Vélemény *Molnár István*

Az idegenfajú génátvitelt segítő strukturális genomikai kutatások *Aegilops* fajokban

c. akadémiai doktori értekezéséről és a tézisekről

1. A jelölt teljesítményének általános bírálata

Molnár István a PhD fokozat megszerzése után 12 évre nyújtotta be akadémiai doktori értekezését. Az MTA doktora címre benyújtott értekezést kb. húsz éves kutató munka után készítette el. Az értekezésben összefoglalt tudományos eredmények jelentős kutatási és szakirodalmi munkásságon alapszanak. A tézisekből megállapítható, hogy a Doktori Értekezés tartalmi része 12 referált folyóiratban megjelent publikáción alapszik. Ezekben a publikációkban Molnár hat esetben első szerzős és ugyancsak hat esetben levelező szerzőként szerepel. Az első és levelező szerzős cikkek között átfedés is van, de összegezve megállapítható, a tizenkét értekezés alapjául szolgáló cikk közül nyolc dolgozatban szerepel meghatározó helyen a szerzők között (első-, levelező szerzőként vagy együtt mindkettő). Összes tudományos folyóiratban megjelent cikkére eső független hivatkozások száma közelíti az ezret. Hirsch indexe 23 és az életműre eső kumulatív impaktfaktora, az értekezés beadásának idején 149,6 volt. Azóta eltelt időben ez az érték már meghaladta a kettőszázat.

A társszerzőkkel megírt cikkeiket a genetika legkiválóbb szaklapjaiban jelentették meg, úgymint a Theoretical and Applied Genetics, Genome, Frontiers in Plant Science, PloS One lapokban, hogy csak a legkiválóbbakat említsem, amelyek kellően fémjelzik Molnár István tudományos pályáját.

Teljesítményét általánosan jellemző adatok között fontos kiemelni, hogy az értekezés szempontjából fontos 12 dolgozaton kívül, még huszonhét szintén nívós folyóirat cikket jegyez Molnár István, társszerző kollégáival együtt (a beadás időpontjában). A tudománymetriai mutatók alátámasztják, hogy helyénvaló Molnár István MTA doktora címre benyújtott pályázatával foglalkozni és a nyilvános vitát lefolytatni.

A jelölt aktívan részt vesz a hazai és nemzetközi tudományos közéletben, nevét és személyét egyaránt jól ismerik bel- és külföldön. Pályázati aktivitása is jelentős, több OTKA pályázat és két Bólyai ösztöndíj nyertese volt, melyeket kiváló eredménnyel fejezett be. Többek között a Bólyai plakett nyertese is volt (CV-jében nem találtam meg), ami magas szintű tudományos kiválóságot jelent.

Az általános értékelés végén megállapítható, – a tudományos publikációk áttekintése után – hogy Molnár István értekezése hiteles adatokat tartalmaz.

2. Az értekezés részletes bírálata

2.1. Megjegyzések

Az értekezéssel kapcsolatban – a részletes bírálat elején - meg kell jegyezni, hogy ilyen jól fogalmazó, nyelvtanilag szinte hibamentes munkát ritkán tart az ember a kezében. Kritikus szemmel található néhány kisebb hiba - pl. egy- és többes szám helytelen használata (54. old. 2 bekezdésben: voltak megfigyelhetők a helyes) - de rendkívül kevés helyen.
Dicsérően meg kell említeni, hogy az érkezést minőségi papírra nyomtatták. Ebből adódóan az ábrák tökéletes minőségűek. A tökéletes szemléltetésre való törekvés, nagyon dekoratív értekezést eredményezett. Jól eső dolog, ilyen gondos, sok munkát tartalmazó értekezést bírálni.

Szeretném kiemelni azt a szerzői szerkesztési kvalitást is, ami az egyes fejezetek megírásánál található. Aki közvetlenül nem az értekezés tématerületén dolgozik, annak nehézséget okozhat az eredmények követése, olykor megértése. Talán ez miatt, Molnár István a fejezetek elején néhány mondatban – népszerűsítő stílusban – bevezeti a fejezet lényegét, majd a végén röviden összegzi az eredményeket. Ezzel az írásmóddal Molnár István nagyon közel tudta hozni az olvasóhoz az elért eredményeket.

