelek H₂O₂ tartalmának mérésére, mind 6% TCA-val mind pedig 70% etanollal készült kivonatok esetében. Bármelyik oldószerrel történik is a mérés, szükségesnek találtuk a szokásos, oldószerben felvett kalibráció mellett egy olyan H₂O₂ kalibráló koncentrációsor alkalmazását, ami levélkivonatot is tartalmazott. A két kalibrálósor meredekségének eltéréséből megállapítható korrekcióval pontosabban tudjuk mintáink H₂O₂ tartalmát megállapítani (Mátai és Hideg, 2017). Pontos koncentráció, illetve annak változásának ismeretében pedig egyszerűbbé válik a H₂O₂ adott fiziológiai folyamatban, pl.: biotikus stressz esetén betöltött szerepének vizsgálata. Az általunk optimalizált módszer egyik alkalmazása szőlőlevelek Bois noir fitoplazma fertőzöttségének vizsgálatához kapcsolódóan történt.

Bois noir fitoplazma betegségből való felépülés mégsem igényel H₂O₂-ot

Egy Villányhoz közeli Kékfrankos (*Vitis vinifera* L.) szőlőültetvényen néhány tőke fitoplazma-fertőzöttség tüneteit mutatta. Ennek ellenőrzéséhez 2014 őszén gyűjtött levélmintákból DNS tisztítás után nested PCR-t alkalmaztunk, melynek segítségével 'Candidatus Phytoplasma solani' jelenlétét igazoltuk. A következő évben két alkalommal, júliusban és szeptemberben gyűjtöttünk levélmintákat ugyanazokról a tőkéről az ismételt

fertőzöttség-teszthez. A nyári mintavétel alkalmával vizsgáltuk a levelek gázcseréjét, fotokémiai teljesítményét és H₂O₂ tartalmát is, melyeket tudomásunk szerint BN fertőzött Kékfrankos esetében még nem vizsgáltak. Nyáron egy, míg ősszel három tőke esetében volt a BN-t okozó fitoplazma kimutatható. Néhány növényből, melyek 2014-ben fertőzöttek voltak, 2015-ben nem mutattuk ki a BN fitoplazmát, vagyis felépültek a betegségből (az angol szakkifejezéssel élve 'recovery'-n mentek keresztül). A 2016-os évre a vizsgált szőlőtőkék mindegyike felépült a fitoplazma fertőzöttségéből, ezért a felépülés folyamatát vizsgáló kutatásunkat, és egy hatékony növényvédelmi eljárás kidolgozását nem tudtuk folytatni.

Más fitoplazma betegségek esetében a felépült növényekben nagymértékű H₂O₂ akkumulációt írtak le (Gambino és mtsai., 2013; Musetti és mtsai., 2005), ezért az általunk vizsgált Kékfrankos tőkék esetében hasonló eredményre számítottunk. Azonban azt tapasztaltuk, hogy a BN fertőzésből felépült növények H₂O₂ tartalma ugyanolyan volt, mint az egészséges társaiké. A magasabb H₂O₂ tartalom a fertőzött egyedek esetében is inkább annak a jele, hogy a növényben megtalálható a patogén (amit esetenként csak ősszel lehetett igazolni), semmint az adott levél aktuális fertőzöttségére adott válasz. Mindez azt mutatja, hogy a H₂O₂ a '*Candidatus* Phytoplasma solani' fertőzött Kékfrankos szőlőfajta esetében valószínűleg a biotikus stresszor felismerése után keletkező jelmolekula és nem a felépülési folyamat elindítója (Mátai és mtsai., kézirat elbírálás alatt).

