

Válasz Dr. Kocsis Lászlónak, az MTA doktorának
Hegedűs Attila: A csonthéjas gyümölcsök antioxidáns hatásában megnyilvánuló genetikai variabilitás jellemzése című akadémiai doktori értekezéséről készített bírálatára

Köszönöm Opponensemnek, Prof. Kocsis Lászlónak, az MTA doktorának, hogy elvállalta doktori értekezésem bírálatát. Köszönöm a kedvező megítélését, a részletes értékelést, a javaslatokat, felvetéseket és kérdéseket, melyekre az alábbiakban, sorrendben kívánok válaszolni.

Az Opponensem által feltárt kisebb-nagyobb szerkesztési-formai hibákat elismerem, és köszönöm, hogy felhívta ezekre a figyelmemet. Ezek közül kizárólag az L-gulonolaktón-oxidáz írásmódjára (a dőlt és antikva betűtípus keveredő használatára) szeretnék kitérni, illetve magyarázatot adni. Itt nem a betűtípusok inkonzekvens használatáról van szó, hanem törekvésem szerint tudatosan alkalmazott tipográfiai eszközökről. A HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org>) ajánlása, hogy a gének nevét dőlt betűvel, míg a gén által kódolt fehérjét antikva betűtípussal jelezzük. A legtöbb (jóllehet kétségtelenül nem az összes) tudományos folyóirat is átemelte ezt az ajánlást formai előírásai közé. Dolgozatomban valamennyi gén és géntermék jelölésekor ezt az irányelvet követtem.

Opponensem rámutat, hogy a Bevezetésben megemlítettem, a piros színt az antocianinok okozzák. Kérdése, hogy a kéket, a lilát stb. nem? A válasz természetesen igen, a csonthéjas gyümölcsök termésében ezek a színek a különböző antocianidin komponenseknek köszönhetők, és a környező sejtoldat pH értéke is jelentősen befolyásolja e vegyületek színét. Opponensem hiányolta, hogy a Bevezetés 3. bekezdésében nem neveztem meg az ott említett „nemesítési célként megjelenő új tulajdonságot”. Opponensem szerint ez nem egy tulajdonság, hanem a funkcionális táplálkozáshoz illesztett nemesítés. Úgy érzem, alig tapintható a különbség a megfogalmazásaink között: én az átlaghoz képest messze kiemelkedő, jelentősebb mértékű egészségi hatást neveztem tulajdonságnak, melynek elérése a nemesítés célja.

Egyetértek Opponensemmel, amikor A gyümölcs mint táplálék című fejezetet úgy jellemzi, hogy hiányos és nem tudományos, ugyanakkor örülök, hogy olvasmányosnak minősítette. Nyilvánvalóan nem lehetett céлом egy átfogó történeti tanulmány írása, hiszen nem vagyok történész. A fejezetet ugyanakkor nyíltan vállalt hiányosságai mellett is rendkívül fontosnak éreztem: egyfelől azt kívántam bemutatni, milyen mély gyökerei lehetnek a sokszor újnak hitt felismeréseinknek, másfelől ez a fejezet szellemi, emocionális keretet ad munkánknak, eredményeinknek. Úgy éreztem, négy oldalt feláldozhatok arra, hogy tágabb, a személyes viszonyulásomat is érintő összefüggés-rendszerbe ágyazzam a későbbiekben bemutatott tudományos eredményeket.

A következőkben a dolgozat értékelése közben fellelhető kérdésekre (minden esetben dőlt betűtípussal idézem azokat) kívánok válaszolni.

Az A-vitamin előanyaga, a β -karotin és más karotinoidok alfejezetben a második bekezdésben csak többszöri olvasásra derül ki, hogy mire vonatkozik a 3. sorban leírt „túlzott mennyiség mérgező” megfogalmazás, a retinolra?

Az állítás valóban a retinolra vonatkozik, hiszen az A-hipervitaminózis okozta toxicitást már a múlt század negyvenes éveinek elején kimutatták. Opponensemnek azonban igaza van, hogy szerencsésebb mondatszerkesztéssel egyértelmű lehetett volna a megfogalmazás.

A 29. oldal utolsó bekezdésében zárójelben említi a gyümölcsök között a faepret? Bizonyára a Morus alba, Morus nigra fajokra gondolt, aminek hétköznapi nevei eperfa. Furcsa a szerző által használt elnevezés.

Egyetértek azzal, hogy a *Morus* fajok közkeletű magyar elnevezése eperfa, ezt azonban az adott helyen nem használhattam, hiszen kifejezetten a fa termésére (gyümölcsére) vonatkozott az állítás (vagyis hogy a gyümölcs E-vitamin-tartalma jelentős). Az általam használt faeper megnevezést napjainkban széles körben használják (pl. faeper pálinka, faeper lekvár, sőt még a vámtarifa számok között is szerepel egy „földi szeder, faeper és kaliforniai málna frissen” tétel). Sajnos a magyar szakirodalom – gazdasági jelentéktelensége miatt – a közelmúltban nem is említette ezt a gyümölcsöt. A „faieper” elnevezésnek tájnyelvi gyökerei vannak (az Új Magyar Tájszótár szerint használata a XVIII. sz. végén Érendréd, Zilah környékén általános volt), ugyanakkor Rapaics Rajmund is ezt használja A magyar gyümölcs című kötetében, „fái eper”-ként. Az Akadémiai Helyesírási Szótár legújabb kötete is szerepelteti szójegyzékében a faeper kifejezést. Az eperfa termését Terpó András epergyümölcsként nevezte meg (Növényrendszertan, Mezőgazdasági Kiadó, 1986), a faeper mellett szinonimaként az eper szó szerepelt. A hazai kertészeti szaknyelv számóca néven ismeri a *Fragaria* gyümölcsét, ez azonban csak korlátozott mértékben nyert teret a köznyelvben, ahol továbbra is inkább földieper vagy egyszerűen eper e gyümölcs neve. A keveredés megelőzésére megoldás lehet az „eperfa gyümölcse” kifejezés is, amit például Jeszenszky Árpád használ a Magyarország Kultúrflórája 1972-es kötetében. Én azonban a faeper szó használatát éreztem a leginkább megfelelőnek, ami egyrészt egyszerűbb, rövidebb, a Rapaics-féle névhasználati hagyományon alapul, másfelől a kurrens szóhasználattal is harmonizál.