Hagy tegyek mégis néhány kritikai megjegyzés. Előfordul a szövegben, a „céljából" szó bántó használata, így olvassuk pl. a 47. oldalon: "genomikai alkalmazások elősegítése céljából vizsgáltuk". Sokkal szebb így írni": "genomikai alkalmazások elősegítésére megvizsgáltuk" vagy "genomikai alkalmazások elősegítése érdekében vizsgáltuk". Nem elegáns megoldás, amikor a szövegben zárójeles szöveg után egy újabb zárójeles megjegyzés következi, pl. ábrára utalás történik egy zárójeles megjegyzés. Ez gyakran előfordul az értekezésben. Úgy kell a szöveget szerkeszteni, hogy közvetlenül egymásután, ne forduljon elő két zárójeles szövegrész vagy idézés (pl. 10 old. utolsó bekezdésében kétszer is előfordul, 32 oldalon Friebe és mtsai két cikkének idézésekor is, stb.).

A dolgozat bírálata közben terminológiai problémám is adódott. Az előállított genetikai alapanyagok kapcsán, a „vonal" kifejezést használja, pl. „diszómás és diteloszómás addíciós vonal" stb. Ez automatikusan fordítódik az angol szaknyelvből (talán). A magyar genetikai, nemesítési szóhasználatban azonban a vonal kifejezést a hibrid vetőmag rendszereknél használjuk, úgyis mondhatjuk a „vonal" kifejezés ott használatos, már foglalt fogalom, ott genetikai szempontból tiszta vonalakat nevezünk meg a szóval. Magyar nyelvben helyesebb a törzs kifejezést használni, az önbeporzó növények genetikai forrásainak megkülönböztetésére.

2.2. A téma érdemei, újdonsága

A hagyományos nemesítési módszerek – melyek főleg ivaros keresztezési eljárásokon alapulnak - természetes módon kombinálják a genetikai alapanyagokat. Mára azonban, a genetikai variáció ilyen módon történő növelése kimerülőben látszik. Az újabb genetikai előnyök kihasználására az utóbbi évtizedekben új megközelítésekkel gazdagodott a genetika-, molekuláris genetika eszköztára. A genetikai transzformáció, a génenomszerkesztés elsősorban mikro szinten (pontmutáció, fontos gének-, szabályzó elemek átvitele) igyekszik megoldást adni a tudatos genetikai előnyök kihasználásra. Ezzel szemben Molnár István értekezése a makro, azaz a kromoszóma szintű átvitelt, markerekkel történő tudatos követés módszertani megközelítését kutatja, próbálja tökéletesíteni. Ezen a területen talán kevesebben dolgoznak a világban, mint az elsőnek említett területen. Ezért örömteli, - újdonság értékét pedig jelentősen növeli - hogy az említett a kutatásnak Martonvásáron van egy több évtizede sikeresen kutató laboratórium. A bírált téma újdonság értéke vitathatatlan. Mivel Növénynemesítési Bizottsághoz tartozik Molnár István értekezése, meg kell említenem, hogy kutatott témájának nemesítési profitja, nagyon lassan bontakozik ki. Arra gondolok, hogy a nemesítésben, különösen a biotikus- és abiotikus stresszekkel szembeni nemesítési programokban, a nemesítők nagyon várják az új keresztezéssel bejuttatott, tudatosan kereshető (markerek), így nemesítésben közvetlenül felhasználható alapanyagokat. Ha figyelembe vesszük azt, hogy az idegenfajú génátvitel témában Molnár István neves elődök (Sutka József, Lángné Molnár Márta) kutatását folytatja, akkor annak is örülhetünk, hogy egy-egy kiemelkedő kutató után, nem a téma megszüntetése, hanem a tudományos értékek további folytatása történik Martonvásáron. Ezt a tudományos elkötelezettséget sokra értékelem.

2.3. Az értekezés fejezeteinek áttekintése és bírálata

Az **irodalmi áttekintés** alig több mint 20 oldal, de tömör, nagyon jó stílusban tárgyalja az irodalmi vonatkozásokat. A három fő alpont, a dolgozat témájának megfelelő felosztásához igazodik. Az idézett citált irodalmakat megfelelő kritikai szemmel értékelte, abból a szempontból, ami értekezésének a lényegi része és munkájához közvetlenül kapcsolódik. Szeretném megkérdezni a 10. oldal alapján, – szakirodalmi adatokat is bevonva - hogy az ismeretlenségbe rejlő A és B genom donorját valóban reménnyel keressük-e tovább, feljönnek-e újabb eredmények, ami a jelenlegi státuszt átírja?? (Az A^u genom sem látszik identikusnak az A genommal.) Mi itt a helyzet, várható-e a közeli jövőben meggyőző áttörés az A és B genom eredetét, hollétét illetően?