A β-aminovajsav segítheti a szőlő vírusos betegségből való felépülését

Vannak olyan betegségek, melyekből a növények természetes úton nem tudnak felépülni. Ilyenek például a szőlő (*Vitis vinifera* L.) vírusos megbetegedései is. Megoldást jelenthet, ha a vírusfertőzött növényben keresztellenállóságot váltunk ki a patogénnel szemben. Ehhez GLRaV-1 fertőzött Olasz rizling, Korai piros veltelíni és Leányka szőlőtőkékről származó kétrügyes fás dugványokat kezeltünk 2,9 mM koncentrációjú BABA törzsoldattal az első levelek megjelenésekor (még rügy állapotban), amit 6 héten keresztül hetente megismételtünk. Mindegyik növényről három eltérő korú levelet analizáltunk, egyet-egyét a hajtás alsó (A), középső (K) illetve felső (F) szakaszáról.

A biotikus stresszválaszokban jelentős SA- illetve JA-függő jelátviteli útvonalak aktivitásának vizsgálatához egy-egy patogenezishez köthető (PR, pathogenesis related) fehérje génjének, mint markergének expresszióját vettük alapul. A *PR-1* a SA-függő védelmi válaszokhoz tartozik, míg a *PR-4* a JA-függő jelátvitel részét képezi. Azokban a kezeletlen kontroll növényekben, melyek fiatalabb leveleiben nem mutattuk ki a patogént, mindkét útvonal aktiválódott valamennyi levélszinten. BABA kezelésben részesült növényeket

vizsgálva azt találtuk, hogy nem szűnt meg a fertőzöttség, a vírus továbbra is jelen volt a levelekben. A PR fehérjék kifejeződését elemezve enyhe fajtától való függést találunk. A kezelt Olasz rizling és Korai piros veltelíni növényekben a mintázat hasonló, mint a kontrollokban. Ezzel szemben a Leányka fajtájú növények leveleiben a fehérjék génjei kevésbé aktívak, ráadásul vírus titer csökkenés olyan növényben is megfigyelhető, amelyikben egyik vizsgált PR gén sem expresszáldott. Eredményeink alapján a GLRaV-1 fertőzöttséggel szemben mind a SA-függő, mind a JA-függő védelmi útvonalra szükség van (eltérően a klasszikus SA és JA antagonizmus modellel). Valamint valószínűsíthető, hogy a BABA nem ezeknek a jelátviteli útvonalaknak az aktiválásával járul hozzá a fertőzöttség csökkenéséhez (Csikászné Krizsics és mtsai 2014).

A β -aminovajsav módosítja az UV-B sugárzásra adott antioxidáns válaszokat

Nemrégiben felfedezték, hogy a BABA alacsony koncentrációban természetes módon van jelen a növényekben, ami abiotikus vagy biotikus stresszor megjelenésekor akár a tízszeresére is növekedhet (Thevenet és mtsai., 2017). Ennek fényében érdemes megvizsgálni, hogy a BABA milyen hatással lehet a növények nem-enzimatikus antioxidáns rendszerére és hogyan módosítja a stresszre adott antioxidáns válaszokat. Vizsgálatunkhoz dohány (*N. tabacum*) növényeket BABA oldattal kezeltünk és ezt követően több napos, alacsony dóziszú UV-B kezelést alkalmaztunk. Ezután a fotokémiai folyamatokra, pigment- és H₂O₂-tartalomra, UV abszorbeáló kapacitásra, teljes antioxidáns kapacitásokra, valamint a nem-enzimatikus H₂O₂ és [•]OH semlegesítő képességekre gyakorolt hatást elemeztük.

Mind a BABA, mind az UV-B kezelés növelte a teljes nem-enzimatikus antioxidáns kapacitásokat, habár az UV-B nagyobb mértékben. A két tényező hatása a kombinált kezelésben összeadódott. Az összeadódó hatás vagy annak köszönhető, hogy a BABA és az UV-B különböző vegyületcsoportok szintézisét stimulálja, vagy pedig ugyanazon vegyületek mennyiségét növelik, de a szabályozó folyamatok eltérő pontjain hatnak. A flavonoid index és az UV abszorbeáló kapacitás növekedéseinek összeadódása a kétfaktoros kísérletben inkább az előbbi feltételezést támogatja. Azonban a BABA és az UV-B hatására bekövetkező ROS-specifikus antioxidáns válaszok között fellépő kölcsönhatás egy bonyolultabb mechanizmusra utalnak. Külön-külön mindkét tényező ugyanis pozitív hatással rendelkezett, viszont a kettősen kezelt levelek már nem különböztek a kezeletlenektől H₂O₂ semlegesítő képességben. Ennek magyarázatára az alábbi hipotézist állítottuk fel: mivel a BABA csökkenti a H₂O₂-koncentrációt, ezért a BABA-kezelt levelekben kevésbé szükséges a magas nem-enzimatikus H₂O₂ semlegesítő antioxidánsok mennyiségének emelkedése az UV-B