A készülőket idéző irodalomban nem említi Kállay és Tusnádi (2001) cikkét. Vagy ugyancsak célszerű lett volna a zöldségnövények esetében a cékláról is szólni idézve Takácsné Hájos Mária és Horváthné Almási Katalin (1991): „A párostenyésztés hatása a cékla színanyag tartalmára” művét, hogy ne csak nemzetközi irodalmakat citáljunk.

A külföldi irodalmak idézése mellett célszerűnek tartottam volna Kiss Erzsébet és munkatársainak ezen a területen végzett munkáját is idézni, akik megemlítik, hogy bizonyos fajták esetében a bogyószín változatok kialakulásáért az említett Gret1 retrotranszpozon VvMYBA1 transzkripció faktorba való inszercióján kívül más genetikai különbség is lehet felelős.

Opponensem fenti szavai elgondolkodtattak. Számításaim szerint a dolgozatomban szereplő 401 hivatkozás közül 59 magyar szerzők műve (ezek közül 20 közleménynek voltam társszerzője). Hogy ez kevés vagy sok, mindenki eldöntheti, az azonban bizonyos, hogy a fent említett 59 magyar munkára nem azért hivatkoztam, hogy „ne csak nemzetközi irodalmakat citáljak”. A szőlőről és a zöldségnövényekről mindössze említés esik a dolgozatomban, hiszen annak célja a csonthéjas gyümölcsök vizsgálata volt. Az Opponensem által említett munkáknak azonban igyekeztem utólag is utánajárni, a megjelölt közleményeket elolvastam. A cékla színanyagát, vagyis a betacianint és betaxantint vizsgálták Takácsné Hájos Mária és Horváthné Almási Katalin. E közlemény valószínűleg azért került el a figyelmemet, mert

ezek a vegyületek nem fordulnak elő a csonthéjas gyümölcsökben. Kiss Erzsébet Professzor Asszonytól személyesen érdeklődtem, és megtudtam, hogy az általuk azonosított, a bogyószín-változatok kialakításáért felelős mutációról szóló közleményük megjelenésre vár. A munkát érdeklődve várom, és ígérem, hogy minden releváns helyen hivatkozni fogom a jövőben.

A növényi anyag ismertetése esetén az 1. melléklet 135 genotípust ismerteti, a 76. oldalon 133 genotípusról van szó. Kiemelem, hogy ilyen sok faj és fajta vizsgálata nagyon nagy feladatot ró a kutatóra, mivel rengeteg adattal kell dolgoznia és a sok-sok értékes információból kell a legértékesebbeket a tudományos közösség elé tárni. Tehát nem tartom lényegesnek az elírást, de jó lenne tudni, hogy melyik az a kettő, amelyik kimaradt, vagy a 133 csak elírás?

A munka során 135 genotípus vizsgálatára került sor, a 133-as szám az Anyag és módszer fejezetben elírás.

A fizikai-kémiai paraméterek esetében mi alapján döntötték el az ismétlés számokat, hisz az egyik esetben 10-35, míg a másik esetben 3-10 ismétlésben dolgoztak?

A flavonoid-bioszintézisben résztvevő gének expressziós analízisét a gyümölcsök érése során jellemeztük, e vizsgálatoknál a fizikai-kémiai paramétereket 35 ismétlésben végeztük el, hogy eredményeink megbízhatóságát növeljük. Itt mindössze négy genotípus és öt érési állapot vizsgálatáról volt szó, tehát a mintaszám kezelhető volt a 35 párhuzamos mérés esetében is. A gyümölcs-genotípusok általános jellemzéséhez (135 minta) ennél kisebb mérésszámmal (10) választottunk, amely azonban elégségesnek bizonyult az érett gyümölcsök statisztikailag megbízható jellemzéséhez.

Az egyes antioxidáns kapacitást mérő módszerek esetében az ismétlések technikai jellegűek, vagy valós biológiai ismétlések voltak? Három ismétlésben történtek-e a vizsgálatok?

Egyértelműen „biológiai ismétlések” voltak, ellenkező esetben a vizsgálat megbízhatósága kétes lenne. Ahogyan azt a 4.19 fejezetben írtam „A fajták antioxidáns paramétereinek összehasonlítása során valamennyi fajta esetében három párhuzamos kivonást végeztünk.” A kivonatok mérésekor két-három technikai ismétlést is elvégeztünk, ami a módszer és a minták stabilitásának ellenőrzésére szolgált.

Az 54-56. oldalon leírtak részben ismétlődnek a 78-81. oldalakon. A korábbi leírást a szakirodalomból célszerű lett volna elhagyni. Az ismétlés persze sohasem árt.

Valóban mindkét helyen ugyanazon módszerekről esik szó, de az irodalmi áttekintésben a technika kémiai hátterét, a módszer által kínált előnyöket és használhatóságának korlátait ismertettem, míg az Anyag és módszer fejezetben a mérés legfontosabb reakciókörülményeit, a detektálás paramétereit, az értékek kiszámítását és a dimenziókat rögzítettem a lehető legtömörebben. Úgy érzem, ezekre az információkra az adott fejezetekben szükség volt, hiszen nélkülük a vizsgálatok eredményei nem lennének értelmezhetők. Opponensem is

megjegyezte, hogy „Nagyon jó, hogy ... áttekintést kapunk az antioxidáns kapacitást mérő módszerekről, mivel így az egyes gyümölcsfajok eltérő antioxidáns kapacitással történő jellemzését megfelelő kritikával fogadhatjuk.” Valóban ez a cél vezérelt az Irodalmi áttekintés szerkesztése közben, míg a kísérletek ismételhetőségét megalapozó objektív adatokat az Anyag és módszer fejezetben adtam meg.

