Válasz Dr. Szegedi Ernő, 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. Szegedi Ernőnek, az MTA doktorának, hogy az akadémiai doktori értekezésem bírálatát vállalta. Köszönöm pozitív értékelését, a felvetéseit, és kérdéseit. Opponensem által megfogalmazott észrevételekre és a feltett kérdésekre az alábbiakban, sorrendben reagálok. Amely felvetésekkel teljesen egyetértek, azokra nem térek ki külön, azokat egészében elfogadom.

„Anyag és módszer, 59. oldal: A klorofill kivonáshoz és visszaoldáshoz használt metanol mennyisége nincs megadva. A metanol forráspontja 64,7°C."

A növényi mintát (500 mg) porcelán mozsárban kevés MgO és üvegpor vagy alt. kvarchomok segítségével, pár csepp metanollal homogenizáljuk, majd 20 cm^3–es jelölt kémcsőbe töltjük és jelig felöntjük metanollal. A lombikot a vízfürdőn első forrásig (74 °C) hevítjük. A melegítés segíti az oldódást és inaktiválja a klorofillázt. A tiszta metanol forráspontja valóban 64,7 °C, a módszer szerint elkészített preparátum esetén a forrás kb. a módszernél leírt 74 °C-on következik be.

„80.-82. oldal, 5.1.2.3. fejezet: A genetikai stabilitás vizsgálata hiányzik az Anyag és módszerből (DNS kivonás módszere, indítószekvenciák nukleotid sorrendje/illetve referencia, PCR körülmények, értékelés)."

Köszönöm az opponensem felvetését, valóban nem közöltem a részletes módszertant az SSR vizsgálatokra, melynek indoka a következő. A dolgozatban bemutatott módszereknél, ahogy az a célkitűzésekben is szerepel, célom volt, hogy előzetesen felmérjük a tTCL explantátumokon regenerálódott hajtások genetikai stabilitását. Mivel járulékos hajtások genetikai stabilitása a későbbi vizsgálatoknál és a módszerek alkalmazhatóságánál egy fontos szempont, ezért nem szerettem volna kihagyni a vizsgálatok eredményének a bemutatását a dolgozatból. Ugyanakkor, mivel a konkrét molekuláris vizsgálatokat Prof. Dr. Kiss Erzsébet és munkatársai végezték el a Szent István Egyetem Genetika és Biotechnológiai Intézetében, a munka ezen részét nem szerettem volna saját munkaként láttatni.

„Ismert-e, hogy hazánkban jelenleg mekkora területen és hány fajtából van in vitro eredetű almaültetvény?"

A szaporítóanyag előállítás egyik fontos kritériuma a vírusmentesség. Az alma vírusmentesítése során ma már különböző *in vitro* és *in vivo* módszereket kombinálnak (pl.

termoterápia, kemoterápia, *in vitro* merisztématenyésztés) (Hansen és Lane, 1985; James és mtsai., 1997; James, 2001; Paprstein és mtsai., 2008; James 2010; Hu és mtsai,. 2015). A vírusmentesített törzsanyagokat *in vitro* körülmények között fenntartva és szaporítva a mikroszaporítással előállított gyökeres hajtásokat akklimatizációt követően izolált körülmények között kell továbbnevelni, (üvegházi) dugványozással. Mire almaültetvény telepítésére kerül sor, addig a törzsanyagokból faiskolai szaporítóanyag-, és oltványnevelés történik, melyek több évig tartanak. Noha az *in vitro* szaporítóanyagot nem közvetlen használjuk ültetvény telepítésére, az újonnan telepített, vírusmentesített szaporítóanyag ma már alapvetően *in vitro* eredetű.

„Mivel magyarázható a sötét előkezelés jelentősége a járulékos hajtásképzésben?"