sugárzáshoz történő sikeres alkalmazkodáshoz. Következésképpen a BABA-kezelt növények kevésbé vannak kitéve a H_2O_2 -ből keletkező $\cdot OH$ károsító hatásának, így ezek a minták alacsonyabb $\cdot OH$ semlegesítő képességgel rendelkeznek. Ez a kölcsönhatás a BABA-kezelés és az UV-B sugárzásra adott alkalmazkodási folyamatok között eltér a más abiotikus tényezőkkel szemben leírtaktól (Mátai és mtsai., 2019a).

Az UV-B kezelés javít a levelek szárazságtűrő képességén

Az alacsony dózisu UV-B sugárzásra adott alkalmazkodási válasz átfed számos más, potenciális stresszor megjelenésére adott válasszal, ami felveti a kérdést, hogy az UV-B sugárzás keltette antioxidánsok segítheti-e a növények alkalmazkodását más stressz körülményekhez. Munkánk során dohány (*N. benthamiana*) növények vízmegvonással elért szárazság és alacsony dózisu, akklimatív UV-B hatására bekövetkező antioxidáns válaszait elemeztük. A két tényező egyidejű alkalmazása a természetben is előforduló többszörös stressz hatás modellezésére irányult. A két kezelést egymás után alkalmazva pedig azt kívántuk megvizsgálni, hogy egy UV-B előkezelés befolyásolja-e a szárazságra adott válaszokat. Az alacsony dózisu UV-B előkezelés stressztolerancia módosító hatását egy tanszékünkön jelenleg is folyó nagyobb kísérletsorozat részeként vizsgáltuk, mely arra irányul, hogy gazdasági növények szállíthatóságát, illetve az előnevelt növények kiültetéssel járó stresszét csökkentjük. A dolgozatban bemutatott munkában az enzimikus és nem-enzimikus ROS-specifikus antioxidáns válaszokat vizsgáltuk az egyes tényezőkkel szemben külön-külön, illetve azok egymás utáni és párhuzamos alkalmazása esetén.

A vizsgált antioxidáns tulajdonságok mindegyike legalább ez egyik kezelés hatására emelkedett. Közülük volt olyan, amelyik vagy csak az UV-B sugárzás (SOD aktivitás, $\cdot OH$ semlegesítő képesség) vagy csak a szárazság (nem-enzimikus H_2O_2 semlegesítés) hatására nőtt, és ezek a válaszok szignifikánsak maradtak a kettős kezelések esetében is. Öt paraméter (peroxidáz aktivitás, flavonoid index, TEAC, FRAP és 1O_2 kioltó képesség) mind szárazság, mind UV-B kezelésre emelkedett, amennyiben ezeket külön-külön alkalmaztuk. Amikor azonban mindkét tényező egyszerre volt jelen, a peroxidáz-aktivitás változását csak az UV-B sugárzás befolyásolta szignifikánsan. A felsorolt további négy paraméterre mind a szárazság, mind az UV-B szignifikáns hatással volt a kettősen kezelt növények esetében. TEAC és FRAP esetében a két tényező hatása összeadódott; míg a flavonoid index esetében a szárazság és az UV-B egymás hatását erősítette, de ezek nem adódtak össze. Érdekes új megfigyelésünk, hogy az UV-B kezelésnek a besugárzást követően több napon át tartó pozitív hatása volt a flavonoid indexre és a FRAP-ra. Így az UV-B előkezelést követő szárazságra a

növények nagyobb mértékű teljes antioxidáns tartalom és epidermális flavonoid mennyiség növeléssel válaszoltak, mint az előkezelés nélkül alkalmazott szárazságra, bár ezek a paraméterek a szekvenciális kétfaktoros kezelés során nem mutattak olyan összeadhatóságot, mint a párhuzamos kezelés esetében. Az eredmények alapján az UV-B előkezelés képes fokozni a szárazság elleni védelmet a flavonoid-tartalom és a levelek teljes antioxidáns kapacitásának növelésével (Mátai és mtsai., 2019b).