A 13. oldalon említi, Dégen nyomán Vojtko eredményét a spontán nemzetség hibridizációval kapcsolatban. Ez azt is jelenheti, hogy a búza evolúciós területe egyre kiterjed és ma már az Kárpát-medence is ide sorolható? Mennyire erősíthető meg molekuláris módszerekkel ez a kb. 100 éves spontán hibridizáció, esetleg csak feltételezés? Ha nyitott szemmel járnánk, talán több ilyen eseményt is találnánk?

A tíz oldalas **anyag és módszer** fejezet jól összefoglalta a kísérletek metodikai hátterét. Ez a fejezet azért fért bele 10 oldalba, mert a módszertani lépések (jelentős mennyiségű) a citált irodalmi hivatkozásokban találhatók meg teljes részletességgel. Ez így természeten elfogadható, hiszen a saját és irodalmi hivatkozásokban a módszertani leírások pontosan megtalálhatók, nemzetközileg ismertek. Felvetődik két egyszerű kérdés, a kromoszómák kinyerésével kapcsolatban. A kiindulás alapanyag az áramlási citometriás kromoszóma vizsgálatokhoz gyökércsúcs eredetű kromoszóma volt. Mindegy-e vizsgált fajon belüli a fajta, vagy törzs/vonal genetikai eredete? A fejezetben leírtakból úgy tűnik, hogy nem. A gyökércsúcs alapanyag a kromoszómák izolálásához a klasszikus citológia metodikáiból adódnak, de kromoszómákat *in vitro* sejt szuszpenzióból könnyebben lehetne izolálni. Van erre vonatkozóan saját vagy irodalmi adat?

Az értekezés lényegi részét az **eredmények és megvitatásuk** fejezet adja. Méretében túlhaladta a 65 oldalt, ami a két összevont fejezet és a három egymásra épülő téma esetében természetesen az értekezés legfontosabb érdemi része. Az eredmények rész tudományos tartalmát nem kívánom tudományos kritika alá vonni, hiszen az itt közölt eredmények a megjelent publikációkban, nemzetközi szakemberek által bírált és jóváhagyott dolgozatokban jelentek meg, tehát a legjobb nemzetközi szakértők adták hozzá nevüket. Elfogadom azt a szerkesztési módosítást, hogy az eredmények fejezetet összevonta a megvitatás fejezettel, bár én szívesebben látom az eredmények és megvitatás fejezeteket külön-külön.

Az egy paraméteres flow sorting-gal kapcsolatban merül fel a kérdés, hogy a kromoszómák méretével arányos DAPI fluoreszcencia intenzitást befolyásolja-e az izolálás során alkalmazott kromoszómák rövidítésére adott kezelés? Ennél a pontnál a vizsgálat ismételhetősége érdekel valójában. Ha ugyanazt a genotípust valaki más vizsgálja, egy másik kísérletben (laboratóriumban), a módszert adaptálva, ugyanazt a hisztogramot kapja-e?

A 47. oldalon - felülről a 8 sorban - a fajkeresztezések helyet, a faj- és nemzetség keresztezések lenne a helyes kifejezés.

A 62 oldal utolsó sorában a tetraploid fajok kromoszóma méretbeli eltérésével kapcsolatban ez olvasható: „tetraploid fajok kromoszómáinak méretei eltérnek, ami a

kromoszómák evolúciós átalakulására utalhat". Feltételezések szerint milyen evolúciós hatás volt, ami a tetraploid fajok kromoszómáira – csak ezekre? – ilyen drasztikus hatással volt?

A 4.2.1.3. fejezetben a COS markerekkel végzett vizsgálatok kapcsán van szó az U és C genommal rendelkező *Aegilops* fajok evolúciós különválása kapcsán az M és N genommal rendelkező fajokról. Mennyire bővülhet ez a kör a további kutatások kapcsán? Vannak-e olyan rokonok/ősök, amelyek már csak archeobotanikai vizsgálatokból tárhatók fel? Azért kérdezem, mert a dolgozatban főleg ma élő nemzetségek, fajok vizsgálatáról, genomszerveződéséről esik szó.

