Válasz Dr. Soltész Miklós, az MTA doktorának a Dobránszki Judit: *Az explantátum és az exogén citokininek alma in vitro hajtásfejlődésre kifejtett hatásainak vizsgálata* című akadémiai doktori értekezéséről készített bírálatára

Köszönöm Opponensemnek, Dr. Soltész Miklósnak, az MTA doktorának, hogy az akadémiai doktori értekezésemet elbírálta. Köszönöm a pozitív értékelését, az észrevételeit, felvetéseit, és kérdéseit. Opponensem által megfogalmazott észrevételekre és kérdésekre az alábbiakban, a bírálati sorrendben reagálok. Amely felvetésekkel teljesen egyetértek, azokra válaszomban nem térek ki külön, azokat egészében elfogadom.

„A munka másik része a hajtások fotoszintetikus apparátusának vizsgálatára irányult. Modellfajtaként itt a 'Royal Gala' szerepelt, s három célkitűzés vezérelte a kutatómunkát. Fel lehet vetni, nem lett volna-e célszerű itt is mindkét fajta bevonása. Mindenesetre szerencsés döntésnek tekinthető, hogy a hatékony hajtásregenerációjú fajtára esett a választás."

Köszönöm opponensem észrevételét! Valóban érdekes a felvetés, hogy a kevésbé hatékony hatásregenerációjú fajta fotoszintetikus apparátusának vizsgálatát is elvégezzük. Olyannyira egyetértek Opponensem véleményével, hogy a kísérleteket el is végeztük, de azok eredményeit már az értekezés elkészítése és benyújtása után kaptuk meg, de a Hungarian Agricultural Research folyóirat 2015. márciusi számában (p. 20-24) közöltük is (Dobránszki és Mendler-Drienyovszki, 2015). Röviden itt is leírom, hogy milyen új ismereteket nyertünk azáltal, hogy ezt a nehezen regenerálódó almafajtát is vizsgálatba vettük. A Freedom fajtával elvégzett kísérletek megerősítették a Royal Gala modellfajtával végzett vizsgálatok azon eredményét, hogy a fotoszintetikus rendszer állapotát a táptalaj citokinin tartalma befolyásolja. Azonban az eredmények jól reprezentálták azt is, hogy ez a hatás genotípusfüggő, mivel az alkalmazott citokininek típusa és mennyisége a levelek klorofill tartalmát és a klorofill fluoreszcenciát eltérő módon befolyásolták, mint a Royal Gala fajta esetében. Míg a Royal Gala fajtánál a benzil-adenin alkalmazása volt a leghatékonyabb a klorofill tartalom növelésére, addig a Freedom fajtánál a meta-topolin, illetve nagy koncentrációnál (25,0 µM) a meta-topolin mellett még a benzil-adenin és a meta-topolin kombinált alkalmazása eredményezte a legnagyobb klorofill tartalmat. A II fotokémiai rendszer maximális kvantumhatékonysága (F_v/F_m) és fotokémiai folyamatainak maximális hatékonysága (F_v/F_0) a benzil-adenin és meta-topolin kombinált alkalmazása esetén volt a legnagyobb Freedom fajta esetében, míg a Royal Gala fajtánál 0,5 µM-nál a benzil-adenin volt szignifikánsan a legalkalmasabb citokinin és nagyobb alkalmazott citokinin koncentrációknál sem csökkent a hatékonysága a benzil-adenin és meta-topolin kombinált alkalmazásához képest. Az aktuális kvantumhatékonyság (Y(II)) vizsgálata során szintén a benzil-adenin és meta-topolin kombinált alkalmazása volt az egyik leghatékonyabb a Freedom fajtánál, míg a kombinált citokinin alkalmazás ilyen hatását Royal Gala esetén nem tapasztaltuk.

A Royal Gala esetében a II fotokémiai rendszer maximális kvantumhatékonysága (F_v/F_m), illetve fotokémiai folyamatainak maximális hatékonysága (F_v/F_0) és a klorofill tartalom között nem lehetett korrelációt kimutatni, viszont közepes szignifikáns (pl. az összklorofill tartalomra: $r=0,561$; $P<0,05$) korreláció volt a klorofill tartalom és a II fotokémiai rendszer aktuális kvantumhatékonysága (Y(II)) között. A Freedom fajta esetében azonban korrelációt nem lehetett kimutatni a klorofill fluoreszcencia paraméterek és a klorofill tartalom között.