A fiatal levelek természetes módon ellenállóbbak a szárazsággal szemben

Mivel a növények életük során folyamatosan növekednek, adott időpontban különböző korú és fejlettségi állapotú levelek is előfordulnak. A fejlődésbeli különbség befolyásolja a stresszre adott antioxidáns válaszokat is. Munkánk során ugyanazon *N. benthamiana* növények még fejlődésben lévő leveleit (FL) vizsgáltuk, mint amelyek kifejlett leveleinek (KL) elemzését az előző pont részletezi. A kezeletlen növények fejlődő levelei friss tömegben és klorofilltartalomban alulmaradtak a kifejlett levelekhez képest, de a Dualex műszerrel meghatározott flavonoid tartalmuk megegyezett. Fényhez adaptált fotokémiai jellemzőkben a FL és KL nem különböztek egymástól. A FL sokkal alacsonyabb teljes antioxidáns kapacitásokkal, peroxidáz aktivitással és kevesebb $^1\text{O}_2$ és $\cdot\text{OH}$ semlegesítő komponensekkel rendelkeztek a KL-hez képest, viszont SOD aktivitásban és a nem-enzimatis H₂O₂ semlegesítő komponensek mennyiségében felülmúlták azokat.

A szárazság csökkentette az FL és a KL friss tömegét is, viszont az UV-B csökkentő hatása csak KL-nél volt megfigyelhető. Még a tíznapos UV-B kezelésnek sem volt hatása a FL tömegére, ami egy teljes növényre kiterjedő összetett UV-B választ feltételez. Kísérleteinkben a szárazságkezelés (sem önmagában, sem UV-B kezeléssel együtt) nem váltott ki antioxidáns választ a FL-ben. Ugyanakkor az UV-B kezelésre is csak a nem-enzimatis antioxidánsok (TEAC, FRAP, $^1\text{O}_2$ és $\cdot\text{OH}$ kioltás) aktivitása emelkedett, az enzimeké nem. A vizsgált tulajdonságok közül az egyetlen, melyre az FL-ben a szárazság és az UV-B sugárzás együttes alkalmazása során a hatás összeadódott, a flavonoidszint növekedése volt, ami alátámasztja ezen speciális anyagcsere termékek központi szerepét a stressztoleranciában. Összességében azt tapasztaltuk, hogy a fiatal levelek természetes módon ellenállóbbak a szárazsággal szemben, valamint, hogy az UV-B sugárzásnak csak közvetlenül van hatása, ami a nem-enzimatis antioxidánsok aktivitásának emelkedésében mérhető (Mátai és mtsai., 2019b).

5. Összefoglalás

A növények enzimatis és nem-enzimatis antioxidánsokból álló összetett hálózattal rendelkeznek az oxidatív károsodás megelőzésére, illetve mérséklésére. A növények válaszait, a környezeti tényezők változásához történő alkalmazkodás sikerét az antioxidánsok és a prooxidánsok egyensúlya határozza meg. A különböző potenciális stresszorok aktiválhatnak hasonló antioxidáns válaszokat, vagyis az egyes tényezők befolyásolhatják a növények válaszát egy másikkal szemben. Ezt a kölcsönhatást a magunk javára fordítva képesek lehetünk megvédeni gazdasági növényeinket a különböző biotikus és abiotikus stresszhatásokkal szemben a természetben is jelenlévő tényezők használatával, a környezetre káros vegyszerek alkalmazása nélkül. Ennek az összetett kérdéskörnek a vizsgálata során az alábbi eredményeket értük el:

1. A H₂O₂, mint stresszt jelző molekula.

- 1.1. A levelek H₂O₂ tartalmát meghatározó irodalmi módszereket összehasonlítva optimalizáltunk egy xylenol orange kromofóron alapuló technikát.
- 1.2. Megállapítottuk, hogy a Kékfrankos fajtájú szőlő '*Candidatus Phytoplasma solani*' által okozott „Bois noir” fertőzésből történő felépülésében a H₂O₂ a biotikus stresszor jelenlétének indikátora és nem a felépülési folyamat elindítója.

2. A β-aminovajsav, a hatékonyabb antioxidáns válasz indukálója.

- 2.1. Megkezdtek egy olyan β-aminovajsav kezelés kidolgozását, amely segítheti a szőlő felépülését GLRaV-1 fertőzésből.
- 2.2. Leírtuk, hogy egyszeri β-aminovajsav kezelésnek is hosszú távú hatása van, valamint segíti a dohány UV-B sugárzáshoz való alkalmazkodását az antioxidáns kapacitás serkentése által.

3. Az UV-B, a növényi stressztűrő képesség modulátora.

- 3.1. Megállapítottuk, hogy az UV-B előkezelés hosszú távú hatásaként a közvetlenül besugárzott dohánylevelekben mérsékelte az azt követő szárazságkezelés kedvezőtlen hatásait.
- 3.2. Megfigyeltük, hogy az UV-B antioxidáns védelmet indukáló hatása csak a közvetlenül UV-B kezelt dohánylevelekben érvényesül, a fiatal levelek természetes módon ellenállóbbak a szárazsággal szemben.

6. Irodalomjegyzék

- Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373–399.
- Childs, R.E., Bardsley, W.G. (1975) The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azinodi-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* **145**, 93–103.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.-A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., Mauch-Mani, B. (2006) Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 1062–1071.
- Csepregi, K., Hideg, É. (2016) A novel procedure to assess the non-enzymatic hydrogen-peroxide antioxidant capacity of metabolites with high UV absorption. *Acta Biol. Hung.* **67**, 447–450.
- Csepregi, K., Hideg, É. (2018) Phenolic compound diversity explored in the context of photo-oxidative stress protection. *Phytochem. Anal.* **29**, 129–136.
- EPPO (2007) Diagnostic. Grapevine flavescence dorée phytoplasma. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **37**, 536–542.
- Flint, S.D., Caldwell, M.M. (2003) A biological spectral weighting function for ozone depletion research with higher plants. *Physiol. Plant* **117**, 137–144.
- Fornera, S., Walde, P. (2010) Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with *o*-phenylenediamine. *Anal. Biochem.* **407**, 293–295.
- Gambino, G., Boccacci, P., Margaria, P., Palmano, S., Gribaudo, I. (2013) Hydrogen peroxide accumulation and transcriptional changes in grapevines recovered from Flavescence dorée disease. *Phytopathol.* **103**, 776–784.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 909–930.
- Goulas, Y., Cerovic, Z.G., Cartelat, A., Moya, I. (2004) Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Appl. Opt.* **43**, 4488–4496.
- Goraya, G.K., Asthir, B. (2016) Magnificent role of intracellular reactive oxygen species production and its scavenging encompasses downstream processes. *J. Plant Biol.* **59**, 215–222.
- Jansen, M.A.K., Bilger, W., Hideg, É., Strid, Å., Aphalo, P., Brelsford, C., Klem, K., Máta, A., Llorens, L., Nezval, J., Nybakken, L., Ryan, L., Sharma, A., Schenke, D., Solhaug, K.A., Spunda, V., Verdager, D., Yan, Y., Urban, O. (2019) Editorial: Interactive effects of UV-B radiation in a complex environment. *Plant Physiol. Biochem.* **134**, 1–8.
- Klughammer, C., Schreiber, U. (2008) Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Appl. Notes* **1**, 27–35.