Nemesítési szempontból az értekezés legizgalmasabb pontja a 4.3. pont, ahol a genomikával támogatott fajidegen génátvitelben elért eredményeiket tárgyalja. Ebben a fejezetben közelít az alapkutatás a felhasználás felé és jó remény van arra, hogy innovációs lépéssel(sekkel) korona kerüljön az értekezésben összefoglalt kutatásokra. A világon először sikerült előállítaniuk hexaploid diszómás addíciós és szubsztitúciós törzseket, haxaploid búza és *Aegilops biuncuális* keresztezést felhasználva. Az eredményeik kapcsán a búza 4-es és 5-ös homeológ csoportjának kromoszómáin több jelentős QTL-régiót térképeztek. Ezeken a kromoszómákon térképezett QTL régiók meghatározó szerepet játszhatnak a termésmennyiség kialakításában. Mások eredményével szinkronban a kalászonkénti szemszám QTL régióiból is több, ezeken a kromoszómákon található. Ebben a régióban a kromoszóma kicserélések még a növénymagasság csökkenését is eredményezhetik. Az említettek mind olyan nemesítési területek, amelyek új genetikai forrást és új lehetőségeket adnak a nemesítés számára (még folytathatnánk a sort).

A molekuláris markerek fejlesztése és alkalmazása a búza-*Aegilops* introgressziós törzsek szelekciójában már az alkalmazás stádiumába jutott. Az értekezésben ez a terület az, amely legközelebb van az alkalmazáshoz. A markerkapcsolt szelekciós munka már előnemesítési programban folyik. A kutatás még kezdeti szakaszban van, de a felvázolt szelekciós rendszer fejlesztése (négy markeres rendszer) gyors és hatékony lehetőségeket jelez. Ehhez specifikus markerfejlesztésre lesz szükség. Ha a kísérletek olyan mértékben haladnak előre, mint azt az értekezésben láthattuk, a továbblépés eredményei sem váratnak sokáig magukra.

2.3. Új tudományos eredmények

Ez a fontos fejezet, „összefoglalás és új tudományos eredmények" címszó alatt található az értekezésben (5. pont, 110-114 oldalon), megtakarítva ezzel az összefoglalás fejezetet. Ebben a pontban, az új tudományos eredmények négy oldalon, 12 pontban kerültek

összefoglalásra. A tézis füzetben a tizenkét pontnak már rövidebb változata található, de még ebben a formában is túlzottan bőségesnek találtam az új tudományos eredményeket. Megítélésem szerint, túl sok szakmai részletet tartalmaznak a pontok, amelyek tudományos szempontból nagyon fontosak, de ebben a pontban a genetikai finomítások, pontosítások, a genotípusok megadása elhagyható. Az értekezésben felsorolt pontokat, új eredményként elfogadom, de alább hat pontban, lényegesen rövidebben foglaltam össze az új tudományos eredményeket. Javaslom, a jelöltnek, hogy a nyilvános védésen az értekezésben írtaknál, lényegesen szűkebben foglalja össze új tudományos eredményeit. A tudományos eredmények megfogalmazásában tettem egy lényeges változtatást, többes szám első személyben fogalmaztam, ami nem csökkenti a jelölt meghatározó szerepét az új tudományos eredmények tekintetében. Publikációi is mind többszerzősek, a jelölt meghatározó szerepét jól mutatják az első- és levelező szerzős pozíciók. A fogalmazásban a többes szám első személy még abban az esetbe is megengedhető, hogy itt most az egyént, Molnár Istvánt értékeljük és minősítjük.

Elfogadásra javasolt új tudományos eredmények:
(A szűkebben értelmezhető tudományos eredményeket aláhúzással emeltem ki.)

1. Egyparaméteres áramlási citometria alkalmazásával - intakt mitótikus kromoszómákon - meghatározták az U, M és C genommal rendelkező *Aegilops* fajok, valamint a kenyérbúza diploid őseinek áramlási kariotípusát. Kimutatták, hogy méret alapján nagy tisztaságban izolálható az *Ae. umbellulata* 1U, 3U és 6U, az *Ae. biuncialis* 1U, a hexaploid búza genomdonor fajainak 5-ös homeológ csoporthoz tartozó kromoszómái és az *Ae. markgrafii* 4C és 5C, illetve az *Ae. cylindrica* $1C^c$ és $5D^c$ kromoszómái.