Leírása alapján, a 82. oldalon (4.15 fejezet) felsorolt enzimeket kódoló génekre terveztek primereket. A felsorolásban szerepel a flavonol-szintáz (FLS) is, azonban az 1. táblázatban felsorolt primerek között a PCR amplifikálásra tervezettek között nem találtam. A 3. táblázatban a specifikus célgénekre tervezettek között azonban már erre is találtam tervezett primert. Tehát a korábbi szakaszból véletlenül maradt ki?

Sajnálatos módon a 4.15 fejezet első bekezdésében szerepel tévesen a gén neve, mert a flavonol-szintáz esetében a számos adatbázisbeli homológ génen kívül őszibarack szekvenciák is rendelkezésünkre álltak (ez az őszibarack genomszekvencia közlését megelőzően csak kivételes esetekben fordult elő), melyek alapján közvetlenül qPCR analízishez használható primereket terveztünk (ezek szerepelnek a 3. táblázatban). Természetesen ezek működését kajszi és meggy DNS-en előzetesen ellenőriztük.

Az enzimeket kódoló génekre tervezett primer szekvenciákban több helyütt is alternatívát biztosító nukleotid került (1. táblázat). Jó néhány esetben (C4H-F1; C4H-R1; CHI-F; CHI-R stb.) 4-5 ponton is alternatív lehetőséget biztosít, mely alapján a variációk száma hatványozottan növekszik. Hogyan ellenőrizték, hogy a nagyszámú variáns közül a célzott allélt kapta-e meg termékként, amit várt?

Vizsgálataink célja az volt, hogy a kajszi és a meggy polifenol-bioszintézisében szerepet játszó géneket, illetve ezek közül néhányat azonosítsunk. A degenerált primerek használata és a degeneráltság mértéke minden esetben azon múlt, hogy az adatbázisokból hozzáférhető szekvenciák illesztését követően milyen mértékű egyezést találtunk a homológ régiókban. Mivel sok gén esetében az alma- vagy a szamóca-gén volt a filogenetikailag legközelebbi homológ szekvencia, nagyobb mértékű degeneráltságot kellett megengednünk ahhoz, hogy esélyünk legyen a *Prunoideae* gén amplifikálására. Több primer készült, melyek közül végül az eredményesen használhatók szekvenciáját közöltem a dolgozatban. A primerek ennek ellenére megfelelően specifikusak voltak, hiszen húsznál több nukleotidból álltak (vagyis a szekvencia előfordulásának valószínűsége $1/1,1 \cdot 10^{12}$, tehát specifikitása még a közel 600 Mb genomméretű meggyénél kétszer nagyobb genom esetében is feltételezhető). Az opponensem által említett primerek közül a C4H-R1-et jellemezte a legnagyobb mértékű degeneráltság (48x), ahol a legtöbb pozícióban csak kétféle alternatív nukleotid szerepelhetett. Természetesen Opponensemnek igaza van abban, hogy a primerek működésének specifikitását ellenőrizni kell, ezt meg is tettük a PCR során amplifikált fragmentumok DNS-szekvenciájának meghatározásával. A szekvenciák BLAST analízise minden esetben igazolta a reakció specifikusságát. A szekvenálást több klónból kiindulva megismételtük, ám az esetek túlnyomó többségében nem talákoztunk szekvencia-polimorfizmussal. Bizonyos esetekben – mint például a meggy *UFGT* gén vizsgálatakor – azonban szekvencia-polimorfizmust mutattunk ki. A klónozott fragmentumok szekvenciája klónonként nem tért el, a különböző telepek viszont két különböző szekvenciát hordoztak, melyek egymással hasonlóságot (86 %-os egyezés) mutattak. Ezek paralóg génkópiák és allélváltozatok is lehetnek, különösen az

allotetraploid eredetű meggy esetében. A szekvenciák közül csak az egyik expressziója volt kimutatható a gyümölcsbőrben.

A 11. ábrán látható értékek, az összes módszerrel elvégzett vizsgálatok a fajtákon, és azok szorzataként értelmezhető? Ha igen akkor nagyon meglepő, hogy a nagy fajtaszámmal jellemezhető őszibarack és cseresznye esetében milyen kicsi az adatok variabilitása, míg a kevés számú kökényre vonatkozóan és a nagyobb számú meggyénél is mennyire nagy. Mi lehet a háttérben?

Az ábrán az értékek az adott mérés (FRAP vagy TPC) esetében az egyes fajtákon elvégzett párhuzamos mérések adatait képviselik. Vagyis a szerepeltetett értékek száma a fajta és a párhuzamos mérések számának szorzata. Az eredmény valóban érdekes, meglepőnek annyiban tartanám, hogy az általunk vizsgált (a gyümölcsök antioxidáns kapacitását jellemző) két paraméter használatával milyen pontosan feltárható a vizsgált fajta genetikai háttere és kultúrevolúciós története. Az eredmények ugyanis kétségtelenül ilyen elemekkel magyarázhatók. A legkisebb variabilitás az őszibarackfajtákat jellemezte, ez egyrészt „természetes”, másrészt emberi hatásokra vezethető vissza. Az őszibarack természetes mutációk következtében, feltehetően még kultúrába vonását megelőzően vált öntermékenyülvé, ami a beltenyésztés lehetősége révén leszűkítette a fajra jellemző variabilitást. Ezt az elmúlt években a *Prunus* fajokra kidolgozott valamennyi molekuláris marker alkalmazásával is alátámasztották (alátámasztottuk). Ehhez társult később a modern nemesítési programok hatása. Az árufajták többsége amerikai nemesítési programokból származik, melyeket néhány kiválasztott, értékes genotípus felhasználásával állítottak elő ('J.H. Hale', 'Elberta' és ezek leszármazottjai). E két tényező együtt drámai mértékben leszűkítette a fajra jellemző variabilitást, ennek következményeit látjuk az általunk vizsgált tulajdonság esetében is. A cseresznye variabilitása felülmúlja az őszibarackét, hiszen alapvetően önmeddő faj. A variabilitás beszűkülésének oka itt elsősorban a nemesítés, bizonyos kedvelt fajták (pl. Magyarországon a 'Germersdorfi', Kanadában a 'Van' stb.) gyakori használata, illetve a múlt század közepén röntgensugárzással nyert mutáns vonalak (JI 2420 és JI 2434) alkalmazása az öntermékenyülő fajta előállításakor. A meggy és a kökény kiemelkedő variabilitásának oka egyértelműen az, hogy ezek a fajok, illetve a munka során vizsgált genotípusaik sokkal közelebb állnak a természetes alapokhoz. A vizsgált kökénygenotípusok mindegyike és a vizsgált meggyfajta többsége tájfajta-szelekció eredménye. Mindössze két meggyfajta ('Erdi bőtermő' és 'Korai pipacs') származik keresztezéses nemesítésből. A tájfajták a Kárpát-medencében nagy variabilitást mutató növényanyagból származnak. A változékonyság egyfelől az ivaros szaporodás következménye, másfelől mindkét faj tetraploid, vagyis a diploid genomokhoz képest nagyobb számban fordulhatnak elő a szelekció által elfogadott mutációk. Ezen fajok esetében tehát nem csökkenhetett a variabilitás kiválasztott fajták, alapító klónok használata miatt.