„ANYAG ÉS MÓDSZER fejezet többszöri áttanulmányozása során sem akadtam nyomára néhány adatnak, mint például a vizsgálatok ideje, vizsgált növények, illetve explantátumok száma, ismétlések száma stb. Ezekre később, az eredmények közlésénél sem lehet rátalálni. Azért említem itt meg, mert nem apró formai hibának, hanem – nyilván véletlenül előforduló, de – feltétlenül kiegészítést igénylő hiányosságnak tekinthető."

A vizsgálatok ideje valóban nem szerepel a dolgozatban; a vizsgálatokat 2009 és 2014 között végeztük. A vizsgált anyagokat és a vizsgálat helyszínét az „Anyag és Módszer" fejezetben az értekezés ***51. oldalán*** felsoroltam „Vizsgálatainkat alma (*Malus* x *domestica* Borkh.) nemes fajtákon végeztük. A járulékos (adventív) hajtásregenerációs kísérletekhez két modell fajtát használtunk a 'Royal Gala' és a 'Freedom' nemes fajtákat; az axilláris *in vitro* hajtások fiziológiai állapotának vizsgálatát 'Royal Gala' modell fajtán végeztük. A kísérletekhez a Debreceni Egyetem Nyíregyházi Kutatóintézet Biotechnológiai Laboratóriumában fenntartott *in vitro* alma hajtástenyészeteket használtuk", s ugyanitt leírtam az *in vitro* fenntartás és a kísérletekhez való felszaporítás körülményeit.

Az ismétlések számát a dolgozatban az alábbiak szerint mutattam be:

A járulékos hajtásregenerálódás esetén az értekezés ***53. oldalán*** leírtam, hogy „Konvencionális explantátum esetén egy Petri csészébe 6 db explantátumot helyeztünk, míg tTCL explantátumból 12 db-ot." Itt valóban konkrétan nem szerepel, hogy minden esetben minimum 10 Petri csészével végeztük egy-egy kezelés vizsgálatát, de a „4.5.2. A hajtásfejlődés ideje alatt, illetve a tenyésztés végén felvett morfológiai paraméterek" fejezetben az ***58. oldalon*** leírtam, hogy „A kísérletekben kezelésenként konvencionális explantátumok esetében legalább 60, tTCL explantátumok esetében legalább 120 explantátum adatait értékeltük (C%, HR%, HSZ), és három független kísérletet végeztünk."

Az értekezés ***57. oldalán*** az „Explantátum morfológiai paramétereinek mérése" fejezetben leírtam, hogy „Az explantátumok preparálást követően steril körülmények között sztereomikroszkóp segítségével megmértük a preparált levéllemez explantátumok méretét ... Explantátum típusonként (konvencionális, vagy tTCL explantátum), illetve az explantátum eredete szerint (1., vagy 2. csúcsi levél) minimum 60 explantátum méretadatait vettük fel ismétlésenként, a méréseket legalább háromszor megismételtük."

A „4.6. Klorofill fluoreszcencia mérése", dolgozat ***58. oldala***, fejezetben szerepel: „Minden kezelésből három független hajtás klorofill fluoreszcenciáját mértük meg, s a méréseket három független kísérletből megismételtük."