Kísérletesen a növény fajok széles körében bizonyított, hogy a fény (fotoperiódus, hullámhossz, fényintenzitás) befolyásolja az *in vitro* járulékos hajtásregenerációt (morfogenezist általában is), de a folyamat pontos hatásmechanizmusa nem ismert. *Arabidopsis* model növényekkel végzett vizsgálatokban kimutatták (Nameth és mtsai., 2013), hogy a folyamatban fitokróm-A és CRY1 receptorok vesznek részt, valamint hogy az explantátumok fotoprotekcióját HY5 downstream transzkripciós faktor közvetítette antocianin akkumuláció révén.

Kimutatták, hogy a fény gátló hatása a járulékos hajtásregeneráció korai fázisában a poláris auxin transzporttól függött, tehát a hormonális modulációnak szerepe van a folyamatban. Ez összhangban van azokkal a korábbi vizsgálatokkal, melyek bizonyították (Halliday és Fankhauser 2003), hogy az auxin-szabályozott gén családokat is szabályozza a fitokróm-A és a fitokróm-B. Tehát nagyon valószínű a rendelkezésre álló adatok alapján, hogy a fény a fitokrómok működésén keresztül szabályozza az auxin génjeit, illetve az auxin maga is módosítani tudja néhány fény-szabályozott gén expresszióját (Gil és mtsai., 1997).

A fény gyakorolhat pozitív, vagy negatív hatást is a járulékos hajtásregenerációra, a növényfajtól (és az explantátumtól) függően. Petúnia fajok (*P. hybrida* R27 fajta, *P. axillaris*) esetén részletesen vizsgálták a fény szerepét a levélből történő hajtásregeneráció során (Reuveni és Evenor, 2007), és megállapították, hogy egy domináns lókusz szükséges a sötétben való regenerációhoz, míg két lókusz felelős a fényben való regenerációért, és a sötétben, illetve fényben való regenerációért felelős lókuszok egymással nem kapcsoltak.

Alma járulékos hajtásregenerációban hasonló vizsgálatokat nem végeztek, de más fajok és az *Arabidopsis* model növény vizsgálatainak eredményei alapján feltételezhető, hogy a két vizsgált fajta (Royal Gala, Freedom) fényre adott eltérő hajtásregenerációs válasza közötti különbség oka lehet az eltérő genetikai háttérből adódóan az eltérő szabályozás okozta különböző endogén hormonszint.

„Próbáltak-e már alma mikrodugványokat inorganikus közegben (pl. hagyományos, szénforrás nélküli táptalaj, perlit, kőzetgyapot) fotoautotróf körülmények között gyökeresíteni, illetve szaporítani?"

Szénforrás nélküli táptalaj használatára alma *in vitro* hajtások esetében nem ismert irodalmi adat. Az agart helyettesítették jó hatékonysággal cukornád bagasszal (22%-kal hosszabb gyökerek fejlődtek és a gyökerek száma 63%-kal volt nagyobb, mint agaros táptalajon) (Mohan et al., 2004).

„Alma szár, illetve nódusz korongból regenerálható-e hajtás? Ugyanis a kétszikű növényekre általánosan jellemző, hogy elsősorban a levélnyél-szár kapcsolódási pontjánál képeznek rügyet."

Alma esetén *in vitro* körülmények között levél explantátumokból regenerálható jó hatékonysággal járulékos hajtás. Korai tapasztalatok (Welander 1988) és saját vizsgálataink a szárdarabok – levéllemezhez viszonyított - alacsonyabb regenerációs képességét mutatták, csak egyes fajták pl. McIntosh Wijcik, voltak képesek hajtást regenerálni, s azt is nagyon alacsony hatékonysággal. Szórványos adatok vannak szárszeletből történő sikeres hajtásregenerációra, amint azt az értekezés 1. táblázatában bemutattam; Bommineni és mts. (2001) Gale Gala fajta *in vitro* szárszeletekből regeneráltak hajtásokat 36,8% hatékonysággal, illetve Liu és mts. (1998) etiolált hajtások szár internóduszait használták regenerációra 17-97%-os hatékonysággal. Guan és Klerk (2000) 1 mm-es hajtásszegmentumokból sikeresen regenerált gyökereket.

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. szeptember 11.

Tisztelettel:

Dr. Dobránszki Judit