Az érésidő és FRAP értékek esetében a nagyon alacsony korrelációs értékek miként mutathattak szignifikáns összefüggést?

A legkisebb korrelációs együttható 0,397 volt, ami az adott mintaszám mellett nagyobb számított t-értéket adott, mint a táblázatos érték. Alig nagyobb, de nagyobb! A statisztikai munkák felhívják a figyelmet arra, hogy a szignifikáns korrelációs együttható nem jelenti azt, hogy a két változó közötti kapcsolat erős, vagy hogy a kapcsolat biológiai értelemben jelentős, fontos. Gyakori és súlyos hibaként írják le, ha a két változó közötti korrelációból

bizonyosan ok-okozati összefüggésre következtetnek. A korreláció mögött lehet ok-okozati viszony, de az is lehet, hogy a két korrelált változó nincs egymással ok-okozati kapcsolatban, hanem mind a kettő egy harmadik, közös októl függ. A korreláció magyarázata lehet a véletlen is. Az ok-okozati összefüggést logikai, vagy kísérleti úton bizonyítani kell. E tekintetben igyekeztem gondosan eljárni, tehát az elemzésben sehol nem állítottam, hogy a szignifikáns korrelációs együttható az érésidő és az antioxidáns kapacitás logikai összefüggését mutatja. Nyilván ebben az esetben is számos tényező állhat a háttérben, melyek közül minden bizonnyal legerősebb a genetikai háttér. Ezért fordulhat elő, hogy egy közepes érésidőjű hibrid gyümölcsének antioxidáns kapacitása kiugró értéket mutat, vagyis „kilóg” az érésidő-antioxidáns kapacitás összefüggésből. Mindazonáltal igazolható volt, hogy valamennyi korai érésű fajta gyümölcse kis antioxidáns kapacitást mutat, és a kései érésű gyümölcsök többségét jelentősen nagyobb FRAP-értékek jellemzik. Mindez együtt valószínűsíti, hogy a jelenség kialakulásában lehet valamekkora szerepe a gyümölcsök fejlődési időtartamának, ennek bizonyítása, a mögöttes genetikai szabályozás feltárása azonban még jelentős kutatási erőfeszítéseket igényel.

Nem tartom szerencsésnek a 100. oldalon az utolsó bekezdésben szereplő új kajszifajták és hagyományos fajtákból képzett csoportok összehasonlítását. Logikusnak tűnik a csoportosítás, de nem tekinthető egzaktnak, inkább önkényesnek. A hibája még, hogy a fajtákat nem azonos évben vizsgálta, a 'Bergarouge', 'Latter Sabatini', 'Ninfa' stb. adatai 2010-ből származnak, míg a többi majdnem mind 2006., 2007. évekből. Ezekből az adatokból semmilyen következtetést nem szabad levonni.

Opponensem kifogásait csak részben tudom elfogadni. A vizsgált kajszifajták felosztása új és hagyományos csoportokra annyiban „önkényes”, hogy miért éppen az adott genotípusokat válogattuk az egyes csoportokba, hiszen nyilvánvalóan mindkét csoport esetében, de különösen a hagyományos fajták csoportjába több tucat fajta közül válogathatnánk. Egy teljes körű analízis megvalósítása a mi körülményeink között nyilvánvalóan lehetetlen célkitűzés lenne. Egyfelől az új fajtákat a Gyümölcseirt Kft. ültetvényeiből kaptuk, az érdekes és perspektivikus fajtákat a termesztők válogatták ki, másfelől jól érzékelhető a két csoport közötti valódi különbség, ha például a 'Flavorcot' és 'Perlecot' fajtákat hasonlítjuk a 'Bergeron' és 'Gönci magyarkajszai' fajtákkal. Maga a felosztási elv azonban nem önkényes. A kajszai esetében az utóbbi két évtizedben hihetetlen mértékben felgyorsult a fajtainnováció, az új fajták termesztésbe állítása. Az új fajták honosításáról, hazai termesztési tapasztalatairól Dr. Szabó Zoltán 2012-ben egy kis kötetet adott közre, melyben kifejtette, hogy az új fajtáknak korábban nem jelentkező vagy nem hangsúlyos igényeknek (pl. szállíthatóság) kell megfeleljenek. Ezek között vannak valóban újnak tekinthető fajták, illetve olyanok, amelyek a hazai termesztésben számítanak újnak.