„A kísérletekbe bevont 'Royal Gala' és 'Freedom' fajtát a Malus x domestica Borkh. fajhoz tartozó fajtákként írja le. Ez megfelel a mások által is követett gyakorlatnak, és szabályosnak tekinthető. Megemlíthető ugyanakkor, hogy a Malus x domestica esetében egy összetett hibridről van szó, amelyet botanikusok szintetikusan alkottak meg, besorolva alá az összes almafajtát, amelyek valamelyik ős Malus faj közvetlen, vagy hibridizációval keletkezett származékának tekinthetők. A szintetikus Malus x domestica faj szülőként való feltüntetésébe mindaddig nem lehetett „belekötni", amíg a keresztezéses nemesítésnél nem kezdődött meg betegségekkel szemben rezisztens más Malus fajok szülőként való bevonása. Így születetett meg közel hat évtizeddel ezelőtt az összetett genomú 'Freedom' fajta is, amely a Malus floribunda varasodással szemben rezisztens egyik klónváltozatának génjeit is hordozza. Vagyis – sok más rezisztens almafajtához hasonlóan – nem tekinthető tisztán Malus x domestica-fajtának. Jövőbeni feladat lehet, olyan nevezéktani korszerűsítés, amely lehetővé tenné annak kifejezését, hogy az adott fajta előállításában nem csak a Malus x domestica vett részt. Elképzelhető olyan megoldás is, hogy nem módosítunk a nevezéktanon, s ebben az esetben a szintetikusan létrehozott Malus x domestica fajt „nyitott" taxonnak tekintjük, amelybe ennél fogva a mostani és a jövőben előállított rezisztens fajták is beletartozhatnak. A hosszas kifejtést azért választottam, mert kíváncsi vagyok Dobránszki Judit véleményére. „

Nemesített kertészeti és különösen dísznövényeink esetében gyakran előfordul, hogy – főleg rezisztencia gének beépítése során – a genom egyéb, többnyire vad fajokból származó géneket/genom részeket is tartalmaz. Ez sokszor, ahogy opponensem is felvetette, nehézségeket okozhat a taxonómiai hovatartozás megítélésénél, illetve az új hibridek, interspecifikus keresztezésekből származó fajták leírásánál és azonosításánál is. Szerencsés esetben a morfológiai jellegek alapján a kérdés eldönthető, főleg ha csak néhány gén átviteléről van szó; más esetekben nem, vagy csak nagyon nehezen.

Ma már azonban molekuláris markerek (RAPD, ISSR, SRAP, AFLP, nrDNS vagy rDNS ITS analízise, DNA barcoding stb.) alkalmazásával lehetőség nyílik arra, hogy a különböző fajták, hibridek tényleges rokonsági fokát molekuláris szinten meghatározzuk, a genomban lévő hasonlóságok/különbözőségek mértéke alapján. A különböző *Dendrobium* hibridek esetében például csak ezekkel a módszerekkel lehetett egyes hibridek esetén a genetikai rokonságot és a „faji" határokat meghatározni, és taxonómiai vitákat eldönteni, ahogy ezt egyik éppen megjelent cikkünkben bemutattuk (Teixeira és mtsai., 2015).

Véleményem szerint, amennyiben a hagyományos taxonómiai módszerekkel a kérdés nem dönthető el, akkor almafajták esetén is a molekuláris markerek alkalmazása hozhat „perdöntő" eredményt.

„A kidolgozott matematikai összefüggés segítségével lehetővé válik a különféle (akár más taxonokhoz tartozó) explantátumok regenerációs kapacitásának összehasonlítása. Az értekezés benyújtása utáni időben sikerült-e a módszert a gyakorlatban tesztelni, s az milyen sikerrel járt?"

A módszer tesztelése folyamatban van. Alma esetén a módszer gyakorlati tesztelését az elmúlt időszakban a Húsvéti rozmaring almafajta esetén végeztük el, az eredmények igazolták az összefüggés alkalmazhatóságát. Egyéb taxonok tekintetében jelenleg a 2014-ben megjelent

publikációnk ad támpontot (Teixeira da Silva és Dobránszki, 2014). A matematikai összefüggést – az értekezésben bemutatott alapelvekre alapozva - pl. *Cymbidium*-ra kidolgozva az összefüggés alkalmazhatóságát 9 Cymbidium fajtánál vizsgáltuk és igazoltuk (Teixeira da Silva és Dobránszki, 2014).