- Majer, P., Hideg, É. (2012) Developmental stage is an important factor that determines the antioxidant responses of young and old grapevine leaves under UV irradiation in a greenhouse. *Plant Physiol. Biochem.* **50**, 15–23.
- Majer, P., Neugart, S., Krumbein, A., Schreiner, M., Hideg, É., (2014) Singlet oxygen scavenging by leaf flavonoids contributes to sunlight acclimation in *Tilia platyphyllos*. *Environ. Exp. Bot.* **100**, 1–9.
- Mátai, A., Hideg, É. (2017) A comparison of colorimetric assays detecting hydrogen peroxide in leaf extracts. *Anal. Methods* **9**, 2357–2360.
- Mátai, A., Jakab, G., Hideg, É. (2019a) Single dose β -aminobutyric acid irrigation modifies tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf acclimation to consecutive UV-B treatment. *Photoch. Photobio. Sci.* **18**, 359–366.
- Mátai, A., Nagy, D., Hideg, É. (2019b) UV-B strengthens antioxidant responses to drought in *Nicotiana benthamiana* leaves not only as supplementary irradiation but also as pre-treatment. *Plant Physiol. Biochem.* **134**, 9–19.
- Mátai, A., Teszlák, P., Jakab, G. Recovery of *Vitis vinifera* cv. 'Kékfrankos' from 'Bois noir' disease does not depend on hydrogen peroxide accumulation. *Elbírálás alatt*
- Musetti, R., Sanità di Toppi, L., Martini, M., Ferrini, F., Loschi, A., Favali, M.A., Osler, R. (2005) Hydrogen peroxide localisation and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European stone fruit yellows. *Eur. J. Plant Pathol.* **112**, 53–61.
- Sigma-Aldrich Technical Bulletin (2013) <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/pd1bul.pdf>.
- Šnyrychová, I., Ayaydin, F., Hideg, É. (2009) Detecting hydrogen peroxide in leaves in vivo - a comparison of methods. *Physiol. Plant.* **135**, 1–18.
- Šnyrychová, I., Hideg, É. (2007) The first application of terephthalate fluorescence for highly selective detection of hydroxyl radicals in thylakoid membranes. *Funct. Plant Biol.* **34**, 1105–1111.
- Song, N.H., Yin, X.L., Chen, G.F., Yang, H. (2007) Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils. *Chemosphere* **68**, 1779–1787.
- Szöllősi, R., Szöllősi-Varga, I. (2002) Total antioxidant power in some species of Labiatae, adaptation of FRAP method. *Acta Biol. Szeg.* **46**, 125–127.
- Thevenet, D., Pastor, V., Baccelli, I, Balmer, A., Vallat, A., Neier, R., Glauser, G., Mauch-Mani, B. (2017) The priming molecule β -aminobutyric acid is naturally present in plants and is induced by stress. *New Phytol.* **213**, 552–559.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* **151**, 59–66.

Wargent, J.J., Elfadly, E.M., Moore, J.P., Paul, N.D. (2011) Increased exposure to UV-B radiation during early development leads to enhanced photoprotection and improved long-term performance in *Lactuca sativa*. *Plant Cell Environ.* **34**, 1401–1413.

7. Publikációs jegyzék

A dolgozat alapját képző bírált folyóiratban megjelent publikációk

Mátai, A., Jakab, G., Hideg, É. (2019) Single dose β -aminobutyric acid irrigation modifies tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf acclimation to consecutive UV-B treatment. *Photoch. Photobio. Sci.* **18**, 359–366. **Q2, IF: 2,902**

Jansen, M.A.K., Bilger, W., Hideg, É., Strid, Å., Aphalo, P., Brelford, C., Klem, K., **Mátai, A.**, Llorens, L., Nezval, J., Nybakken, L., Ryan, L., Sharma, A., Schenke, D., Solhaug, K.A., Spunda, V., Verdaguer, D., Yan, Y., Urban, O. (2019) Editorial: Interactive effects of UV-B radiation in a complex environment. *Plant Physiol. Biochem.* **134**, 1–8. **Q1, IF: 2,718**