Az eltérő évjáratokkal kapcsolatos kritikára válaszul megjegyezném, hogy korábbi vizsgálataink igazolták, az antioxidáns kapacitás tekintetében a genotípus hatása döntő, az évjárat hatása nem szignifikáns. Bizonyos mértékben értem és el is fogadom Opponensem kétségeit, de úgy érzem, az az egy következtetés, amit ezekből a vizsgálatokból levontam, megállja a helyét, nevezetesen, hogy az általunk vizsgált, jelenleg a piac által preferált, „újabb” fajták gyümölcse antioxidáns hatás szempontjából jelentős mértékben elmarad a hagyományos fajtáktól, tájfajtáktól és szelektált genotípusoktól. Ez a különbség messze meghaladja az egyes évjáratokban jelentkező eltéréseket. Ráadásul a tendencia akkor is igaz maradna, ha találnánk kivételes genotípusokat bármely csoportban. Mindez a nemesítési programok hatását mutatja, másfelől rámutat a tájfajták értékére és új nemesítési célokra. Az ilyen vizsgálatokat különösen fontosnak tartom, hiszen egyfelől a kérdésfelvetés a

termesztőktől érkezett, és az analízis jól mutatta, hogy a tudományos kutatásnak van a termesztés számára releváns üzenete, illetve képes bizonyos szempontból rámutatni létező veszélyekre és lehetséges megoldásokra is.

A 'Gönczi magyarkajsi' és a 'Preventa' összehasonlító vizsgálata jól mutatja a genotípus meghatározó szerepét a FRAP, a TAC és a TPC értékekre. Azonos alanyon termesztett a két genotípus?

Igen, mindkét genotípus fái myrobalán magoncalanyon állnak.

Az ukrán és főárúfajták boxplot analízise szerintem nem mutathat valós információt, mint ahogy a kajszinál sem tudom ezt elfogadni.

Tudomásul veszem Opponensem értékelését, de én is fenntartom véleményemet. A cseresznye esetében különösen igaz, hogy a felosztás nem önkényes. Hiszen az egyik csoportban a kanadai, olasz, német stb. nemesítési programok világpiacokat uraló fajtái találhatók, míg a másik csoportban régi ukrán fajták (közel 30-35 éve kerültek hazánkba vizsgálatra), melyek tájszelekcióból származnak, vagy tájfajták keresztezésével jöttek létre. Elfogadom, hogy jobb lenne minél szélesebb merítés mindkét csoport esetében, de az egyetlen állítást, amit az analízis alapján megfogalmaztam, az eredmények világosan alátámasztják. Vagyis: a korlátozott genetikai variabilitású növényanyag felhasználásával folytatott keresztezéses nemesítési folyamat során jelentős mértékben csökkenhetett mindazon tulajdonságok változékonysága, melynek fenntartására/megőrzésére nem irányult szelekciós nyomás!

A csapadékmennyiséggel való összefüggést érdekes megközelítésnek vélem. Nem a talaj vízkapacitása lett volna érdekes? A januári csapadék és az érésben lévő gyümölcs antioxidáns kapacitás összefüggése milyen élettani folyamatokon keresztül vezethető le?

Az általunk vizsgált négy év FRAP és januári csapadékmennyiség adatai között nagyon szoros korrelációt mutattunk ki. És külön érdekes, hogy ez a 0,9 fölötti korrelációs koefficiens csak az északkelet-magyarországi tájfajták esetében jelentkezett. Ezek rokonsága ma már bizonyítottan tekinthető. Éppen ez volt az oka, hogy ezt az eredményt fontosnak tartottam megemlíteni az értekezésemben. Magyarazatot azonban sajnos nem tudok adni a jelenségre, jöllehet valamikor a növényélettan felől kezdtem meg szakmai pályafutásomat. Fontos lenne, további évek adatsorait is bevonni a kísérletbe, és ha megerősíthető az összefüggés, megkeresni a biológiai okokat.

A meggy gyümölcserése során említi, hogy a gének expressziója a 4. érési fázisig növekedett és felsorolja az érintett enzimeket. Szerintem a CHS és a CHI a VN-1 genotípus gyümölcshéjában ez folyamatosan növekedett az 5. érési fázisig. Meg lehet-e mondani a szintézis utak egyes lépcsőit követve, hogy melyik génexpresszió segíti az antocianinok, melyik az antioxidánsok és melyik a C-vitamin gyarapodását?

A VN-1 gyümölcshéjában a CHS expressziója változatlan volt a 4. érési fázishoz képest, a CHI valóban növekedett, bár a növekedés nem volt jelentős. Az eredeti mondatomban a CHS

tévesen került be, hiszen a mondat azokat a géneket sorolja fel, ahol az 5. érési állapotra jelentős mértékű csökkenés következett be.

Az antocianinok bioszintéziséhez valamennyi vizsgált enzim hozzájárul, de kitüntetett szerepük van az *antocianidin-szintáz* és *antocianidin-reduktáz* géneknek. Az előbbi által kódolt fehérje közvetlenül az antocianidinek kialakulását katalizálja, míg a korábbi lépések mindegyikénél más flavonoidkomponensek kialakulása felé is fordulhat a bioszintézis útvonal. Az ANR enzimnek pedig azért van kitüntetett szerepe, mert az antocianidinek mennyiségét azáltal csökkenti, hogy szubsztrátként hasznosítja e molekulákat a flavan-3-olok szintéziséhez. Az antocianidin szubsztrátokért az ANR és az UFGT enzimek versengenek, ezért az UFGT vizsgálata is jelentős lenne, ez felel a stabil antocianinok kialakításáért. Sajnos azonban az általunk vizsgált gén terméke feltehetően nem vesz részt a gyümölcs antocianidin-bioszintézisében, így a megfelelő gén azonosítása érdekében a vizsgálatokat tovább kell folytatni. Mivel a vizsgált géneknek az aszkorbinsav-bioszintézisben nincs szerepük, erre vonatkozó közvetlen információt nem adnak.

