

Vélemény **Dobránszki Judit** „Az explantátum és az exogén citokininek alma *in vitro* hajtásfejlődésre kifejtett hatásainak vizsgálata” c. MTA doktori értekezéséről

Általános értékelés

A dolgozatban leírt munka fő célja, hogy feltárják azokat a fontosabb tényezőket, amelyek jelentősen befolyásolják az alma *in vitro* szaporítását és hajtásregenerációját. Ezek ismeretével az alma mikroszaporítása mind mennyiségi, mind minőségi szempontból javítható. A téma és a cél gyakorlati jelentősége vitathatatlan. Az alma világszerte, beleértve hazánkat is az egyik legfontosabb gyümölcs. Termesztésével szaporításával kapcsolatos mindenfajta eredmény rövid vagy hosszú távon gazdasági jelentőséggel bírhat. Napjainkban a mikroszaporítás a kertészeti szaporítási technikák részévé váltak, így jelen munka jelentősen hozzájárulhat e rendkívül értékes gyümölcs termesztéséhez.

A kérdés vizsgálatával kapcsolatban jelen dolgozat két fő kérdéskör köré csoportosul. Vizsgálták egyrészt az explantátum szerepét a hajtásregeneráció hatékonyságában egy jól regenerálódó (Royal Gala) és egy nehezen regeneráló (Freedom) fajtánál. Ehhez kapcsolódóan arra kerestek választ, hogy

- Almánál lehetséges-e levél tTCL (transverse thin cell layer) explantátumokon hajtásregenerációt indukálni?

- Hogyan befolyásolja a hajtásregenerációs folyamatot a tTCL explantátumokon a genotípus, az explantátumot szolgáltató levél eredeti pozíciója az *in vitro* hajtáson, a megvilágítás, a regenerációs periódus hossza, és a táptalaj citokinintartalma?

- Vizsgálták a tTCL explantátumokon regenerálódott hajtások gyökeresedési képességét és genetikai stabilitását.

- Vizsgálták az explantátum mérete és hajtásregenerációs képessége közötti kapcsolatot, annak matematikai modellezési lehetőségeit.

A másik kérdéskör az axilláris hajtáskultúrában fejlődő hajtások minőségi jellemzésére irányult a 'Royal Gala' fajta esetében. Ehhez kapcsolódóan vizsgálták különböző típusú citokininek hatását a hajtások klorofilltartalmára, valamint egyes klorofill-a fluoreszcencia indukciós paraméterek alakulására.

Részletes elemzés

Formai szempontok

A dolgozat fő része 129 oldalas, mellékletekkel együtt 133. Összeállítása gondos munkára vall. Stílusa jól követhető, elírás vagy helyesírási hiba ritkán fordul elő. Felépítése hagyományos jellegű, nyolc fő, és logikusan tagolt alfejezetekre oszlik. (Fő fejezetek: Bevezetés, Irodalmi áttekintés, Célkitűzés, Anyag és módszer, Eredmények és megvitatásuk, Kiemelt új tudományos eredmények, Felhasznált irodalom, Köszönetnyilvánítás)

Tartalmi értékelés

A **Bevezetés**ben ismerteti a téma jelentőségét, és a bemutatott munka várható hasznát. Az Irodalmi áttekintés célirányos, „sallangoktól” mentes. Örömmel fedeztem fel ebben a részben is a szerző saját munkáját is (pl. Dobránszki és Teixeira da Silva, 2010). Bemutatja a dolgozat megértéséhez szükséges legfontosabb elméleti háttérrel és a legfontosabb kapcsolódó tudományos eredményeket. Itt ismerteti az alma *in vitro* szaporításának problémakörét, ezt leszűkíti az explantátummal kapcsolatos kérdésekre, valamint bemutatja a vizsgált hormon, a citokininek hatásait.

A **Célkitűzés** részletes, lefedi a dolgozatban bemutatott munkát. Talán egy kicsit túlzottan is részletes. Ehhez kapcsolódó kérdésem, hogy **miért feltételezték, hogy ha konvencionális típusú explantátum esetében működik a hajtásregereáció, akkor tTCL explantátumon nem fog?**

Az **Anyag és módszer** fejezet leírása precíz, az itt felsorolt fegyvertár segítségével a kísérletek megismételhetők. Hiányosságot a fluoreszcencia indukció mérésének leírásában találtam: nem ismerteti sem a fényadaptált állapot eléréséhez használt fény foton fluxus sűrűségét, sem az aktinikus megvilágítás hosszát. Mindezek pedig alapvetően befolyásolják a PS2 kvantumhatásfokának és az ETR paraméternek a meghatározását. A műszerhez megadott „Yield protokoll” önmagában nem informatív, különösen azon olvasók számára, akik más készülékkel vagy mérőprogrammal dolgoznak.