2. Kétparaméteres áramlási citometria segítségével diploid *Aegilops* fajokból nagy tisztaságban izolálták az U, M, C, S genomok összes egyedi kromoszómáját, és az S^{sh} genom kromoszómáinak többségét.

3. Kimutatták, hogy az M genom és (a hexaploid búza B genomjának feltételezett őseként) az *Ae. speltoides* kromoszómái mutatták a legnagyobb homeológiát a búzakromoszómákkal. Ugyanakkor megállapították, hogy az U genomban és az *Ae. markgrafii* C genomjában több átrendeződés történt a búzához képest.

4. Elsőként állították elő az allotetraploid *Ae. biuncialis* nagy felbontású genetikai térképét génbanki tételek keresztezésével létrehozott F_2 szegregáló populáció segítségével. Kimutatták, hogy az M genom kromoszómái nagymértékben kolineárisak a megfelelő homeológ csoportba tartozó búzakromoszómákkal, míg az U genom inter- és intrakromoszómális transzlokációk és inverziók következtében jelentős mértékben átrendeződtek a búzagenomokhoz képest.

5. Az *Ae. umbellulata* és *Ae. comosa* izolált kromoszómáinak szekvenálásával elkészítették az U és M genom *de novo* vázlatos genom összeillesztéseit. Az U genom kromoszómáin azonosított 25225 gén helyzete alapján megerősítették az 1U, 2U és 3U kromoszómákkal való hasonlóságot, valamint a 4U, 5U, 6U és 7U kromoszómák szerkezeti különbségei a búza kromoszómákhoz képest. A kromoszóma szekvenciák alapján fejlesztett génalapú molekuláris

markerekből az U és M kromoszómák nyomon követésére alkalmas markerkapcsolt szelekciós rendszert hoztak létre fajidegen génátviteli programok számára.

6. A világon elsőként sikerült hexaploid búza (Mv9kr1) × *Ae. biuncialis* MvGB642 keresztezési populációban molekuláris citogenetikai (FISH és GISH) módszerekkel és molekuláris markerekkel, szelekció segítségével új 4U diszómás addíciós-, valamint 4M(4D) és 5M(5D) diszómás szubsztitúciós vonalakat állítottak elő, .

3. Nyilatkozat:

Az értekezés és a tézisek részletes áttanulmányozását követően megállapítottam, hogy az MTA doktori cím elnyerésére beadott munka **hiteles adatokat tartalmaz**. A hitelességet a megjelent nemzetközi publikációk dokumentálják, melyekre az értekezés épült. Molnár István tudományos teljesítménye a benyújtott értekezés alapján minden vonatkozásban eléri az MTA doktora címmel szemben támasztott követelményeket. **Javaslom az értekezés és a tézisek elfogadását és a mű nyilvános vitára bocsátását**. Az értekezés bírálata alapján **támogatom az MTA doktora cím odaítélését**.

4. Az értekezéssel kapcsolatban felmerült kérdések

1. Az értekezésben többször szó esik az áramlási citometriával izolált kromoszómák tisztaságról (pl. 70-80% közötti tisztaság). Mi okozza a szennyeződést, kromoszómáknak töredéke (valószínűleg nem), vagy más nem DNS eredetű szennyeződésről van szó? A szennyeződés mennyire zavarja az eredményekből levont következtetéseket?
2. Az értekezés kapcsán létrejött nemesítési alapanyagok, mikor jutnak közvetlen nemesítési programokba? Oltalommal mit lehet védeni? Az előállítás módszerét, a genetikai alapanyagot (pl. diszómás törzs), vagy csak az előállított fajtát, hasonlóan ahhoz, mint azt ma is tesszük?
3. Mi a véleménye az ivaros keresztezésen alapuló, idegen fajú genetikai eseményről, amiről szól az értekezés? A transzgénikus kutatások és alkalmazások azért kerültek korlátozás alá, mert idegenfajú DNS kerül egy nemesített fajba, igaz ott legtöbbször rokonsági körön kívüli (távoli) genetikai kapcsolatról van/volt szó. Véleménye szerint, az értekezésben végzett kutatás (idegenfajú génátvitel), természetes eseménynek számít-e?

Szeged, 2022. augusztus 1.

Pauk János
MTA doktora
egyetemi magántanár