A 6.1.1 alfejezetben a gyümölcsfajok fajon belüli variabilitásának sorrendjét helyesen állítja fel, de szerényen illene megjegyezni, hogy a szerző által vizsgált genotípusok alapján. Teljes biztonsággal jelenti-e ki a variabilitás mértékére vonatkozóan a szerző azt az állítását, hogy további genotípusok ezt nem befolyásolnák pl. a kisebb genotípus számmal szereplő japánszilva több fajtáját bevonva stb. esetében? Erre utal az eredmények megvitatása során a szilvafajták esetében hivatkozott irodalom is (Gil és mtsai., 2002; Vizotto és mtsai., 2007), melyben a 3-5-szörös mértéket meghaladó értéket mértek a hivatkozott irodalmakhoz képest. Ugyanezt említi a cseresznyénél is.

Egyetértek Opponensemvel, természetesen ez a félmondat mindenképpen fontos: bármikor találhatunk egy kiemelkedő fajtát, olykor igencsak váratlanul. Saját kutatásaink történetéből is mondhatok erre példát: a 'Pipacs 1' meggyfajta gyümölcsét azért vontuk be a vizsgálatba, mert arra gondoltam, annak lesz legkisebb az antioxidáns kapacitása. Meglepetésünkre máig csúcstartónak bizonyult ez a meggyfajta az antioxidáns kapacitás szempontjából!

Nagyon fontos eredménynek tartom az antioxidáns kapacitás vonatkozásában a főbb vegyületcsoportok elkülönítését, mely több komplex vizsgálat összehasonlító elemzésével volt megvalósítható. Azonban elgondolkodtam azon, hogy mennyire pontosak ezek az elválasztási technikák az egyes vegyületcsoportok antioxidáns hatásának mérésében és együttes hatásuk összegződő, vagy egymást gerjesztő, tehát több mint az egyszerű összegük?

Köszönöm Opponensem értékelését. Kérdésére azt tudom válaszolni, hogy általános vélekedés szerint a gyümölcsökben fellelhető antioxidánsok „additív és szinergens” hatásban állnak egymással (Liu, 2003. Am. J. Clin. Nutr., 78: 517S–520S). A kérdés azonban rendkívül bonyolult, jelenleg vita folyik arról, hogy a gyümölcsökben képződő antioxidánsok milyen formában szívódnak fel és kerülnek a keringésbe, illetve az egyes szervekhez. Ma már a vegyületek kedvező fiziológiai hatásában sem antioxidáns tulajdonságukat tartják meghatározónak. Számomra ezek a kérdések bár érdekesek, nem döntöek a vizsgálataim szempontjából. Én ezeket a jellemzőket olyan fenotípusos bélyegeknak tartom, amelyekkel a gyümölcsfajták jellemezhetők, és amelyek vizsgálatával a genetikai alapokról információt nyerhetünk. Természetesen a kutatócsoportunk kémiai-analitikai része továbblépett a vegyületek pontos azonosítása, és antioxidáns sajátságaik értékelése felé. Dr. Abrankó László

kollégám HPLC-Q-TOF technikával azonosított számos polifenolos vegyületet, Papp Nóra PhD hallgatóm pedig a Jaeni Egyetemen együttműködve jellemezte ezek *in vitro* antioxidáns kapacitását. Ezek már részletesebb információt adnak majd, mint az általam bemutatott, vegyületcsoportokra történő szétbontás, melyek például a C-vitamin és az antocianin esetében azért kellően pontosnak, megbízhatónak tekinthetők. Dr. Abrankó László és munkatársai jelenleg egy OTKA pályázat keretei között azt vizsgálják, hogy a gyümölcsök polifenolos vegyületei a felszívódást követően milyen változásokon esnek át. Tehát a jövő sok újdonságot ígér még ezen a területen!

Miként látja megvalósíthatónak a jelölt az általa azonosított flavonoid bioszintézisben feltehetően szerepet játszó gének funkcionális tesztelését?

Elképzelhetőnek tartom a teljes génszekvencia azonosítását követően a fehérjék heterológ expresszióját például *Pichia pastoris* vagy *Saccharomyces cerevisiae* expressziós rendszerekben. Ezt követően az enzimfehérjék funkcionálisan tesztelhetők. Talán a leginformatívabb vizsgálat transzgénikus növények létrehozása lenne, melyekben a vizsgált gének csendesítésével azok funkciója feltárható. De gyümölcsfákról lévén szó, az ilyen vizsgálatok meglehetősen nehézkesek és hosszadalmasak.

A katechin és epikatechin bioszintéziséhez szükséges enzimeket kódoló gének transzkriptumának mennyiségében a két vizsgált fajta között eltérést tapasztalt (következtetések 154. és 155. oldal). Leírása alapján mind a katechin, mind pedig az epikatechin szintéziséhez szükséges LAR (leukoantocianidin-reduktáz), illetve ANS (antocianidin-szintáz) és ANR (antocianidin-reduktáz) enzimeket kódoló gének transzkriptuma esetében a 'Preventa' rendelkezett nagyobb mennyiséggel. Katechinból a 'Preventa', epikatechinből azonban a 'Gönczi magyarkajsi' tartalmazott többet. Miből adódhat akkor ez a jelenség?

Ahogy azt az értekezésben kifejtettem, jelenleg mindössze hipotéziseim lehetnek ezzel kapcsolatban. Feltételezem, hogy a 'Gönczi magyarkajsi' gyümölcsének nagyobb epikatechin-tartalma annak köszönhető, hogy a kondenzált tanninok a Preventa esetében elsősorban epikatechinből keletkeznek. Természetesen a flavan-3-olok továbbalakulásának, lebomlásának, vagy a szerepet játszó gének poszt-transzkripcionális szabályozásának vizsgálata is választ adhat a két genotípus között látható különbségre. Az antocianinfelhalmozódás idején a kondenzált tanninok bioszintézis génjeinek transzkriptuma kisebb mennyiségben van jelen (Tako és mts., 2006. Plant Sci., 170: 487–499), mint más flavonoid-bioszintézis gének transzkriptuma. Ennek alapján, az almahéjhoz hasonlóan a CT-bioszintézis és az antocianin-bioszintézis a kajsi gyümölcshéjban is eltérő szabályozás alatt állhat.