Mátai, A., Nagy, D., Hideg, É. (2019) UV-B strengthens antioxidant responses to drought in *Nicotiana benthamiana* leaves not only as supplementary irradiation but also as pre-treatment. *Plant Physiol. Biochem.* **134**, 9–19. **Q1, IF: 2,718**

Mátai, A., Hideg, É. (2017) A comparison of colorimetric assays detecting hydrogen peroxide in leaf extracts. *Anal. Methods* **9**, 2357–2360. **Q1, IF: 2,073**

Czégény, Gy., **Mátai, A.**, Hideg, É. (2016) UV-B effects on leaves – Oxidative stress and acclimation in controlled environments. *Plant Sci.* **248**, 57–63. **D1, IF: 3,437**

Csikászné Krizsics A., **Mátai A.**, Nagy Á., Kovács S., Végh B.É., Werner J., Jakab G. (2014) Indukált rezisztencia alkalmazása a szőlő szürkerothadás és vírusfertőzés okozta kártétele mérséklésére. *G. Agric.* **19**, 73–77. **IF: –**

A dolgozat alapját képző elbírálás alatt álló publikációk

Mátai, A., Teszlák, P., Jakab, G. Recovery of *Vitis vinifera* cv. ‘Kékfrankos’ from ‘Bois noir’ disease does not depend on hydrogen peroxide accumulation. *Elbírálás alatt*

A dolgozat alapját képző konferencia közlemények

Mátai, A., Nagy, D., Hideg, É.: A tale of two factors: Can UV-B modify drought responses? In: Gaberscik, A., Germ, M., Neugart, S., Jenkins, G.I., Robson, M., Abram, D. (szerk.) Abstracts of the UV4Plants International Association of Plant UV Research 2nd Network Meeting. Ljubljana, Szlovénia: Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, 2018, p. 39. **ISBN: 978-961-6822-47-3**

Mátai, A., Nagy, D., Hideg, É.: External factors modifying acclimative leaf UV-B responses. In: Christiansen, S.K., Bendevis, M. (szerk.) Abstract Book for the Plant Biology Europe Conference in Copenhagen. Koppenhága, Dánia: Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, 2018, p 82. **ISBN: 978-87-996274-1-7**

Mátai, A., Jakab, G., Hideg, É.: Alacsony dózisú UV-B sugárzásra adott válaszában módosítása küldő tényezőkkel. In: Szalka, É., Bali Papp, Á., Molnár, Z. (szerk.) XXVII. Óvári Tudományos Napok 'Fenntartható Agrárium és Környezet Az Óvári Akadémia 200 Éve – Múlt, Jelen, Jövő' Összefoglalói. Mosonmagyaróvár, Magyarország: VEAB Agrártudományi Szakbizottság, Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, 2018, p. 211. **ISBN: 978-615-5837-14-2**

Mátai, A., Nagy, D., Hideg, É.: Antioxidáns szintű válaszok *Nicotiana benthamiana* növényekben szárazság és UV-B sugárzás hatására. In: Györgyey, J. (szerk.) A Magyar Növénybiológiai Társaság XII. Kongresszusa. Szeged, Magyarország: Magyar Növénybiológiai Társaság, 2017. p. 36. **ISBN: 978-963-12-9736-2**

Mátai, A., Nagy, D., Hideg, É.: Combined effects of drought and UV in growth chamber experiments. In: Urban, O., Jansen, M.A.K. (szerk.) Modulation of plant UV-responses by environmental factors. Book of Abstracts. Brno, Csehország: Global Change Research Institute, The Czech Academy of Sciences, 2017. p. 14. **ISBN: 978-80-87902-18-9**

Mátai, A., Teszlák, P., Hideg, É., Jakab, G.: Physiological changes in field grown grapevine leaves infected by „Bois noir” phytoplasma. In: Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress Abstracts. Paper ID: 248.