„Milyen fajtatulajdonságok játszhatnak szerepet abban, hogy a hajtásregeneráció hatékonyságát tekintve a fajták között nagyfokú eltérések mutathatók ki? Milyen lehetőségek vannak a gyenge hajtásregenerációjú fajtáknál az eredmények javítására? „

A növényi szövettenyészetekben, mind az axilláris, mind az adventív regeneráció során a jól szabályozható abiotikus tényezők mellett figyelembe kell venni a ható biotikus tényezőket is, azaz a genotípust és az explantátum fiziológia állapotát.

A genotípus-függőség a növényi sejt-, szövet- és szervtenyésztésben egy jól ismert tényező, gyakran a genotípus gyakorolja a legnagyobb hatást (Gahan és George, 2008). Mértéke függ a növényfajtól és az indukálandó fejlődési folyamattól is. Hátterében elsősorban genetikai okok (magi és citoplazma gének, géninterakciók, ploidiaszint), azaz a fajták, klónok stb. genetikailag determinált eltérései, húzódnak meg (Gahan és George, 2008); ugyanakkor epigenetikai (eltérő DNS metiláció, kromatin módosulásai, miRNS-ek szerepe) és szabályozási okai is vannak (Smulders és de Klerk, 2011; Us-Camas és mtsai., 2014), valamint erős az *in vitro* környezet és a genotípus kölcsönhatása is.

Az értekezés témájához kapcsolódóan, jól ismert például, és erre a dolgozatban is kitértem, hogy a táptalajban alkalmazott különböző struktúrájú és koncentrációjú citokinineknek utóhatásuk van a következő szaporítási ciklusban, illetve a járulékos hajtásregeneráció során (Werner és Boe, 1980; Theiler-Hedtrich és Theiler-Hedtrich, 1990; összefoglaló áttekintés: Ďurkovič és Mišalová, 2008; Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010; Magyar-Tábori és mtsai., 2010), valamint a gyökeresedési és akklimatizálási szakaszokban is. Az explantátum endogén hormontartalma természetesen hatással van arra, hogy az adott explantátumból milyen *in vitro* feltételek mellet lehet egy adott fejlődési, növekedési választ indukálni. Az aktuális endogén hormonszintet is befolyásolják mind genetikai, mind epigenetikai és környezeti tényezők is. A morfogenezist befolyásoló endogén anyagok mennyisége, s így hatásuk is lecsökken TCL explantátumok használata esetén a hagyományos „vastagabb" explantátumokhoz viszonyítva (Tran Thanh Van, 2003). Ezt az értekezésben bemutatott kísérletek is alátámasztják. Míg az optimális exogén citokinin tartalom (táptalaj TDZ koncentrációja) hagyományos explantátumok használata esetében egy nagyságrendnyi különbséget mutat a két vizsgált fajta esetében; 0,5 mg/l Royal Gala és 5,0 mg/l Freedom esetében, addig a tTCL explantátumok alkalmazásakor az optimumok közötti eltérés a két fajtánál sokkal kisebb: 5,0 mg/l Royal Gala és 2,5 mg/l Freedom fajtáknál.

Alma szövettenyészetben a genotípus-függő „viselkedés", illetve növekedési-fejlődési válasz igen kifejezett (Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010; Magyar-Tábori és mtsai., 2010). Egy új fajta, vagy genotípus esetén az optimális *in vitro* tenyésztési körülményeket (fizikai és kémiai faktorok) mindig kísérletesen kell meghatározni. A faj egyéb genotípusaival szerzett korábbi ismeretek természetesen hasznosíthatóak, pl. jelen esetben egy jól és nehezen regenerálódó fajta vizsgálata irányt mutat arra, hogy például milyen TDZ tartományt (2,27-

22,7 µM a 1,135-113,5 µM tartomány helyett) érdemes figyelembe venni egy új genotípus *in vitro* hajtásregenerációjának optimalizálása során. Sok esetben azonban az adott hormonok különböző típusainak és koncentrációinak, illetve ezek kombinációinak széleskörű kísérletes vizsgálata vezet csak pozitív eredményre.

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni Opponensemnek az értekezésem értékelését és pozitív megítélését, a feltett kérdéseket, és sikeres védés esetén javaslatát az MTA doktori cím odaítélésére.

Nyíregyháza, 2015. október 15.

Tisztelettel:

Dr. Dobránszki Judit