A fahéjsav-4-hidroxiláz (C4H) enzimet szabályozó gén 10-szeres transzkriptumot tartalmazott a VN-1 gyümölcshéjban a 'Pipacs I'-hez képest, ami több p-kumársavat kellene, hogy eredményezzen, így elméletileg több szubsztrátummal indul útnak a flavonoidok szintéziséhez. Melyik enzimet szabályozó gén transzkriptuma volt az említett arányban alacsonyabb, hogy a VN-1 kisebb antioxidáns kapacitással rendelkezik?

A *C4H* génen kívül közel valamennyi vizsgált flavonoid-bioszintézis enzimet kódoló génjelölt expressziója nagyobb volt a VN-1 genotípus gyümölcshéjában, mint a 'Pipacs 1' gyümölcshéjában. Az expressziós szintek közti különbség szoros korrelációt mutat a két meggyfajta gyümölcsének antocianintartalmában kimutatott különbséggel. Vizsgálatunk nem tárt fel olyan, a flavonoid-bioszintézisben feltételezhetően szerepet játszó gént, melynek expressziója a 'Pipacs 1' gyümölcsben lett volna az említett arányban nagyobb. Ez azonban nem jelent ellentmondást, hiszen az expressziós szintek a gyümölcshéjra jellemzők, míg az antioxidáns kapacitást a teljes gyümölcs kivonatából határoztuk meg. Tudjuk, hogy a 'Pipacs 1' gyümölcsében jelentős mértékű genisztein halmozódik fel és bizonyos fenolsavakból is többet tartalmaz, mint a VN-1 gyümölcse (eredményeink közlése folyamatban van). A 'Pipacs 1' gyümölcshúsa ugyanakkor nem tartalmaz antocianint. Az egyes vegyületek antioxidáns hatása sem azonos, az epikatechin, a procianidin B2 és hidroxifahéjsav *in vitro* antioxidáns hatása például meghaladja az antocianinok antioxidáns hatását (Tsao et al., 2005. J. Agr. Food Chem., 53: 4989–4995). Saját vizsgálateink kimutatták azt is, hogy a 'Pipacs 1' gyümölcsének aszkorbinsav-tartalma jelentősen nagyobb, mint a VN-1 gyümölcsoké. Eredményeink alapján ezért ilyen precízen arányosítható összefüggések egyelőre nem állapíthatók meg az antioxidáns kapacitásra vonatkozóan.

Véleményem szerint az in vivo kísérletek beillesztése a dolgozatba szükségtelen volt. Egy fontos kutatást mutat be, de elő kísérletről van szó és sem az anyag és módszer, sem az eredmények fejezetekben nem tárgyalja. A célkitűzések utolsó, 10. pontjában ugyan megemlítsre kerül. Az eddigi eredmények alapján tett új tudományos eredmény megállapítása, még ha óvatosan is fogalmaz, nehezen állja meg a helyét.

Belátom, hogy az *in vivo* kísérletek eredményeit némileg inkoherens módon kezeltem. Kifejezetten figyeltem arra, hogy ne szerepeltessem ezeket az Anyag és módszer illetve Eredmények fejezetekben, hiszen ezek a vizsgálatok nem tartoztak bele a szűken vett tudományos tevékenységembe. A kísérletek a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Tanszék (Prof. Blázovics Anna vezetésével) és az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet (Dr. Fébel Hedvig) vezetésével zajlottak, mi mindössze a témafelvetésért vagyunk felelősek. Miközben nem akartam sajátomnak láttatni mások tudományos eredményét, úgy éreztem, hogy a Megvitatás fejezetben mégis kitérek a kísérlet legfontosabb eredményére: vagyis hogy a különleges, kiemelkedő polifenol-tartalmú meggyektől valóban sokkal jelentősebb fiziológiai hatás várható. Ezt feltétlenül meg akartam említeni a dolgozat végén, hiszen ez az első kézzelfogható bizonyítékunk arra, hogy munkánk nem pusztán a csonthéjas gyümölcsfák genetikai jellemzésére vonatkozó tudományos munka, de a jövőben (reményeim szerint a nem túl távoli jövőben!) e munka eredményeinek konkrét felhasználása is megvalósulhat! Azt azonban teljes mértékben elfogadom, hogy ilyen körülmények között sem a Célkitűzésben, sem az Új tudományos eredmények között nem szerencsés szerepeltetni az ezzel kapcsolatos gondolatokat.

Válasz az Opponensem által feltett további kérdésekre:

Mennyire tartja elképzelhetőnek, hogy a Rosaceae családon belül meghatározott antioxidáns kapacitás kialakításáért felelős flavonoid-bioszintézis utat kódoló géneket genetikai transzformációval aktivizálva állítsanak elő egy-egy szupergyümölcsöt?

Tudományos szempontból elképzelhetőnek tartom, ugyanakkor társadalmi-politikai aspektusból tekintve a kérdést jelenleg nem tartom elképzelhetőnek, legalább is Európában

nem. Látjuk az aranyrizs sorsát, látjuk az alma gyors nemesítésére kidolgozott technológia fogadtatását. Ez utóbbi végeredménye olyan gyümölcs, mely nem hordoz transzgent, Európában mégsem alkalmazható. Nem gondolom, hogy bármely vállalat érdemesnek gondolná jelenleg, hogy hosszadalmas és költséges fejlesztőmunkába kezdjen. Különösen, hogy munkánk és számos nemzetközi munka is bizonyítja, óriási mértékű polimorfizmus létezik e tulajdonságok tekintetében a természetben is. Én azt gondolom, a közeljövőben ezeket a kiemelkedő polifenol-tartalmú gyümölcsöket kell alapos orvosi biológiai kutatásokba bevonni, hogy kiderüljön, milyen mennyiségben milyen fiziológiai állapotokhoz illeszthető a fogyasztásuk a minél kedvezőbb egészségi hatás elérése érdekében. Jó hír, hogy erre külföldön számos kezdeményezés mutatkozik, és talán hazánkban is van remény ilyen kutatások megindítására. Meg kell jegyezni azt is, hogy bár a genetikai transzformáció megvalósítását tudományos szempontból lehetségesnek érzem, nem gondolom azt könnyű feladatnak. A polifenolok anyagcseréje számos növényi életfolyamatra jelentős hatással van, így a beavatkozásoknak nyilvánvalóan lehetnek nem célzott, káros hatásai is.