Mátai, A., Rácz, A., Czégény, Gy., Hideg, É.: Balancing between H₂O₂ generation and neutralisation during acclimation to UV-B. In: Czégény, Gy., Hideg, É. (szerk.) 1st Network Meeting of UV4Plants, International Association for Plant UV Research: Abstract Book. Pécs: Pécsi Tudományegyetem Biológiai Intézet, 2016. p. 52. **ISBN:978-963-429-048-3**

Mátai, A., Werner, J., Szegedi, E., Jakab, G.: BABA induced resistance against virus infection in grapevine. Konferencia helye, ideje: Aachen, Németország, 2015.09.06-2015.09.10. PR Proteins and Induced Resistance against Pathogens and Insects

Mátai, A., Czégény, Gy., Hideg, É.: Detecting hydrogen peroxide in tobacco leaves responding to light stress. Konferencia helye, ideje: Aveiro, Portugália, 2015.08.31-2015.09.04. 16th Congress of the European Society for Photobiology

Csikász-Krizsics, A., **Mátai, A.,** Nagy, Á., Kovács, S., Végh, B., Werner, J., Jakab, G.: BABA (β-aminovajsav) által indukált szürkerothadás és vírusfertőzés elleni védelem szőlőben. Szőlőtermesztési és Borászati Tudományos Konferencia 2015.

Mátai, A., Jakab, G.: Effect of beta-aminobutyric acid treatment on the spread of grapevine viruses. In: Györgyey, J. (szerk.) 11th Congress of the Hungarian Society of Plant Biology: Book of Abstracts. MTA Szegedi Biológiai Központ, 2014. p. 50.

Csikász-Krizsics, A., **Mátai, A.,** Nagy, Á., Kovács, S., Végh, B., Werner, J., Jakab, G.: BABA (β-aminobutyric acid) induced resistance against grey mould and virus infection in grapevine. In: Bardin, M., Mauch-Mani, B., Mazzotta, S., Nicot, P., Pieterse, C., Poessel, J.-L., Ponchet, M., Schmitt, A. (szerk.) Induced resistance in plants against insects and diseases: Leaping from success in the lab to success in the field. Darmstadt: 2013. pp. 429-432. **ISBN:978-92-9067-267-8**

A dolgozat témakörén kívül megjelent publikációk

Kocsis, M., Csikász-Krizsics, A., Szata, B.É., Kovács, S., Nagy, Á., **Mátai, A.**, Jakab, G. (2018) Regulation of cluster compactness and resistance to *Botrytis cinerea* with β -aminobutyric acid treatment in field-grown grapevine. *Vitis* **57**, 35–40. **Q2, IF: 0,508**

Del-Castillo-Alonso, M.Á., Castagna, A., Csepregi, K., Hideg, É., Jakab, G., Jansen, M.A.K., Jug, T., Llorens, L., **Mátai, A.**, Martínez-Lüscher, J., Monforte, L., Neugart, S., Olejnickova, J., Ranieri, A., Schödl-Hummel, K., Schreiner, M., Soriano, G., Teszlák, P., Tittmann, S., Urban, O., Verdaguer, D., Zipoli, G., Martínez-Abaigar, J., Núñez-Olivera, E. (2016) Environmental Factors Correlated with the Metabolite Profile of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir Berry Skins along a European Latitudinal Gradient. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 8722–8734. **Q1, IF: 3,154**

Hideg, É., **Mátai, A.**, Bognár, B., Kálai, T.: EPR Detection (Spin Probes) In: Santi Nonell, Cristina Flors (szerk.) Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 2. 332 p. Cambridge: Royal Society of Chemistry (RCS), 2016. pp. 121-134. **ISBN:978-1-78262-697-8**

Kuczog, A., Galambos, A., Horváth, S., **Mátai, A.**, Kozma, P., Szegedi, E., Putnoky, P. (2012) Mapping of crown gall resistance locus *Rcg1* in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* **125**, 1565–1574. **Q1, IF: 3,658**

Tudományometriai adatok:

Kumulatív impakt faktor: 21,168 (a dolgozat alapját képző: 13,848)

Idézetek összesen: 48 (ebből független: 33)

h-index: 4