Az **Eredmények és megvitatásuk** fejezetben az eredmények bemutatása alapvetően áttekinthető, igényes kivitelezésű. Szerencsés lett volna azonban megadni az egyes táblázatoknál az értékek szórását, valamint azt, hogy hány ismétlés átlagát látjuk. Ezt a

hiányosságot részben kompenzálja, hogy a statisztikai elemzést minden kísérletnél precízen elvégezték és eredményét dokumentálták.

Ebben a fejezetben elsőként kétféle típusú levélexplantátumot hasonlít össze (a kontrollként használt konvencionális, valamint a tTCL típusút), ill. vizsgálja egyes meghatározó tényezők (fény, citokinin, az explantátum kora, stb.) hajtásregenerációra kifejtett hatásait (5.1.2.1-5.1.2.2. fejezetek). Ebben a részben megállapítja, hogy

- a regeneráció kezdeti szakaszában alkalmazott fény – genotípustól függő mértékben – befolyásolja a tTCL explantátumok regenerációját,
- a fiatalabb levelekből készített tTCL explantátumok hajtásregenerációs képessége nagyobb volt,
- a regenerációs periódus hossza mind a konvencionális, mind a tTCL explantátumok regenerációs kapacitását – mind a hajtásregenerációs százalékot, mind az explantátumonkénti átlagos hajtásszámot – befolyásolja,
- Optimalizálták a táptalaj thidiazuron (TDZ) koncentrációját a tTCL explantátumok igényeihez mindkét vizsgált almafajta esetében.

Számomra ezek a részek, bár gyakorlati fontosságuk vitathatatlanok, kissé leírónak tűnnek. Véleményem szerint előre várható volt, hogy a vizsgált paraméterek hatással lesznek a regenerációra. Szívesen láttam volna választ olyan kérdésekre, hogy ha ismert az, hogy az explantátum genotípusa meghatározza a regeneráció sikerét, akkor valójában **milyen genotípushoz köthető faktorok játszanak ebben szerepet (génnek, vegyületek, stb.)?** Vannak-e ezzel kapcsolatos ismeretek? Ehhez kapcsolódóan kérdezem továbbá, **hogy azon túl, hogy ezen két vizsgált almafajta esetében optimalizálták a paramétereket, milyen általános megállapítások vonhatók le annak érdekében, hogy újabb genotípus bevetése esetén ne kelljen az egész kísérleti rendszert újra végigcsinálni, hanem már egyszerűbben megoldható legyen ezen paraméterek optimalizálása? Mi a helyzet pl. az endogén hormonszinttel?**

Mindezekhez kapcsolódóan megállapítja, hogy a nehezen regenerálódó fajta (Freedom) esetében a fény teljesen gátolta a hajtásképződést (65. o. 8. sor). **Kérdésem, hogy egyrészt milyen mechanizmus útján teszi ezt? Illetve elképzelhető-e, hogy a kétféle fajta közti regenerációs képességben tapasztalt különbség alapvető oka a fénnel kapcsolatos jelátviteli utak működésében keresendő?**

A következő lépésben a regenerálódott járulékos hajtások genetikai stabilitását vizsgálja. Megállapítják, hogy sem az explantátum típusa, kora, sem az alkalmazott citokininkezelések nem okoztak genetikai változást. Ez látszólag ellentmond pl. Li és mtsai (2002) eredményeinek. Kérdésem, hogy **mivel magyarázható az eltérő következtetés? Nem lehet-e az az ok, hogy más szerzők a metilációs mintázatban mutattak ki eltérést (aminek változása egyáltalán nem meglepő egy ilyen rendszerben), míg a jelen munkában bemutatott rendszer ilyen különbség kimutatására esetleg nem alkalmas?**

Véleményem szerint a dolgozat legizgalmasabb része a következő, 5.1.3. alfejezet, ahol bevezeti a Növényi Növekedési Korrekciós Faktor és a Geometriai Faktor fogalmakat, ill. matematikailag jellemzi ezeket. Segítségével egy adott explantátum regenerációs kapacitása összehasonlíthatóbbá válik egy másik kísérletből származó explantátum regenerációs kapacitásával különböző növényfajok esetében is. Kapcsolódó kérdés: a 86. oldalon az $R\%_{\text{conv}}/nR\%_{\text{TCL}}$ hányadossal jellemzi a kapcsolatot a konvencionális és a TCL explantátumok regenerációs százaléka között, ahol n a konvencionális explantátumból elméletileg preparálható TCL preparátumok száma. Kérdezem, hogy **n megadásakor mennyire kell figyelembe venni a „szélhatást”, vagyis hogy a konvencionális felület közepe nem sérült, a széle viszont igen?** Bár a 90. oldalon leírtak szerint a vágási felület nagysága nem befolyásolta a regenerációs képességet, az meglepő lenne, ha a TCL esetében, ahol a sebzett sejtek aránya összemérhető a sebzetlenekével, ez nem számítana.