A Prunus nemzetség genomikai adatainak milyen adatbázisa és bioinformatikai szoftvere használható azok elemzésére?

Az elemzések legfontosabb központja a 2003-ban megnyitott GDR (Genome Database for Rosaceae, <http://www.rosaceae.org/>) honlap. A honlapot 2012-ben 14 ezernél is több látogató használta, mintegy 130 országból. Itt megtalálható a *Fragaria vesca*, az alma és őszibarack genomszekvencia, valamint a további csonthéjas fajok genetikai térképe. Adatokon kívül bioinformatikai eszközök is elérhetők a honlapon, elsősorban a genomszekvenciák kezelésére, elemzésére, megjelenítésére használható GBrowse, a genetikai térképek bemutatását és fajok közötti összehasonlítását lehetővé tevő CMAP, a metabolikus utakat bemutató Cyc oldalak. A honlap kitekintéssel van továbbá az NCBI adatbázisra és a Primer3 primertervező szoftver is integrálva van az oldalon. A GDR-hez hasonló célokra alkalmazható a Phytozome v9.1 honlap is, ahol jelenleg 31 virágos növény genomszekvenciája található meg, közte a szamóca, alma és őszibarack genomszekvenciákkal. Jól használható adatbázis továbbá a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), ahol génekre, ortológ génekre vagy anyagcsere-útvonalakra egyaránt kereshetünk. A közelmúltban megjelent a *Prunus mume* genomszekvenciája, a közeljövőben várható a cseresznye genomszekvenciájának közzététele. A folyamatosan bővülő adatbázisok egyre több lehetőséget teremtenek a *Prunus* fajok genetikai megismerése terén, és egyre jelentősebb mértékű bioinformatikai alkalmazást tesznek szükségessé.

Az antioxidáns kapacitás kialakításához hozzájáruló flavonoid-bioszintézis utat kódoló gének öröklődéséről milyen információkkal rendelkeznek, a környezeti hatások szerepe mennyire erős expressziójuk kiváltásában, milyen más tulajdonságokhoz történő kapcsolat jellemzi ezeket?

A környezeti stimulusok kétségkívül hatással vannak a flavonoid-bioszintézisre. E vegyületeket stresszvegyületeknek is nevezik utalva arra, hogy különböző biotikus és abiotikus stresszhatásokra mennyiségük jelentősen megnövekedhet. Errea és mts. már a 90-es évek elején felfigyeltek arra, hogy a flavanoloik mennyisége növekszik az oltási hely környezetében inkompatibilis kombinációknál (Acta Hort. 381:498-501). Alma esetében például kimutatták, hogy az *MdMYB1* transzkripció faktor expresszióját a fény indukálja, és hatására az antocianin-bioszintézisben szerepet játszó gének expressziója is növekedett

(Tako és mts. 2006. *Plant Physiol.* 142: 1216-1232). Saját eredményeink kajszi esetében megerősítették, hogy eltérő évjáratokban valamelyest különböző polifenol-tartalom jellemzi a gyümölcsöket a legtöbb fajta esetén. Ennek alapján bizonyosnak látszik, hogy a különféle stresszhatások a *Prunus* fajok flavonoid génexpressziójára is hatással vannak. Feltehető, hogy az egyes gének egyszerű mendeli öröklődést mutatnak, az érdekes azonban az, hogy az általunk azonosított génekkel homológ szekvenciák az őszibarack különböző kromoszómáin találhatóak meg. Vagyis ha a struktúr- vagy szabályozó génekben található allélpolimorfizmus, az az utódokban számtalan kombinációt eredményezhet, és ennek eredményeként a mennyiségi tulajdonságokra jellemző öröklésmentet követik. Egy kajszi hibridcsalád esetében végeztünk erre vonatkozó kísérletet, de a vizsgált hibridek kis száma miatt ezek mindössze tájékoztató jelleggel vehetők figyelembe. A 'Bergeron' × 'Baneasa' hibridcsalád 12 tagjának vizsgálatával igazoltuk, hogy gyümölcsaik antioxidáns kapacitása a szülőkre jellemző értékek (1,0 illetve 3,5 mmol AS/L) között változott.

Az antioxidáns kapacitás és polifenol-tartalom más tulajdonságokkal való kapcsoltsága nem bizonyított. Érdekes azonban, hogy a meggyfajták közül például a 'Csengődi' és a 'Pipacs 1' esetében állapítottak meg bizonyos fokú ellenállóságot a blumeriellás foltossággal és monília betegséggel szemben (Holb és mts., 2005. *Agrártudományi Közlemények*, 17:101-105). Hogy ezt a közismerten fungicid hatással is rendelkező, és ezen fajták gyümölcsében (esetleg vegetatív szerveikben is) nagyobb mennyiségben akkumulálódó polifenolok okozzák-e vagy egyéb tényezők, még további vizsgálatokat igényel. Amely tulajdonság bizonyosan összefüggésben áll a polifenol-tartalommal, az a 'Pipacs 1' fajta gyümölcsének fanyar íze, hiszen a polifenolos vegyületek többségére jellemző ez az íz (Drewnowski és Gomez-Carneros, 2000. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72, 1424-1435).

Még egyszer megköszönöm Opponensem értékes idejét, amelyet értekezésem áttanulmányozására fordított és a munkámmal kapcsolatos felvetéseit, kérdéseit.

Budapest, 2014. március 23.

Tisztelettel:



Dr. Hegedűs Attila