A dolgozatban bemutatott munka utolsó fázisában különböző citokininek hatásait vizsgálja 'Royal Gala' almafajta axilláris *in vitro* hajtásainak egyes fotoszintetikus paramétereire. Ez a fejezet elsősorban gyakorlati vonatkozása miatt érdekes, mert felhívja a figyelmet arra, hogy a nem megfelelően megválasztott citokininféleség és/vagy -koncentráció a fotoszintetikus apparátus működésének zavarához, ezen keresztül a szaporítás sikerének csökkentéséhez vezethet. Ebben a részben számomra néhány technikai jellegű furcsaság található. Nem tudom pl., hogy **miért kellett az Fv/Fm értékeit bemutató ábrán a skálát 1000-rel szorozva bemutatni? Mennyivel mond többet az Fv/Fo paraméter az Fv/Fm-nél?** (Ezek egymásból származtatott paraméterek, tehát ez a két hányados várhatóan hasonlóan fog viselkedni). **A 103. oldalon a fényadaptált állapotban mért kvantumhatásfok értékeinek bemutatása mellett (16. ábra) az elektrontranszport rátáját is bemutatja (ETR). Miért kellett mindkettő?** Az utóbbi paraméter akkor mutat eltérést a kvantumhatásfoktól, ha eltérő fényintenzitás mellett történt a mérés, de jelen esetben

feltehetően nem ez az eset áll fenn (bár az aktinikus fény nincs megadva). Előfordulhat továbbá, hogy az ETR számításához használt képletben az abszorpciós koefficiens a különböző mintákban eltér. Erre azonban a dolgozatban nincs utalás.

Mindezekről függetlenül kérdezem, hogy mi okozhatta az Fv/Fm ill. a kvantumhatásfok (vagy ETR) paraméterekben kapott csökkenéseket?

Az Új tudományos eredmények részben összesen 14 pontot sorol fel. Ezek az eredmények valamennyien igazolva lettek a dolgozatban bemutatott kísérletekkel, így elvileg elfogadhatóak új eredményként. Azonban megjegyzem, hogy érdemes lett volna ezeket az eredményeket súlyozni, és a munka során elért részsikereket egy akadémiai doktori értekezésben nem feltétlenül új tudományos eredményként kiemelni. Például az 2-5-ig bemutatott eredmények vizsgált 2 fajtára koncentrálnak, és erősen leíró jellegűek, így ezeket egységesen kezelve azt mondanám, hogy „Két almafajta, a Royal Gala és a Freedom esetében az explantátum típusára, a levél pozíciójára, a regenerációs periódus hosszára, az alkalmazott megvilágításra és TDZ koncentrációra vonatkozóan optimalizálták az in vitro szaporítás egyes körülményeit.” Hasonlóképpen, a 12-14 eredményeket is szerencsésebb lett volna összevonni, és a részeredményekből egy általánosabb következtetést levonni. Véleményem szerint mindez egyáltalán nem csökkentette volna a dolgozat tudományos értékét.

Összefoglalóan megállapítható, hogy a disszertációban bemutatott munka értékes, a téma művelői számára hasznos információkat hordoznak. A dolgozattól nekem kitűnik, hogy készítője régóta jártas a növényi szövettenyésztés módszertanában, ill. gyakorlati alkalmazhatóságában. A bemutatott eredmények véleményem szerint a szerző saját eredményeinek tekinthetők, amelyek a megfogalmazott kritikai megjegyzések, kiegészítő kérdések ellenére meghatározó mennyiségű és színvonalú kutatási teljesítményt jeleznek. A dolgozatban bemutatott tudományos eredményeket elegendőnek tartom az MTA doktori cím megszerzéséhez, és a nyilvános vita kitűzését, sikeres védelem esetén az MTA doktora cím odaítélését javaslom.

Martonvásár, 2015. július 27.

Janda Tibor, az MTA doktora